



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
GUANILIDRAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

MACEIÓ- AL
2015

MARIANA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
GUANILIDRAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magna Suzana
Alexandre Moreira

Coorientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo
Júnior

MACEIÓ- AL
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S237a Santos, Mariana da Silva.
Avaliação do potencial leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e
tiossemicarbazônicos / Mariana da Silva Santos. – 2015.
69 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 58-67.

Anexos: f. 68-69.

1. Antileishmania. 2. Doença negligenciada.
3. Leishmaniose. I. Título.

CDU: 616.993.161:615.283

Folha de Aprovação

Mariana da Silva Santos

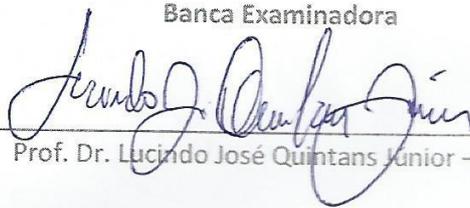
Avaliação do potencial leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e tiosemicarbazônicos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 23 de fevereiro de 2015.



Prof.^a Dr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientadora)

Banca Examinadora



Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior – (UFS)



Prof.^a Dr.^a Adriana Ximenes da Silva – (UFAL)



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade - (UFAL)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, principalmente pela minha vida e saúde, pela minha família e pela conclusão de mais uma etapa em minha vida;

A minha mãe (Maria Célia), por tudo o que fez por mim, pois graças à ela eu consegui concretizar alguns de nossos sonhos;

Ao meu marido (Ricardo), por me apoiar em todos os meus interesses e estar comigo sempre;

A Profa. Dra. Magna Suzana, tanto pela orientação desse trabalho e de todos os outros, desde a minha Iniciação Científica Júnior, quanto por todo o seu apoio e conselhos todo esse tempo;

A Profa. Dra. Eliane Campesatto pelo seu apoio e conhecimento;

Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior pelas substâncias testadas nesse trabalho; E aos seus alunos Edeildo Ferreira da Silva Júnior e Paulo Henrique Barcellos França por toda ajuda;

Aos professores Luiz Carlos Alves e Fábio André Brauner dos Santos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela colaboração;

As minhas amigas Mayara Canuto e Izadora Izidoro, pela sua amizade e companheirismo sempre;

A Aline Cavalcanti por todo seu apoio, amizade e conhecimento compartilhado, além da sua colaboração direta para a elaboração desse trabalho;

A Thays Dias por toda sua amizade, companheirismo e apoio, além de seu conhecimento compartilhado;

As leishgirls (Carolina da Matta, Morgana Vital e Amanda Evelyn) e leishboys (Anderson Leite, Luiz Antônio e Thiago Matos), por todos os experimentos e conhecimentos compartilhados e por todo companheirismo e amizade;

A todas e todos os Lafianos que de forma direta e indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho: Gabriela Muniz, Yolanda Karla, Ana Carolina, Max Viana, Walfrido, Jefferson Miguel, Gicele, Liliane, Karoline, João Kaycke, Edla, João Flávio, Layse, Ellymaira e Geraldo;

A Ana Rachel, Giani e Vanessa pela sua amizade e companheirismo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

RESUMO

SANTOS, M. S. **Avaliação do potencial leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

A leishmaniose está entre as cinco maiores doenças parasitárias mundiais e segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), afeta mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo esperados em torno de dois milhões de novos casos por ano. Apesar de ser um grave problema de saúde pública, até o momento não existe terapêutica ideal, tendo em vista que, os fármacos disponíveis apresentam sérios efeitos adversos, como é o caso dos antimoniais pentavalentes, fármacos de primeira escolha para o tratamento, que tem como um dos principais efeitos colaterais a cardiotoxicidade. Sendo assim, esse trabalho teve como principal objetivo a avaliação da atividade leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos na busca de novos protótipos de fármacos leishmanicidas que apresentassem menor toxicidade e maior eficácia do que os disponíveis no mercado farmacêutico. Para isso, foi investigado o potencial leishmanicida de vinte derivados guanilidrazônicos e três derivados tiossemicarbazônicos. Foi observado que dos vinte derivados guanilidrazônicos, apenas quatro não apresentaram citotoxicidade para os macrófagos da linhagem J774, até a máxima concentração testada (100 μ M): LQM 3, LQM 4, LQM 11 e LQM 16; e dos três derivados tiossemicarbazônicos apenas o derivado LQM 17(1) não mostrou efeito deletério para as células até a concentração de 100 μ M. Também foi visto que alguns derivados apresentaram uma potente atividade contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi* destacando-se os derivados guanilidrazônicos LQM 5, LQM 8, LQM 10, LQM 14 e LQM 17, e os três derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) que apresentaram concentração inibitória de 50% (CI₅₀) abaixo de 10 μ M e efeito máximo acima de 90%. Além disso, o derivado aminoguanidínico LQM 19 e o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) foram os únicos que apresentaram atividade contra formas amastigotas de *Leishmania chagasi*, ambos acima de 60%. Sendo o derivado LQM 17(1) selecionado para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e também para o ensaio *in vivo*, com *Mesocricetus auratus* (Golden Hamster). Foi observado que o derivado LQM 17(1) foi capaz de causar modificações no tamanho e na forma de promastigotas de *Leishmania chagasi* observadas pela (MEV). Além disso, o mesmo apresentou efeito sobre o curso da infecção no baço de *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania chagasi* (100 μ mol/kg/dia x 15 dias, i.p.), sem alterar as enzimas hepáticas (AST e ALT), e os metabólitos renais creatinina e ureia. Ou seja, o derivado LQM17(1), não causou alterações significativas nos parâmetros para avaliação de toxicidade hepática e renal. Além disso, o mesmo foi capaz de alterar o tamanho do baço de forma estatisticamente significativa, podendo ser um indicativo de substância imunoestimuladora ou de toxicidade. Dessa forma, esse trabalho demonstrou que o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) apresentou um potencial leishmanicida contra *Leishmania chagasi*, podendo vir a ser utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas.

Palavras-chave: Leishmaniose. Doença negligenciada. Antileishmania.

ABSTRACT

SANTOS, M. S. **Evaluation of leishmanicidal potencial of the guanylhydrazones and thiosemicarbazones derivatives.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

Leishmaniasis is among the world's five highest parasitic diseases and according to the World Health Organization (WHO), affects more than 12 million people around the world and is expected to be around two million new cases each year. Although a serious public health problem, to date there is no ideal treatment, considering that the available drugs have serious adverse effects, such as the pentavalent antimonials, drugs of choice for the treatment, which is one of the main side effects cardiotoxicity. Therefore, this work had as main objective the evaluation of leishmanicidal activity guanylhydrazones and thiosemicarbazones derivatives in search of new prototypes of antileishmanial drugs to submit less toxic and more effective than those available in the pharmaceutical market. For this, we investigated the leishmanicidal potential of the twenty guanylhydrazones derivatives and three thiosemicarbazones derivatives. It was observed, that derivatives of the twenty guanylhydrazones, only four showed no cytotoxicity for the J774 macrophage lineage, up to the maximum concentration tested (100 μ M): LQM 3, LQM 4, LQM 11 e LQM 16; and the three thiosemicarbazones derivatives, only thiosemicarbazone derivative LQM 17(1) did not show deleterious effect on the cells until the concentration of 100 μ M. It was also seen that some derivatives showed potent activity against *Leishmania chagasi* promastigotes highlighting guanylhydrazones derivatives LQM 5, LQM 8, LQM 10, LQM 14 e LQM 17, and the three thiosemicarbazones derivatives LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) that showed IC₅₀ below 10 μ M and maximal effect above the 90%. Moreover, the guanylhydrazone derivative LQM 19 and thiosemicarbazone derivative LQM 17(1) were the only ones showed activity against amastigotes of *Leishmania chagasi*, above 60%. Being the LQM 17(1) derivative selected for the realization of scanning electron microscopy (SEM) and also for the *in vivo* test with *Mesocricetus auratus* (*Golden Hamster*). It was observed that the LQM 17(1) derivative showed effect on the course of infection in spleen of *Mesocricetus auratus* infected with *Leishmania chagasi* (100 μ mol/kg/dia/15 dias (i.p.)) without altering liver enzymes (AST and ALT), and creatinine and urea, renal metabolites, the derivative did not cause significant changes in the parameters for evaluation of liver and kidney toxicity. Still being seen, that it was able to alter the spleen size statistically significant way, which could be indicative of immunostimulatory substance or toxicity. Thus this study demonstrated that thiosemicarbazone derivative LQM 17(1) showed a leishmanicidal potential against *Leishmania chagasi*, and could be used as a prototype for the development of new antileishmanial drugs.

Keywords: Leishmaniasis. Neglected disease. Antileishmanial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Individuo portador de Leishmaniose visceral, apresentando hepatoesplenomegalia.....	17
Figura 2 -	Manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar.....	18
Figura 3 -	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	18
Figura 4 -	Formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	19
Figura 5 -	Formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	19
Figura 6 -	Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	21
Figura 7 -	Receptores para internalização de <i>Leishmania</i> em fagócitos.....	22
Figura 8 -	Resposta imune a <i>Leishmania spp.</i>	25
Figura 9 -	Distribuição da Leishmaniose Tegumentar, no ano de 2012.....	26
Figura 10 -	Distribuição da Leishmaniose Visceral, no ano de 2012.....	26
Figura 11 -	Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes.....	28
Figura 12 -	Estrutura química da Pentamidina.....	29
Figura 13 -	Estrutura química da Anfotericina B.....	30
Figura 14 -	Estrutura química da Miltefosina.....	30
Figura 15 -	Estrutura química da paramomicina.....	31
Figura 16 -	Micrografia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>L. chagasi</i>	51
Figura 17 -	Efeito do derivado LQM 17(1) sobre a inibição de topoisomerase recombinante em eletroforese de gel de agarose.....	52
Figura 18 -	Efeito <i>in vivo</i> do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a carga parasitária do baço de <i>Golden hamsters</i> infectados com <i>L. chagasi</i>	53
Figura 19 -	Efeito do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre o peso do baço de <i>Golden hamsters</i> infectados com <i>L. chagasi</i> ...	54
Figura 20 -	Efeito <i>in vivo</i> do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a atividade das enzimas hepáticas ALT e AST em <i>Golden hamsters</i> infectados com <i>L. chagasi</i>	55
Figura 21 -	Efeito <i>in vivo</i> do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a atividade de creatinina e ureia em <i>Golden hamsters</i> infectados com <i>L. chagasi</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito dos derivados sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT após 48 horas.....	43
Tabela 2 -	Efeito dos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> após 48 horas de tratamento.....	46
Tabela 3 -	Efeito dos derivados aminoguanídínicos e tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade de amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> após 48 horas de tratamento.....	48

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Planejamento da síntese das guanilidrazonas e tiossemicarbazonas.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanino aminotransferase
ANOVA – Análise de variância
AST – Aspartato aminotransferase
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
CDC – Centro de Controle de doenças
CI₅₀ – Concentração Inibitória de 50%
CL₅₀ – Concentração Letal 50%
CO₂ – Dióxido de carbono
CR1 – Receptor de Complemento 1
CR3 – Receptor de complemento 3
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EM – Efeito Máximo
FcγRs – Receptores para porção Fc das imunoglobulinas
FnRs – Receptores de Fibronectina
gp 63 – Glicoproteína 63
IgG – Imunoglobulina G
IL-2 – Interleucina-2
IL-4 – Interleucina-4
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-13 – Interleucina-13
INF-γ – Interferon-γ
iNOS – Óxido Nítrico Sintase
kg – Quilograma
L – Litro
LdTOPO – Topoisomerase recombinante
LPG – Lipofoglicano
LQM – Laboratório de Química Medicinal
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – Miligrama

mM – Milimolar

MR – Receptor de Manose

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NA – Não Ativo

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADH – Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzido

nm – Nanometros

NO – Óxido Nítrico

NT – Não Tóxico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OsO₄ – Tetróxido de Ósmio

PBS – Tampão fosfato-salino

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – Rotações por minuto

Sb(III) – Antimônio trivalente

Sb(V) – Antimônio pentavalente

SFB – Soro Fetal Bovino

Th – Linfócitos T helper

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

μ M – Micromolar

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Leishmaniose.....	16
2.2 Imunologia.....	21
2.3 Epidemiologia da Leishmaniose.....	25
2.4 Controle e Tratamento da Leishmaniose.....	27
2.4.1 Guanilidrazonas e Tiossemicarbazonas	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Planejamento dos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos.....	35
4.2 Preparação dos derivados aminoguanidícos e tiossemicarbazônicos	36
4.3 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i>.....	36
4.3.1 Cultura de parasitos.....	36
4.3.2 Manutenção de macrófagos.....	36
4.3.3 Determinação da viabilidade celular.....	36
4.3.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas.....	37
4.3.5 Ensaio de infecção de macrófagos com <i>Leishmania chagasi</i>	37
4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
4.3.7 Inibição de topoisomerase.....	38
4.4 Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i>.....	39
4.4.1 Ética dos experimentos.....	39
4.4.2 Ensaio de infecção visceral de Golden hamsters com <i>L. chagasi</i>	39
4.4.3 Pesagem do baço.....	39
4.4.4 Diluições limitantes.....	39
4.4.5 Dosagem da enzima ALT.....	40
4.4.6 Dosagem da enzima AST.....	40
4.4.7 Dosagem de Creatinina.....	40

4.4.8 Dosagem de Ureia.....	41
4.5 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Ensaio de viabilidade celular	42
5.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas.....	44
5.3 Ensaio de infecção de macrófagos com <i>Leishmania chagasi</i>	47
5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
5.5 Inibição de Topoisomerase.....	52
5.6 Avaliação do efeito do derivado LQM 17(1) no tratamento de <i>Golden hamsters (Mesocricetus auratus)</i> infectados com <i>L. chagasi</i>	52
CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por um protozoário flagelado pertencente ao gênero *Leishmania*, podendo apresentar manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas (leishmaniose tegumentar), até formas viscerais (leishmaniose visceral). Sendo estas as mais preocupantes uma vez que podem ser letais, pois afetam órgãos como baço, fígado e medula óssea (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a leishmaniose está entre as cinco maiores doenças parasitárias do mundo, e até o ano de 2010, 12 milhões de pessoas foram afetadas pela doença, existindo ainda, aproximadamente 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHOa, 2014).

No Brasil a leishmaniose apresenta prevalência crescente, no período de 2007 e 2013 foram registrados 159.301 casos de leishmaniose tegumentar e 26.112 de leishmaniose visceral. No período de 2007 a 2013 a região Norte foi onde mais ocorreram casos de leishmaniose tegumentar com 40,9% dos casos registrados. No mesmo período a região Nordeste foi a que apresentou o maior percentual de casos registrados de leishmaniose visceral (51%). No estado de Alagoas, entre os anos de 2011 a 2014, foram notificados 175 casos de leishmaniose tegumentar e 110 de leishmaniose visceral (SINAM, 2014).

Apesar de sua importância, não existe até o momento tratamento ideal para a leishmaniose. Os fármacos de primeira escolha usados na terapêutica dessa endemia são os antimoniais pentavalentes, seguidos da anfotericina B e da pentamidina. Existindo outros medicamentos alternativos como a miltefosina oral e a anfotericina B lipossomal (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2005; WHOa, 2014). Sendo a terapia medicamentosa disponível limitada e longe de ser satisfatória, pois apresenta sérios efeitos adversos, alto custo, necessidade de administração parenteral e crescente frequência de resistência do parasito ao tratamento (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Frente ao panorama exposto, fica evidente a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas, de menor custo, maior eficácia, de fácil administração, de elevado índice terapêutico e com menos efeitos adversos em relação aos disponíveis no mercado farmacêutico. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a busca por novos protótipos de fármacos para o tratamento dessa doença que se tornou um grave problema de saúde pública.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Os protozoários causadores desta doença, são pertencentes ao reino Protista, ao sub-reino Protozoa, ao filo Sarcomastigophora, ao sub-filo Mastigophora, a classe Zoomastigophorea, a ordem Kinetoplastida, a sub-ordem Trypanosomatina, a família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, podendo pertencer a várias espécies, chegando esse número a ser superior a 20 (BAIOCCO et al., 2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Existem duas formas clínicas de leishmaniose: a forma visceral e a forma tegumentar. A forma visceral também é conhecida como Calazar, e é caracterizada por se apresentar sob diversas formas clínicas, que podem variar de uma forma assintomática silenciosa, as formas subclínicas ou oligossintomáticas, agudas até a forma clássica (BADARÓ; JONES; LORENÇO, 1986).

A forma assintomática da leishmaniose visceral é representada pelo paciente sem sintomatologia aparente. Já a forma oligossintomática ou subclínica é caracterizada por uma sintomatologia inespecífica como: febre baixa, diarreia, sudorese. A forma aguda da doença se caracteriza pelo surgimento de diarreia intensa, febre alta e tosse, além de hepatoesplenomegalia discreta. A forma sintomática ou clássica é aquela que é característica a presença de edema generalizado e abdome aumentado devido a hepatoesplenomegalia, caquexia acentuada, cefaleia, dores musculares, problemas digestivos e evolução ao óbito, caso não tratada (**Figura 1**) (BADARÓ; JONES; LORENÇO, 1986). As espécies responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose visceral são: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi* (GIL et al, 2007).

A leishmaniose visceral caracteriza-se pelo comprometimento cada vez maior do sistema fagocítico mononuclear, levando a seu parasitismo, hiperplasia e hipertrofia. Ressaltando a participação do interstício de alguns órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmões, rins e medula óssea, com alterações de seus componentes celulares, fibrilares e infiltrado de células mononucleares. Sendo o aumento do volume e do peso dos órgãos acometidos, resultado da reatividade do sistema fagocítico, com

a participação do interstício conjuntamente com a congestão e dilatação das veias (LAURENTI, 2010).

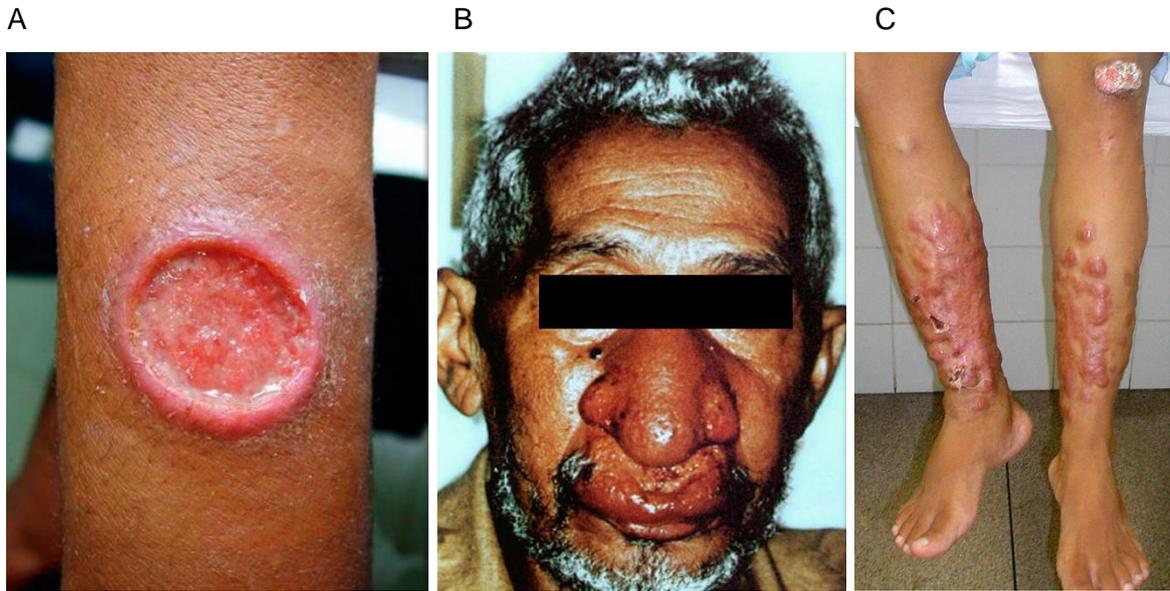
Figura 1- Indivíduo portador de Leishmaniose visceral, apresentando hepatoesplenomegalia.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

A leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo comprometimento da pele, podendo haver lesão do tecido mucoso. Pode se apresentar de três formas distintas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. A forma cutânea é conhecida pela presença de úlceras crônicas, conhecidas como úlceras leishmanióticas (**Figura 2 A**). A forma mucocutânea caracteriza-se pela presença de úlceras crônicas similares à forma cutânea, mas que tendem a reaparecer mesmo após a cicatrização, em mucosas do nariz e da boca, na maioria das vezes associadas a infecções secundárias levando a destruição de grandes extensões de tecido (**Figura 2 B**). A forma cutânea difusa é conhecida por formação de pápulas, principalmente nos membros superiores e inferiores (**Figura 2 C**) (GIL et al., 2007; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Figura 2- Manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar.



Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

A- Leishmaniose cutânea; B- Leishmaniose mucocutânea e C- Leishmaniose cutânea difusa.

Os parasitos causadores da Leishmaniose possuem um ciclo de vida heteroxênico, possuindo assim dois hospedeiros: vertebrados (roedores, edentados, canídeos, primatas e o homem) e insetos vetores (dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no novo mundo (**Figura 3**), e ao gênero *Phlebotomus* no velho mundo). Sendo estes vetores responsáveis pela transmissão do parasito aos mamíferos, durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991). Slama et al., (2014), demonstraram que o DNA de *Leishmania infantum chagasi* foi encontrado em *Culicoides spp.*

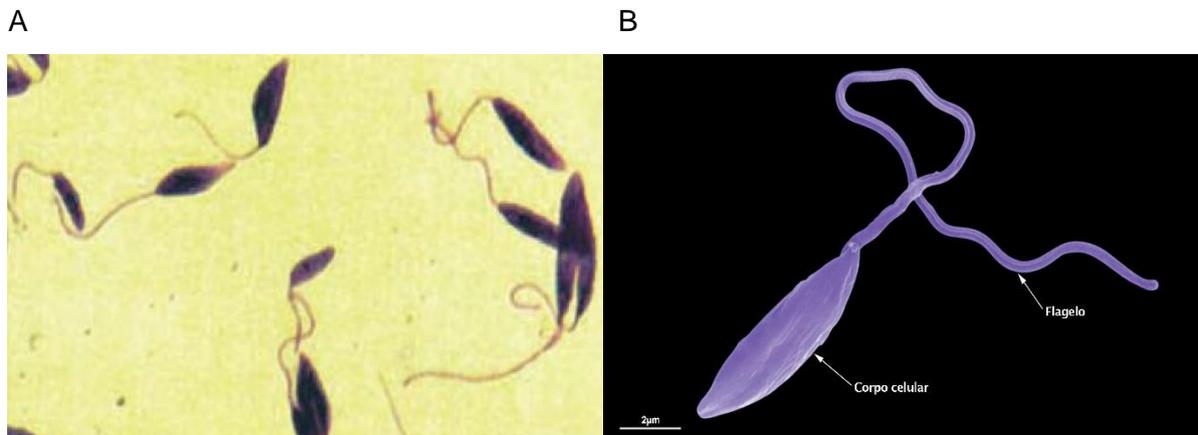
Figura 3- Vetor - *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: VECTORBASE, 2014.

Estes parasitos apresentam-se sob duas formas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas são alongadas e possuem flagelo, sendo encontradas no trato digestivo dos vetores (**Figura 4**). As amastigotas, são formas que variam de redondas a ovais, não possuem flagelo e constituem a forma de *Leishmania* encontrada dentro de células do sistema fagocítico mononuclear em tecidos dos hospedeiros mamíferos (**Figura 5**) (BAIOCCO et al., 2009; PATIL, 2012).

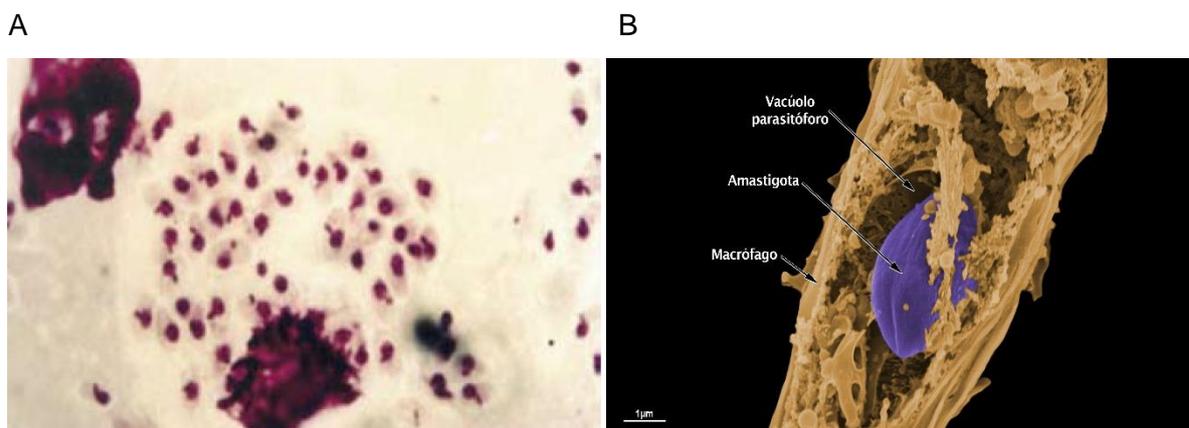
Figura 4- Formas promastigotas de *Leishmania*.



Fonte: MANUAL, 2007; TEIXEIRA et al., 2013.

A- Foto de microscopia ocular (100X); B- Foto de microscopia eletrônica de varredura de *Leishmania amazonensis*.

Figura 5- Formas amastigotas de *Leishmania*.



Fonte: MANUAL, 2007; TEIXEIRA et al., 2013.

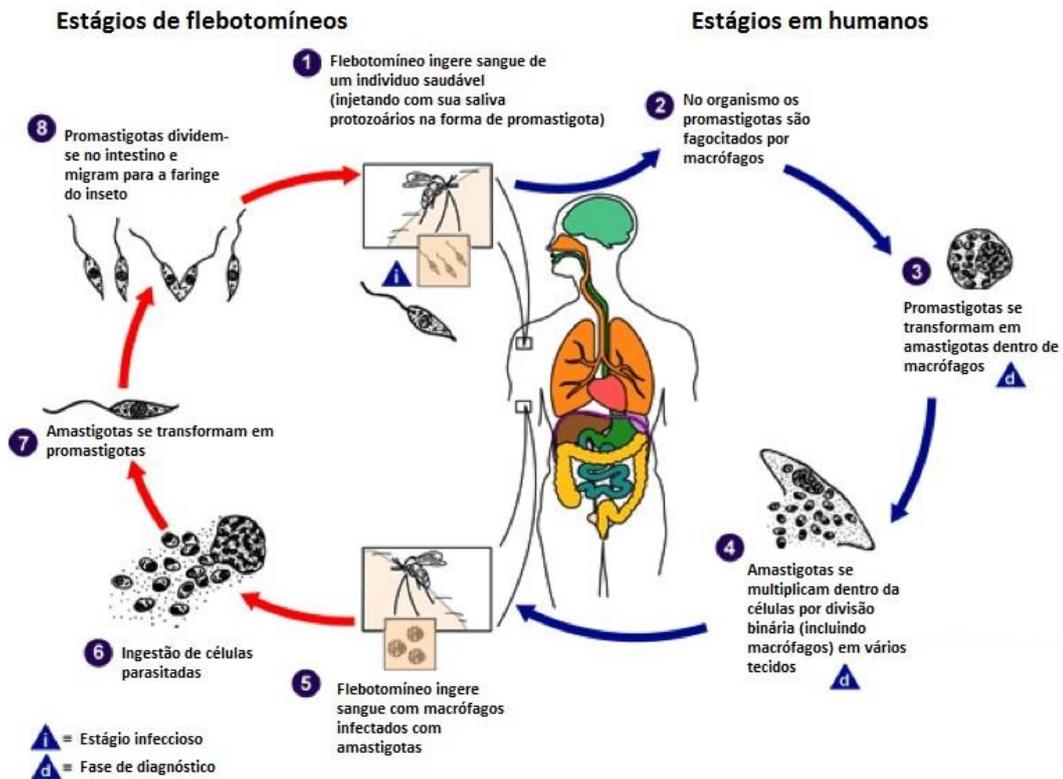
A- Foto de microscopia ocular (100X); B- Foto de microscopia eletrônica de transmissão de forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago.

No hospedeiro mamífero, o início do ciclo se dá quando formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) são inoculadas no momento do repasto sanguíneo do vetor (fêmea infectada). Nesse momento acredita-se que a maioria dos parasitos seja eliminada por ação lítica do sistema complemento. As formas promastigotas que sobrevivem acabam sendo fagocitadas por células mononucleares fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (PATIL, 2012).

No interior celular, os parasitos se alojam nos vacúolos parasitóforos, e se transformam em formas amastigotas. Após a internalização do parasito ocorre a fusão dos vacúolos parasitóforos com os lisossomas secundários resultando no fagolisossoma. Ocorre então a multiplicação do parasito por divisão binária. Após inúmeras divisões, estas células se rompem e liberam as formas amastigotas que serão fagocitadas por outras células fagocíticas, proliferando assim a infecção (**Figura 6**) (BAIOCCO et al., 2009; ASSIS, 2012).

Já no vetor, a infecção ocorre quando este realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, ingerindo as formas amastigotas presentes em seu sangue. Uma vez ingeridas, as formas amastigotas são convertidas em formas promastigotas no tubo digestivo do vetor. Após um período, essas formas promastigotas avançam para o esôfago e chegam às glândulas salivares do flebótomo, que durante o repasto sanguíneo, são regurgitadas na forma de promastigotas metacíclicas para os hospedeiros mamíferos, repetindo o ciclo de desenvolvimento da *Leishmania* (**Figura 6**) (ASSIS, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

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



Fonte: CDC, 2014.

2.2 Imunologia

Conforme citado anteriormente, a infecção tem início quando formas promastigotas são inoculadas na pele dos hospedeiros mamíferos através da picada dos insetos vetores infectados (PATIL, 2012). A partir daí, a resposta imune ao parasito irá depender de mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida do hospedeiro (FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013).

Sabe-se que a internalização das promastigotas ocorre por fagocitose mediada pelo reconhecimento receptor/ligante como: receptores de complemento CR1 e CR3 receptor de manose (MR), receptores para porção Fc das imunoglobulinas (FcγRs), e os receptores de fibronectina (FnRs) (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Além de ser facilitada por algumas substâncias vasodilatadoras encontradas na saliva dos insetos

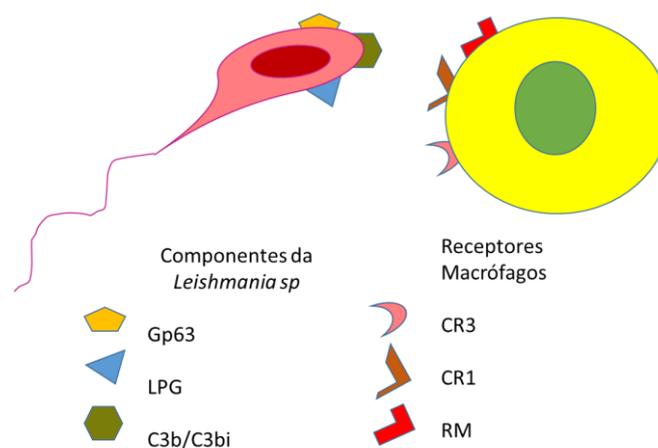
vetores, como o maxadilan, potente vasodilatador encontrado na saliva de *Lutzomyia longipalpis* (PIRES, 2012; LERNER; SHOEMARK, 1992).

O sistema complemento tem um papel fundamental no início da infecção, pois ele pode desencadear papéis antagônicos como: capacidade lítica dos parasitos não interiorizados e o favorecimento da sobrevivência dos interiorizados (LAURENTI, 2010).

Alguns estudos já mostraram que os fragmentos C3b e C3bi gerados após a ativação do sistema complemento podem se depositar na superfície das promastigotas e interagir com receptores do sistema complemento do tipo 3 (CR3) e do tipo 1 (CR1) presentes na superfície dos macrófagos, facilitando a sua internalização e posterior sobrevivência (**Figura 7**) (UENO; WILSON, 2012).

Além disso, foi observado que a membrana plasmática do parasito apresenta carboidratos de superfície, glicoproteínas e glicolípideos, que são importantes na adesão do parasito aos macrófagos e também nas células do trato digestivo do vetor. Dentre elas estão a glicoproteína gp 63 e o lipofoglicano (LPG) que podem interagir com o receptor de complemento CR3. E além do receptor CR3 a gp 63 também pode se ligar aos receptores de manose (TUON et al, 2008).

Figura 7- Receptores para internalização de *Leishmania* em fagócitos.



Fonte: AUTORA, 2015.

Sacks e Kamhawi (2002) mostraram que a entrada da *Leishmania* nas células imunes, através de receptores do sistema complemento, resulta em uma forma de

escape do parasito, pois dessa forma os mecanismos oxidativos dos macrófagos não são ativados.

Além disso, Peters et al., (1995), observaram que anticorpos da classe IgG participam do processo de adesão e fagocitose das formas promastigotas aos macrófagos, por meio de receptores para a fração Fc dos anticorpos, porém sem ativar o estresse oxidativo, demonstrando outra forma de escape do parasito.

Após a inoculação do parasito no indivíduo chegam as primeiras células de defesa: neutrófilos, células dendríticas e macrófagos residentes. (PETERS; SACKS, 2009). Alguns trabalhos já mostraram a importância do neutrófilo no processo inicial de defesa, pois eles irão fagocitar os parasitos para sua remoção, caso não consigam destruir os parasitos internalizados, tornam-se apoptóticos, sinalizando sua remoção por macrófagos (WEINRAUCH et al., 2002). Outros autores, como Van Zandbergen et al., (2004) e Jochim e Teixeira (2009), apontam esta célula como um importante responsável pela progressão da infecção, acreditando na hipótese que ele funcione como “Cavalo de Tróia” propondo que os neutrófilos infectados facilitam a entrada dos parasitos nos macrófagos que são as células hospedeiras definitivas.

As células dendríticas vão funcionar como células apresentadoras de antígenos. Os macrófagos também podem agir como apresentadores de antígenos, mas exercem também o papel de células hospedeiras na multiplicação do parasito, além de produtoras de citocinas que vão modular o tipo de resposta que será desencadeada (ZER et al., 2001; FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013).

Segundo Pearson et al (1983) e Antoine et al, (1990) a transformação das formas promastigotas em formas amastigotas no interior celular, é um mecanismo de evasão, pois estas são formas resistentes ao pH ácido e resistentes a hidrolases presentes nos lisossomos. Além disso, as formas amastigotas são mais resistentes a lise pois produzem a enzima catalase e a superóxido dismutase que as protege dos metabólitos de oxigênio (CHANNON; BLACKWELL, 1985). E a presença de gp 63 em abundância na sua superfície também favorece a sua sobrevivência pois esta é responsável pela degradação de enzimas lisossômicas e apresenta atividade ótima em pH ácido (interior do fagolisossoma).

Macrófagos infectados liberam citocinas e células dendríticas apresentam antígenos do parasito que ativam a diferenciação de linfócitos T helper (Th). As células Th compreendem duas populações T CD4+ e T CD8+. As células T CD4+ podem se diferenciar em duas subpopulações, Th1 e Th2 que produzem diferentes citocinas.

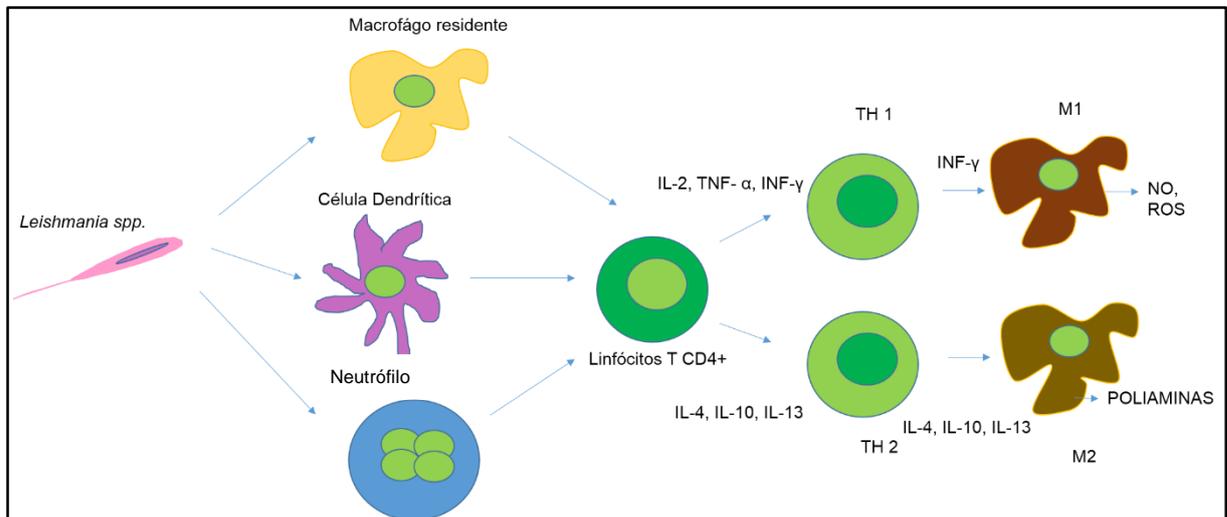
As células do tipo Th1 produzem Interferon- γ (INF- γ), Interleucina-2 (IL-2) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). As células do tipo Th2 produzem Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-13 (IL-13) (BELKAID et al., 2002; BARBIÉRI, 2006; KORN et al., 2009).

As citocinas IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α estão envolvidas no desenvolvimento da resposta Th1, associada à resistência a doença. Isso ocorre quando a ativação do linfócito T CD4+ acontece na presença de IL-12, o que leva a produção de INF- γ (MOUGNEAU et al., 2011; PETERS; SACKS, 2006). O INF- γ produzido por Th1 induz a diferenciação de macrófagos em células M1 produtoras de espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas inflamatórias e óxido nítrico (NO), que são moléculas efetoras necessárias para a erradicação intracelular do parasito (**Figura 10**) (CHAN; ADAPALA; CHEN, 2012).

Na presença das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, ocorre a supressão da produção de INF- γ levando ao desenvolvimento de uma resposta Th2. Isso induz a diferenciação dos macrófagos em M2 (CHAN; ADAPALA; CHEN, 2012; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005), sendo esse tipo de resposta ineficaz contra a infecção, acarretando o agravamento da doença (**Figura 8**) (PETERS; SACKS, 2006; REIS et al., 2006).

L-arginina é um aminoácido que funciona como substrato comum de duas importantes enzimas envolvidas no desenvolvimento da leishmaniose, que podem induzir a morte ou a proliferação do parasito (WANASEN; SOONG, 2008). Caso este substrato venha a ser utilizado pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que está nas células M1, irá promover a síntese de óxido nítrico, importante para a eliminação do parasito. Mas caso esse aminoácido seja utilizado pela arginase, que está em células M2 irá fazer com que ocorra a síntese de poliaminas, que são utilizadas como fonte de energia do parasito, aumentando assim sua infectividade e conseqüentemente proliferação da infecção (**Figura 8**) (GAUR et al., 2007).

Figura 8- Resposta imune a *Leishmania spp.*



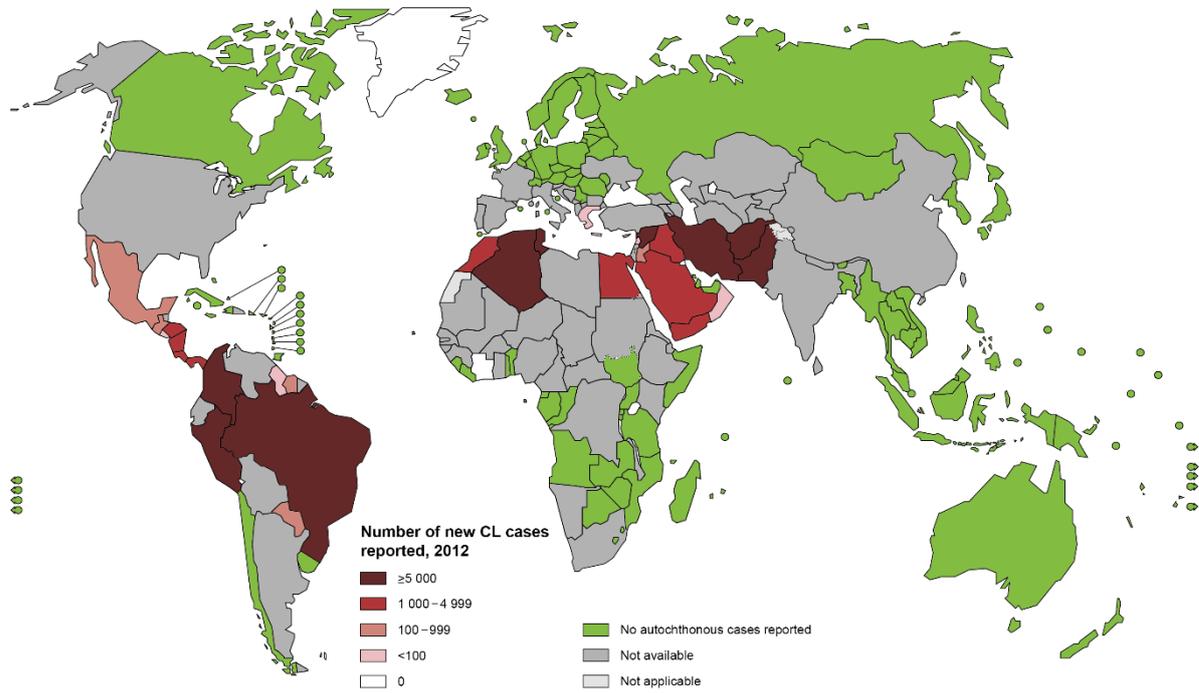
Fonte: AUTORA, 2015.

2.3 Epidemiologia da Leishmaniose

De acordo com a OMS, mais de 98 países são endêmicos para Leishmaniose, destacando-se os países em desenvolvimento, visto que a parasitose está relacionada diretamente com a falta de recursos. Além disso, são estimados em média 1,3 milhões de novos casos anualmente, e calcula-se que ocorram entre 20.000 a 30.000 mortes por ano, tornando esta doença um grave problema de saúde pública (WHO, 2014a).

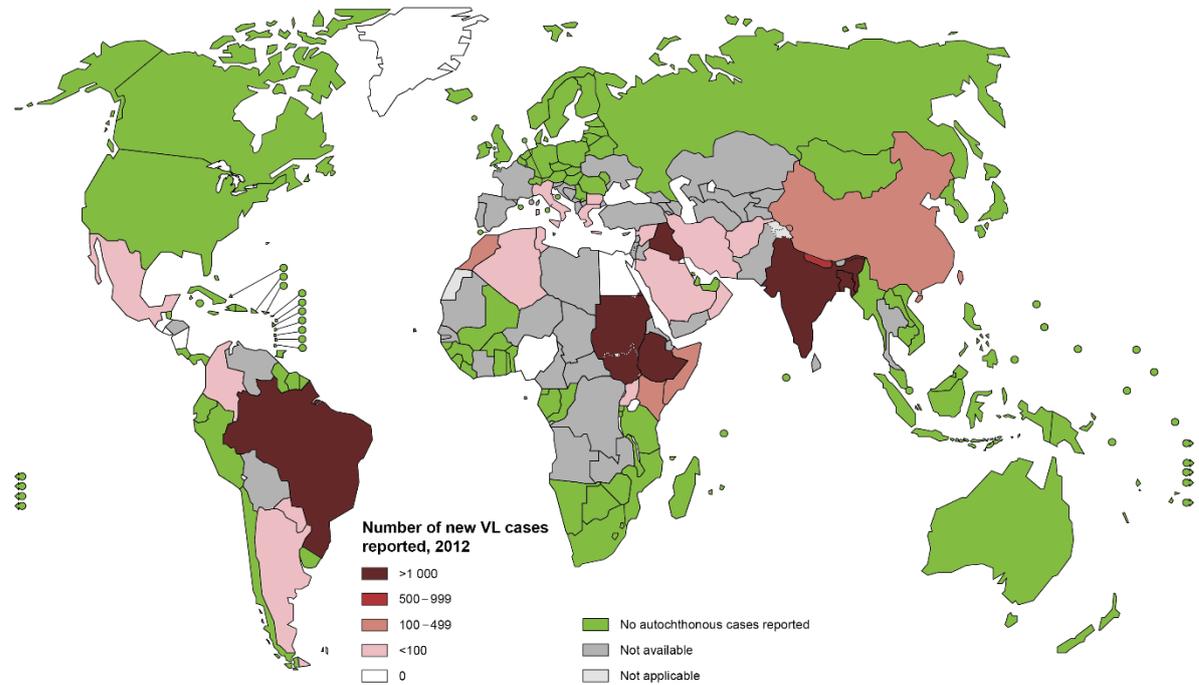
Ainda de acordo com a OMS estima-se que cerca de 95% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorram nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio, além da Ásia Central. É estimado que ocorram em torno de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos por ano (**Figura 9**). Mais de 90% desses novos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, sendo altamente endêmica no subcontinente indiano e no leste da África. Estimam-se mais de 200.000 novos casos por ano (**Figura 10**) (WHO, 2014a).

Figura 9- Distribuição da Leishmaniose Tegumentar, no ano de 2012.



Fonte: OMS, 2014a.

Figura 10- Distribuição da Leishmaniose Visceral, no ano de 2012.



Fonte: OMS, 2014a.

No Brasil, foram registrados 159.301 casos de Leishmaniose tegumentar e 26.112 de visceral no período de 2007 e 2013. A região onde mais ocorreram casos de Leishmaniose Tegumentar foi a região Norte com 40,9% dos casos registrados, em segundo ficou a região Nordeste com 33,3%. Em relação a Leishmaniose visceral, a região Nordeste apresentou o maior percentual de casos registrados, 51%, no mesmo período (2007 a 2013) (SINAM, 2014).

Entre os anos de 2011 a 2014, no estado de Alagoas, foram notificados 175 casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar e 110 de Leishmaniose Visceral (SINAM, 2014).

2.4 Controle e Tratamento da Leishmaniose

Para o controle da leishmaniose existem algumas medidas que podem ser tomadas como profiláticas, como as de combate ao inseto vetor e também a eutanásia de cães infectados (reservatórios de parasitos nas áreas peridomiciliares). O tratamento medicamentoso está disponível, porém, apresenta muitas deficiências significativas, como toxicidade elevada, necessitando de administração parenteral, longos regimes terapêuticos e custo elevado, limitando assim sua utilização e eficácia (MORAIS-TEIXEIRA, 2011; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Devido a esses motivos, muitos pacientes abandonam o tratamento, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes (AMATO, 2000).

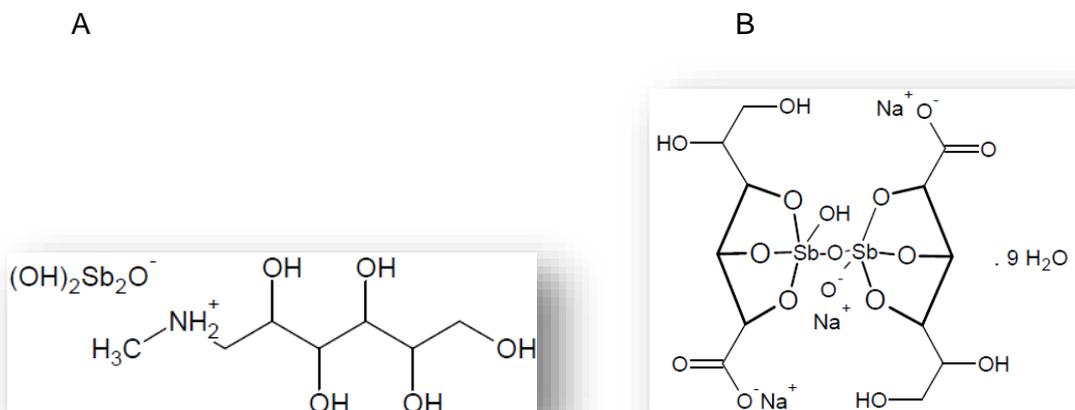
Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes Sb(V). Estes são o resultado de modificações dos antimoniais trivalentes Sb(III), primeiros medicamentos utilizados para o tratamento dessa parasitose desde o início do século XX (GOTO; LINDOSO, 2010). Estas modificações foram realizadas porque estes fármacos apresentavam uma alta toxicidade (RATH et al., 2003). Atualmente os antimoniais disponíveis são o Estibogluconato de sódio (Pentostan® Glaxo Wellcome e Solustibosan® Bayer) e o Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime® Rhône-Poulenc-Rohrer) (**Figura 11**) (GIL et al., 2007).

Não se sabe ao certo o mecanismo exato pelo qual os antimoniais pentavalentes Sb(V) exercem a sua ação. No entanto, existem hipóteses sobre esse mecanismo. Chai (2005) e Demichele et al. (2002) propõe que o Sb(V) sofra oxirredução para Sb(III), funcionando o Sb(V) como um pró-fármaco. Destacando-se

o papel dos grupos tiol, comuns em biomoléculas contendo cisteína, que tem sido associada a este mecanismo de conversão. Outros autores tem demonstrado que o Sb(III) inibi as enzimas do parasito, tripanotiona redutase e a glutaciona sintetase, comprometendo suas atividades, uma vez que o sistema tripanotiona/tripanotiona redutase é responsável pela proteção dos parasitos contra danos oxidativos e da ação de metais pesados. Além disso, a exposição à Sb(III) resulta também em efluxo rápido de glutaciona e tripanotiona de amastigotas e promastigotas *in vitro*, substâncias importantes para a manutenção da amastigota dentro do macrófago (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Outra hipótese associada aos mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes Sb(V), é a inibição da topoisomerase I de *Leishmania* (FRÉZARD et al., 2009).

A OMS preconiza que a dose dos antimoniais não deve ultrapassar 20 mg/kg/dia (via parenteral), devido à sua toxicidade que pode proporcionar efeitos adversos como mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (RATH et al., 2003). Os antimoniais estão contraindicados em pacientes com problemas cardíacos, mulheres grávidas e nos indivíduos com insuficiência renal ou hepática. Caso o paciente não apresente nenhum desses problemas ele pode realizar o tratamento, caso ocorra o aparecimento de arritmias, o medicamento deve ser suspenso e o paciente tratado com outras alternativas terapêuticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 11- Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes.



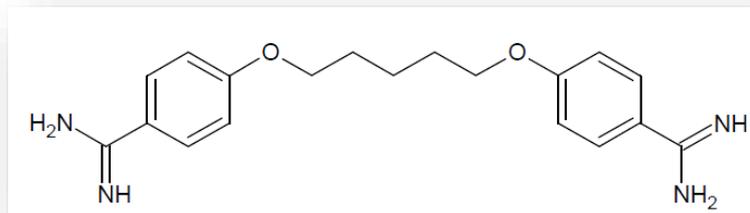
Fonte: GIL et al., 2007.

A- Antimoniato de N-metilglucamina; B- Estibogluconato de sódio.

Outros fármacos estão sendo utilizados para o tratamento da leishmaniose, a Pentamidina, a Anfotericina B, a Miltefosina e a Paramomicina são alguns deles (RATH et al., 2003).

A Pentamidina é uma poliamina aromática, administrada por via parenteral muito utilizada em pacientes não responsivos aos antimoniais (**Figura 12**) (MONZOTE, 2009). O tratamento é feito com a administração de uma dose de 2-4 mg/kg/dia em dias alternados, sendo necessárias de 2-4 aplicações. Geralmente esse tratamento causa dor no local da aplicação, mialgias, náuseas, dores de cabeça, hipotensão, taquicardia e pancreatite (OLIVEIRA et al, 2011). Segundo Berman (1997) este medicamento age provavelmente interferindo na síntese do DNA, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial do parasito.

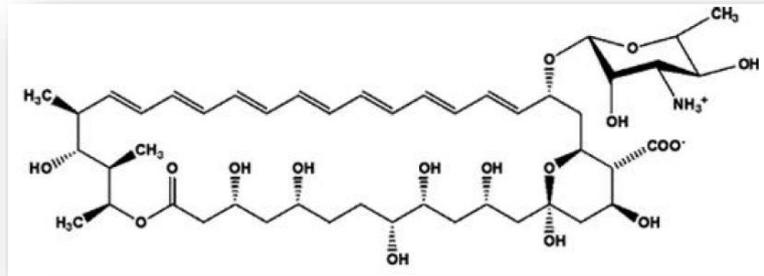
Figura 12- Estrutura química da Pentamidina.



Fonte: GIL et al., 2007.

A Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, com atividade antifúngica, pois liga-se ao ergosterol, presente na membrana celular de fungos e protozoários, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (**Figura 13**). Ela tem sido utilizada para o tratamento de casos graves de leishmaniose não responsivos ao tratamento com antimoniais. A internação do paciente é necessária para a realização do tratamento devido à sua cardiotoxicidade e nefrotoxicidade. Os principais efeitos adversos são: febre, calafrios, tromboflebite, miocardite, hipocalemia severa, disfunção renal, podendo levar a morte (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; MONZOTE, 2009).

Figura 13- Estrutura química da Anfotericina B.

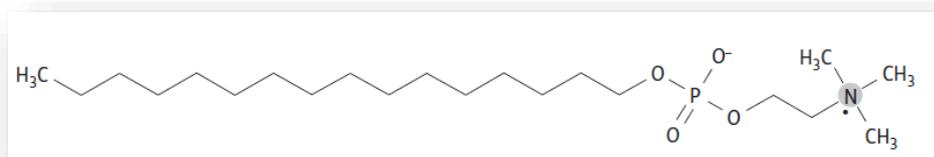


Fonte: GIL et al., 2007.

No intuito de diminuir a toxicidade, novas formulações da Anfotericina B foram desenvolvidas: Anfotericina B lipossomal (AmBisome®), a forma complexada em lipídeos (Abelcet®) e uma Anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil®), sendo entretanto, significativamente mais caras (MITROPOULOS et al., 2010; GRIENSVEN; DIRO, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O AmBisome® apresenta uma formulação com sistema de liberação de fármaco lipossomal com bicamada única. Adler-Moore e Proffit (2002) demonstraram que essa forma é menos tóxica do que a apresentação convencional.

A Miltefosina é um fármaco alquilfosfolipídico que foi inicialmente desenvolvido para o tratamento do câncer (**Figura 14**). É o primeiro fármaco leishmanicida ativo por via oral, sendo seus principais efeitos adversos relacionados ao trato gastrointestinal (GOTO; LINDOSO, 2010). A dose de Miltefosina, atualmente recomendada como monoterapia, é de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias, embora na prática clínica outras doses sejam administradas. O seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. Alguns trabalhos mostraram alterações no metabolismo alquil-lipídico e na biossíntese de fosfolipídios (LUX et al., 2000; ARTHUR; BITTMAN, 1998).

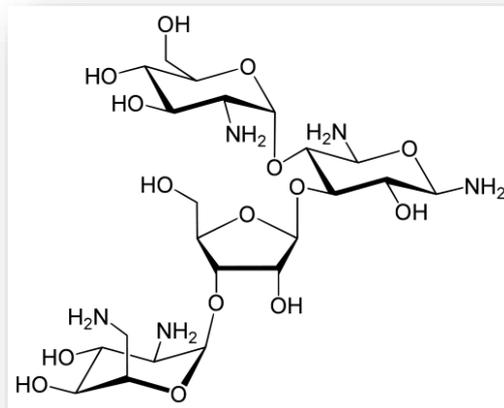
Figura 14- Estrutura química da Miltefosina.



Fonte: DORLO et al., 2012.

A Paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo administrado por via parenteral (**Figura 15**). Estudos já mostraram que sua atividade pode ser devido à disfunção respiratória por conta da despolarização da membrana mitocondrial, podendo existir outras vias. Os principais efeitos adversos relacionados ao seu uso são a ototoxicidade e a nefrotoxicidade (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; RATH et al., 2003; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Figura 15- Estrutura química da paramomicina.



Fonte: PARAMOMICINA, 2015.

A terapia farmacológica disponível para o tratamento da leishmaniose ainda está muito longe de ser satisfatória, levando-se em conta, o número limitado de medicamentos, a necessidade de administração parenteral da grande maioria deles, o alto nível de toxicidade e muitos efeitos adversos, além da crescente resistência dos parasitos aos mesmos. Assim, é necessária uma busca cada vez maior por fármacos mais efetivos e com menos efeitos adversos que os atualmente disponíveis no mercado farmacêutico.

2.4.1 Guanilidrazonas e Tiossemicarbazonas

As guanilidrazonas e as tiossemicarbazonas constituem duas classes de substâncias cujas propriedades vêm sendo muito estudadas nos últimos anos, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Devido às suas atividades

biológicas, são considerados compostos de alto interesse científico (EPIFÂNIO, 2011).

Existem vários estudos relatando diferentes atividades biológicas para guanilidrazonas. Foye et al., (1990) e Hoffman (2003) demonstraram os efeitos anti-hipertensivos dessa classe; Larsen et al., (2001) e Edmont et al., (2000) reportaram os efeitos antidiabéticos. Andreani et al., (2000), Foye et al., (1990) e Brzozowski, Saczewski e Slawinski (2007) a atividade antineoplásica. Walzer et al., (1994), Gadad et al., (2000) e Borges e Figueroa (2001) os efeitos antibacterianos. Ruiz (1970) reportou os efeitos antimaláricos e Sundberg et al., (1990), Messeder et al., (1995) e Santos-Filho; Figueroa-Villar e Araújo (1997) a atividade tripanocida.

A literatura também reporta várias atividades biológicas encontradas para as tiossemicarbazonas, incluindo anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, antibacterianas, antimaláricas e tripanocidas (BERALDO, 2004; CHIPELEME et al, 2006; KONSTANDINIDOU et al., 1998).

Além dessas atividades citadas anteriormente, alguns autores já demonstraram o potencial leishmanicida dessas duas classes (AHMED et al.,2012; BRITTA et al., 2014; KAUR et al., 2011; RAYCHAUDHURY et al., 2005). Kaur et al, (2011), estudaram 12 compostos gerados a partir de aminas para inibir a enzima pteridina redutase (importante na metaciclo-gênese do parasito, transformação em promastigotas metacíclicas infectantes). E observaram que o composto pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona apresentou atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* com CI_{50} igual a 29 μ M para formas promastigotas e 3 μ M para formas amastigotas.

Ahmed et al, (2012), elaboraram 50 análogos tricíclicos com o grupo guanidina, a partir do alcaloide batzelanina K isolado de *Batzella spp*, e observaram que o candidato mais promissor apresentou uma CI_{50} de 2,34 μ M para amastigotas de *L. donovani*. Nesse trabalho a pentamidina foi utilizada como fármaco padrão e teve uma CI_{50} de 2,94 μ M.

Raychaudhury et al, (2005), trabalharam com o complexo trifenil estanho, uma tiossemicarbazona, contra *L. donovani* e observaram que o mesmo apresentou uma CI_{50} de 0,05 \pm 0,01 mg/L para promastigotas e uma CI_{50} de 6 mg/L para amastigotas. Britta et al (2014) estudaram o efeito do composto tiossemicarbazônico 4-nitobenzaldeído derivado do S-limoneno contra *Leishmania amazonensis* e viram que

ele apresentou atividade leishmanicida com CI_{50} de 3,8 μM para promastigotas e 7,7 μM para amastigotas intracelulares.

Com base no que foi exposto, viu-se que as guanilidrazonas e as tiossemicarbazonas apresentam uma gama de atividades biológicas e dentre elas atividade leishmanicida. Visando a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, tendo em vista que os fármacos disponíveis são em número limitado e apresentam muitos efeitos adversos, como alta toxicidade, e que essas duas classes apresentam um potencial leishmanicida, foi proposta uma avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida de duas séries de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial citotóxico e a atividade leishmanicida de uma série de derivados guanilidrazônicos e de uma série de derivados tiossemicarbazônicos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos;
- Avaliar o efeito de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi in vitro*;
- Analisar a morfologia dos parasitos tratados com o derivado mais ativo;
- Avaliar a atividade do derivado mais ativo sobre a enzima topoisomerase;
- Selecionar o derivado mais ativo e avaliar sua atividade leishmanicida *in vivo* por meio da determinação da carga parasitária e estudo do curso da infecção;
- Avaliar a toxicidade do derivado mais ativo no baço, rins e fígado dos animais infectados do ensaio *in vivo*.

4 METODOLOGIA

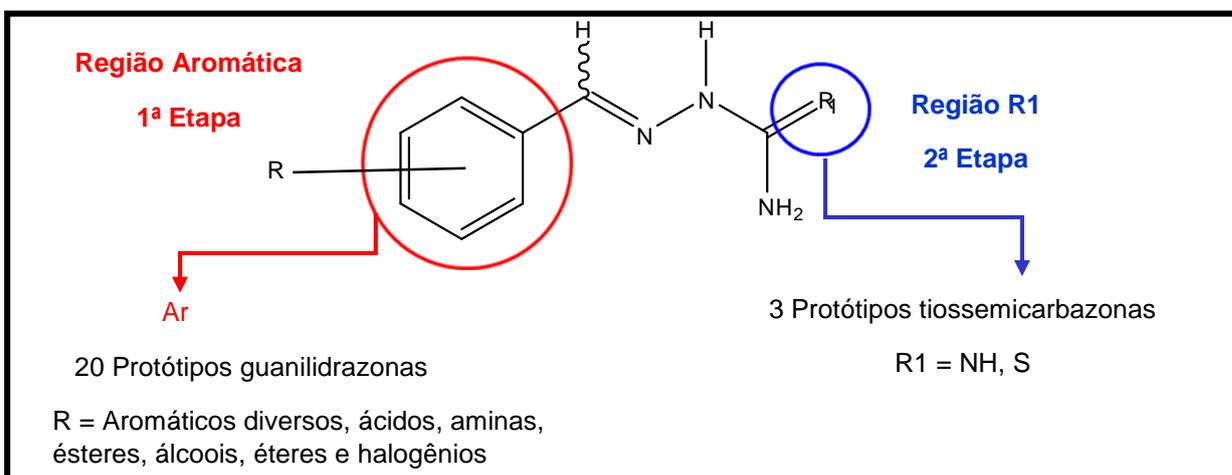
4.1 Planejamento dos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos

Os derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos foram planejados e sintetizados pelo grupo de pesquisa do professor Dr. João Xavier de Araújo Júnior, do Laboratório de Química Medicinal, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (LQM-UFAL).

A criação dos derivados foi planejada variando-se duas regiões, a partir do esqueleto base das guanilidrazonas e das tiossemicarbazonas aromáticas (**Esquema 1**). A primeira série consistiu em vinte guanilidrazonas, contendo diferentes substituintes aromáticos, obtidos a partir de seus respectivos aldeídos (LQM 1, LQM 2, LQM 3, LQM 4, LQM 5, LQM 6, LQM 7, LQM 8, LQM 9, LQM 10, LQM 11, LQM 12, LQM 13, LQM 14, LQM 15, LQM 16, LQM 17, LQM 18, LQM 19 e LQM 20).

Posteriormente, partindo-se de três protótipos obtidos na primeira etapa (LQM 10, LQM 14 E LQM 17), realizou-se a síntese de uma nova série de derivados, conservando-se a região aromática e realizando modificações estruturais na região R (**Esquema 1**). Essa etapa posterior procedeu-se através da utilização da tiossemicarbazida para a produção dos compostos almeçados. Sendo sintetizados três derivados análogos através de bioisosterismo clássico divalente, ocorrendo a troca da aminoguanidina pela tiossemicarbazida (LQM 10 (1), LQM 14 (1) E LQM 17 (1)) (EPIFÂNIO, 2011).

Esquema 1- Planejamento da síntese das guanilidrazonas e tiossemicarbazonas.



4.2 Preparação dos derivados aminoguanidícos e tiossemicarbazônicos

Os vinte derivados aminoguanidícos e os três derivados tiossemicarbazônicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e filtrados, formando a solução estoque I (100 mM). No momento dos experimentos, os derivados foram diluídos na forma seriada em meio RPMI para obtenção das concentrações de 100 a 0,1 μ M e foram plaqueados.

4.3 Ensaios farmacológicos *in vitro*:

4.3.1 Cultura de parasitos: Culturas de promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA. As formas promastigotas do parasito foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% urina humana masculina a 27°C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensão em meio Schneider's. Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

4.3.2 Manutenção de macrófagos: Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e semeadas.

4.3.3 Determinação da viabilidade celular: O estudo de viabilidade celular de macrófagos frente aos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos foi realizado utilizando-se o método de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993). Neste ensaio, macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados em placas de 96 poços por 1 hora em (1×10^5 / poço) e expostos a diferentes concentrações dos compostos diluídos em meio RPMI suplementado (1, 10 e 100 μ M) por um período de 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os poços

controles continham células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 µL da solução de MTT (5 mg/10 mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, logo após foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 µL de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle. O cálculo da CI₅₀ foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Resposta} = 100 + \frac{(-100)}{1 + 10^{(X - \log \text{CI}_{50})}}$$

4.3.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas: Formas promastigotas de *L. chagasi* numa concentração de 1x10⁵ parasitos/poço num volume de 100 µL foram cultivadas em triplicatas em placa de 96 poços com meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana. Foram adicionadas diferentes concentrações (0,1, 1, 10 e 100 µM) dos vinte e três derivados e pentamidina (fármaco padrão) aos poços contendo as formas promastigotas até a obtenção do volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. Após esse período, os parasitos de *L. chagasi* foram homogeneizados e o número de parasitos foi determinado em contador automático de células (ÁVILA et al., 1997).

4.3.5 Ensaio de infecção de macrófagos com *Leishmania chagasi*: Macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados na proporção de 3 x 10⁵ células/poço de placa de 24 poços com lamínulas por uma hora com meio RPMI suplementado. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. chagasi*, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa foi incubada por 6 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 6 horas de infecção, os macrófagos foram "lavados" com solução salina com fosfatos (PBS, pH 7,2), para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 2 mM aminoácidos não essenciais e 2 mM piruvato, na presença ou não dos derivados na concentração de 10 µM e foram mantidos em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período de cultura os poços contendo as lamínulas foram

lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa-May-Grünswald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100X (imersão) (NUNES et al., 2005).

4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): A morfologia de promastigotas de *L. chagasi* tratadas e/ou não com o derivado e as alterações sobre a superfície dos parasitos foram comparativamente avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para as análises morfológicas, foram processados parasitos incubados por 24 horas com o derivado tiossemicarbazônico 17(1), na concentração de 10 μ M. Parasitos não tratados foram processados como controle. Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas e fixadas por 72 horas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina. Após 20 minutos, as lamínulas foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl_2 em tampão cacodilato 0,1M. Em seguida as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 no LIKA-Fiocruz-PE.

4.3.7 Inibição de topoisomerase: Topoisomerasas recombinantes (LdTOPO) foram cedidas pelo Dr. Rafael Balaña-Fouce, coordenador do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidad de León – Espanha. Para determinar a atividade inibitória do derivado selecionado sobre a LdTOPO, foi preparada uma mistura de DNA superhelicoidal em tampão correspondente. O inibidor de topoisomerase Camptotecina e o derivado foram incubados em eppendorffs, em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 μ M), no gelo durante 20 minutos, em presença da LdTOPO. Transcorrido esse tempo foram submetidos a um banho quente a 37°C por 30 minutos. Após esse período as reações foram paradas e as misturas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% por 16 horas a 25°C. Em seguida foram reveladas com brometo de etídio a 0,25 μ g/L.

4.4 Ensaios farmacológicos *in vivo*:

4.4.1 Ética dos experimentos: Os estudos *in vivo* realizados utilizaram *Golden Hamsters* (*Mesocricetus auratus*) provenientes da Fiocruz-RJ, para determinar o efeito terapêutico do derivado selecionado nos modelos *in vitro*. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Utilização de Animais de Laboratório da UFAL e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Utilização de Animais de Laboratório da UFAL (CEP Nº 56/2014).

4.4.2 Ensaio de infecção de Golden hamsters com *L. chagasi*: Com o objetivo de avaliar a atividade leishmanicida dos compostos, *Golden Hamsters* (*Mesocricetus auratus*) machos com seis a oito semanas de idade foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^7 de promastigotas de *Leishmania chagasi* na fase estacionária (DENISE et al., 2006). Após 45 dias da infecção, os animais foram separados de forma randômicas em grupos experimentais com 5 hamsters cada. Os animais receberam tratamento diário por via intraperitoneal na dose de 100 $\mu\text{mol/kg/dia}$ de antimoniato de meglumina (Glucantime) (sintetizado e cedido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Mário Roberto Meneghetti/UFAL) e do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) ambos foram utilizados para tratar os animais durante um período de 15 dias. O grupo controle recebeu tratamento diário com água para injeção durante o mesmo período de 15 dias (LIMA; BLEYENBERG; TITUS, 1997). Após o fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária no baço foi avaliada através do método de diluições limitantes (item 4.4.4). A toxicidade do composto também foi determinada através de dosagens bioquímicas no plasma dos animais, o sangue foi colhido por via intracardíaca após a eutanásia, usando kits comerciais (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios, Ltda, Brazil).

4.4.3 Pesagem do baço: Após os animais serem eutanasiados, o baço foi retirado para pesagem em balança analítica e os grupos tratados foram comparados com o grupo controle.

4.4.4 Diluições limitantes: Para quantificação dos parasitos no baço foi utilizada a técnica de diluição limitante (TASWELL, 1986). O baço foi retirado assepticamente e

macerado em 1 mL de meio Schneider (Sigma) com 10% de soro fetal bovino até a formação de uma suspensão. Posteriormente, 200 µL do macerado de cada amostra foi transferido para placa de cultura de fundo chato de 96 poços, em duplicata, representando a diluição de 1:5. Realizou-se 11 diluições seriadas do macerado, utilizando a proporção de 1:20. As placas foram incubadas em estufa BOD à 26°C por 14 dias. No décimo quarto dia de cultura, a quantidade de parasitos foi calculada multiplicando o fator de diluição, cujo valor era 5, por 10 elevado a potência referente ao número da última diluição que havia presença de pelo menos um parasito, visto em microscópio óptico.

4.4.5 Dosagem da enzima ALT: A determinação da atividade da alanino aminotransferase (ALT) foi realizada através do kit ALT/TGP (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, adicionou-se 100 µL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (10 µL do plasma dos animais infectados com *L. chagasi* utilizados no ensaio *in vivo*) e, logo após 30 segundos, foi realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 340 nm. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da ALT. A atividade enzimática é calculada através da diminuição da absorbância da solução de NADH em 340 nm.

4.4.6 Dosagem da enzima AST: A determinação da atividade de aspartato aminotransferase (AST) foi realizada através do kit AST/TGO (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, adicionou-se 100 µL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (10 µL do plasma dos animais infectados com *L. chagasi* utilizados no ensaio *in vivo*) e, logo após 30 segundos, foi realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 340 nm. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da AST. A atividade enzimática é calculada através da diminuição da absorbância da solução de NADH em 340 nm.

4.4.7 Dosagem de Creatinina: A determinação da quantidade de creatinina foi realizada através do kit Creatinina (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, foram adicionados 100 µL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (10 µL do plasma dos animais infectados com *L.*

chagasi utilizados no ensaio *in vivo*) e, logo após 30 segundos, é realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 505 nm. O reagente de trabalho consiste em uma solução de ácido pícrico, hidróxido de sódio, creatinina e ácido Túngstico. A creatinina reage com picrato alcalino, formando um complexo de cor amarelo avermelhado (reação de Jaffé).

4.4.8 Dosagem de Ureia: A determinação da quantidade de ureia foi realizada através do kit ureia 500 (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, adicionou-se 100 µL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (31 µL do plasma dos animais infectados com *L. chagasi* utilizados no ensaio *in vivo*) e, após 5 minutos, é realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 600 nm. Os reagentes de trabalho consistem em uréase, salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio, EDTA dissódico, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio e ureia. Em meio alcalino, na presença de salicilato, Nitroprussiato de Sódio e hipoclorito, os íons amônios reagem dando origem a um composto cromógeno azul esverdeado. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração da ureia na amostra analisada.

4.5 Análise estatística: Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de viabilidade celular

Inicialmente foi realizado o ensaio de viabilidade celular dos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos sobre macrófagos da linhagem J774, através do método de MTT.

Foi observado no teste que apenas os derivados aminoguanidínicos LQM 3, LQM 4, LQM 11 e LQM 16, além do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1), não apresentaram efeito citotóxico até a máxima concentração testada (100 μ M). Porém os derivados aminoguanidínicos LQM 1, LQM 2, LQM 5, LQM 6, LQM 7, LQM 8, LQM 9, LQM 10, LQM 12, LQM 13, LQM 14, LQM 15, LQM 17, LQM 18, LQM 19 e LQM 20 e os derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1) e LQM 14(1) apresentaram efeito tóxico significativo para os macrófagos, quando comparado ao controle, DMSO 0,1% (**Tabela 1**).

Como esperado, o DMSO 0,1% não apresentou efeito deletério significativo para os macrófagos, quando comparado ao controle negativo (células cultivadas apenas com o meio de cultura).

Tabela 1- Efeito dos derivados sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT após 48 horas.

Substâncias	CL ₅₀ (µM) ^a	Citotoxicidade Máxima (%) ^b	Citotoxicidade 10 µM (%) ^c
Pentamidina	44,1 ± 0,4	93,2 ± 0,8***	NT
LQM 1	51,4 ± 3,1	95,3 ± 2,3***	NT
LQM 2	41,2 ± 4,5	93,2 ± 0,8***	NT
LQM 3	> 100	NT	NT
LQM 4	> 100	NT	NT
LQM 5	52,3 ± 9,5	69,1 ± 2,8***	31,5 ± 5,0*
LQM 6	48,5 ± 2,2	97,0 ± 1,5***	NT
LQM 7	64,3 ± 1,7	69,1 ± 1,1***	NT
LQM 8	52,8 ± 9,2	96,5 ± 3,5***	NT
LQM 9	57,2 ± 5,8	81,0 ± 6,3***	NT
LQM 10	34,6 ± 3,6	93,9 ± 0,3***	32,7 ± 4,0*
LQM 10(1)	38,0 ± 0,8	93,9 ± 0,3***	NT
LQM 11	> 100	NT	NT
LQM 12	23,7 ± 6,1	93,9 ± 0,3***	41,0 ± 5,1**
LQM 13	51,9 ± 1,8	94,0 ± 0,3***	NT
LQM 14	35,7 ± 2,8	93,9 ± 0,3***	31,4 ± 3,1*
LQM 14(1)	61,3 ± 8,2	62,2 ± 0,6***	30,6 ± 5,7*
LQM 15	71,8 ± 4,3	75,5 ± 4,8***	NT
LQM 16	> 100	NT	NT
LQM 17	0,5 ± 0,3	93,9 ± 0,4***	65,6 ± 4,9***
LQM 17(1)	> 100	NT	NT
LQM 18	53,9 ± 5,8	85,9 ± 1,8***	NT
LQM 19	51,3 ± 2,3	86,6 ± 2,3***	NT
LQM 20	3,0 ± 1,2	94,0 ± 0,3***	60,5 ± 1,9***

Os resultados referem-se a: ^a Concentração Letal a 50% dos macrófagos (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^b Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. ^c Média ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não apresenta atividade letal significativa para os macrófagos nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Fonte: AUTORA, 2015.

Uma observação importante é que a única diferença estrutural dos derivados aminoguanidínicos LQM 10, LQM 14 e LQM 17 para os seus análogos tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) é a presença do enxofre (S) no lugar da imina da região guanidínica. Essa mudança de substituintes foi crucial para a diminuição da citotoxicidade do derivado aminoguanidínico LQM 17 que apresentou citotoxicidade máxima de $93,90 \pm 0,4 \%$ e o seu análogo tiossemicarbazônico LQM 17(1) não apresentou citotoxicidade até a máxima concentração testada ($100 \mu\text{M}$) (**Tabela 1**). No entanto, esse padrão não foi visto para os outros análogos, LQM 10(1) e LQM 14(1), que apresentaram uma citotoxicidade máxima similar à de seus protótipos de origem (LQM 10 e LQM 14) (**Tabela 1**).

Epifânio (2011) estudou os derivados aminoguanidínicos LQM 10, LQM 14, LQM 17 e LQM 19 e observou que os mesmos apresentaram toxicidade frente a linfócitos humanos saudáveis avaliados pelo ensaio de redução de MTT, apresentando CL_{50} de 1,3, 0,5, 1,2 e 2,2 μM , respectivamente.

Também foi possível constatar que essa citotoxicidade diminuiu consideravelmente quando a concentração testada foi de $10 \mu\text{M}$. Foi mostrado que, nessa concentração, 70% dos derivados não apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa, com exceção apenas dos derivados aminoguanidínicos LQM 5, LQM 10, LQM 12, LQM 14, LQM 17 e LQM 20, além do derivado tiossemicarbazônico LQM 14(1), que ainda se mostraram tóxicos, como pode ser observado na **Tabela 1**.

O grupo químico tiossemicarbazona é relatado por apresentar uma baixa citotoxicidade quando ligado a outros grupos químicos. Isso foi visto por Britta et al., (2014) quando pesquisaram a atividade de um composto tiossemicarbazônico, derivado do S-limoneno, o 4-Nitrobenzaldeído e observaram através do método de MTT que a concentração citotóxica 50% (CL_{50}) em J774. A1 foi de $88.8 \mu\text{M}$.

5.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas

Buscando-se identificar uma possível atividade leishmanicida direta, foi então realizado o ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas de *L. chagasi*. O fármaco padrão escolhido foi a pentamidina, um medicamento de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, pois apresenta resultados significativos em casos de resistência aos antimoniais pentavalentes, que são a terapia medicamentosa de

primeira escolha, porém com baixa atividade em formas promastigotas (SUNDAR, 2001; WHO, 2014b; ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007).

Como é possível observar na **Tabela 2** os derivados aminoguanidínicos LQM 2, LQM 3, LQM 5, LQM 8, LQM 10, LQM 12, LQM 14, LQM 17, LQM 18, LQM 19 e LQM 20, além dos derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1), apresentaram um efeito máximo acima de 90%, que pode ser comparado ao da Pentamidina ($97,9 \pm 0,5\%$). Contudo, os derivados aminoguanidínicos LQM 6 e LQM 9 apresentaram um efeito máximo em torno de 60%. Já os derivados aminoguanidínicos LQM 1, LQM 4, LQM 7, LQM 11, LQM 13, LQM 15 e LQM 16 não apresentaram atividade leishmanicida direta contra as formas promastigotas de *L. chagasi* até a máxima concentração testada ($100 \mu\text{M}$).

A **Tabela 2** nos mostra que a maioria dos derivados apresentou uma potente atividade contra promastigotas de *L. chagasi* destacando-se os derivados aminoguanidínicos LQM 5, LQM 8, LQM 10, LQM 14 e LQM 17, além dos três derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) que apresentaram CI_{50} abaixo de $10 \mu\text{M}$.

É possível analisar que não houve uma mudança significativa na atividade direta contra o parasito, nem na CI_{50} entre os análogos aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos LQM 14 e LQM 14(1), e LQM 17 e LQM 17(1), que apresentaram um efeito máximo em torno de 98% e CI_{50} variando entre $0,4 - 1,5 \mu\text{M}$. Enquanto entre os análogos LQM 10 e LQM 10(1) a CI_{50} diminuiu de $9,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$, no derivado aminoguanidínico LQM 10, para $1,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$, no derivado tiossemicarbazônico LQM10(1), mantendo-se o efeito máximo acima de 90%.

A porcentagem de inibição do crescimento na concentração de $10 \mu\text{M}$ também está descrita na **Tabela 2**. Nela é possível ver que apenas os derivados aminoguanidínicos LQM 5, LQM 8, LQM 14 e LQM 17 e os derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) mantiveram a sua atividade leishmanicida direta acima de 80% assim como a pentamidina, o que não aconteceu com o derivado aminoguanidínico LQM 10 que apresentou uma redução na sua atividade ($55,8 \pm 2,6\%$).

Tabela 2- Efeito dos derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania chagasi* após 48 horas de tratamento.

Tratamento	CI ₅₀ ^a	EM ^b	Efeito (10µM) ^c
Pentamidina	6,1 ± 0,2 µM	97,9 ± 0,5***	84,6 ± 1,4***
LQM 01	>100 µM	NA	NA
LQM 02	58,0 ± 0,7 µM	93,5 ± 1,0***	NA
LQM 03	57,0 ± 0,4 µM	95,6 ± 1,0***	NA
LQM 04	>100 µM	NA	NA
LQM 05	4,4 ± 0,6 µM	99,8 ± 0,1***	88,2 ± 1,3***
LQM 06	67,8 ± 3,8 µM	67,2 ± 2,3***	NA
LQM 07	>100 µM	NA	NA
LQM 08	6,2 ± 0,1 µM	97,8 ± 1,0***	86,2 ± 0,2***
LQM 09	86,2 ± 3,6 µM	61,7 ± 4,5***	NA
LQM 10	9,0 ± 0,4 µM	93,4 ± 1,0***	55,8 ± 2,6***
LQM 10(1)	1,0 ± 0,2 µM	99,5 ± 0,1***	96,4 ± 1,3***
LQM 11	>100 µM	NA	NA
LQM 12	48,7 ± 3,4 µM	98,6 ± 0,3***	NA
LQM 13	>100 µM	NA	NA
LQM 14	0,7 ± 0,1 µM	98,4 ± 0,1***	98,4 ± 0,1***
LQM 14(1)	1,5 ± 0,5 µM	98,4 ± 0,2***	98,4 ± 0,2***
LQM 15	>100 µM	NA	NA
LQM 16	>100 µM	NA	NA
LQM 17	1,4 ± 0,3 µM	98,6 ± 0,3***	97,0 ± 0,2***
LQM 17(1)	0,4 ± 0,1 µM	97,5 ± 0,7***	96,2 ± 1,0***
LQM 18	42,9 ± 1,5 µM	98,1 ± 0,2***	NA
LQM 19	26,8 ± 11,5 µM	99,1 ± 0,4***	NA
LQM 20	56,1 ± 0,3 µM	97,5 ± 0,5***	NA

Os resultados referem-se a: ^a Concentração letal a 50% das formas promastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ***p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para promastigotas de *L. chagasi* nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

A atividade leishmanicida direta de algumas guanilidrazonas sintéticas já foi descrita por alguns autores, dentre eles Mukhopadhyay e Madhubala (1995), demonstraram que a atividade leishmanicida do Metilglioxal bis, uma guanilidrazona, contra promastigotas de *L. donovani*. Nesse estudo, foi visto que o composto estudado apresentou uma atividade antileishmania na concentração de 67 μM . Em outro trabalho também com promastigotas de *L. donovani*, Kaur et al. (2011) observaram que o composto guanidínico tricíclico, pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona apresentou CI_{50} de 29 μM .

Dados da literatura mostram que as tiossemicarbazonas apresentam atividade direta contra *Leishmania sp.* (RAYCHAUDHURY et al., 2005). Britta et al., (2014) estudaram a atividade antileishmania em formas promastigotas de *L. amazonensis*, do 4-Nitrobenzaldeído, e registraram uma CI_{50} de 3,8 μM .

De posse dos resultados de viabilidade celular e da atividade direta contra promastigotas de *L. chagasi*, foi possível analisar e selecionar os derivados que não apresentaram citotoxicidade significativa no ensaio de MTT na concentração de 10 μM e também aqueles que apresentaram um efeito máximo significativo na concentração de 100 μM no ensaio contra promastigotas, para a realização do ensaio contra formas amastigotas intracelulares de *L. chagasi*. Os derivados aminoguanidínicos selecionados foram: LQM 2, LQM 3, LQM 6, LQM 8, LQM 9, LQM 18 e LQM 19 e os tiossemicarbazônicos foram LQM 10(1) e LQM 17(1).

Alguns autores demonstraram que um dos mecanismos de compostos guanilidrazônicos é a inibição da síntese de poliaminas (PEGG; MCCANN, 1982; MARQUES et al., 2007). Pode ser devido a essa inibição que os compostos guanilidrazônicos testados estejam apresentando atividade leishmanicida direta.

Britta et al., (2014), observaram que o composto tiossemicarbazônico 4-Nitrobenzaldeído que o mesmo era capaz de causar disfunção mitocondrial e danos devido ao estresse oxidativo.

5.3 Ensaio de infecção de macrófagos com *Leishmania chagasi*

O ensaio contra formas amastigotas é o experimento *in vitro* padrão-ouro para a busca de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose, tendo em vista que nesse ensaio o parasito se encontra na forma intracelular, forma esta que é a encontrada no hospedeiro mamífero (WHO, 2014b).

Nesse ensaio, foi visto que apenas o derivado aminoguanidínico LQM 19 e o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) apresentaram atividade leishmanicida estatisticamente significativa contra as formas amastigotas intracelulares de *L. chagasi*, com CI_{50} de $4,9 \pm 0,8$ e $2,2 \pm 1,8 \mu\text{M}$, respectivamente, e efeito máximo de $63,8 \pm 0,4 \%$ e $66,4 \pm 4,1 \%$, respectivamente, podendo ser comparados com a pentamidina que apresentou CI_{50} de $4,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ e efeito máximo de $67,3 \pm 2,2 \%$ (Tabela 3).

TABELA 3- Efeito dos derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade de amastigotas de *Leishmania chagasi* após 48 horas de tratamento.

Tratamento	<i>Leishmania chagasi</i>	
	CI_{50}^a	EM ^b
Pentamidina	$4,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$	$67,3 \pm 2,2^{***}$
LQM 02	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 03	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 06	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 08	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 09	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 10(1)	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 17(1)	$2,2 \pm 1,8 \mu\text{M}$	$66,4 \pm 4,1^{***}$
LQM 18	$>10 \mu\text{M}$	NA
LQM 19	$4,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$	$63,8 \pm 0,4^{***}$

Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória a 50% de formas amastigotas (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média \pm erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média do citotoxicidade máxima \pm erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando $***p < 0,01$ em relação ao grupo DMSO 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para promastigotas de *L. chagasi* até a concentração de $10 \mu\text{M}$ em relação ao grupo DMSO.

Fonte: AUTORA, 2015.

Alguns autores também demonstraram que, além da atividade contra formas promastigotas, os compostos tiossemicarbazônicos são capazes de atuar contra a forma intracelular do parasito, como Britta et al., (2014) que demonstraram que o 4-

Nitrobenzaldeído, apresentou atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e registraram que a concentração letal de 50% dos parasitos foi de 7,7 μM .

Raychaudhury et al., (2005) em seu trabalho também demonstraram que o complexo trifenil estanho foi eficiente contra formas amastigotas de *L. donovani*, observando que foi necessária uma concentração de 6 mg/L do composto para se atingir 50% de morte do parasito. O derivado guanilidrazônico LQM 19 apresentou uma CI_{50} de 1,34 mg/L e o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) uma CI_{50} de 0,54 mg/L contra amastigotas de *L. chagasi*.

Estudos também mostram a atividade de compostos que apresentam o grupo guanidina em suas estruturas (derivados aminoguanidínicos e pirimidínicos) contra as formas promastigotas de *Leishmania sp.* Pez et al. (2003), em seu trabalho com as 2,4-Diaminopirimidinas, mostraram que dos dezesseis compostos testados contra a forma intracelular de *L. donovani*, cinco não apresentaram atividade, quatro mostraram atividade com uma concentração superior a 90 μM e sete se mostraram ativos em concentrações abaixo de 70 μM . Kaur et al., (2011) observaram que o pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona apresentou CI_{50} de 3 μM contra amastigotas de *L. donovani*.

Diante dos resultados obtidos, foi observado que o derivado guanilidrazônico LQM 19 apresentou uma alta citotoxicidade frente aos macrófagos da linhagem J774, apresentando uma CL_{50} de $51,3 \pm 2,3 \mu\text{M}$ e uma citotoxicidade máxima de $86,6 \pm 2,3\%$, enquanto que o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) não demonstrou citotoxicidade até a máxima concentração testada (100 μM).

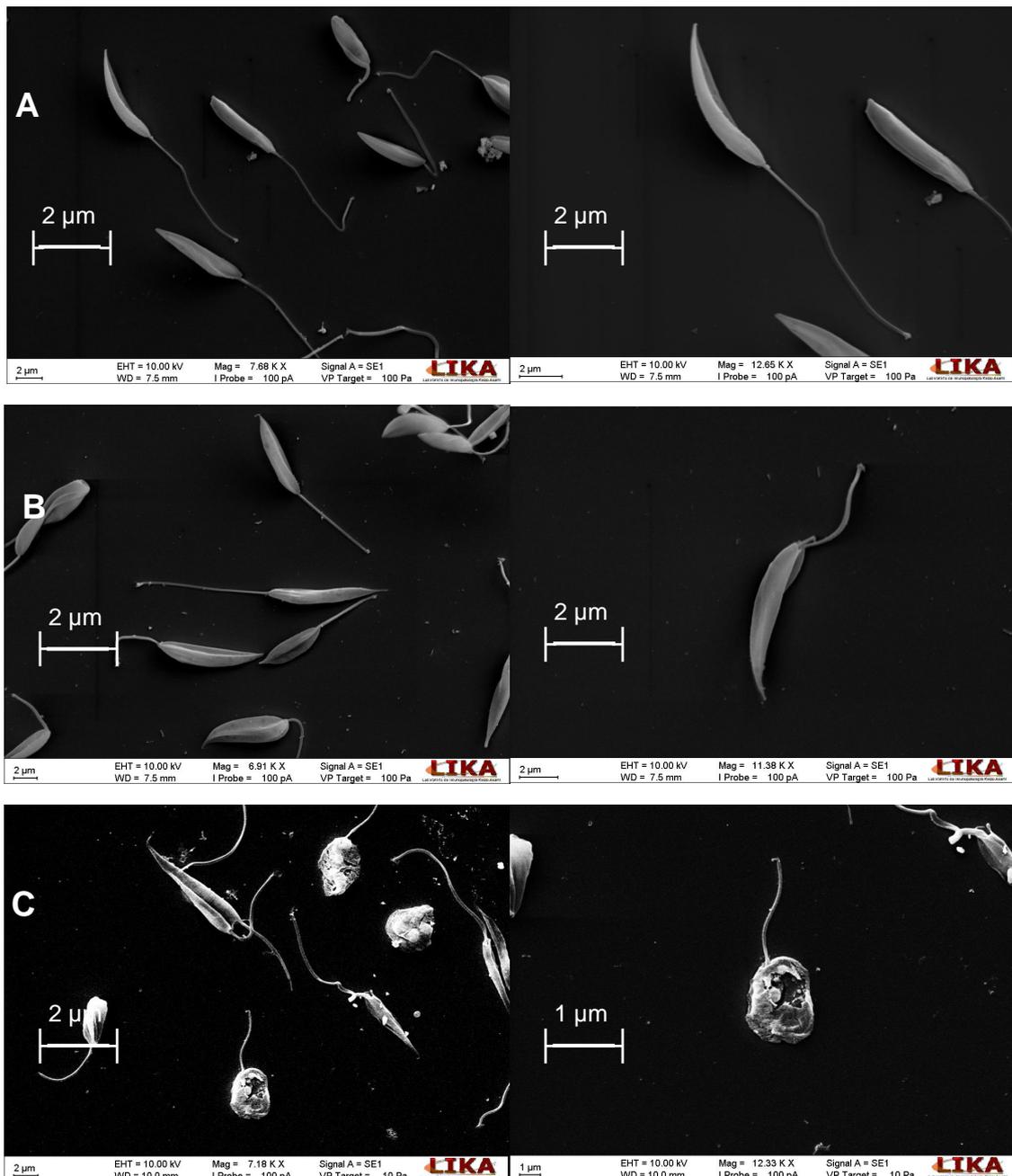
Além disso, no ensaio contra formas promastigota de *L. chagasi* o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) apresentou uma CI_{50} de $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, enquanto o derivado guanilidrazônico LQM 19 apresentou uma CI_{50} de $26,8 \pm 11,5 \mu\text{M}$, ou seja, uma concentração 65 vezes maior para exercer a mesma atividade, eliminar 50% das promastigotas de *L. chagasi* viáveis.

Devido a citotoxicidade apresentada pelo derivado guanilidrazônico LQM 19, observada no ensaio de viabilidade celular com macrófagos da linhagem J774, e pelo resultado obtido no experimento contra formas promastigotas de *L. chagasi*, o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) foi selecionado para a realização da microscopia eletrônica de varredura, para o ensaio de inibição de topoisomerase e também para o experimento *in vivo*.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado para mostrar as alterações sofridas na morfologia das promastigotas de *L. chagasi* após o tratamento com o derivado tiosemicarbazônico. A **Figura 16** mostra o efeito do composto LQM 17(1) na concentração de 10 μM , após 24 horas de tratamento. Nela é possível ver as alterações ultraestruturais observadas nas formas promastigotas do parasito como indicativo de efeito tóxico (**Figura 16 A**), quando comparada com os controles meio de cultura (Schneider's) (**Figura 16 B**) e o DMSO (diluente do derivado) (**Figura 16 C**). As principais alterações observadas são na forma e no tamanho, assim como profundas mudanças na membrana plasmática, com ruptura e perda do conteúdo intracelular.

Figura 16- Micrografia eletrônica de varredura de promastigotas de *L. chagasi*.



A. Controle (*Leishmania chagasi* em meio-Schneider's) B. Controle (*Leishmania chagasi* + DMSO). C. *Leishmania chagasi* tratada com o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) na concentração de 10 μM, após 24 horas de tratamento.

Fonte: AUTORA, 2015.

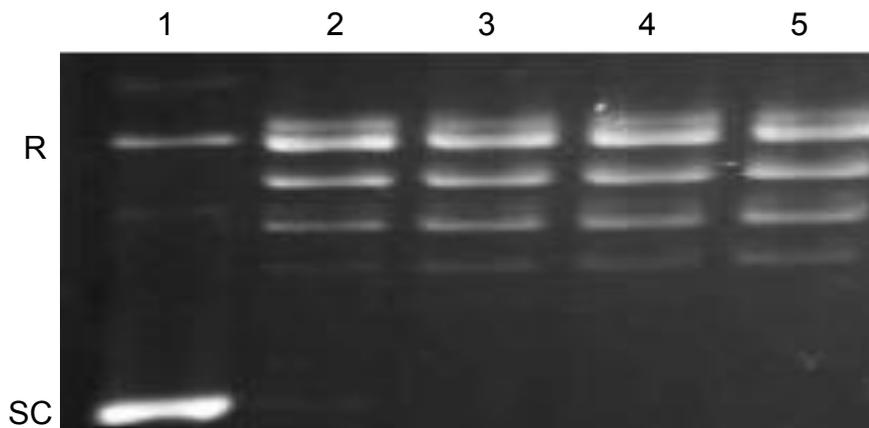
Britta et al., (2014) também observaram em seus estudos com o derivado tiossemicarbazônico, o 4-Nitrobenzaldeído, em promastigotas de *L. amazonensis*, que o mesmo foi capaz de induzir alterações na forma e tamanho do protozoário na concentração de 3,8 μM (CI₅₀).

5.5 Inibição de Topoisomerase

A topoisomerase é uma enzima importante para a manutenção e sobrevivência da *Leishmania*. Tendo em vista, que ela é responsável por manter o DNA em diferentes graus de enovelamento, para que ocorra a transcrição, evitando seu superenovelamento. Dessa forma ela é um alvo para a atuação de compostos leishmanicidas. Pois sua inibição promove um superenrolamento do DNA, evitando os processos de replicação, transcrição e recombinação do DNA (BUGREEV; NEVINSK, 2010).

Foi possível observar na **Figura 17** que o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) não apresentou atividade frente a topoisomerase, descartando assim essa enzima como um possível alvo terapêutico.

Figura 17- Efeito do derivado LQM 17(1) sobre a inibição de topoisomerase recombinante em eletroforese de gel de agarose.



1 - LdTOPO + Camptotecina (Inibidor de TOPO); 2 - Ld TOPO + LQM 17(1) 0.1 µM; 3 - Ld TOPO + LQM 17(1) 1 µM; 4 - Ld TOPO + LQM 17(1) 10 µM; 5 - Ld TOPO + LQM 17(1) 100 µM.

LEGENDA: R = DNA relaxado; SC = DNA super helicoidal; LdTOPO = Topo Recombinante de *Leishmania*; Derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1).

5.6 Avaliação do efeito do derivado LQM 17(1) no tratamento de *Golden hamsters* (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. chagasi*.

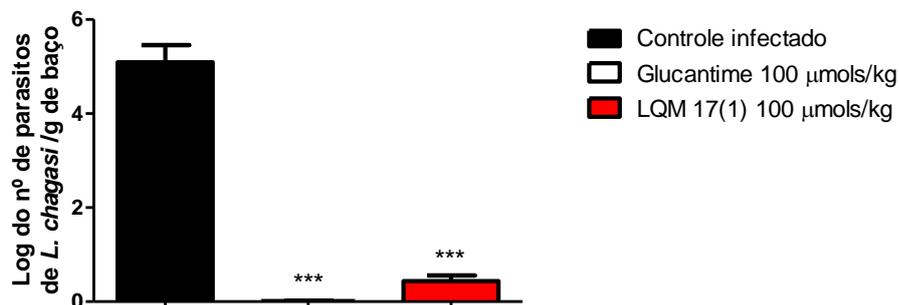
Como foi citado anteriormente, o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) foi selecionado para a realização do ensaio *in vivo*, utilizando-se *Golden hamsters* (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal. Alguns estudos mostram este como sendo o modelo animal mais indicado para infecção com *L. chagasi*, pois mimetiza a

doença canina e humana, apresentando sinais como: hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunodepressão (NIETO et al., 2011; REQUENA et al., 2000).

O antimoniato de N-metil meglumina (Glucantime) foi usado como controle para avaliação *in vivo*, já que é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose (WHO, 2014a).

Nesse ensaio a carga parasitária no baço foi mensurada e foi possível observar que o derivado LQM 17(1) foi capaz de reduzir a carga parasitária de forma estatisticamente significativa, assim como o Glucantime, ambos na concentração de 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, como mostra a **Figura 18**. Essa dose é equivalente a 24,8 mg/kg do derivado LQM 17(1). Não havendo diferença significativa entre os grupos que receberam tratamento com o fármaco-padrão e o derivado LQM 17(1).

Figura 18- Efeito *in vivo* do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a carga parasitária do baço de *Golden hamsters* infectados com *L. chagasi*.



Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $***p < 0,001$ versus o grupo controle infectado.

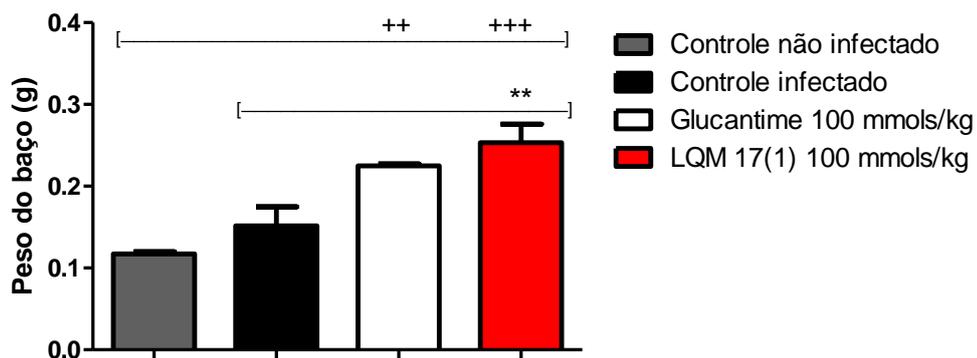
Fonte: AUTORA, 2015.

Raychaudhury et al., (2005) em seus estudos com complexo trifenil estanho observaram que uma dose de 20 mg/kg por via intramuscular (duas vezes por semana, por trinta dias), reduziu 96% da carga parasitária do baço de *hamsters*, infectados com *L. donovani*.

O peso do baço dos hamsters infectados também foi analisado e foi observado que o derivado LQM 17(1) induziu aumento do baço de forma estatisticamente significativa quando comparado com os controles infectado e não infectado (**Figura**

19), ao contrário do tratamento com o Glucantime (**Figura 19**). Além disso, não houve diferença estatística significativa entre o Glucantime e o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) (**Figura 19**). De acordo com Silva (2008), o aumento do baço pode ser um indicativo do aumento da função do sistema imune, mas também pode ser indicativo de toxicidade.

Figura 19- Efeito do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre o peso do baço de Golden hamsters infectados com *L. chagasi*.



Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando ** $p < 0,01$ versus o grupo controle infectado e quando ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ versus o grupo controle não infectado.

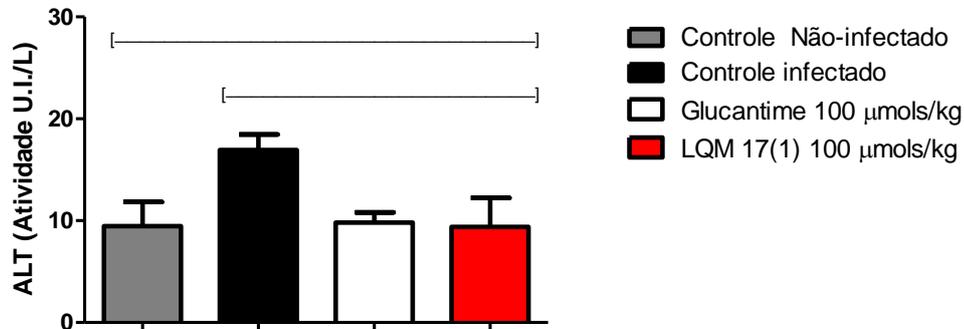
Fonte: AUTORA, 2015.

Neste ensaio também foi observado que o derivado LQM 17(1) não aumentou as enzimas hepáticas ALT e AST dos hamsters infectados, quando comparados com os controles infectado e não infectado, assim como o Glucantime (**Figura 20 A e 20 B**).

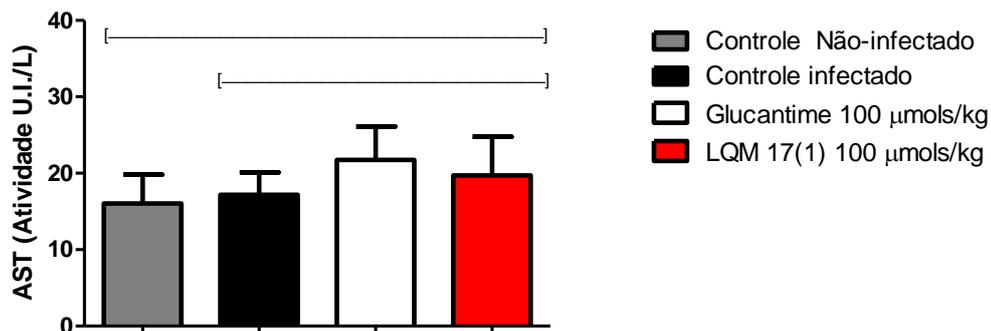
Segundo Wang et al. (2012), a quantificação das enzimas séricas é uma ferramenta bastante útil no diagnóstico clínico, pois fornece informações sobre danos patológicos. A enzima alanina aminotransferase (ALT) é específica do fígado, então níveis elevados no plasma sugere dano hepatobiliar. Já o aumento de aspartato aminotransferase (AST) no soro pode estar relacionado com danos cardíacos, hepáticos, ou da musculatura esquelética (WANG et al, 2012). Assim, podemos inferir que não ocorreram danos hepáticos estatisticamente significantes nos animais tratados como derivado. Tendo em vista que não ocorreram alterações das enzimas ALT e AST.

Figura 20- Efeito *in vivo* do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a atividade das enzimas hepáticas ALT e AST em *Golden hamsters* infectados com *L. chagasi*.

A



B



A- ALT; B- AST. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle infectado e quando $+p < 0,05$ versus o grupo controle não infectado.

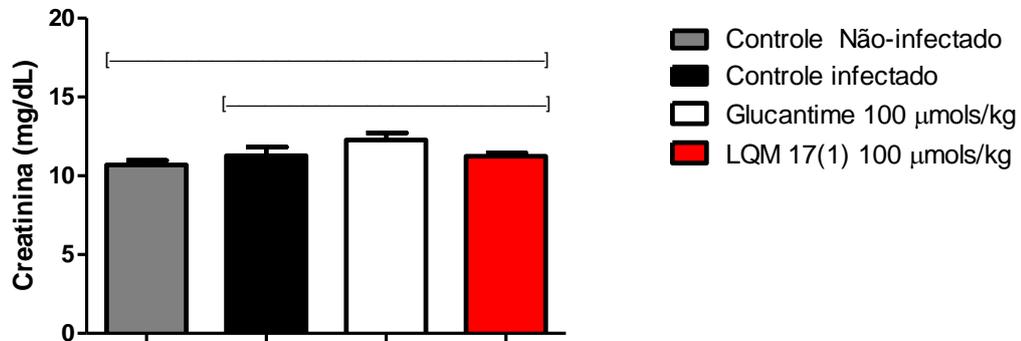
Fonte: AUTORA, 2015.

Raychaudhury et al., (2005) viram que o tratamento com o complexo trifeníl estanho também não aumentou os níveis séricos de ALT e AST dos *hamsters* infectados com *L. donovani*.

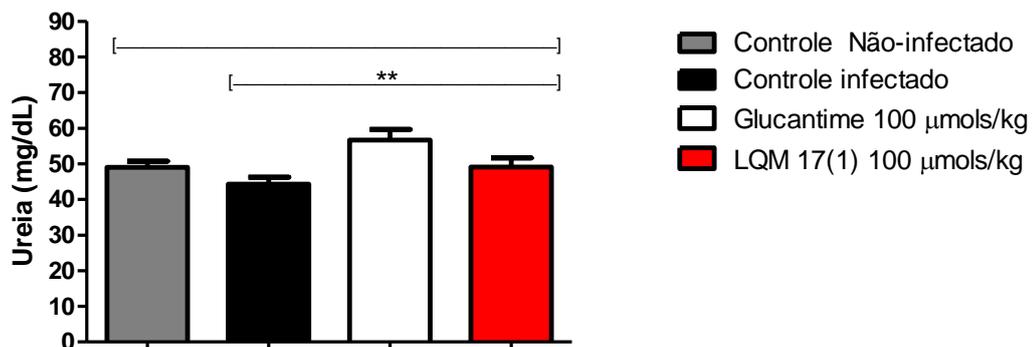
Também no ensaio *in vivo* foi possível dosar creatinina e ureia. Foi observado que o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) não alterou significativamente os níveis destes metabólitos quando comparado com os controles infectado e não infectado (**Figura 21 A e 21 B**). Já o Glucantime aumentou a concentração de ureia quando comparado com o controle infectado (**Figura 21 B**).

Figura 21- Efeito *in vivo* do derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) sobre a atividade de creatinina e ureia em *Golden hamsters* infectados com *L. chagasi*.

A



B



A- Creatinina; B- Ureia. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $**p < 0,01$ versus o grupo controle infectado e quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle não infectado.

Fonte: AUTORA, 2015.

De acordo com Bellomo, Kellum e Ronco (2012), o acúmulo de produtos finais do metabolismo do nitrogênio, como ureia e creatinina é indicativo de dano renal. Assim, podemos mensurar que não ocorreram alterações estatisticamente significantes nos grupos tratados com o derivado LQM 17(1).

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que dos vinte derivados aminoguanidínicos, apenas quatro não apresentaram citotoxicidade para os macrófagos até a máxima concentração testada (100 μ M), LQM 3, LQM 4, LQM 11 e LQM 16, e dos três derivados tiossemicarbazônicos apenas o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) não mostrou efeito deletério para as células da linhagem J774;

Alguns derivados apresentaram uma potente atividade contra promastigotas de *L. chagasi* destacando-se os derivados aminoguanidínicos LQM 5, LQM 8, LQM 10, LQM 14 e LQM 17, e os três derivados tiossemicarbazônicos LQM 10(1), LQM 14(1) e LQM 17(1) que apresentaram CI_{50} abaixo de 10 μ M e efeito máximo acima de 90%;

O derivado aminoguanidínico LQM 19 e o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1) foram os únicos que apresentaram atividade contra formas amastigotas de *L. chagasi*, ambos acima de 60%, quando testados na concentração de 10 μ M;

O derivado LQM 17(1) foi capaz de causar modificações no tamanho e na forma de promastigotas de *L. chagasi* (MEV);

Foi visto também que o derivado LQM 17(1) não exerceu atividade sobre topoisomerase de *Leishmania*. Descartando dessa forma a inibição dessa enzima como alvo do derivado LQM 17(1).

Além disso, o derivado LQM 17(1) apresentou efeito sobre o curso da infecção no baço de *Golden hamsters* infectados com *L. chagasi* (100 μ mol/kg/dia/15 dias (i.p.)), sem alterar as enzimas hepáticas (AST e ALT), creatinina e ureia, alterando ainda o tamanho do baço de forma estatisticamente significativa, podendo ser um indicativo de substância imunoestimuladora ou de toxicidade.

Diante do exposto, é válido aprofundar os estudos com o derivado tiossemicarbazônico LQM 17(1), avaliando outros alvos terapêuticos e também sua sua atividade sobre outras espécies de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE, J.; PROFFIT, R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 49, p. 21-30, 2002.

AHMED, N. et al. Synthesis and biological evaluation of tricyclic guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities. **Chemical Biology and Drug Design.** p. 491-498, 2012.

AMATO, V. S. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study. **Int. J. Infect. Dis.** v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000.

ANDREANI, A. et al. Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo[2,1-b]thiazole guanyldrazones. **Bioorg. Med. Chem.** v.8, n.9, p.2359–2366, 2000.

ANTOINE, J. G. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* – infected macrophages maintain an acid pH. **Infection and Immunity.** v. 58, p. 779-787, 1990.

ARTHUR, G.; BITTMAN R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. **Acta. Biochim. Biophys.** v. 1390, p. 85-102, 1998.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol.** v. 56, p. 143–153, 2007.

ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1820, p. 1354-1365, 2012.

ÁVILA, J.L et al. Specific inhibitory effect of 3-deazaneplanocin A against several *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* strains. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 57, n. 4, p. 407-412, 1997.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO, R. A. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases.** v. 154, p. 639-649, 1986.

BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 2603–2612, 2009.

BARBIÉRI C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 28, p. 329–337, 2006.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature.** v. 420, p. 502–507, 2002.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet**, v. 380, p. 756-766, 2012.

BERALDO H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quím. Nova**, n. 27, v. 3, p. 461-469, 2004.

BERMAN, J.D. Human Leishmaniasis: Clinica, Diagnosis, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clin. Infect. Dis.** v.24,n. 4, p. 684-703, 1997.

BIOPARASITOLOGIA. Disponível em:
<https://sites.google.com/site/bioparasitologia2/leishimaniase--video>. Acessado em: 12 de Janeiro de 2015.

BORGES, M.N.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers.** v.62, n.1, 9–14, 2001.

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **B.M.C. Microbiology**, v. 14, p.236, 2014.

BRZOZOWSKI, Z.; SACZEWSKI, F.; SLAWINSKI, J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents. **Eur. J. Med. Chem.** v. 42, p. 1218-1225, 2007.

BUGREEV, D. V.; NEVINSK, G. A. The Structure and Mechanism of the Action of Type-IB DNA Topoisomerases. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry.** v. 36, n. 3, p. 269–286, 2010.

CDC. Disponível em: [http: <www.dpd.cdc.gov/dpdx>](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx) Acesso em 27 de dezembro de 2014.

CHAI, Y. Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **J. Inorg. Biochem.** v. 99, p. 2257-2263, 2005.

CHAN, M. M.; ADAPALA, N.; CHEN, C. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Polarization of Macrophages in *Leishmania* Infection. **P. P. A. R. Research**, v. 2012, p. 11, 2012.

CHANNOAN, J. Y. BLACKWELL, J. M. A study of sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide II. Possible mechanism involved in protective H₂O₂ scavenging. **Parasitology**. v. 91, p. 207-217, 1985.

CHIPELEME, A. et al. Synthesis and biological evaluation of phenolic Mannich bases of benzaldehyde and (thio)semicarbazone derivates against the cysteine protease falcipain-2 and a chloroquine resistant strain of *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic. Med. Chem.** v. 1, n. 15, p. 273-282, 2007.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **TRENDS in Parasitol.** v.19, n.11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, p. 111–126, 2006.

DA-CRUZ, A.; PIRMEZ, C. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Editor José Rodrigues Coura – Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp: 697-712, 2005.

DENISE, H. et al. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. **BMC Mol Biol.** v. 7, p. 42-48, 2006.

DEMICHELI, C. et al. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1570, p. 192-198, 2002.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 67, p. 2576–2597, 2012.

EDMONT, D. et al. Synthesis and evaluation of quinoline carboxyguanidines as antidiabetic agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 10, n.16, p.1831-1834, 2000.

EPIFÂNIO, W. **Síntese de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Leishmanioses: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta. Vet. Brasilica**, v.7, n.3, p.193-204, 2013.

FOYE, W. O. et al. Synthesis and biological activity of guanylhydrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **J. Pharm. Sci.** v.79, n.6, p.527–530, 1990.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al., Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.** v.2, p. 11–19, 2012.

FRÉZARD, F. et al. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules.** v. 14, p. 2317-2336, 2009.

GADAD, A. K. et al. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanylhydrazone/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v.35, n.9, p.853–857, 2000.

GAUR, U. et al. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.** v.179, n. 12, p. 8446–8453, 2007.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita Sanitas**, Trindade/Go, v. 1, n . 01, 2007.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.1, p71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v. 26, p. 309–322, 2012.

HERNÁNDEZ, W. et al. Synthesis and characterization of new palladium(ii) thiosemicarbazone complexes and their cytotoxic activity against various human tumor cell lines. **Bioinorg. Chem. Appl.** v. 12, 2013.

HOFFMAN, B. B.; Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN J.G.; LIMBIRD L.E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. Pág. 163-203.

HUSSAIN, R.F.; NOURI, A.M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J. Immunol. Method.** v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

JOCHIM, R. C.; TEIXEIRA, C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. **Trends Parasitol.** v. 25, p. 145–147, 2009.

KAUR, J. et al. *In Silico* Screening, Structure-Activity Relationship, and Biologic Evaluation of Selective Pteridine Reductase Inhibitors Targeting Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents chemother.** v. 55, n. 2, p. 659–666, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R; RIOUX, J, A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée.** v. 66, p.71-74, 1991.

KONSTANDINIDOU, M. et al. Anti-inflammatory properties of diclofenac transition metalloelement complexes. **J. Inorg. Biochem.** v. 70, n. 1, p. 63-9, 1998.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Ann. Rev. Immunol.** v. 27, p. 485–517, 2009.

LARSEN, S. D. et al. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidinoacetic Acid Antidiabetic Agent. **J. Med. Chem.** v.44, n.8, p.1217–1230, 2001.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. Tese (Doutorado em medicina veterinária e zootecnia), USP, São Paulo, 2010.

LERNER, E. A.; SHOEMARK, C. B. Maxadilan, cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **The Journal of Biological Chemistry**. v.26, p. 1062-1066, 1992.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitol. Today**. v. 13, p. 80–82, 1997.

LUX, H. et al. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 111, p. 1-8, 2000.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, p. 344–346, 2005.

MANUAL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília:Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR. A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q. J. Med.** v. 107, p. 7–14, 2014.

MESSEDER, J. C. et al. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.5, n.24, 3079–3084, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica Boletim Epidemiológico. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_leishman.pdf., 2010.

MITROPOULOS, P. et al. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.** p. 309-322, 2010.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **Open Antimicrob. Agents J.**, v. 1, p. 9-19, 2009.

MORAIS-TEIXEIRA, E. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

MOUGNEAU, E. et al. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.** v. 240, p. 286–296, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, R; MADHUBALA, R. Antileishmanial activity of Berenil and Methylglyoxal bis (Guanylhydrazone) and its correlatios with S-Adenosylmethionine na ployamines. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v.27, n. 1, p. 55-59, 1995.

NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: *BALB/c* mouse versus *syrian hamster* model. **Vet. Res.** v. 42, n. 39, 2011.

NUNES, M.P. et al. Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieue. **Micro Infect.** v.7, n. 1, p. 78-85, 2005.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta. Tropica**, v.118, p 87-96, 2011.

PARAMOMICINA: Disponível em:

<http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/farmacos/paramomicina/qu%C3%ADmica/index.html> Acesso em: 10 de fevereiro de 2015.

PATIL, R. S. et al. Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: A Review. **World J. Publ. Health. Sci.** v.1, n. 1, p. 7-22, 2012.

PEARSON, D. et al. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **Journal of immunology.** v. 131, p. 1994-1999, 1983.

PETERS, C. et al. The Hole of Machophage Receptors in Adhesion and Uptake of *Leishmania Mexicana* amastigote. **J. Cell. Sci.** v.108, n.12, p. 3715-3724, 1995.

PETERS, N.; SACKS, D. L. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol. Rev.** v. 213, p. 159–179, 2006.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cell. Microbiol.** v. 11, p. 1290–1296, 2009.

PEZ, D. et al. 2,4-Diaminopyrimidines as Inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal Dihydrofolate Reductase. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, p. 4693–4711, 2003.

PIRES, A.M. et al. Aspectos Imunológicos e Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: UMA REVISÃO. **Rev. Ciênc. Saúde.** v. 14, n. 1, p. 30-39, 2012.

RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Quím. Nova,** v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAYCHAUDHURY, B. et al. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta. Tropica,** v. 95, p. 1–8, 2005.

REIS L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. patol. trop.** v. 35, n. 2, p. 103-115, maio-ago. 2006.

REQUENA, J. M. et al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the *golden hamster* model. **Vet. Immunol. Immunop.** v. 76, p. 269-281, 2000.

RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of new antimalarial drugs—3 guanylhydrazones. **Pharmacology,** v.4, n.1, p.45, 1970.

SACKS D., KAMHAWI S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 55, p. 453-483, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The Immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania Major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.** v. 2, p. 845-858, 2002.

SANTOS-FILHO, O.A.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; ARAÚJO, M.T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 7, n. 13, 1797–1802, 1997.

SILVA, L. C. R. **Efeito do extrato acetato de etila de cocos *nucifera* LINN (palmae) sobre a resposta inflamatória e sobre a resposta imunológica *in vivo*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Tabulação de dados. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acesso em 20 de Setembro de 2014.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.** 10: 307-315, 2004.

SLAMA, D. et al. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides spp.* Dipitera: Ceratopogonidae. **Parasites and Vectors.** v. 7, 2014.

SOARES, R. O. A. **Avaliação da atividade e toxicidade de derivados de tiossemicarbazonas e semicarbazonas contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*.** Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, n. 2, 2004.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 849–854, 2001.

SUNDBERG, R. J. et al. Cationic antiprotozoal drugs—trypanocidal activity of 2-(40-formylphenyl) imidazo[1,2-A]pyridinium guanylhydrazones and related derivatives of quaternary heteroaromatic-compounds. **J. Med. Chem.** v.33, n.1, p.298–307, 1990.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny. In: T.C. Pretlow, T.P. Pretlow (Eds.), Cell Separation: Methods and Selected Applications. **Academic Press.** Nova Iorque, p. 109-145, 1986.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclos de vida da Leishmania**, 1ª edição, Rio de Janeiro, 2013.

TUON, F. F. et al. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. **Infect. Immun.** v.68, n. 3, p. 866-872, 2008.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.** v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

VAN ZANDBERGEN G. et al. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.** v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VECTORBASE. Disponível em:

<<https://www.vectorbase.org/imagegallery/Lutzomyia%20longipalpis>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2014.

WALZER, P. D. et al. Guanyldrazones in Therapy of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Immunosuppressed Rats. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 38, n.11, p. 2572-2576, 1994.

WANASEN, N; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol. Res.** v. 41, n. 1, p. 15–25, 2008.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.** v.279, p. 39925–39932, 2004.

WANG, Y. et al. Evolution of *in vivo* Antioxidant and Immunity Enhancing Activities of Sodium Aecinate Injection Liquid. **Mol.**, v.17, p. 10267-10275, 2012.

WEINRAUCH, Y. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. **Nature**, v. 417, p. 91–94, 2002.

WHOa. Disponível em:

<http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 26 de dezembro de 2014.

WHOb. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2014.

ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol.** v. 31, p. 810–814, 2001.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 56/2014

TÍTULO: Desenvolvimento de protótipos de fármacos leishmanicidas a partir de produtos naturais, derivados semi-sintéticos e/ou sintéticos

RESPONSÁVEL: Magna Suzana Alexandre Moreira

OBJETIVO: Visa à obtenção de protótipos que representem uma nova estratégia terapêutica contra doenças negligenciadas com características multifatoriais, com comprometimento imune e/ou infeccioso.

JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):

A pesquisa proposta é de relevada importância científica apresentando justificativas plausíveis para a utilização de animais. O projeto ressubmetido atendeu a todas as solicitações do parecer consubstanciado.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 15-03-2015 a 30-05-2015

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Hamster	Syrian Golden	72

Maceió, 12 de fevereiro de 2015.

Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858