



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

**JOÃO FLÁVIO MONTEIRO SILVA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE DERIVADOS FTALIMIDO-1,4-  
NAFTOQUINONAS E FTALIMIDO-1,2,3-TRIAZOLIL-1,4-NAFTOQUINONAS**

**MACEIÓ-AL**

**2018**

**JOÃO FLÁVIO MONTEIRO SILVA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE DERIVADOS FTALIMIDO-1,4-  
NAFTOQUINONAS E FTALIMIDO-1,2,3-TRIAZOLIL-1,4-NAFTOQUINONAS**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magna Suzana Alexandre Moreira

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Morgana Vital de Araújo

**MACEIÓ - AL**

**2018**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586a Silva, João Flávio Monteiro.  
Avaliação do potencial de leishmanicida de derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas e ftalimido-1,2,3-triazolil-1-4-naftoquinonas / João Flávio Monteiro Silva. – 2018.  
69 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientador: Morgana Vital de Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 58-69.

1. Leishmaniose. 2. Derivados de 1,4-Naftoquinonas. 3. Atividade leishmanicida.  
I. Título.

CDU: 616.993.161



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, 5/N  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

João Flávio Monteiro Silva

Avaliação do potencial leishmanicida de derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas e ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 02 de março de 2018.

### Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Camila Braga Dornelas - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Tânia Maria Sarmiento Silva - (UFRPE)

## AGRADECIMENTOS

O que possibilitou grandes feitos à humanidade foi sua capacidade de cooperação. Executar esse trabalho deixou claro isso para mim. Nada aqui seria possível sem a cooperação assídua de algumas pessoas e o apoio constante de outras, às quais sou profundamente grato. À Profa. Dra. *Magna Suzana Alexandre Moreira*, orientadora desse trabalho, pela confiança depositada, pelo espírito científico, afinal “só muda de opinião quem tem uma”, por toda atenção tão valiosa e conselhos durante essa etapa, e além de tudo, por ser a pessoa mais de bem com a vida que eu conheço, sempre te deixando confortável mesmo nos dias mais difíceis. À Dra. *Morgana Vital de Araújo*, co-orientadora desse trabalho, que nunca mediu esforços para que tudo desse certo, sempre acompanhando de perto. Nunca vou esquecer seu esforço e positividade. Ao doutorando *Anderson Brandão Leite*, um dos alicerces desse grupo cujo auxílio técnico e pessoal foi imprescindível para a execução desse trabalho. A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, em especial a *Max, Kaycke, Mariana, Karoline, Rafael, Amanda, Alisson, Camila, Suellen, Gessyca, Marcela, Lyliana, Hilda* e Profa *Eliane*. À *Raquel, Carmelita, Zeca, Fernanda, Maísa, Tamires* e *Noé*, que mesmo em outros laboratórios sempre estavam disponíveis para ajudar quando necessário. Ao coordenador Prof. Dr. *Marcelo Duzzioni*, à vice-coordenadora Profa. Dra. *Adriana Ximenes*, ao secretário *Jhonatan Guedes* e aos demais funcionários do ICBS por todo o suporte. Aos integrantes das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. *Aline Cavalcanti de Queiroz*, Profa. Dra. *Camila Braga Dornelas* e Profa. Dra. *Tânia Maria Sarmiento Silva* pelas contribuições a esse trabalho. A todos os professores que encontrei durante este curso, pela troca de experiências específicas e multidisciplinares, necessárias para um bom pensamento crítico. Finalmente, agradeço à minha família *Socorro, João* e *Flaviane*, por serem o pano de fundo de qualquer conquista que eu venha alcançar.

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”*

Carl Sagan

## RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias de caráter negligenciado que afetam milhões de pessoas, com tratamentos precários devido principalmente à toxicidade e a capacidade de induzir resistência parasitária. Uma das principais estratégias para o aprimoramento da terapia contra as leishmanioses é a descoberta de novos fármacos através da síntese química. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade leishmanicida *in vitro* de derivados de 1,4-naftoquinonas inéditos. A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos da linhagem J774.A1 através do ensaio colorimétrico de MTT e a atividade leishmanicida em culturas de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* através de contagem direta em microscópio óptico. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism. Todos os derivados apresentaram atividade leishmanicida contra *L. chagasi*, e apenas J4Br não foi ativo contra *L. amazonensis*. Foi observada atividade acima de 50% contra *L. amazonensis* para J3Br (63,2 ± 8,2% com Cl<sub>50</sub> 21,8 ± 4,1 µM), J4 (86,4 ± 5,5% com Cl<sub>50</sub> 32,1 ± 15,5 µM), J6 (80,4 ± 7,5% com Cl<sub>50</sub> 57,4 ± 6,9 µM), J6Br (85,0 ± 5,2% com Cl<sub>50</sub> 63,6 ± 11,5 µM), J01.3 (100% com Cl<sub>50</sub> 5,7 ± 0,8 µM), J02.3 (60,9 ± 13,0% com Cl<sub>50</sub> 21,3 ± 16,3 µM) e J03.3 (80,4 ± 7,5% com Cl<sub>50</sub> 8,6 ± 8,4 µM), e contra *L. chagasi* para J3 (58,3 ± 6,8% com Cl<sub>50</sub> 27,8 ± 1,1 µM), J4 (89,6 ± 4,1% com Cl<sub>50</sub> 20,0 ± 4,8 µM), J6Br (58,3 ± 8,3% com Cl<sub>50</sub> 89,5 ± 10,3 µM), J01.3 (100% com Cl<sub>50</sub> 7,3 ± 0,5 µM) e J03.3 (89,5 ± 4,1% com Cl<sub>50</sub> 8,1 ± 0,3 µM). Os derivados J3Br, J4Br e J02.3 não apresentaram toxicidade aos macrófagos, enquanto que J3 e J4 apresentaram toxicidade abaixo de 50% e J6, J6Br, J01.3 e J03.3 acima de 50%. Os derivados mostraram-se moléculas promissoras quanto a sua atividade leishmanicida, porém, aspectos relacionados com a toxicidade dessas substâncias ainda precisam ser aprimorados.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected parasitic diseases that affect millions of people, with poor treatment due mainly to toxicity and the ability to induce parasitic resistance. One of the key strategies for improving leishmaniasis therapy is the discovery of new drugs through chemical synthesis. The objective of this work was to investigate the in vitro leishmanicidal activity of unpublished 1,4-naphthoquinone derivatives. Cytotoxicity was evaluated in macrophages of lineage J774.A1 through the MTT colorimetric assay and leishmanicidal activity in *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigotes cultures by direct counting under an optical microscope. Statistical analyzes were performed in the GraphPad Prism program. All the derivatives showed leishmanicidal activity against *L. chagasi*, and only J4Br was not active against *L. amazonensis*. It was observed activity above 50% against *L. amazonensis* for J3Br ( $63.2 \pm 8.2\%$  with  $IC_{50} 21.8 \pm 4.1 \mu M$ ), J4 ( $86.4 \pm 5.5\%$  with  $IC_{50} 32.1 \pm 15.5 \mu M$ ), J6 ( $80.4 \pm 7.5\%$  with  $IC_{50} 57.4 \pm 6.9 \mu M$ ), J6Br ( $85.0 \pm 5.2\%$  with  $IC_{50} 63.6 \pm 11.5 \mu M$ ), J01.3 (100% with  $IC_{50} 5.7 \pm 0.8 \mu M$ ), J02.3 ( $60.9 \pm 13.0\%$  with  $IC_{50} 21.3 \pm 16.3 \mu M$ ) and J03.3 ( $80.4 \pm 7.5\%$  with  $IC_{50} 8.6 \pm 8.4 \mu M$ ), and against *L. chagasi* for J3 ( $58.3 \pm 6.8\%$  with  $IC_{50} 27.8 \pm 1.1 \mu M$ ), J4 ( $89.6 \pm 4.1\%$  with  $IC_{50} 20.0 \pm 4.8 \mu M$ ), J6Br ( $58.3 \pm 8.3\%$  with  $IC_{50} 89.5 \pm 10.3 \mu M$ ), J01.3 (100% with  $IC_{50} 7.3 \pm 0.5 \mu M$ ) and J03.3 ( $89.5 \pm 4.1\%$  with  $IC_{50} 8.1 \pm 0.3 \mu M$ ). Derivatives J3Br, J4Br and J02.3 showed no toxicity to macrophages, whereas J3 and J4 had toxicity below 50% and J6, J6Br, J01.3 and J03.3 above 50%. The derivatives have shown promising molecules for their leishmanicidal activity, however, aspects related to the toxicity of these substances still need to be improved.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Huaco de cerâmica exibindo mutilações faciais semelhantes às da LMC.<br>.....  | 17 |
| <b>Figura 2</b> - Distribuição geográfica das leishmanioses no ano de 2013. (A) LT; (B) LV.<br>.....   | 19 |
| <b>Figura 3</b> - Casos de leishmaniose no Brasil no período de 1980 a 2015. (A) LT; (B) LV.....   | 20 |
| <b>Figura 4</b> - Classificação das espécies causadoras das leishmanioses em mamíferos.<br>.....   | 21 |
| <b>Figura 5</b> - Manifestações clínicas comuns da LT: (a) LC, (b) LCD e (c) LMC.....  | 22 |
| <b>Figura 6</b> - Manifestações clínicas da LV: (a) indivíduo apresentando esplenomegalia; (b) indivíduo apresentando PKDL. ....                         | 23 |
| <b>Figura 7</b> - O ciclo evolutivo de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . ....  | 24 |
| <b>Figura 8</b> - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> : (a) Promastigota e (b) Amastigota intracelular.....   | 25 |
| <b>Figura 9</b> - Adesão e fagocitose de promastigota de <i>Leishmania</i> por macrófagos. ...   | 28 |
| <b>Figura 10</b> - Interações entre os parasitos e as células do sistema imune. ....   | 29 |
| <b>Figura 11</b> - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes. ....   | 32 |
| <b>Figura 12</b> - Estrutura química da pentamidina.....   | 33 |
| <b>Figura 13</b> - Estrutura química da anfotericina B. ....   | 34 |
| <b>Figura 14</b> - Estrutura química da miltefosina. ....  | 36 |
| <b>Figura 15</b> - Estrutura química da paramomicina.....  | 37 |
| <b>Figura 16</b> - Estrutura química da sitamaquina.....   | 38 |
| <b>Figura 17</b> - Estrutura básica das naftoquinonas. (A): 1,2-naftoquinonas; (B): 1,4-naftoquinonas.....   | 40 |
| <b>Figura 18</b> - Grupos utilizados para a síntese dos derivados: (A) ftalimida; (B) triazol.....   | 42 |
| <b>Figura 19</b> - Derivados com atividade acima de 50% apenas contra <i>L. amazonensis</i> . LA – <i>L. amazonensis</i> ; LC – <i>L. chagasi</i> . .... | 58 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Estruturas químicas das ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) .....42
- Tabela 2** - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) em macrófagos J774.A1 (ensaio de MTT) .....49
- Tabela 3** - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) contra formas promastigotas de *L. amazonensis* .....50
- Tabela 4** - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) contra formas promastigotas de *L. chagasi*.....51
- Tabela 5** - Índice de seletividade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) para macrófagos x *L. amazonensis* e para macrófagos x *L. chagasi* .....53

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>ATP</b>                     | “Trifosfato de Adenosina” do inglês “Adenosine Triphosphate”                           |
| <b>CD</b>                      | “Células dendríticas”  |
| <b>CD4+</b>                    | “Grupamento de diferenciação 4 ativado” do inglês “Cluster of Differentiation”         |
| <b>CR1</b>                     | “Receptor de complemento tipo 1” do inglês “Complement Receptor”                       |
| <b>CR3</b>                     | “Receptor de complemento tipo 3” do inglês “Complement Receptor”                       |
| <b>DNA</b>                     | “Ácido desoxirribonucleico” do inglês “Deoxyribonucleic Acid”                          |
| <b>DTNs</b>                    | “Doenças Tropicais Negligenciadas”   |
| <b>Fc</b>                      | “Porção Cristalizável dos anticorpos” do inglês “Fragment Crystallizable”              |
| <b>FnR</b>                     | “Receptor de fibronectina” do inglês “Fibronectin Receptor”                            |
| <b>GP63</b>                    | “Glicoproteína de 63 kDa”  |
| <b>IgG</b>                     | “Imunoglobulina G”   |
| <b>HIV</b>                     | “Vírus da Imunodeficiência Humana” do inglês “Human Immunodeficiency Virus”            |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | “Interferon gama”  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | “Interleucina-1 beta”  |
| <b>IL-10</b>                   | “Interleucina-10”  |
| <b>IL-4</b>                    | “Interleucina-4”   |
| <b>IL-12</b>                   | “Interleucina-12”  |
| <b>iNOS2</b>                   | “Óxido nítrico sintase induzível tipo 2” do inglês “Nitric Oxide Synthase (inducible)” |
| <b>KDa</b>                     | “quilo Daltons”  |
| <b>LC</b>                      | “Leismaniose Cutânea”  |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>LCD</b>                    | “Leismaniose Cutânea Difusa”  |
| <b>LMC</b>                    | “Leismaniose Mucocutânea”   |
| <b>LPG</b>                    | “Lipofosfoglicanos”   |
| <b>LT</b>                     | “Leismaniose Tegumentar”  |
| <b>LV</b>                     | “Leismaniose Visceral”  |
| <b>M1</b>                     | “Macrófagos ativados na via clássica 1”   |
| <b>M2</b>                     | “Macrófagos ativados na via alternativa 2”  |
| <b>MR</b>                     | “Receptor de manose” do inglês “Manose Receptor”  |
| <b>NADPH</b>                  | “Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida” do inglês<br>“Nicotinamide adenine Dinucleotide phosphate” |
| <b>NET</b>                    | “Armadilha extracelular de neutrófilos” do inglês “Neutrophil<br>Extracellular Traps”                           |
| <b>NO</b>                     | “Óxido Nítrico” do inglês “Nitric Oxide”  |
| <b>OMS</b>                    | “Organização Mundial de Saúde”  |
| <b>pH</b>                     | “Potencial Hidrogeniônico”  |
| <b>PKDL</b>                   | “Leishmaniose Dérmica Pós Calazar” do inglês “Post Kalazar Dermal<br>Leishmaniasis”                             |
| <b>ROS</b>                    | “Espécies Reativas de Oxigênio” do inglês “Reactive Oxygen Species”   |
| <b>Sb<sup>3+</sup></b>        | “Antimônio na forma trivalente “  |
| <b>Sb<sup>5+</sup></b>        | “Antimônio na forma pentavalente”   |
| <b>Th1</b>                    | “Resposta T auxiliar do tipo 1” do inglês “T helper response type 1”  |
| <b>Th2</b>                    | “Resposta T auxiliar do tipo 2” do inglês “T helper response type 2”  |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | “Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ ” do inglês “Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ”                                |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 15 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE LEISHMANIOSE</b> .....                              | 16 |
| <b>2.1 Aspectos históricos</b> .....   | 16 |
| <b>2.2 Aspectos gerais das leishmanioses</b> .....                                   | 18 |
| <b>2.3 Aspectos sobre a interação de <i>Leishmania</i> com o sistema imune</b> ..... | 26 |
| <b>2.4 Tratamento das leishmanioses</b> .....  | 31 |
| 2.4.1 Antimoniais .....  | 31 |
| 2.4.2 Pentamidina .....  | 33 |
| 2.4.3 Anfotericina B .....   | 34 |
| 2.4.4 Miltefosina .....  | 35 |
| 2.4.5 Paramomicina .....   | 36 |
| 2.4.6 Sitamaquina .....  | 37 |
| 2.4.7 Terapias de combinação .....   | 38 |
| <b>3 Aspectos sobre os derivados testados</b> .....                                  | 39 |
| <b>4 OBJETIVOS</b> .....   | 45 |
| <b>4.1 Objetivo geral</b> .....  | 45 |
| <b>4.2 Objetivos específicos</b> .....   | 45 |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 46 |
| <b>5.1 Obtenção dos derivados 1,4-naftoquinonas</b> .....                            | 46 |
| <b>5.2 Manutenção das células</b> .....  | 46 |
| 5.2.1 Culturas de <i>Leishmania</i> .....  | 46 |
| 5.2.2 Culturas de macrófagos .....   | 47 |
| <b>5.3 Ensaio <i>in vitro</i></b> .....  | 47 |
| 5.3.1 Determinação da viabilidade celular .....                                      | 47 |
| 5.3.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas .....                                   | 47 |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>5.4 Análise estatística .....</b> | <b>48</b> |
| <b>6 RESULTADOS.....</b>             | <b>49</b> |
| <b>7 DISCUSSÃO .....</b>             | <b>54</b> |
| <b>8 CONCLUSÃO .....</b>             | <b>60</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>              | <b>61</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são doenças que se desenvolvem comumente em ambientes quentes e úmidos, em regiões populosas como em países emergentes, carecem de medidas mais efetivas de controle, causam expressivo prejuízo socioeconômico e afetam milhões de pessoas pelo mundo. Entre as DTNs destacam-se as leishmanioses, um grupo heterogêneo de doenças parasitárias de caráter antropozoonótico endêmicas em 98 países, com mais de 300 mil casos registrados por ano (WHO, 2015).

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* considerados parasitas humanos por conseguirem realizar seu estágio de desenvolvimento intracelular obrigatório em nossas células, consumindo seus nutrientes enquanto se prolifera, levando-as à morte. Tais células podem compor órgãos importantes, como pele, fígado, baço ou medula óssea, que têm então seu funcionamento comprometido pelo parasitismo, gerando importantes danos à saúde (SANGSHETTI et al., 2015).

Por depender da capacidade de resposta do sistema imune, as leishmanioses podem ser assintomáticas. Porém, em casos de maior susceptibilidade, como acontece em indivíduos desnutridos, sob uso de agentes imunodepressores ou infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), as leishmanioses podem apresentar-se como doenças oportunistas, sendo nesses casos extremamente debilitantes e até letais (MONGE-MAILLO, 2016).

O tratamento das leishmanioses consiste principalmente no uso de compostos antimoniais, como o antimoniato de meglumina. Outros fármacos, como pentamidina e anfotericina B também possuem atividade leishmanicida, e por isso também podem ser utilizados em tratamentos alternativos. No entanto, a atual farmacoterapia possui restrições que acabam limitando sua aplicação, como a elevada toxicidade traduzida em efeitos adversos graves durante o tratamento, a capacidade em desenvolver resistência aos parasitos gerando cepas de difícil combate e muitas vezes recidiva da doença, a ausência de tratamentos efetivos por via oral que melhorem a adesão ao tratamento e o alto custo que gera prejuízos socioeconômicos principalmente para os países em desenvolvimento (SANGSHETTI et al., 2015; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Por conta dessas restrições, as leishmanioses se mantêm como doenças carentes de métodos mais efetivos e seguros de tratamento. O desenvolvimento de tais métodos têm sido o objetivo de vários nichos de pesquisa ao redor do mundo. Dada a importância atual da síntese de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos, a investigação do potencial leishmanicida de compostos sintéticos pode representar um caminho promissor para o aprimoramento da farmacoterapia contra as leishmanioses.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE LEISHMANIOSE**

### **2.1 Aspectos históricos**

As doenças parasitárias são registradas desde tempos remotos, como sugerem elementos gráficos milenares do Egito, Ásia e Europa. Durante suas migrações por todo o mundo ao longo do tempo, o homem adquiriu e disseminou inúmeras espécies capazes de parasitá-los, e atualmente cerca de 90 espécies são consideradas parasitas humanos (COX, 2002).

Dentre as doenças parasitárias humanas mais antigas estão as leishmanioses, causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. Existem várias descrições das doenças nos povos antigos, como papiros egípcios de até 5 mil anos atrás descrevendo doenças com sintomas semelhantes à Leishmaniose Visceral (LV), ou descrições detalhadas da medicina árabe de feridas características da Leishmaniose Tegumentar (LT) no século X, ou esculturas feitas por civilizações extintas do continente americano aparentemente representando Leishmaniose Muco Cutânea (LMC) (COX, 2002; ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). A figura 1 ilustra um Huaco de cerâmica mochica exibindo mutilações faciais semelhantes as da LMC.

**Figura 1 - Huaco de cerâmica exibindo mutilações faciais semelhantes às da LMC.**



**Fonte: ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003.**

A paleoparasitologia tem trazido novas evidências sobre as relações parasitárias humanas, com grande impacto sobre a leishmaniose (ARAÚJO et al., 2013; NOVO et al., 2016). Técnicas de identificação moleculares, como imunohistoquímica, revelaram a presença de macrófagos infectados com *Leishmania* em amostra proveniente de uma múmia peruana de 6 anos de idade, datada de 800 anos a.C. (NOVO; FERREIRA, 2016). A identificação de DNA de *Leishmania* em amostras provenientes de múmias chilenas utilizando a técnica de PCR (*do inglês Polymerase Chain Reaction*) sugere que a doença já estava presente na região há pelo menos 11 mil anos atrás (COSTA et al. 2009).

A doença adquiriu vários nomes antes da descoberta do seu agente etiológico. A forma tegumentar podia ser chamada de "botão do oriente" no velho mundo ou "úlceras de Bauru" no Brasil, e a forma visceral "calazar" ou "febre dum dum". Esta última era facilmente associada à outras doenças como a malária devido a seus sintomas inespecíficos. Como é amplamente aceito, parasitos do gênero *Leishmania* foram primeiramente vistos por Cunningham em 1885 na Índia, e encontrados em pacientes doentes por Leishman e Donovan em 1900. Desde então, as doenças são genericamente conhecidas como leishmaniose (COX, 2002; BASANO; CAMARGO, 2004).

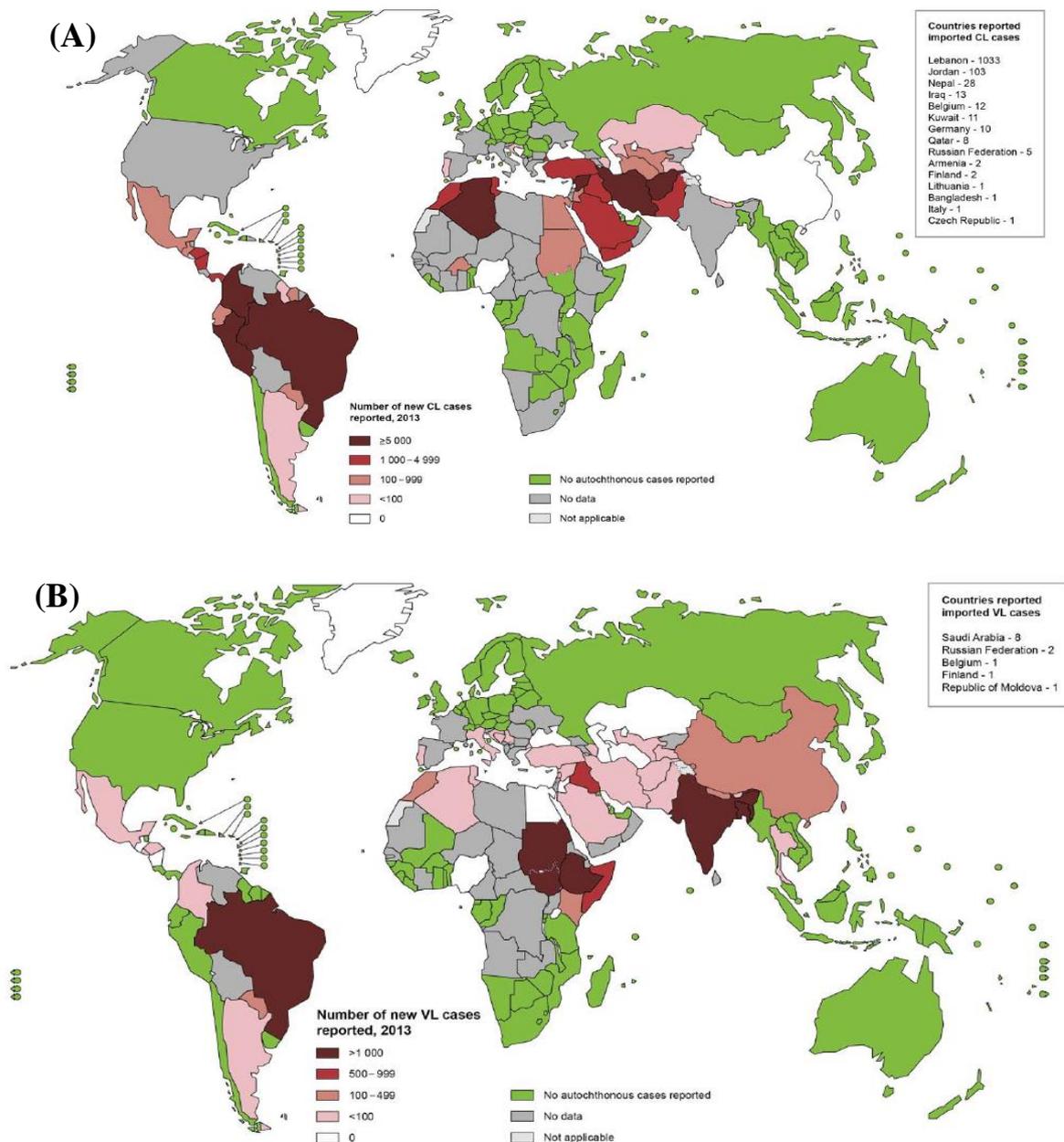
## 2.2 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em 98 países e causam um prejuízo socioeconômico que afeta mais de 1 bilhão de pessoas. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam sob risco, sendo registrados mais de 300 mil casos por ano. Além disso, as doenças ainda são bastante subnotificadas, o que acaba agravando esse quadro (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu em 2010 as leishmanioses nas "doenças tropicais negligenciadas", grupo de doenças transmissíveis prevalentes em condições tropicais e subtropicais. Nele encontram-se doenças de várias naturezas, a maioria infectocontagiosas, como a hanseníase, doença de chagas, ou chikungunya, e outras como ectoparasitoses ou acidentes com cobras peçonhentas. Por compartilharem características que as tornam negligenciadas, a inclusão das leishmanioses nesse grupo se traduz, entre outros aspectos, numa melhor difusão do conhecimento e aprimoramento nos métodos de notificações e controle (WHO, 2015).

As leishmanioses podem ser encontradas nos principais 5 continentes do planeta, e são concentradas em regiões como América do Sul, norte da África, oriente médio e sul da Europa (ALVAR et al., 2012). A figura 2 ilustra a distribuição geográfica da LT (Figura 2A) e da LV (Figura 2B) até o ano de 2013, segundo a OMS.

Figura 2 - Distribuição geográfica das leishmanioses no ano de 2013. (A) LT; (B) LV.

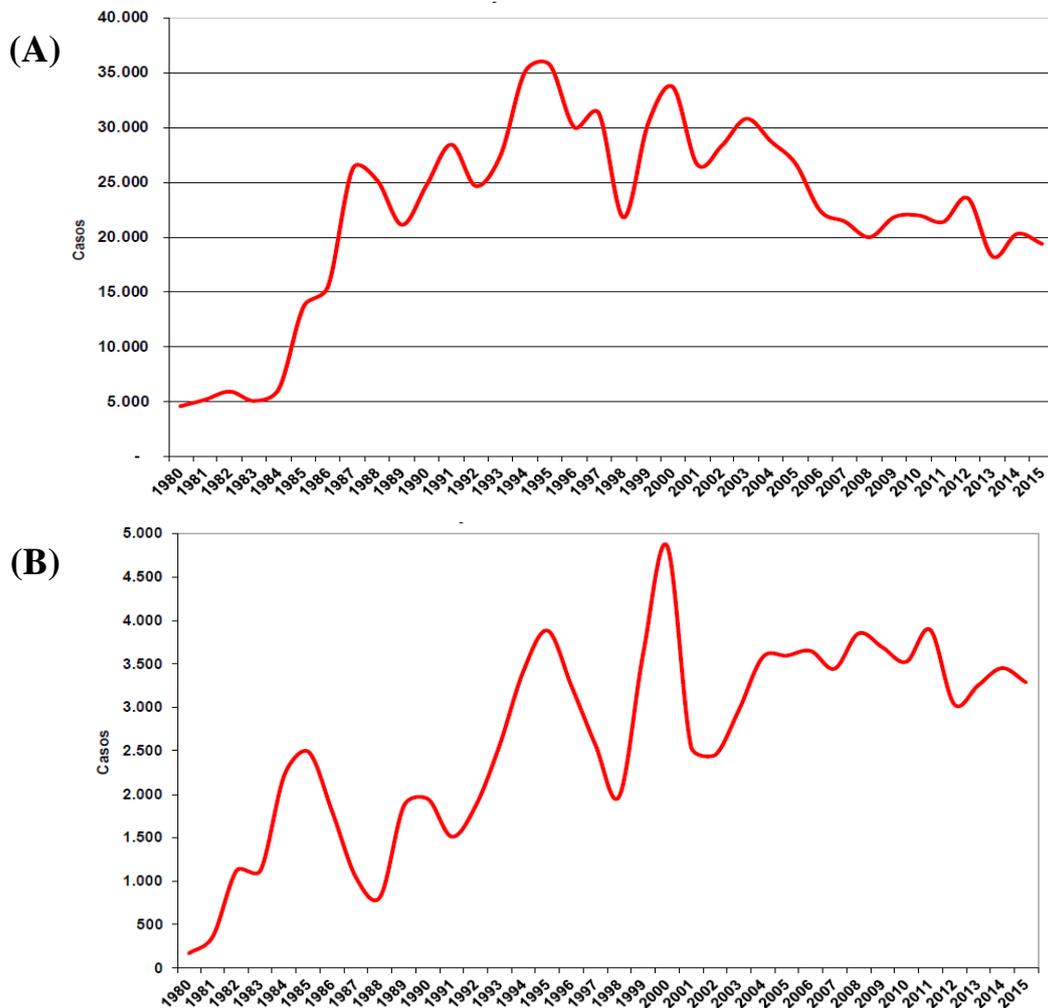


Fonte: Adaptado de WHO, 2015.

As leishmanioses são endêmicas há muito tempo. O Brasil possui o maior número de casos registrados nas américas, e é um dos países mais endêmicos do mundo. A figura 3 representa o número de casos de LT (Figura 3A) e LV (Figura 3B) no Brasil entre os anos de 1980 e 2015, mostrando que tais doenças parasitárias não só sobreviveram ao período de maior desenvolvimento tecnológico da

humanidade, como, pelo menos no Brasil, continuam sem uma tendência clara de redução (SINAM, 2015).

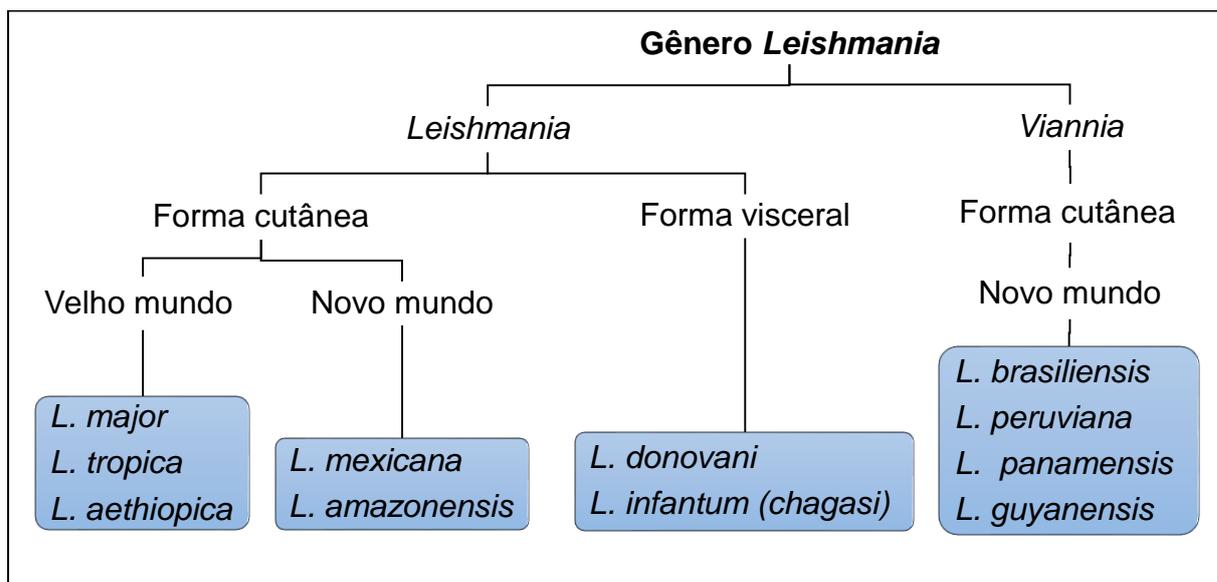
Figura 3 - Casos de leishmaniose no Brasil no período de 1980 a 2015. (A) LT; (B) LV.



Fonte: Adaptado de SINAM, 2015.

Leishmaniose é um termo geral para designar um grupo heterogêneo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que compreende atualmente mais de 20 espécies de protozoários parasitas, das quais cerca de 10 apresentam maior importância clínica, classificadas na figura 4 de acordo com a região onde são registradas e o tipo de leishmaniose associado à espécie (BATES, 2007).

**Figura 4 - Classificação das espécies causadoras das leishmanioses em mamíferos.**



Fonte: adaptado de BATES, 2007.

As leishmanioses são divididas clinicamente em LT, que pode ser causada pela maioria das espécies patogênicas do gênero, e LV, principalmente por *L. donovani* e *L. infantum (chagasi)* devido a seu maior tropismo visceral. De forma menos comum, espécies dermatrópicas também podem desenvolver a forma visceral, como *L. tropica* ou *L. amazonensis*. A forma tegumentar é subdividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; SANGSHETTI et al., 2015).

LC caracteriza-se por nódulos cutâneos que podem gerar lesões ulcerosas com bordas delimitadas localizadas (Figura 5a). LCD é uma variante da LC caracterizada pelo aparecimento lento de nódulos não ulcerosos e desfigurantes na pele (Figura 5b), sem envolvimento visceral, muitas vezes com episódios de relapso, e resistente à quimioterapia convencional (REITHINGER et al., 2007, VERMA et al., 2012). LMC é a forma mais grave, caracterizada por agressivas destruições do tecido mucoso (Figura 5c). Na maioria dos casos essa forma de leishmaniose resulta no espalhamento metastático de *Leishmania (Viannia) brasiliensis* a partir de lesões cutâneas para a mucosa nasal e orogárgica, e a intensa resposta inflamatória pode levar a destruição de cartilagens e tecidos moles faciais (REITHINGER et al., 2007; AMATO et al., 2008).

**Figura 5 - Manifestações clínicas comuns da LT: (a) LC, (b) LCD e (c) LMC.**



**Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.**

Já na LV, ou calazar, os parasitos migram através da circulação sanguínea e linfática para células do sistema retículo endotelial de órgãos como baço, fígado, intestinos, linfonodos e medula óssea. Devido a disseminação visceral é comum a ocorrência de sintomas como esplenomegalia (Figura 6a), ascite, perda de peso e em menor grau hepatomegalia, que são facilmente identificadas ao exame clínico. O comprometimento medular pode levar a anemia, trombocitopenia e neutropenia, que deixam o indivíduo susceptível a co-infecções e hemorragias. Em estágios mais avançados da doença pode haver disfunção hepática e icterícia (MURRAY et al., 2005; VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012). Mesmo após o sucesso no tratamento, a doença pode ainda sofrer recidiva numa forma cutânea crônica (Figura 6b), conhecida como leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL). A gravidade da LV depende da infectividade do parasito e do estado imunológico do indivíduo, porém sem tratamento a doença é potencialmente fatal (VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012).

**Figura 6 - Manifestações clínicas da LV: (a) indivíduo apresentando esplenomegalia; (b) indivíduo apresentando PKDL.**

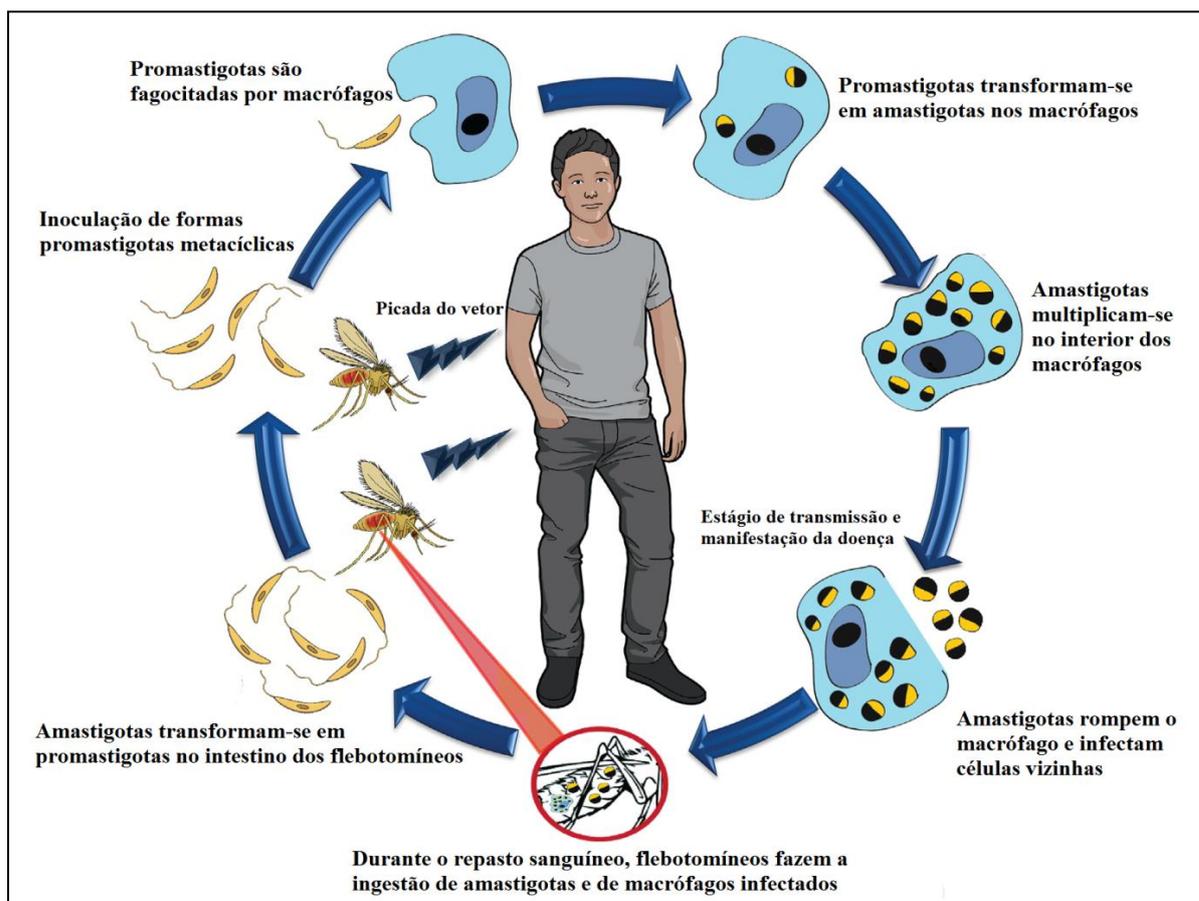


**Fonte: VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012.**

Por ser uma zoonose, a infecção pode acontecer de forma cruzada entre humanos e cães, e estes são considerados os principais reservatórios do parasito. O ciclo evolutivo (Figura 7) depende de dois tipos de hospedeiros: durante o repasto sanguíneo, fêmeas de mosquitos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) infectadas inoculam na derme parasitos *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que têm hábitos intracelulares no hospedeiro mamífero, se diferenciando em amastigotas no interior de macrófagos e outras células fagocíticas, e proliferando-se até se espalharem pela corrente sanguínea, onde estarão disponíveis para infectar novos mosquitos (BATES, 2007; SANGSHETTI et al, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Vale ressaltar que a infecção de novos mosquitos depende da ingestão de células infectadas do hospedeiro e/ou de formas amastigotas livres disponíveis no sangue periférico durante o repasto sanguíneo. Parasitos presentes em células do sistema retículo endotelial de órgãos como fígado e baço na leishmaniose visceral, ou contidos na matriz extracelular e em células da derme na leishmaniose tegumentar, não são acessíveis aos mosquitos (BATES, 2007).

**Figura 7 - O ciclo evolutivo de parasitos do gênero *Leishmania*.**

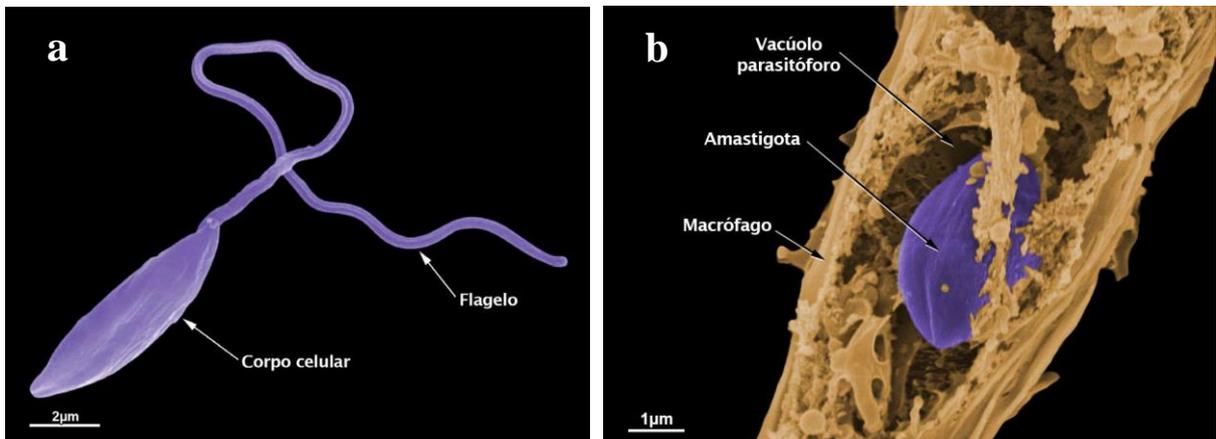


**Fonte: adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.**

O ciclo evolutivo dos parasitos *Leishmania* é heteroxênico, onde há obrigatoriamente a participação do hospedeiro invertebrado (flebotomos) no desenvolvimento das formas promastigotas metacíclicas (infectantes) e do hospedeiro vertebrado (mamíferos) no desenvolvimento das formas amastigotas (CHAPPUIS et al., 2007). Por exemplo, a diferenciação das formas amastigotas em formas promastigotas flageladas (Figura 8a) só ocorre quando os parasitos entram em contato com o aparelho digestivo dos flebotomíneos, que possui menor temperatura e pH mais elevado (BATES, 2007). Esta forma flagelada tem maior capacidade de penetração nos tecidos do hospedeiro mamífero, e é facilitada com a vasodilatação local promovida pela saliva dos mosquitos (TURCO e DESCOTEAUX, 1992; SALEI et al., 2017). De forma análoga, a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas (Figura 8b) só ocorre após sua fagocitose e contenção no microambiente do fagolisossomo (vesícula intracelular formada pela união do fagossomo contendo os parasitos com lisossomos), que possui um baixo

pH, temperatura mais elevada, nutrientes essenciais para a diferenciação e atividade de enzimas líticas (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; SALEI et al., 2017).

**Figura 8 - Formas evolutivas de Leishmania: (a) Promastigota e (b) Amastigota intracelular.**



Fonte: adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

A transmissão mais comum ocorre através do inseto vetor, porém pode haver transmissão direta através do contato com material biológico infectado, por exemplo através de transfusão sanguínea ou transplante de órgãos. A facilidade na transmissão, a manutenção de reservatórios dos parasitos, as modificações ambientais, o aumento no trânsito de pessoas pelo mundo, as condições sanitárias e de saúde da população, a ineficiência no combate ao vetor e no controle da doença e outros fatores impactantes tornam a leishmaniose um dos maiores problemas de saúde em países em desenvolvimento e uma preocupação mundial (AMATO et al., 2008; AMEEN, 2010).

Nesses países o diagnóstico é feito geralmente de forma clínica a partir dos sintomas encontrados por anamnese. Pode ser utilizado o teste de Reação Intradérmica de Montenegro, que diferencia um indivíduo infectado de um não infectado indiretamente através da resposta inflamatória induzida por solução com antígenos inoperantes. Se possível, há confirmação da presença do parasito através de exame microbiológico a partir de biópsia das lesões. O diagnóstico mais preciso através de técnicas moleculares em países endêmicos ainda não tem um alcance clínico, sendo limitado à pesquisa (REITHINGER et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2010).

Ainda não há vacinas efetivas disponíveis contra o parasito e o tratamento das leishmanioses atualmente depende de fármacos pouco específicos que trazem uma série de limitações no seu uso clínico, o que gera a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas mais seguras e eficientes (AMATO et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2016).

### **2.3 Aspectos sobre a interação de *Leishmania* com o sistema imune**

A leishmaniose é um exemplo clássico de doença parasitária humana, e atualmente é clara a ideia de que existe uma longa relação temporal entre protozoários *Leishmania* e humanos, principalmente quando consideramos seu registro histórico e comprovações em achados paleoparasitológicos (ARAÚJO et al., 2013).

Num cenário hipotético, de acordo com o ciclo evolutivo de *Leishmania*, os parasitos se instalariam em células fagocíticas do hospedeiro, conseguindo vencer inicialmente seus mecanismos de defesa até se proliferarem o suficiente para chegarem ao sangue periférico, ficando disponíveis para infectar novos mosquitos. Simultaneamente, os mecanismos de defesa do hospedeiro controlariam essa proliferação, combatendo a infecção e impedindo a manifestação da doença e a eventual morte do hospedeiro (NOVO et al., 2016).

Em princípio, é interessante a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção parasitária, havendo um equilíbrio entre as espécies (COX, 2002). De fato, grande parte das infecções por *Leishmania* são assintomáticas, e a perda desse equilíbrio, seja por deficiência imunológica do hospedeiro ou por uma maior capacidade infectante do parasito, comumente resulta em manifestação da doença (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Apesar disso, a doença também pode se manifestar em indivíduos imunocompetentes, e isso se deve principalmente a mecanismos bioquímicos e celulares desenvolvidos pelos parasitos para desviar a resposta imune do hospedeiro (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

*Leishmania* são parasitos que desencadeiam uma complexa resposta imune inata e adaptativa, comprometendo os sistemas orgânicos e levando a gasto energético e nutricional excessivo por parte do hospedeiro (KUMAR et al., 2014). As

interações entre os parasitos e o sistema imune humoral e celular do hospedeiro são reguladas por uma resposta inflamatória, que possui genericamente etapas de deflagração, manutenção e resolução (HEADLAND; NORLING, 2015). Como forma de evasão, *Leishmania* desenvolveu mecanismos que subvertem essa resposta, e que estão sendo cada vez mais elucidados (UENO; WILSON, 2012).

Os estágios iniciais da infecção são fundamentais para a sobrevivência e proliferação dos parasitos. Células residentes iniciam uma resposta inflamatória aguda, liberando fatores quimiotáticos de leucócitos circulantes (BATES, 2007). Nesse momento, neutrófilos são massivamente recrutados para o local, promovendo seus mecanismos de defesa, como liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que funcionam como uma contenção mecânica para os parasitos, liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que irão propagar a resposta inflamatória, e fagocitose, que expõe os parasitos a mecanismos antimicrobianos intracelulares (SOUZA-VIEIRA et al., 2016).

O papel dos neutrófilos é importante para o controle imediato de patógenos, e sua ação contra *Leishmania* resulta em contenção significativa dos parasitos e apoptose dessas células, gerando no local um grande número de corpos apoptóticos e resíduos celulares tóxicos, que podem exacerbar a inflamação causando danos teciduais (REITHINGER et al., 2007).

Para controlar essa inflamação, a fagocitose de células apoptóticas é fundamental, e devido à quantidade reduzida de macrófagos maduros nos primeiros momentos da infecção, os neutrófilos são os que primeiro realizam esse processo. Ao fazê-lo, adquirem um perfil anti-inflamatório que é importante para a resolução da inflamação, porém acaba comprometendo seus mecanismos microbicidas (HEADLAND; NORLING, 2015; SALEI et al., 2017).

Dessa forma, um dos primeiros mecanismos de evasão promovido pelos parasitos *Leishmania* é a indução da fagocitose de células apoptóticas por neutrófilos infectados, facilitando sua sobrevivência nessas células (SALEI et al., 2017). Além disso, a interação com neutrófilos apoptóticos já tinha sido relacionada com o aumento da carga parasitária em macrófagos infectados (AFONSO et al., 2008).

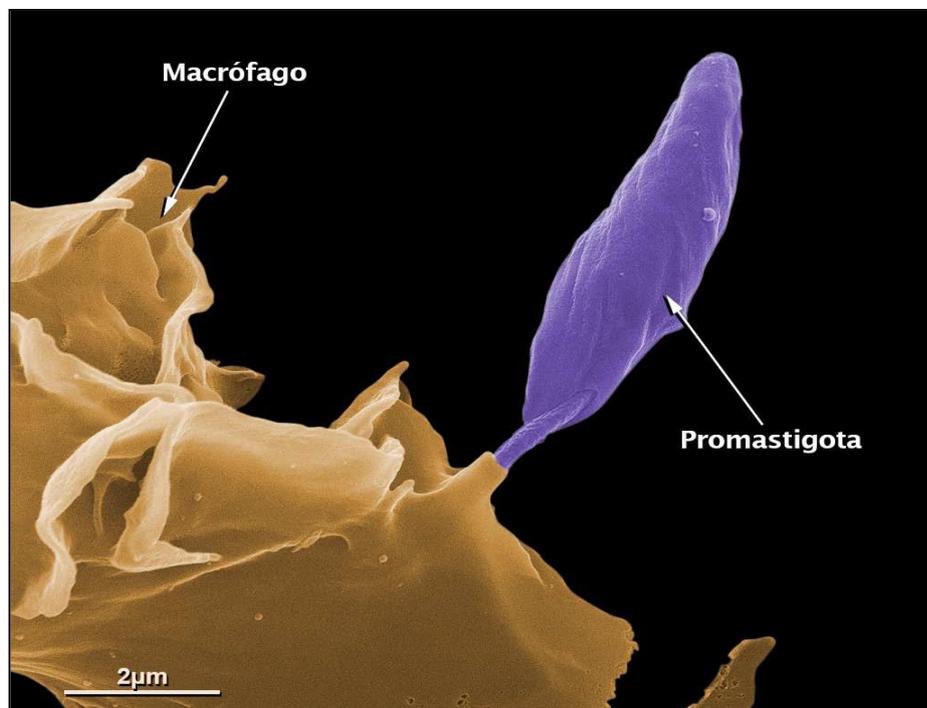
De fato, a fagocitose desses parasitos é amplificada pela ação de células do sistema mononuclear fagocitário. Células dendríticas (CD) têm preferência pela

fagocitose de formas promastigotas enquanto macrófagos disseminam a fagocitose para as promastigotas, para as amastigotas desenvolvidas em um macrófago anterior ou para as células apoptóticas contendo parasitos intracelulares (KAYE; SCOTT, 2011; ARGUETA-DONOHUÉ et al., 2016).

*Leishmania* pode ser encontrada em vários tipos celulares, mas durante a progressão da infecção residem majoritariamente em macrófagos, e por isso essas são consideradas as células mais importantes relacionadas à patogenia da leishmaniose (HEADLAND; NORLING, 2015; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

O flagelo das formas infectantes tem papel fundamental na adesão dos parasitos aos macrófagos (Figura 9). Através de antígenos de superfície no flagelo e membrana plasmática os parasitos são reconhecidos e opsonizados por elementos humorais do sistema imune, como anticorpos e fragmentos do sistema complemento, facilitando as interações entre moléculas receptoras nos macrófagos (UENO; WILSON, 2012; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

**Figura 9 - Adesão e fagocitose de promastigota de *Leishmania* por macrófagos.**

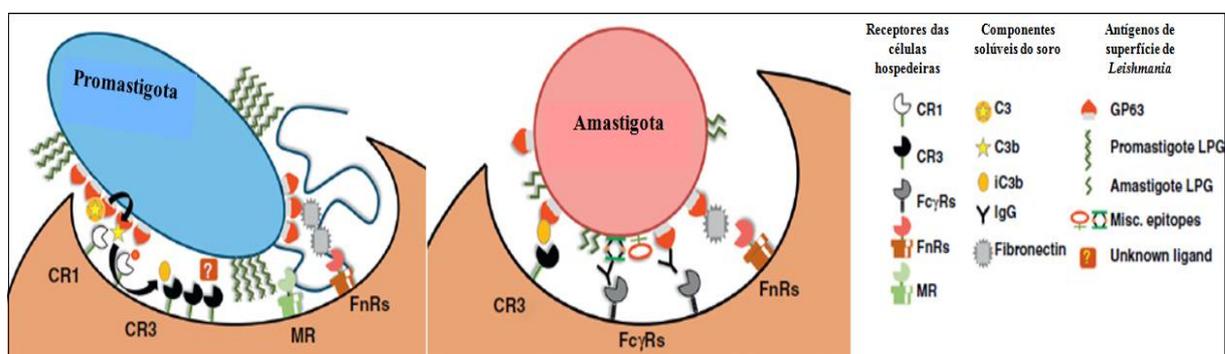


Fonte: adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

A membrana plasmática dos parasitos possui proteases como a glicoproteína de massa molecular 63 kDa (GP63), que pode ser liberada em exossomos e modular a atividade de células circunvizinhas ou continuar na membrana e participar da opsonização do parasito através da ligação às moléculas de matriz extracelular (MEC), como a fibronectina e moléculas solúveis como C3. A ligação à C3 resulta na clivagem em fragmentos C3b e iC3b, ligantes de receptores do complemento tipo 1 (CR1) e tipo 3 (CR3) respectivamente, enquanto a ligação à fibronectina permite a interação com receptores de fibronectina (FnRs) (UENO; WILSON, 2012; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Os lipofosfoligancanos (LPG) de membrana são importantes para o reconhecimento das formas promastigotas infectantes através de receptores de manose (MR). Como as formas amastigotas expressam LPG em quantidade reduzida, anticorpos IgG presentes no local são importantes para a adesão desses parasitos através do reconhecimento de sua porção Fc por receptores nos macrófagos (UENO; WILSON, 2012). As principais interações entre os parasitos e os macrófagos durante a fagocitose estão ilustradas na figura 10.

**Figura 10 - Interações entre os parasitos e as células do sistema imune.**



**Fonte: Adaptado de UENO; WILSON, 2012.**

Conjuntamente, essas interações desencadeiam o englobamento e internalização dos parasitos em fagossomos através da extensão e fissão da membrana plasmática dos macrófagos. No citoplasma esses fagossomos unem-se a lisossomos gerando fagolisossomos, vacúolos destinados à destruição dos parasitos por estresse oxidativo. É nesse microambiente que ocorre a diferenciação das formas amastigotas e sua proliferação por divisão binária, que acontecerá progressivamente até o rompimento dos macrófagos caso não sejam efetivamente

ativados, propagando a infecção para outras células (VERNON; TANG, 2013; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Essa ativação acontece por meio da apresentação de antígeno aos linfócitos. Durante a infecção por *Leishmania*, há uma grande expansão de linfócitos T CD4+ auxiliares, que podem promover uma resposta do tipo T "helper" 1 (Th1) ou do tipo T "helper" 2 (Th2), no intuito de direcionar as células efetoras para um comportamento que leve à resolução da infecção (BUXBAUM, 2015).

Para uma resposta adequada, é preciso que haja um equilíbrio entre a resposta clássica, do tipo Th1, que ativa os macrófagos para um caráter pró-inflamatório (M1) e a resposta alternativa, do tipo Th2, que ativa os macrófagos para um caráter ou resolutivo (M2). O fenótipo M1 está relacionado com uma maior capacidade antiparasitária, enquanto M2 com funções de reparação, como fagocitose de corpos apoptóticos, remoção de restos celulares e remodelamento tecidual (NUNES et al., 2005; HEADLAND; NORLING, 2015).

Numa resposta Th1, linfócitos secretam um arsenal de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12, que induzem o fenótipo M1 nos macrófagos e a ativação de vias intracelulares que promovem múltiplos mecanismos de combate aos parasitos. O estresse oxidativo ocorre, por exemplo, através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a uma maior atividade de enzimas como NADPH no lúmen dos vacúolos e mitocôndria. O Óxido nítrico (NO), produzido em maior quantidade através da ativação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), inibe enzimas da cadeia respiratória do parasito, além de ser um importante modulador enzimático para o macrófago (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015).

Para que não haja exacerbação da atividade inflamatória desses macrófagos, os linfócitos promovem uma resposta contrarregulatória do tipo Th2, secretando citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e IL-10, que têm alta capacidade de supressão do sistema imune. A resposta Th1 está relacionada com uma maior capacidade em combater o parasito, enquanto que a resposta Th2 está envolvida na manutenção do parasito e conseqüentemente na progressão da doença (SAXENA et al., 2015; HEADLAND; NORLING, 2015).

Em estudo com camundongos infectados, a deficiência na produção de IL-10 resultou em cura das lesões e controle dos parasitos, enquanto a produção normal

de IL-10 resultou na doença crônica (BUXBAUM, 2015). Interessantemente, parasitos *Leishmania* também são capazes de induzir uma resposta Th2, encontrando facilidade para sobreviver e se proliferar nos macrófagos (SAXENA et al., 2015).

As descobertas relacionadas com o processo de infecção de *Leishmania* têm avançado nos últimos anos, gerando impacto sobre a pesquisa científica. Atrelado a isso, o melhor entendimento sobre a patogenia dos parasitos *Leishmania* resulta em aprimoramento de abordagens voltadas para o controle e tratamento das doenças.

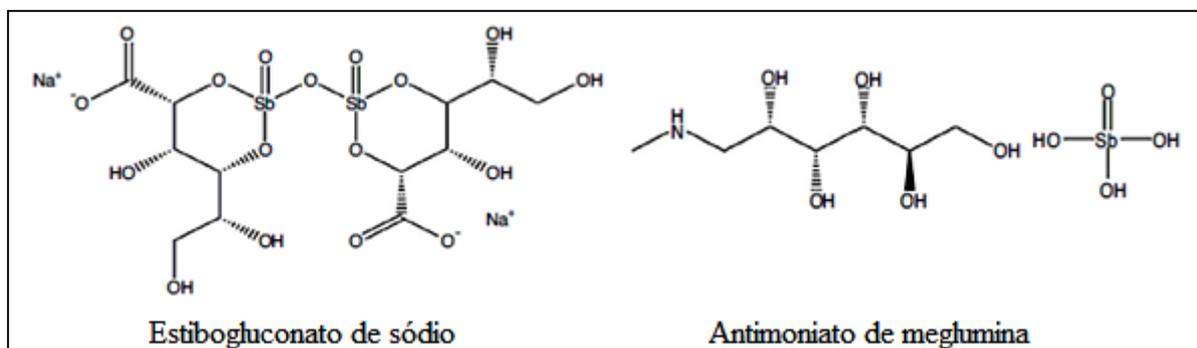
## **2.4 Tratamento das leishmanioses**

### **2.4.1 Antimoniais**

Antimônio (Sb) é um semimetal encontrado na natureza, e seus derivados são utilizados desde a antiguidade para diversos fins. O tartarato de antimônio e potássio, por exemplo, é utilizado desde a Idade Média em formulações homeopáticas devido a seu potencial emético, ficando conhecido como tártaro emético (WEISS; HATCHER, 1922; GALLIGNANI et al., 2005).

Na década de 1910 surgiram as primeiras evidências da eficácia do tártaro emético, um antimonial trivalente ( $Sb^{3+}$ ), no tratamento da leishmaniose. Em 1912 no Brasil sua eficácia foi demonstrada para a LT e em 1915 na Itália para a LV (VIANNA, 1912; RATH et al., 2003). Porém o uso dos complexos  $Sb^{3+}$  logo foi impactado pela sua elevada toxicidade, dando lugar aos antimonias pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ). A partir da década de 1940 foram introduzidos o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina ou N-metilglucamina (Glucantime®) (Figura 11). Este último é utilizado até hoje como fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil (RATH et al., 2003).

**Figura 11 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes.**



**Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.**

A atividade leishmanicida dos  $Sb^{5+}$  é influenciada pelo sistema imune do hospedeiro, sendo pouco ativos contra os parasitos *in vitro*. Desse modo, o tratamento pode ser prejudicado em casos de imunodeficiência. Apesar de possuir um mecanismo de ação pouco esclarecido, acredita-se que atuem como pró-fármacos, sendo reduzidos à  $Sb^{3+}$  e causando a inibição de enzimas como a tripanotona redutase, o que interfere no processo de glicólise e  $\beta$ -oxidação, causando depleção de ATP, aumento do estresse oxidativo e morte dos parasitos por apoptose (RATH et al., 2003; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Os antimoniais são ativos tanto para as formas tegumentares quanto para a forma visceral da doença, porém apenas através de administração parenteral. Podem ser administrados por via intramuscular, intralinfática ou como é mais comum, por via intravenosa, com uma dose recomendada de 20 mg/kg/dia durante 20-30 dias, até um limite de 850 mg. São rapidamente excretados, o que gera a necessidade de intervalos menores na administração para a manutenção de uma concentração sérica ativa. Baixas dosagens e falhas na adesão ao tratamento estão associadas ao aumento na resistência, como visto em Bihar, na Índia, onde os antimoniais já estão em desuso (RATH et al., 2003; SANGSHETTI et al., 2015).

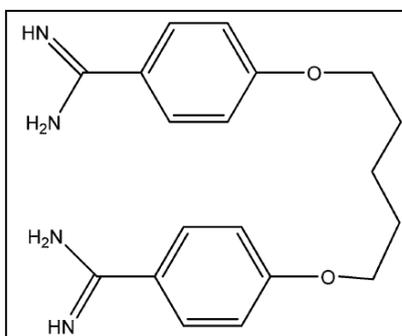
Além da resistência parasitária, outros fatores limitam o uso dos antimoniais, como elevada toxicidade hepática, neural, renal e cardíaca, podendo o tratamento ser mais potencialmente letal do que a própria infecção. Apesar de serem rapidamente excretados, também podem se acumular em órgãos como fígado e baço. O uso é contraindicado em gestantes, hepatopatas e nefropatas, e sua

efetividade em crianças é insuficiente (RATH et al., 2003; SANGSHETTI et al., 2015).

#### 2.4.2 Pentamidina

Pentamidina é uma amidina (Figura 12) utilizada no tratamento da leishmaniose desde 1939, e em outras doenças como tripanossomíase e pneumonia por *Pneumocystis carinii* desde a década de 1980 (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Pentamidina é atualmente um fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, sendo aplicado em casos onde houve resistência aos antimoniais. Porém, uma série de fatores limita seu uso: eficácia inferior à dos antimoniais, potencial para desenvolver resistência parasitária, efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, diabetes mellitus insulino-dependente irreversível e até morte súbita (BASSELIN et al., 2002; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

**Figura 12 - Estrutura química da pentamidina.**



Fonte: Adaptado de SANGSHETTI et al., 2015.

É recomendado o uso de 4 mg/kg do fármaco por via intravenosa três vezes por semana entre 5-10 semanas. Pentamidina pode entrar nos parasitos por meio de transportadores de alta afinidade dependentes de prótons, e ligar-se ao DNA mitocondrial, influenciando nos processos de replicação e transcrição (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Além disso, pode inibir transportadores de poliaminas, como LmPOT1, causando uma diminuição na captação de substratos importantes para rotas biossintéticas nos parasitos (DIAZ et al., 2014).



via intravenosa. A anfotericina B alcança pouco tecidos como o SNC e acumula-se rapidamente em órgãos como os rins, causando danos que podem ser irreversíveis. Entre os efeitos adversos mais graves estão insuficiência renal e anemia. Além disso, durante a administração o fármaco comumente provoca uma reação inflamatória generalizada, marcada por febre, calafrios e dor, que apesar de diminuir com a frequência de uso, causa sérios transtornos ao paciente (SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

No intuito de corrigir essas falhas farmacocinéticas foram desenvolvidas outras formulações apresentando diferentes graus de eficácia e segurança, com destaque para a anfotericina B lipossomal (AmBisome), constituída por vesículas lipídicas contendo o fármaco, que apresenta melhor distribuição no organismo, maior tempo de meia-vida e menos efeitos adversos, além de ser comprovadamente eficaz na LV, porém tem seu uso restrito devido ao alto custo do tratamento (HAMILL, 2013; SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

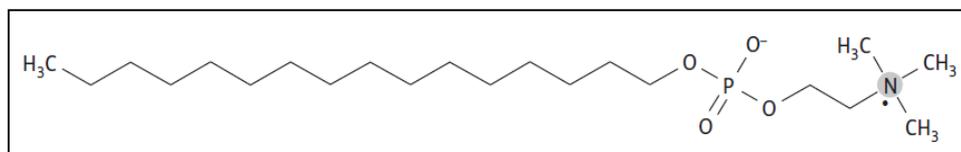
#### 2.4.4 Miltefosina

Na década de 80 surgiram os primeiros éteres lipídicos utilizados na área oncológica, que dariam origem a miltefosina, inicialmente conhecida como hexadecilfosfocolina, utilizada com sucesso no tratamento de câncer mamário, cujo alvo farmacológico era a membrana plasmática, e não o núcleo, como os demais agentes antineoplásicos (WESTPHAL, 1987; EIBL; UNGER, 1990). Em 2002 a droga foi registrada para o tratamento de LV na Índia, após ensaios clínicos demonstrando resultados semelhantes aos de drogas já utilizadas, como anfotericina B, porém com o diferencial de ser ativa por via oral. Miltefosina apresenta como principais efeitos adversos cefaléia, distúrbios gastrointestinais e renais, além do potencial teratogênico que impede seu uso em gestantes (CROFT; SEIFERT; DUCHÊNE, 2003).

Miltefosina (Impavido), uma alquilfosfocolina (Figura 14), é um análogo de fosfolipídeos ativa contra várias espécies de *Leishmania*, inclusive aquelas que causam a forma cutânea da doença (CROFT; ENGEL, 2006). Acredita-se que tenha ação em mais de um alvo molecular, e desenvolva seu efeito através de distúrbios na sinalização celular dependente de lipídeos, indução da expressão de óxido nítrico

sintase 2 (iNOS2) com produção de NO e formação de radicais livres, que juntos direcionam o parasito à morte semelhante a apoptose (DORLO et al., 2012). Além disso, miltefosina é capaz de reverter a resposta celular para o tipo Th1 em macrófagos infectados, ativando funções que ajudam a combater os parasitos através da indução de IFN- $\gamma$  (WADAHONE et al., 2009).

**Figura 14 - Estrutura química da miltefosina.**



**Fonte: Adaptado de DORLO et al., 2012.**

Apesar de ser uma molécula simples e estável por via oral, sua eficácia depende de um tratamento prolongado, o que muitas vezes pode levar ao uso inadequado, e sua longa meia-vida facilita o desenvolvimento de resistência parasitária (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006). De fato, após 10 anos do início do seu uso clínico houve um aumento substancial nos índices de falha terapêutica (SUNDAR et al., 2012). Seu uso na leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL) também não obteve sucesso, com pacientes apresentando relapsos ao longo de 18 meses e manutenção da carga parasitária (RAMESH et al., 2015).

Em 2016 o uso de miltefosina foi aprovado no Brasil para o tratamento de leishmaniose canina, sob justificativa de que o fármaco não é utilizado no país para o tratamento da doença em humanos, sendo uma alternativa à eutanásia dos animais, porém em âmbito particular, o que limita seu uso devido aos custos elevados, além de gerar riscos inerentes à administração inadequada do medicamento. Evidências que comprovem a eficácia e segurança da miltefosina nesses casos são escassas e insuficientes, considerando a facilidade de seleção de cepas resistentes a partir da utilização do fármaco (BRASIL, 2016).

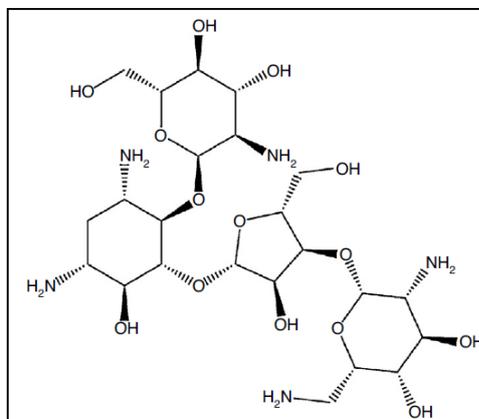
#### 2.4.5 Paramomicina

Paramomicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos (Figura 15), isolado na década de 1950 de *Streptomyces krestomuceticus*, que inicialmente

mostrou-se ativo contra uma gama de bactérias, como gram-positivas, gram-negativas e até *Mycobacterium tuberculosis*. Por ser pouco absorvida por via oral, preparações injetáveis foram amplamente utilizadas até a década de 1980, quando foram substituídas por cefalosporinas e quinolonas. Porém, devido a sua atividade leishmanicida, também foi utilizado para o tratamento das leishmanioses (DAVIDSON; BOER; RITMEIJER, 2009).

O fármaco é mais utilizado por via intramuscular, alcançando seu pico de concentração sérica em até 90 minutos. Apesar de ser amplamente distribuído para os fluidos periféricos e ser ativo na LT, sua maior aplicabilidade é para a forma visceral. Na Índia, a paramomicina foi licenciada para o tratamento de LV, sendo um dos tratamentos de menor custo para essa doença. É excretado pelos rins e costuma ser bem tolerada, com raros relatos de nefrotoxicidade e ototoxicidade, porém pouca evidência em idosos, crianças, gestantes, obesos ou desnutridos (DAVIDSON; BOER; RITMEIJER, 2009).

**Figura 15 - Estrutura química da paramomicina.**



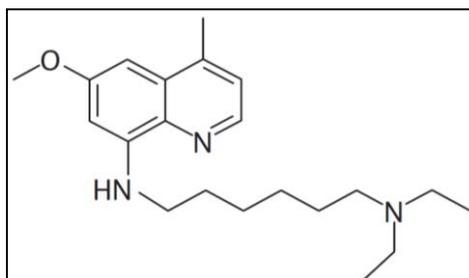
**Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.**

O principal fator impactante no seu uso é sua forte tendência a causar resistência, já observada *in vitro*. Por esse motivo, paramomicina tem sido aplicada em associação com outros fármacos leishmanicidas, como estibogluconato de sódio ou anfotericina B, promovendo resultados satisfatórios (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

#### 2.4.6 Sitamaquina

Sitamaquina é uma 8-aminoquinolina (Figura 16) que surge como fármaco alternativo para o tratamento de leishmaniose visceral (LV) já em ensaios clínicos de fase 2. Estudos mostraram que o tratamento por via oral durante 28 dias resultou em cura de mais de 80% dos pacientes com LV com poucos efeitos adversos, como toxicidade renal nas maiores doses testadas (JHA et al., 2005; WASUNNA et al., 2005).

**Figura 16 - Estrutura química da sitamaquina.**



**Fonte: Adaptado de COIMBRA et al., 2010.**

Sitamaquina se acumula rapidamente no citoplasma de parasitos *Leishmania* através de difusão e da possível ação de um transportador de membrana num processo facilitado por fosfolipídeos aniônicos e independente de energia ou esteróides, e sua sensibilidade não depende de vesiculação por acidocalcisomos (LOPÉZ-MARTÍN et al., 2008; COIMBRA et al., 2010). Foi proposto que essa droga iniba de forma dose-dependente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase, pertencente ao complexo 2 da cadeia respiratória, onde os baixos níveis de ATP e a formação de radicais livres leve à morte semelhante a apoptose dos parasitos (CARVALHO et al., 2011).

#### 2.4.7 Terapias de combinação

A terapia de combinação de drogas leishmanicidas nos esquemas de tratamento para leishmaniose tem sido amplamente aceita como uma estratégia capaz de aumentar a eficácia e tolerância aos efeitos adversos, além de diminuir custo e risco de resistência parasitária, considerando que essas drogas possuem diferenças em seus alvos farmacológicos e farmacocinética. Pacientes co-infectados

com leishmaniose e HIV, por exemplo, podem ser reservatórios para cepas resistentes e necessitam de um tratamento diferenciado (VAN-GRIENSVEN et al., 2010; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Áreas com altos índices de leishmaniose visceral, como o norte de Bihar, na Índia, já apresentam altos índices de resistência, e não há políticas concretas voltadas para o seu controle ou prevenção. Desse modo, além de medidas de saúde pública que diminuam a transmissão, estratégias de associações de medicamentos precisam ser consideradas (BRYCESON, 2001; SANGSHETTI et al., 2015).

Nos últimos anos, diversos estudos em fase clínica têm demonstrado resultados satisfatórios utilizando terapias de combinação. No sul do Sudão, pacientes com leishmaniose visceral apresentaram melhores índices de cura inicial e melhor prognóstico quando tratados com a associação de estibogluconato de sódio e paramomicina do que apenas com estibogluconato de sódio (MELAKU et al., 2007; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Outras combinações incluindo drogas com menor toxicidade, como a anfotericina B lipossomal, paramomicina e/ou miltefosina têm se mostrado eficazes, e recentemente foram incluídas nas recomendações da OMS para o subcontinente indiano (VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Recentes pesquisas experimentais têm mostrado resultados promissores, testando drogas leishmanicidas usuais com outras possíveis associações, como nitazoxanida, tamoxifeno ou pentostam (KHAYEKA-WANDABWA et al., 2013; MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014). Atualmente busca-se um tratamento específico para as leishmanioses que possua efetividade, menor efeito tóxico e consequentemente maior segurança. Neste contexto, observa-se nas estratégias de associação uma alternativa que precisa ser mais estudada, fortalecida e sua aplicação expandida (TRINCONI et al., 2014; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

### **3 Aspectos sobre os derivados testados**

O desenho racional e síntese de novas moléculas que constituam maior diversidade e complexidade estrutural representam atualmente uma via potencial

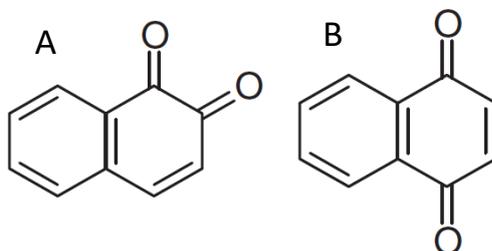
para a descoberta de agentes bioativos inovadores. Com o uso de técnicas de bioisosterismo pela química medicinal tem sido possível a síntese de novas moléculas a partir da hibridação de grupamentos com atividades farmacológicas conhecidas (NICOLAOU et al., 2012).

Quinonas são uma classe de compostos orgânicos com ampla distribuição na natureza que resultam da oxidação de moléculas aromáticas. São caracterizadas pela presença de duas carbonilas conjugadas em um anel de seis átomos (KUMAGAI et al., 2012).

Moléculas dessa classe interagem com sistemas biológicos principalmente através de dois mecanismos. Primeiro, podem reagir com agentes de transferência de elétrons, como o NADPH, um agente redutor de oxigênio, gerando ROS como superóxido ou peróxido de hidrogênio, e assim aumentando o estresse oxidativo. Em segundo lugar, podem reagir como eletrófilos, formando ligações covalentes com grupos funcionais nucleofílicos em moléculas biológicas, como proteínas, alterando assim seu funcionamento (KUMAGAI et al., 2012).

Naftoquinonas são um subgrupo de quinonas derivadas do anel naftaleno com dois grupamentos carbonilas nas posições 1,2 (figura 17A) ou 1,4 (figura 17B) do anel. A descoberta da vitamina K como sendo um tipo de 1,4-naftoquinona foi marcante para o desenvolvimento de agentes terapêuticos dessa classe (TANDON; KUMAR, 2013).

**Figura 17 - Estrutura básica das naftoquinonas. (A): 1,2-naftoquinonas; (B): 1,4-naftoquinonas.**



**Fonte: Adaptado de TANDON; KUMAR, 2013.**

As 1,4-naftoquinonas são produzidas por diversos organismos, como algas, bactérias, fungos e principalmente plantas, como as das famílias Bignoniaceae e Verbanaceae, e são de grande interesse na pesquisa por possuírem uma gama de

atividades biológicas, incluindo efeitos bactericidas, fungicidas, antiprotozoários, antivirais, anti-inflamatórios e citotóxicos (ARAÚJO et al., 2017; SILVA, 2016).

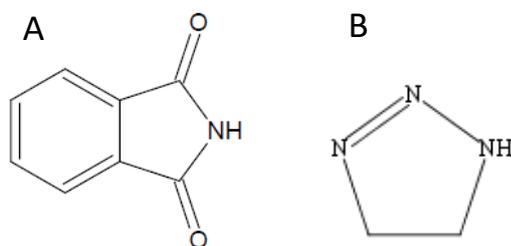
Compostos heterocíclicos, como as naftoquinonas, são de grande interesse para a pesquisa acadêmica devido a seu grande potencial em promover atividades biológicas (TANDON; KUMAR, 2013). Da mesma forma, compostos heterocíclicos nitrogenados, como os derivados ftalimídicos, são promissores devido a sua versatilidade em se acoplar a grupamentos diversos, e são capazes de promover uma gama de atividades biológicas (SINGH et al., 2015). Na literatura há descrição de efeitos importantes produzidos por compostos ftalimídicos, como anti-inflamatório, analgésico, antilipêmico e até contra protozoários, como os do gênero *Plasmodium*, causadores da malária (KUMAR et al., 2015).

Outros compostos nitrogenados, como os derivados triazólicos, são extensivamente utilizados na clínica devido a seus efeitos antifúngicos e antiparasitários. Um dos principais exemplos é o fluconazol, um fármaco triazólico utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e em alguns casos em leishmaniose, que apresenta com boa segurança e eficácia (ASSIS et al., 2012).

Um outro aspecto explorado na síntese destes derivados foi a bromoadição, haja vista, os halogênios serem os elementos mais eletronegativos da tabela periódica, estabilizando-se normalmente através de uma ligação simples a outro átomo, sendo assim passíveis de adição ou remoção molecular, catálise de diversos tipos de reações químicas, além de serem promissores na interação com biomoléculas. Dentre os halogênios mais utilizados na síntese orgânica destaca-se o bromo (Br) devido a sua versatilidade (SAIKIA; BORAH; PHUKAN, 2016). A estratégia de bromoadição foi utilizada em alguns destes derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas (SILVA, 2016).

O planejamento da síntese dos derivados utilizados nesse trabalho baseou-se na hibridização do anel 1,4-naftoquinônico com 1 átomo de bromo e grupamentos ftalimida (figura 18A) e triazol (figura 18B) no intuito de investigar as possíveis atividades biológicas desses novos derivados (SILVA, 2016).

**Figura 18 - Grupos utilizados para a síntese dos derivados: (A) ftalimida; (B) triazol.**

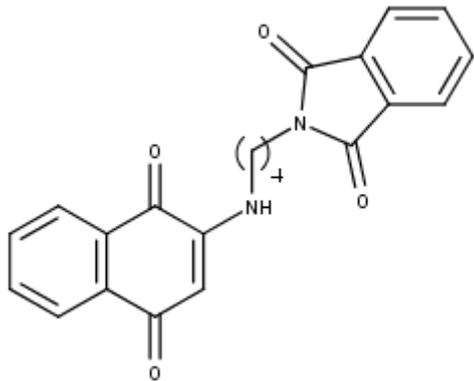
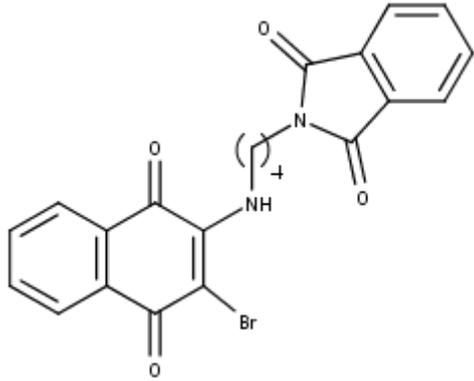
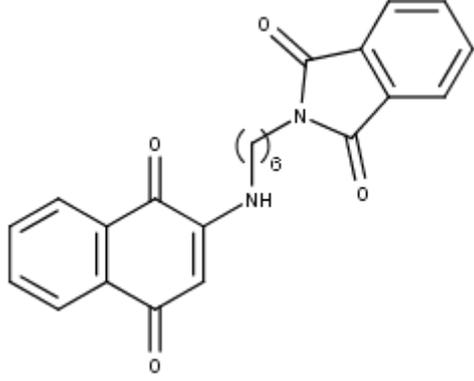
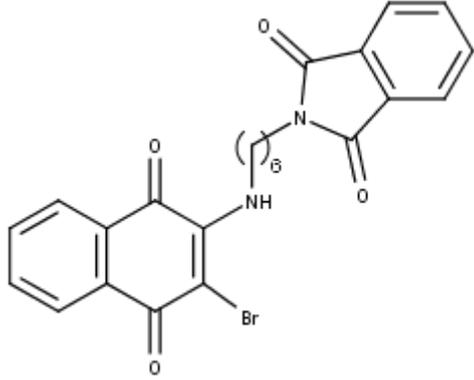


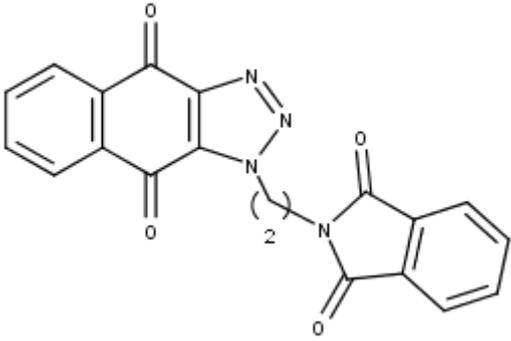
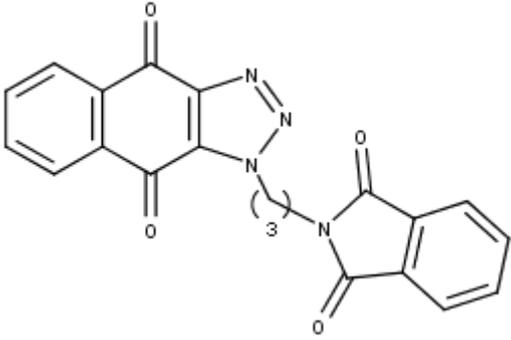
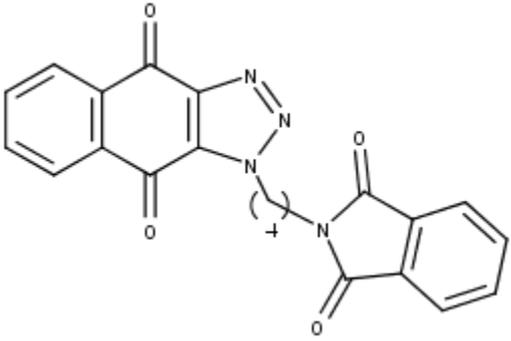
**Fonte: Autor.**

Esses derivados constituem moléculas inéditas cujos grupos hipoteticamente podem ter incrementado atividade leishmanicida, possuindo diferenças pontuais entre suas estruturas, constituindo maior variabilidade química. A tabela 1 ilustra as estruturas dos derivados.

**Tabela 1 - Estruturas químicas das ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3).**

| Derivados | Estrutura química  |
|-----------|--|
| J3        | <p>The structure shows a 1,4-naphthoquinone core with a phthalimidoethylamino group (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(=O)-C(=O)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-C(=O)-NH-) attached to the 2-position.</p> |
| J3br      | <p>The structure is identical to J3, but with a bromine atom (Br) attached to the 2-position of the naphthoquinone ring.</p>   |

|      |  |
|------|--|
| J4   |    |
| J4br |   |
| J6   |  |
| J6br |  |

|              |  |
|--------------|--|
| <p>J01.3</p> |    |
| <p>J02.3</p> |    |
| <p>J03.3</p> |  |

Fonte: Programa Marvin Suite.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida de uma série de derivados 1,4-naftoquinonas.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar o potencial citotóxico dos derivados 1,4-naftoquinonas para a célula hospedeira (macrófagos da linhagem J774.A1);
- Investigar a atividade dos derivados 1,4-naftoquinonas sobre formas promastigotas extracelulares de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* em ensaio *in vitro*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção dos derivados 1,4-naftoquinonas

Os derivados foram sintetizados e caracterizados pelo Prof. Dr. Mauro Gomes da Silva no Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) tendo sido objeto da sua tese de doutorado, sob coordenação e orientação do Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara. Para realização dos experimentos, foram elencadas nove substâncias derivadas de 1,4-naftoquinonas com diferentes substituições, as ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e as ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3). Os derivados foram disponibilizados para o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e em seguida, diluídos em DMSO 0,1%, esterilizados em filtro (0,22 µm) e alicotados à uma concentração de 100 mM para composição das soluções estoque, que foram armazenadas em ambiente estéril, refrigerado e protegido da luz para realização dos experimentos farmacológicos *in vitro*.

### 5.2 Manutenção das células

#### 5.2.1 Culturas de *Leishmania*

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 e de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram cedidas pelo Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ. As formas promastigotas dos parasitos foram mantidas *in vitro* em meio Schneider, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% de urina humana masculina filtrada, a 27°C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (Shel Lab). 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. Fez-se, então,

a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

### 5.2.2 Culturas de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato e mantidos em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado e plaqueadas.

## 5.3 Ensaio *in vitro*

### 5.3.1 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular após exposição aos derivados foi feita através do teste de detecção colorimétrica da redução mitocondrial de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) à formazan (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993). Para isto, macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 96 poços (1x10<sup>5</sup> células/poço) e expostos aos compostos em concentrações de 1, 10 e 100 µM por 48 horas em estufa a 37° C, 95% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>. 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 (0,5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa, logo após foi retirado o sobrenadante, adicionado 100 µL de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Plate) a 550 nm. A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte nas culturas controle a partir dos valores de absorbância obtidos após leitura.

### 5.3.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram cultivadas numa concentração de  $1 \times 10^5$  parasitos/poço e volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço em placa de 96 poços com meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana. Foram adicionadas em triplicatas diferentes concentrações (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) dos nove derivados e pentamidina (Sal Isotianato de Pentamidina, Sigma Aldrich P0547) (fármaco padrão) aos poços contendo as formas promastigotas até a obtenção do volume final de 200  $\mu\text{L}$ . A placa foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. Após esse período, os parasitos de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram homogeneizados e o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer e microscopia óptica em aumento de 400x (Nikon Eclipse Ci) (TIUMAN et al., 2005).

#### **5.4 Análise estatística**

A tabulação de dados foi realizada com o auxílio do software Microsoft Excel® e o tratamento estatístico no programa GraphPad Prism. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle, considerados significativos quando  $p < 0,05$ , foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett.

## 6 RESULTADOS

Inicialmente foi investigada a citotoxicidade dos derivados em macrófagos da linhagem J774.A1. Os resultados revelaram efeitos tóxicos associados ao fármaco padrão pentamidina, que apresentou citotoxicidade máxima de  $80,2 \pm 1,9\%$  e uma concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células ( $CT_{50}$ ) de  $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ . Entre as substâncias testadas, foi observado efeito tóxico abaixo de 50% para as substâncias J3 e J4 ( $47,0 \pm 8,7\%$  e  $43,1 \pm 0,5$ , respectivamente) e acima de 50% para as substâncias J6 ( $63,3 \pm 0,9\%$  com  $CT_{50} 39,9 \pm 11,8 \mu\text{M}$ ), J6Br ( $75,3 \pm 1,0\%$  com  $CT_{50} 42,1 \pm 3,7 \mu\text{M}$ ), J01.3 ( $72,5 \pm 0,5\%$  com  $CT_{50} 7,8 \pm 0,2$ ) e J03.3 ( $71,4 \pm 0,4\%$  com  $CT_{50} 45,7 \pm 17,1$ ). Os demais derivados não apresentaram efeitos deletérios nas concentrações testadas (Tabela 2). As culturas tratadas apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias (DMSO 0,1%) não apresentaram efeitos tóxicos significantes quando comparadas àquelas apenas com meio de cultura, utilizadas como controle negativo (dados não mostrados). Desse modo, a toxicidade das substâncias não pode ser atribuída à presença de DMSO nas culturas.

**Tabela 2 - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) em macrófagos J774.A1 (ensaio de MTT).**

| Tratamento  | $CT_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> | Citotoxicidade máxima (%) <sup>b</sup> |
|-------------|--|--|
| Pentamidina | $0,7 \pm 0,2$                            | $80,2 \pm 1,9^{***}$                   |
| J3          | > 100                                    | $47,0 \pm 8,7^{***}$                   |
| J3br        | > 100                                    | NT                                     |
| J4          | > 100                                    | $43,1 \pm 0,5^{**}$                    |
| J4br        | > 100                                    | NT                                     |
| J6          | $39,9 \pm 11,8$                          | $63,3 \pm 0,9^{**}$                    |
| J6br        | $42,1 \pm 3,7$                           | $75,3 \pm 1,0^{**}$                    |
| J01.3       | $7,8 \pm 0,2$                            | $72,5 \pm 0,5^{**}$                    |

|       |             |              |
|-------|-------------|--------------|
| J02.3 | > 100       | NT           |
| J03.3 | 45,7 ± 17,1 | 71,4 ± 0,4** |

<sup>a</sup> Concentração tóxica 50 (CT<sub>50</sub>) calculada a partir da curva dose-resposta. <sup>b</sup> Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata. Os valores de efeito máximo foram considerados significantes quando \* p <0.05, \*\* p <0.01, e \*\*\* p <0.001 comparados com o grupo DMSO 0.1%; ND: Não determinada a citotoxicidade máxima até a concentração de 100 µM comparado com o grupo DMSO.

Para verificar a possível atividade leishmanicida, foram calculados o efeito máximo e a potência por meio da CI<sub>50</sub> dos derivados e da pentamidina contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os resultados obtidos com a cultura de *L. amazonensis* evidenciaram efeito leishmanicida para o fármaco padrão pentamidina, cuja citotoxicidade máxima foi de 100%, com CI<sub>50</sub> de 8,5 ± 0,4. Entre os derivados, apenas J4Br não apresentou atividade leishmanicida nas concentrações testadas e apenas J3 apresentou atividade abaixo de 50% (45,5 ± 5,5%). As substâncias que apresentaram atividade acima de 50% foram J3Br (63,2 ± 8,2% com CI<sub>50</sub> 21,8 ± 4,1 µM), J4 (86,4 ± 5,5% com CI<sub>50</sub> 32,1 ± 15,5 µM), J6 (80,4 ± 7,5% com CI<sub>50</sub> 57,4 ± 6,9 µM), J6Br (85,0 ± 5,2% com CI<sub>50</sub> 63,6 ± 11,5 µM), J01.3 (100 % com CI<sub>50</sub> 5,7 ± 0,8 µM), J02.3 (60,9 ± 13,0% com CI<sub>50</sub> 21,3 ± 16,3 µM) e J03.3 (80,4 ± 7,5% com CI<sub>50</sub> 8,6 ± 8,4 µM) (Tabela 3).

**Tabela 3 - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.**

| Tratamento  | CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup> | Citotoxicidade máxima (%) <sup>b</sup> |
|-------------|------------------------------------|--|
| Pentamidina | 8,5 ± 0,4                          | 100 ± 0,0***                           |
| J3          | > 100                              | 45,5 ± 5,5**                           |
| J3br        | 21,8 ± 4,1                         | 63,2 ± 8,2***                          |
| J4          | 32,1 ± 15,5                        | 86,4 ± 5,5***                          |
| J4br        | > 100                              | NA                                     |

|       |             |               |
|-------|-------------|---------------|
| J6    | 57,4 ± 6,9  | 80,4 ± 7,5**  |
| J6br  | 63,6 ± 11,5 | 85,0 ± 5,2**  |
| J01.3 | 5,7 ± 0,8   | 100 ± 0,0***  |
| J02.3 | 21,3 ± 16,3 | 60,9 ± 13,0** |
| J03.3 | 8,6 ± 8,4   | 80,4 ± 7,5*** |

<sup>a</sup> Concentração inibitória 50 (CI<sub>50</sub>) calculada a partir da curva dose-resposta. <sup>b</sup> Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata. Dados reportados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças com \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.01 foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.1%. NA: não ativos na faixa de concentração testada.

Os resultados obtidos com a cultura de *L. chagasi* evidenciaram efeito leishmanicida e concentração inibitória de 50% semelhante para o fármaco padrão pentamidina, cuja citotoxicidade máxima foi de 100% com CI<sub>50</sub> 0,6 ± 0,1 µM. Todos os derivados testados apresentaram alguma atividade leishmanicida para *L. chagasi*. Os derivados com atividade abaixo de 50% foram J3Br (25,0 ± 8,3%), J4Br (4,2 ± 5,9%), J6 (37,5 ± 5,9%) e J02.3 (29,2 ± 8,3%). Os derivados que apresentaram atividade leishmanicida acima de 50% foram J3 (58,3 ± 6,8% com CI<sub>50</sub> 27,8 ± 1,1 µM), J4 (89,6 ± 4,1% com CI<sub>50</sub> 20,0 ± 4,8 µM), J6Br (58,3 ± 8,3% com CI<sub>50</sub> 89,5 ± 10,3 µM), J01.3 (100% com CI<sub>50</sub> 7,3 ± 0,5 µM) e J03.3 (89,5 ± 4,1% com CI<sub>50</sub> 8,1 ± 0,3 µM) (Tabela 4). As culturas dos parasitos tratadas apenas com DMSO 0,1% não apresentaram efeitos significantes quando comparadas àquelas apenas com meio de cultura, utilizadas como controle negativo (dados não mostrados). Desse modo, a atividade observada não pode ser atribuída à presença de DMSO nas culturas.

**Tabela 4 - Citotoxicidade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) contra formas promastigotas de *L. chagasi*.**

| Tratamento  | CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup> | Citotoxicidade máxima (%) <sup>b</sup> |
|-------------|------------------------------------|--|
| Pentamidina | 0,6 ± 0,1                          | 100 ± 0,0***                           |

|       |             |               |
|-------|-------------|---------------|
| J3    | 27,8 ± 1,1  | 58,3 ± 6,8*** |
| J3br  | > 100       | 25,0 ± 8,3    |
| J4    | 20,0 ± 4,8  | 89,6 ± 4,1*** |
| J4br  | > 100       | 4,2 ± 5,9     |
| J6    | > 100       | 37,5 ± 5,9    |
| J6br  | 89,5 ± 10,3 | 58,3 ± 8,3*** |
| J01.3 | 7,3 ± 0,5   | 100 ± 0,0***  |
| J02.3 | > 100       | 29,2 ± 8,3    |
| J03.3 | 8,1 ± 0,3   | 89,5 ± 4,1*** |

<sup>a</sup> Concentração inibitória 50 (CI<sub>50</sub>) calculada a partir da curva dose-resposta. <sup>b</sup> Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata. Dados reportados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças com \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.01 foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.1%. NA: não ativos na faixa de concentração testada

Baseado na viabilidade em macrófagos e no ensaio de promastigora para *L. amazonensis* e *L. chagasi*, foi realizado o cálculo do índice de seletividade (IS) dos compostos (Tabela 5). Esse índice reflete a razão entre as CT<sub>50</sub> (macrófagos) e a CI<sub>50</sub> (parasitos) de cada substância, fornecendo assim um valor indicativo da possível seletividade dos compostos. Para os compostos que não apresentaram toxicidade aos macrófagos, foi necessário utilizar o valor da maior concentração testada (100 µM), o que pode gerar uma subestimação quantitativa, mas não qualitativa do IS. Assim, em se tratando da atividade em *L. amazonensis*, aparentemente, os derivados J3br, J02.3 e J03.3 mostraram-se moderadamente seletivos, com IS respectivamente de 4,58, 4,69 e 5,31. Para as demais não foi observada atividade seletiva para os parasitos. Para *L. chagasi*, os derivados que apresentaram atividade moderadamente seletiva foram J3, J3Br, J4 e J03.3, com IS 3,59, 4,00, 5,00 e 5,64, respectivamente.

**Tabela 5 - Índice de seletividade das Ftalimido-1,4-naftoquinonas (J3, J3br, J4, J4br, J6, J6br) e das Ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas (J01.3, J02.3, J03.3) para macrófagos x *L. amazonensis* e para macrófagos x *L. chagasi*.**

| Tratamento  | <sup>1</sup> IS para <i>L. amazonensis</i> | <sup>1</sup> IS para <i>L. chagasi</i> |
|-------------|--|--|
| Pentamidina | -  | 1,16                                   |
| J3          | -  | 3,59                                   |
| J3br        | 4,58                                       | -                                      |
| J4          | 3,11                                       | 5,00                                   |
| J4br        | -  | -                                      |
| J6          | -  | -                                      |
| J6br        | -  | -                                      |
| J01.3       | 1,36                                       | 1,06                                   |
| J02.3       | 4,69                                       | -                                      |
| J03.3       | 5,31                                       | 5,64                                   |

<sup>1</sup>IS: Índice de Seletividade = CT<sub>50</sub> (macrófagos) / CI<sub>50</sub> (*Leishmania spp.*). (-): Substância sem atividade acima de 50% ou com CT<sub>50</sub> menor que CI<sub>50</sub>.

## 7 DISCUSSÃO

As patogenias associadas à parasitos do gênero *Leishmania* tem relação estreita com a resposta inflamatória promovida pelo hospedeiro, de modo que substâncias capazes de modular a inflamação podem influenciar a sobrevivência do parasito durante a infecção (KAYE; SCOTT, 2011). ASSIS et al. (2012) demonstraram que substâncias contendo os grupamentos triazol e ftalimida possuem importante atividade anti-inflamatória. Assim, naftoquinonas contendo esses grupamentos podem ser moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas, já que o agravo da doença e as lesões estão também associadas à liberação descontrolada de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 por células inflamatórias, como macrófagos, responsáveis pela destruição tecidual (NOVAIS et al., 2017).

Inicialmente foi investigada a possível toxicidade desses novos derivados em macrófagos (linhagem J774.A1), que durante a infecção por *Leshmania* são importantes como células hospedeiras e como células reguladoras do processo inflamatório.

Para isso foi utilizado o ensaio de viabilidade através do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Este teste determina a atividade metabólica das células através da quantificação indireta, por meio de espectrofotometria, de produtos da redução do MTT promovida por enzimas mitocondriais como a succinato desidrogenase a partir de NADPH e NADH. Dessa forma, culturas que apresentam macrófagos com mitocôndrias viáveis, parâmetro utilizado para determinar a viabilidade celular, são capazes de reduzir o MTT à cristais de formazan (cor púrpura e insolúveis em água), e essa redução é quantificada em espectrofotômetro. Os resultados obtidos nas culturas tratadas com os derivados foram comparados com o resultado nas culturas tratadas apenas com DMSO 0,1% (MOSMANN, 1983; ARAÚJO et al., 2017).

A partir dos resultados, é possível observar que entre as ftalimido-1,4-naftoquinonas, as substâncias J3, J4, J6 e J6Br apresentaram alguma toxicidade aos macrófagos até a concentração de 100  $\mu$ M, porém apenas com J6 e J6Br essa toxicidade chegou a 50%, (CT<sub>50</sub> = 39,9  $\pm$  11,8  $\mu$ M e 42,1  $\pm$  3,7  $\mu$ M, respectivamente).

Os derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas possuem o anel ftalimida ligado ao grupamento 1,4-naftoquinônico através de uma amina secundária e uma cadeia de hidrocarbonetos. Os derivados diferem entre si no número de carbonos nessa cadeia e na presença ou ausência de um átomo de bromo no anel 1,4-naftoquinônico.

Os derivados J6 e J6Br possuem 6 átomos de carbono na cadeia de hidrocarbonetos, diferindo entre si pela ausência (J6) ou presença (J6Br) do átomo de bromo. A adição do bromo diminuiu a toxicidade apenas nos derivados com 3 (J3Br) ou 4 (J4Br) carbonos separando os grupamentos, mas não teve influência nos derivados com 6 carbonos. Aparentemente, esse maior número de carbonos teve maior influência na toxicidade que a presença ou ausência do bromo.

O fármaco padrão pentamidina, que faz parte dos fármacos de segunda escolha no tratamento das leishmanioses, apresentou toxicidade acima de todos os derivados ( $80,2 \pm 1,9\%$ ) com  $CT_{50}$  mais baixa que todos os derivados ( $0,7 \pm 0,2 \mu M$ ).

A maioria das substâncias bioativas promove sua atividade através de interações de regiões específicas em suas estruturas (farmacóforo), por exemplo grupamentos eletrofílicos, com receptores na célula alvo, ou seja, biomoléculas (proteínas, lipídeos, nucleotídeos) contendo sítios de ligação com afinidade química àqueles farmacóforos, e assim, promovendo modificações celulares que resultam no efeito farmacológico (NICOLAOU et al., 2012).

Desse modo, até pequenas alterações na estrutura molecular da substância, como um maior ou menor espaçamento entre grupamentos devido à presença ou ausência de um carbono, podem modificar bruscamente o efeito farmacológico (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018).

Os derivados ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas apresentam o grupamento 1,4-naftoquinônico acoplado ao grupamento triazol, e a este o grupamento ftalimida ligado por uma cadeia de hidrocarbonetos que difere em número de carbonos entre as substâncias. O derivado J02.3 não foi tóxico, porém tanto J01.3 quanto J03.3 apresentaram toxicidade acima de 50% ( $CT_{50}$   $7,8 \pm 0,2 \mu M$  e  $45,7 \pm 17,1 \mu M$ , respectivamente). O derivado J02.3 possui 3 carbonos na cadeia de hidrocarbonetos, enquanto as substâncias J01.3 e J03.3 possuem 2 ou 4, respectivamente.

Por se tratarem de ligações simples entre esses carbonos, os grupamentos podem adquirir diferentes conformações e distâncias dependendo do número de carbonos na cadeia. Por exemplo, um grupamento pode adquirir uma conformação diferente numa molécula quando ligado por um número ímpar ou par de carbonos, e isto pode possibilita-lo interagir ou não com um receptor (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018).

Desse modo, um número ímpar de carbonos parece estar associado à ausência de toxicidade na substância J02.1. Além disso, a toxicidade observada com os derivados ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas foi maior que com os derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas (alguns não tóxicos), sugerindo que o grupo triazol, ausente nestas substâncias, pode ter participação na toxicidade das substâncias J01.3 e J03.3.

Entre as atividades biológicas associadas às quinonas mais descritas na literatura está sua atividade contra protozoários. SUTO et al. (2015) demonstraram a atividade de derivados sintéticos de quinonas contra *Tripanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de chagas. SHARMA et al. (2013) demonstraram atividade de derivados 1,4-naftoquinonas contra *Plasmodium falciparum*, principal causador da malária. De forma semelhante, ARAÚJO et al. (2014) demonstraram que compostos sintéticos derivados de 1,4-naftoquinonas também apresentam boa atividade contra *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*.

Para estabelecer seu potencial leishmanicida *in vitro*, os derivados ftalimido-1,4-naftoquinonas e ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas foram avaliados neste trabalho contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Entre os seis ftalimido-1,4-naftoquinonas, os derivados J3Br, J4, J6 e J6Br tiveram atividade acima de 50% contra *L. amazonensis*, porém contra *L. chagasi*, apenas J4 e J6Br. Com o derivado J4 foi possível observar uma atividade mais próxima de 100% em ambas as espécies ( $86,4 \pm 5,5\%$  para *L. amazonensis* e  $89,6 \pm 4,1\%$  para *L. chagasi*), ao passo que com J6Br isso só foi observado contra *L. amazonensis* ( $85,0 \pm 5,2\%$  para *L. amazonensis* e  $58,3 \pm 8,3\%$  para *L. chagasi*). O fármaco padrão pentamidina apresentou atividade de 100% (ausência de parasitos viáveis) em ambas as espécies.

O derivado J4, que apresentou melhor atividade para ambas as espécies, possui quatro carbonos em sua cadeia de hidrocarbonetos e não possui o átomo de

bromo no anel 1,4-naftoquinona. Essa configuração molecular pode ter incrementado aspectos farmacocinéticos como a passagem da substância pelas barreiras celulares e/ou facilitado interações com alvos farmacológicos específicos nos parasitos.

Para se considerar uma substância protótipo promissora é preciso que esta possua não só a atividade biológica esperada, mas também que tal atividade seja direcionada à célula/tecido alvo, caracterizando-a uma substância seletiva. Isso é uma vantagem a ser considerada quando tratamos de fármacos antimicrobianos ou antineoplásicos. Sua seletividade pode se traduzir clinicamente em baixa propensão de causar efeitos adversos ao indivíduo na concentração terapêutica. A baixa seletividade dos fármacos utilizados atualmente é um dos principais problemas do tratamento das leishmanioses (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018).

O índice de seletividade é um parâmetro que permite identificar o padrão de seletividade *in vitro* de uma substância em culturas de células diferentes relacionando suas concentrações ativas. Neste caso foram utilizados os valores de  $CT_{50}$  (macrófagos) e  $CI_{50}$  (parasitos), ou seja, as concentrações que desempenharam 50% do efeito observado nas duas culturas. O índice de seletividade reflete a razão entre a  $CT_{50}$  e a  $CI_{50}$ . Um derivado que apresente uma concentração ativa nos parasitos menor que nos macrófagos terá seu índice de seletividade acima de 1, e quanto maior esse índice, mais seletivo tal derivado pode ser considerado (ARAÚJO et al., 2014).

Por exemplo, uma substância que produza 50% de morte na cultura de macrófagos numa concentração de 50  $\mu$ M (sendo, portanto, este seu valor de  $CT_{50}$ ) e na de parasitos numa concentração de 5  $\mu$ M (seu valor de  $CI_{50}$ ), seria considerada 10 vezes mais seletiva para os parasitos. Em um ambiente contendo os dois tipos celulares, hipoteticamente, tal substância teria 10 vezes mais chance de desempenhar sua atividade nos parasitos que nos macrófagos.

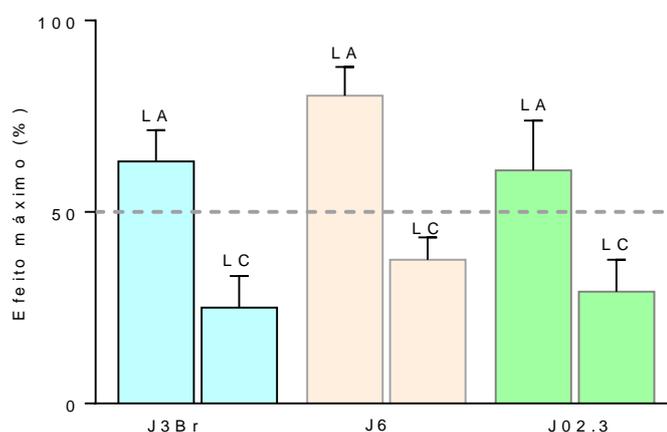
Desse modo, além de ser ativo para ambas as espécies, o derivado J4 parece ser seletivo aos parasitos, uma vez que seus índices de seletividade para *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram 3 e 5, respectivamente (Tabela 5). O derivado J3Br, por não apresentar toxicidade aos macrófagos, obteve índice de seletividade semelhante à J4 para *L. amazonensis*, o que não foi observado para *L. chagasi*.

Resultados semelhantes foram observados entre as ftalimido-1,2,3-triazolil-1,4-naftoquinonas. Com os derivados J01.3 e J03.3 foi observada atividade acima de 50% em ambas as espécies, porém com J02.3 apenas em *L. amazonensis*. Vale ressaltar que a única diferença estrutural entre eles está na cadeia de hidrocarbonetos que separa os grupamentos, que no derivado J02.3 possui 3 carbonos, enquanto nos derivados J01.3 e J03.3 possui 2 e 4, respectivamente. Semelhante ao efeito tóxico, a atividade leishmanicida parece maior quando há um número par de carbonos.

As espécies de parasitos do gênero *Leishmania* possuem características morfológicas, metabólicas e patogênicas diferentes entre si, sendo esta a natureza dos diferentes tipos de leishmaniose. Parasitos da espécie *L. chagasi*, por exemplo, tem maior tropismo, ou conseguem sobreviver com mais facilidade em células fagocitárias contidas ou sendo transportadas para órgãos viscerais, causando desse modo a forma visceral da leishmaniose, ao passo que espécies dermatrópicas, como a *L. amazonensis*, são incapazes de sobreviver em tais ambientes ou possuem maior tropismo por células fagocitárias contidas no tecido subcutâneo (LEON et al., 2017).

As diferenças entre as espécies podem também se traduzir em diferentes perfis de resistência à fármacos, como foi visto em nossos resultados. Três derivados, J3Br, J6 e J02.3, tiveram atividades acima de 50% apenas para *L. amazonensis*, podendo ter havido maior resistência a esses derivados nas culturas de *L. chagasi* (Figura 19).

**Figura 19 - Derivados com atividade acima de 50% apenas contra *L. amazonensis*. LA – *L. amazonensis*; LC – *L. chagasi*.**



**Fonte: Autor, 2018.**

Quando consideramos os tratamentos utilizados, apesar dos mesmos fármacos serem preconizados para todas as formas da doença, os sintomas das formas tegumentares podem ser atenuados com o uso de adjuvantes tópicos como antifúngicos e cicatrizantes, porém quando se trata da forma visceral não há muitas alternativas adjuvantes disponíveis que não estejam associadas ao aumento da toxicidade e custo (SANGSHETTI et al., 2015).

O derivado J01.3 foi o único com efeito leishmanicida máximo de 100%. Tal efeito só foi obtido nas culturas tratadas com pentamidina. Além disso, J01.3 foi o derivado mais potente, apresentando os menores valores de  $CI_{50}$  ( $5,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$  para *L. amazonensis* e  $7,3 \pm 0,5$  para *L. chagasi*). Apesar disso, o derivado mostrou-se pouco seletivo aos parasitos.

A partir dos nossos experimentos, o derivado considerado um protótipo ideal seria aquele que, nas concentrações testadas, não apresentasse toxicidade aos macrófagos, apresentasse robusta atividade contra ambas as espécies de *Leishmania* (próxima ou igual a 100%), e que tal atividade se desenvolvesse em concentrações baixas, sendo por isso seletivo, o que poderia refletir maior eficácia e segurança no tratamento. Apesar de não ter havido derivado com tal perfil, o que mais se aproximou foi J03.3, que se apresentou cerca de 5 vezes mais seletivo para ambas as espécies, com efeito máximo de  $80,4 \pm 7,5\%$  para *L. amazonensis* e  $89,5 \pm 4,1\%$  para *L. chagasi*, e valores de  $CI_{50}$  menores que  $10 \mu\text{M}$  em ambas as espécies.

## 8 CONCLUSÃO

O processo de desenvolvimento fármacos se inicia em etapas como a identificação de propriedades químicas e de atividades biológicas e tóxicas de protótipos. Apesar da maior parte desses protótipos serem descartados no processo, com raras exceções alcançando etapas de ensaios clínicos, geram inevitavelmente um rastro de informações que auxiliam em novas pesquisas.

As substâncias inéditas apresentadas nesse trabalho mostraram-se promissoras quanto a sua atividade leishmanicida. Entre as ftalimido-1,4-naftoquinonas, tem destaque o derivado J4, com atividade leishmanicida elevada tanto para promastigotas de *L. amazonensis* quanto de *L. chagasi*, sendo também seletiva para os parasitos. Entre as ftalimido-1,2,3-trazolil-1,4-naftoquinonas, destacam-se os derivados J01.3, que foi capaz de zerar a carga parasitária, e J03.3, que se mostrou seletivo para os parasitos, com elevada atividade e baixos valores de  $CI_{50}$  em ambas as espécies. Apesar da atividade leishmanicida, aspectos relacionados com a toxicidade dessas substâncias ainda precisam ser aprimorados.

Estas substâncias serão posteriormente avaliadas quanto a sua atividade frente a formas amastigotas *in vitro*, assim como nos testes de infecção *in vivo*, uma vez que estes derivados apresentam requisitos importantes para se avançar na cadeia de desenvolvimento de fármacos leishmanicidas.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOS REIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARÊNCIO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol.** v 84(2):389-96. 2008.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde Manguinhos.** 10(3), 853-882. 2003.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v.7, p. e35671, 2012.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEM, A. C. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica.** v. 105, p. 1-9. 2008.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.** v. 35, p. 699–705, 2010.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v 31(2):109-18. 2012.
- ARAUJO, A.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F.; PUCU, E.; CHIEFFI, P. P. Paleoparasitology: the origin of human parasites. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** 71(9B):722-726. 2013.

ARAÚJO, M. V.; SOUZA, P. S.; QUEIROZ, A. C.; MATTA, C. B.; LEITE, A. B.; SILVA, A. E.; FRANÇA, J. A.; SILVA, T. M.; CAMARA, C. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Synthesis, leishmanicidal activity and theoretical evaluations of a series of substituted bis-2 hydroxy-1,4-naphthoquinones. **Molecules**. 19(9):15180-95. 2014.

ARAÚJO, M. V.; DAVID C. C.; NETO, J. C.; OLIVEIRA, L. A.; SILVA, K. C.; SANTOS, J. M.; SILVA, J. K.; BRANDÃO, V. B. A.; SILVA, T. M.; CAMARA, C. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Exp Parasitol**. 176:46-51. 2017.

ARGUETA-DONOHUÉ, J.; WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. **Microbiol Immunol**. v 60(6):369-81. 2016.

ASSIS, S. P.; DA SILVA, M. T.; DE OLIVEIRA, R. N.; LIMA, V. L. Synthesis and anti-inflammatory activity of new alkyl-substituted phthalimide 1H-1,2,3-triazole derivatives. **Scientific World Journal**. v 2012:925925. 2012.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res**. v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**. v 7, nº 3, 2004.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 3731-38. 2002.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**. v 37(10):1097-106. 2007.

BERMAN, J. Amphotericin B Formulations and Other Drugs for Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v 92(3):471-73. 2015.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários. **Nota técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Processo nº 21000.042544/2016-94. 2016.

BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Tropical Medicine and International Health**. 6(11):928-934. 2001.

BUXBAUM, L. U. Interleukin-10 from T cells, but not macrophages and granulocytes, is required for chronic disease in *Leishmania mexicana* infection. **Infect Immun**. v 83(4):1366-71. 2015.

CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; LÓPEZ-MARTÍN, C.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. The 8 aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. **Antimicrob Agents Chemother**. 55(9):4204-10. 2011.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nat. Rev. Microbiol**. v. 5, p. 874-882. 2007.

COIMBRA, E. S.; LIBONG, D.; COJEAN, S.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; SOLGADI, A.; LE MOYEC, L.; DUENAS-ROMERO, A. M.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P. M. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemother**. v. 65(12):2548-55. 2010.

COSTA, M. A.; MATHESON, C.; IACHETTA, L.; LLAGOSTERA, A.; APPENZELLER, O. Ancient Leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile. **PLoS One**. v 4(9):e6983. 2009.

COX, F. E. G. History of human parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15, n. 4, p. 595–612, 2002.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 1:4-8. 2006.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v. 126:165-172. 2003.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v 103(7):653-60. 2009.

DIAZ, M. V.; MIRANDA, M. R.; CAMPOS-ESTRADA, C.; REIGADA, C.; MAYA, J. D.; PEREIRA, C. A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.** v 134:1-9. 2014.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.** 67(11):2676-97. 2012.

EIBL, H., UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treat. Rev.** 17:233-242. 1990.

FERREIRA, LEONARDO G.; OLIVA, GLAUCIUS; ANDRICOPULO, ADRIANO D. From Medicinal Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro. 2018.

- GALLIGNANI, M.; OVALLES, F.; BRUNETTO, M. D. R. BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Flow analysis-hydride generation-gas phase derivative molecular absorption spectrophotometric determination of antimony in oral homeopathic products ("*Antimonium Tartaricum*") formulated under alcoholic medium. **Talanta**. v 68:365-373. 2005.
- 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.
- HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**. v 73(9):919-34. 2013.
- HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol**. v 27(3):149-60. 2015.
- HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J Immunol Methods**. v 160(1):89-96. 1993.
- JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; FELTON, J. M.; SABIN, A. J.; HORTON, J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 1005 – 1011, 2005.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol**. v. 9, p. 604–615, 2011.
- KHAYEKA-WANDABWA, C.; KUTIMA, H. L.; NYAMBATI, V. C. S.; INGONGA, J.; OYOO-OKOTH, E.; KARANI, L. W.; JUMBA, B.; GITHUKU, K. S.; ANJILI, C. O. Combination therapy using Pentostam and Praziquantel improves lesion healing and parasite resolution in BALB/c mice co-infected with *Leishmania major* and *Schistosoma mansoni*. **Parasit Vectors**. 6:244. 2013.

KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; CHO, A. K. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v 52:221-47. 2012.

KUMAR, V.; BIMAL, S.; SINGH, S. K.; CHAUDHARY, R.; DAS, S.; LAL, C.; PANDEY, K.; DAS, V. R.; DAS, P. Leishmania donovani: dynamics of L. donovani evasion of innate immune cell attack due to malnutrition in visceral leishmaniasis. **Nutrition.** v 30(4):449-58. 2014.

KUMAR, C. S. C.; LOH, W. S.; CHANDRAJU, S.; WIN, Y. F.; TAN, W. K.; QUAH, C. K.; FUN, H. K. Synthesis, structural and antioxidant studies of some novel N-ethyl phthalimide esters. **PLoS One.** 2015 v 5:10(3).

LEÓN, C. M.; MUÑOZ, M.; HERNÁNDEZ, C.; AYALA, M. S.; FLÓREZ, C.; TEHERÁN, A.; CUBIDES, J. R.; RAMÍREZ, J. D. Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six Leishmania Species DNA in Colombia. **Front Microbiol.** v 8:1907. 2017.

LÓPEZ-MARTÍN, C.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; CARVALHO, L.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Sitamaquine sensitivity in Leishmania species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. **Antimicrob Agents Chemother.** 52(11):4030-6. 2008.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v 56(1):1-11. 2014.

MELAKU, Y.; COLLIN, S. M.; KEUS, K.; GATLUAK, F.; RITMEIJER, K.; DAVIDSON, R. N. Treatment of kala-azar in Southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 77:89-94. 2007.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Trop.** 130:112-6. 2014.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Treatment Options for Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection. **AIDS Rev.** (1):32-43. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v 65(1-2):55-63. 1983.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, p. 1561–1577, 2005.

NICOLAOU, K. C.; HALE, C. R.; NILEWSKI, C.; IOANNIDOU, H. A. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. **Chem Soc Rev.** v 41(15):5185-238. 2012.

NOVAIS, F. O.; CARVALHO, A. M.; CLARK, M. L.; CARVALHO, L. P.; BEITING, D. P.; BRODSKY, I. E.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. **PLoS Pathog.** v. 13(2): e1006196. 2017.

NOVO, S. P. C.; LELES, D. B. R.; ARAUJO, A. The process of leishmania infection - disease and new perspectives of paleoparasitology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58:45. 2016.

NOVO, S. P.; FERREIRA, L. F. The Paleoparasitology in Brazil and Findings in Human Remains from South America: A Review. **Korean J Parasitol.** v. 54(5):573-583. 2016.

NUNES, M. P.; CYSNE-FINKELSTEINA, L.; MONTEIRO, B. C.; SOUZA, D. M.; GOMES, N. A.; DOSREIS, G. A. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in

Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Microbes and Infection**. v 7:78-85. 2005.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Trends Parasitol**. v 31(12):653-64. 2015.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist Updat**. 9(1-2):26-39. 2006.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**. v 10(1):111-29. 2015.

RAMESH, V.; SINGH, R.; AVISHEK, K.; VERMA, A.; DEEP, D. K.; VERMA, S.; SALOTRA, P. Decline in Clinical Efficacy of Oral Miltefosine in Treatment of Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in India. **PLoS Negl Trop Dis**. 9(10). 2015.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. v 26(4):550-555. 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis review. **Lancet Infect Diseases**. v. 7, p. 581–596 2007.

SAIKIA, I.; BORAH, A. J.; PHUKAN, P. Use of Bromine and Bromo-Organic Compounds in Organic Synthesis. **Chem Rev**. 116(12):6837-7042. 2016.

SALEI, N.; HELLBERG, L.; KÖHL, J.; LASKAY, T. Enhanced survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells. **PLoS One**. v 12(2): e0171850. 2017.

SANGSHETTI, J. N.; KHAN, F. A. K. ; KULKARNI, A. A.; AROTE, R.; PATIL, R. H. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 32376–32415, 2015.

SAXENA, A.; KHOSRAVIANI, S.; NOEL, S.; MOHAN, D.; DONNER, T.; HAMAD, A. R. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**. v 74(1):27-34. 2015.

SHARMA, A.; SANTOS, I. O.; GAUR, P.; FERREIRA, V. F.; GARCIA, C. R.; DA ROCHA, D. R. Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3 phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). **Eur J Med Chem**. 59:48-53. 2013.

SILVA, MAURO GOMES DA. Síntese e avaliação da atividade antitumoral de heterociclos furânicos, triazólicos e quinolínicos contendo o núcleo naftoquinona. **Doutorado em Química**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2016.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Tabulação de dados**. 2015. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/doencas-e-agravos>. Visualizado em 26/07/2017.

SINGH, A. K.; RAJENDRAN, V.; PANT, A.; GHOSH, P. C.; SINGH, N.; LATHA, N.; GARG, S.; PANDEY, K. C.; SINGH, B. K.; RATHI, B. Design, synthesis and biological evaluation of functionalized phthalimides: a new class of antimalarials and inhibitors of falcipain-2, a major hemoglobinase of malaria parasite. **Bioorg Med Chem**. v 23(8):1817-27. 2015.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac J Trop Med**. 5(6):485-97. 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, 2004.

SOUZA-VIEIRA, T.; GUIMARÃES-COSTA, A.; ROCHAEL, N. C.; LIRA, M. N.; NASCIMENTO, M. T.; LIMA-GOMEZ, P. S.; MARIANTE, R. M.; PERSECHINI, P. M.; SARAIVA, E. M. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3K $\gamma$ , ERK, PI3K $\alpha$ , PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. **J Leukoc Biol.** v 100(4):801-810. 2016.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasit Vectors.** v. 9(1):277. 2016.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res.** v 123:345-52. 2006.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; SINDERMAN, H.; JUNGE, K.; BACHMANN, P.; BERMAN, J. Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 22:434-38. 2003.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine.** 347(22):1739-46. 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin Infect Dis.** 55(4):543-50. 2012.

SUTO, Y.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; YAMAGIWA, N.; ONIZUKA, Y.; IWASAKI, G. Synthesis and biological evaluation of quinones derived from natural product komaroviquinone as anti-Trypanosoma cruzi agents. **Bioorg Med Chem Lett.** 25(15):2967-71. 2015.

TANDON, V. K.; KUMAR, S. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. **Expert Opin Ther Pat.** v 23(9):1087-108. 2013.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, F. L.; SOUZA, W. Atlas didático: Ciclos de vida da *Leishmania*. **Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ.** 1ª edição. 64 p. 2013.

TIUMAN, T. S.; UEDA, T. N.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v 49:176-182. 2005.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(5):2608-13. 2014.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol.** v 46:65-94. 1992.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.** v 28(8):335-44. 2012.

VAN-GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** v. 10, p. 184–94. 2010.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.** v. 26(2):309-22, 2012.

VERMA, G. K.; VERMA, S.; SHANKER, V.; SINGH, G.; TEGTA G. R. A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from Sub Himalayan India. **Tropical Doct.** v. 42, n. 4, p. 237-239, 2012.

VERNON, P. J.; TANG, D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. **Antioxid Redox Signal.** v. 18(6):677-91. 2013.

VIANNA, G. O. Emprego do tártaro emético para leishmaniose tegumentar. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia.** v. 4(426). 1912.

WADHONE, P.; MAITI, M.; AGARWAL, R.; KAMAT, V.; MARTIN, S.; SAHA, B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **J. Immunol.** v. 182:7146-54. 2009.

WASUNNA, M. K.; RASHID, J. R.; MBUI, J.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; LODENYO, H.; FELTON, J. M.; SABIN, A. J.; ALBERT, M. J.; HORTON, J. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 7:871-876. 2005.

WEISS, S.; HATCHER, R. A. The Mechanism of the Vomiting Induced by Antimony and Potassium Tartrate (Tartar Emetic). **Journal of Experimental Medicine.** v 37(1):97-111. 1922.

WESTPHAL, O. Ether lipids in oncology - welcoming address. **Lipids.** 22:787-788. 1987.

WHO. World Health Organization. Control of leishmaniasis. **WHO Technical Report Series.** Geneve. v 949:1-186. 2010.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Third who report on neglected tropical diseases,** 2015.

WHO. Status of endemicity of cutaneous and visceral leishmaniasis, worldwide.

**World Health Organization.** 2015. Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso: 21/07/2017.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discov Today**. v. 0(0). 2017.