



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS**

MACEIÓ-AL

2023

SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito para obtenção do grau de Doutora.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes de diagnósticos.

Profa. Orientadora: Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Profa. Coorientadora: Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz

MACEIÓ-AL

2023

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

Bibliotecária Responsável: Livia Silva dos Santos - CRB 1670

- S586a Silva, Suellen Maria Albuquerque da.
Avaliação da atividade leishmanicida e antitumoral de novos derivados sintéticos
antraquinônicos / Suellen Maria Albuquerque da Silva. – 2023.
101f.:il.
- Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Coorientadora: Aline Cavalcante de Queiroz.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de
Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2023.
- Bibliografia: f. 90-101
1. Quinonas. 2. Leishmania - Doenças. 3. Farmacoterapia. 4. Glioblastoma. I. Título.
- CDU: 615.1

SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

Avaliação da atividade Leishmanicida e antitumoral de novos derivados sintéticos antraquinônicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 01/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA**
Data: 26/09/2023 12:30:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
Orientadora - Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ**
Data: 25/09/2023 12:43:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
Coorientadora – Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Arapiraca

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA BRAGA DORNELAS**
Data: 13/09/2023 19:36:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Camila Braga Dornelas
Universidade Federal de Alagoas –

Documento assinado digitalmente
 **JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR**
Data: 15/09/2023 10:49:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Universidade Federal de Alagoas –
UFAL

Documento assinado digitalmente
 **JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS**
Data: 25/09/2023 11:14:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas –
IFAL Campus Maceió

Documento assinado digitalmente
 **TIAGO GOMES DE ANDRADE**
Data: 14/09/2023 16:01:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade
Universidade Federal de Alagoas -
UFAL

*Dedico este trabalho especialmente
ao meu filho Josué, meu esposo Moisés,
minha mãe Maria da Conceição, minha avó
Selina Francisca (in memorian) e minha irmã
Maria Darleia e a todos que me ajudaram
e torceram pelo meu sucesso.*

AGRADECIMENTOS

Eu não conseguiria nada sem o poder de DEUS, ele que guiou meus passos, me fez forte, firmou meus pés na rocha, me levantou com sua poderosa mão. Esse trabalho é para honra e glória do meu pai amado e querido: DEUS de milagres, forte e imortal. Me fez forte para realizar esse tão almejado sonho. Quem como DEUS? Ninguém como DEUS!

Agradeço ao meu filho Josué, força imensurável nos meus dias, meu maior amor do mundo. Ao meu esposo Moisés, por todo amor, carinho, paciência, apoio e força. A minha mãe Conceição por sempre ser minha base, meu apoio, com amor e paciência. A minha avó Selina (*in memorian*) minha saudade eterna, minha gratidão. Minha irmã Darleia, por tanta força e incentivo, e sua família. Aos meus avós paternos, José Vicente e Maria Inácio, pelo incentivo, força, e por acreditarem no meu potencial. Ao meu pai Reginaldo, por acreditar em mim, e me auxiliar com palavras de força e coragem. A todos da minha família que sempre torceram por mim, e acreditaram que eu chegaria até aqui;

A minha orientadora Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira pela oportunidade que me proporcionou de participar da equipe do seu laboratório, confiança depositada e pela orientação nesse trabalho, me rendendo um vasto conhecimento e experiência para vida toda;

A Prof^a Dr^a Aline Cavalcanti de Queiroz por todo auxílio na pesquisa, confiança, por dividir seu conhecimento e por aceitar fazer parte da coorientação, contribuindo com essa pesquisa. A Prof^a Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart por ceder as substâncias testadas nesse projeto. Ao Prof^o Dr^o João Xavier de Araújo Junior e a Prof^a Dr^a Camila Braga Dornelas por aceitar fazer parte da banca, e contribuir para o melhor desenvolvimento deste trabalho, e todo incentivo durante minha trajetória, incluindo como aluna de graduação. Ao Prof^o Dr^o Johnnatan Duarte de Freitas, bem como o Prof^o Dr^o Tiago Gomes de Andrade, por todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, e por fazer parte da banca;

Ao Prof^o Dr^o Luciano Aparecido Meireles Grillo, por todo incentivo e apoio e por aceitar contribuir com esse trabalho em banca de avaliação como suplente. Ao Prof^o D^o Max

Denisson Maurício Viana, por todo incentivo, outras contribuições na caminhada acadêmica, e por aceitar participar como suplente da banca, contribuindo com o trabalho;

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

Também aos docentes: Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Campesatto por todas as oportunidades confiança e amizade, e Prof Dr Ticiano Gomes do Nascimento por todo incentivo e oportunidade desde o início da minha trajetória acadêmica; A Prof^a Prof^a Dr^a Maria Cláudia da Silva e a Prof^a Dr^a Amanda Evelyn da Silva, por todo incentivo colaboração, e também diante do processo de qualificação deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Eufrânio Nunes da Silva Júnior e aos alunos do Laboratório de Síntese Orgânica (UFMG), e do Laboratório de Eletroquímica (LEQUI/UFAL), pelos quais as substâncias foram sintetizadas, analisadas e cedidas para os ensaios realizados nesse trabalho;

A toda a equipe do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFi/ICBS/UFAL), em especial aos que contribuíram com esse projeto, meus amigos Amanda, Kaycke, Márcio, Letícia, Joice, Éder, Hilda, Lilyana, Shakira, Camila e José Clementino;

Aos meus amigos tão especiais que me incentivaram nessa jornada: Erika, Geraldo Neto, Alyne, Karoline, Gessyca, Tamires Alves, Karynna, Tammyres Nutels, Flávio e Valdemir;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

OBRIGADA!!!

“...E sabemos que todas as coisas
concorrem para o bem daqueles
que amam a Deus, daqueles que
são chamados segundo o seu
propósito.”

(Romanos 8:28)

RESUMO

As quinonas são uma classe dentre os compostos naturais, que possuem múltiplos alvos terapêuticos, com diversas afinidades farmacológicas. Dentre suas ações terapêuticas incluem: antibacteriana, antifúngica, antiprotzoário, atingindo ação leishmanicida e antitumoral. As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidas por meio de vetores flebotomíneos infectados. São endêmicas em 98 países e a população sob risco de infecção é estimada em 350 milhões. Dentre os tumores mais fatais, o Glioma é a sexta causa de morte associada ao câncer em todo o mundo (75% dos tumores cerebrais malignos), sua forma mais agressiva é o Glioblastoma com incidência mundial de 3,21/100.000 indivíduos. O tratamento adotado em ambos os casos, apresenta uma série de eventos adversos, contra indicações e toxicidade significativa, podendo levar o paciente ao óbito. Baseando-se no panorama exposto, fica evidente a necessidade de buscar novas opções terapêuticas para ambos os tratamentos, sendo o foco principal, estruturas terapêuticas, convenientes a atuar em diferentes aspectos farmacoterapêuticos. Este estudo propõe investigar a atividade leishmanicida e antitumoral de novos derivados sintéticos antraquinônicos (DSAQs). Para isto, nove DSAQs, foram desenvolvidos e cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica – UFMG e pelo Laboratório de Eletroquímica LEQUI/UFAL. Foi realizado o ensaio toxicidade *in vitro* pelo método de MTT, sobre macrófagos da linhagem J774.A1, para avaliação a dos DSAQs. A atividade leishmanicida foi avaliada pelo ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*, sobre formas promastigotas extracelulares de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada através dos ensaios de viabilidade celular sobre Glioblastomas da linhagem GBM02, pelo método de MTT. Foi realizado o ensaio de avaliação do efeito citotóxico sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC). Posteriormente, os DSAQs mais promissores foram submetidos aos ensaios de: análise morfológica e migração celular. Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI/ICBS/UFAL). No ensaio de MTT, os DSAQs, não reduziram 50% da população celular. Com relação ao ensaio de promastigota, ENSJ841, 848, 849 e 854 apresentaram redução estatística na viabilidade parasitária para espécie *L. chagasi*, com ENSJ849 apresentando IS mais expressivo (>35,33) e ENSJ849, 851 e 854, para espécie *L. amazonensis*, com ENSJ854 com IS>4,68, melhor resultado. Na viabilidade celular de GBM02, ENSJ650, 845, 848 e 854 apresentaram redução tumoral, após o tratamento de 72 horas. Os DSAQs não foram citotóxicos ao PBMC. ENSJ650 apresenta IS>4,55, mais expressivo. Após esses ensaios, apenas os DSAQs que mostraram redução das células de GBM02, prosseguiram para os ensaios de morfologia, e demonstraram sinais de morte celular com presença células com citoplasma arredondado, restos celulares, vacúolos citoplasmáticos com extravasamento de conteúdo pelo rompimento de membrana celular. Esses DSAQs selecionados, no ensaio de migração celular, foram capazes de inibi-la de forma estatisticamente significativa, em que o tratamento com ENSJ650 migra apenas 16% de GBM02. Diante dos resultados, é possível afirmar que os DSAQs induzem uma ação leishmanicida e antitumoral, corroborando com a ação multiterapêutica dos derivados quinônicos e na pesquisa de novos fármacos em ambas as áreas.

Palavras-chave: Quinonas. Antraquinonas. *Leishmania*. Antitumoral. Glioblastoma.

ABSTRACT

Quinones are a class among natural compounds, which have multiple therapeutic targets, with different pharmacological affinities. Among its therapeutic actions include: antibacterial, antifungal, antiprotozoal, reaching leishmanicidal and antitumor action. Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* transmitted through infected sand fly vectors. They are endemic in 98 countries and the population at risk of infection is estimated at 350 million. Among the most fatal tumors, Glioma is the sixth leading cause of death associated with cancer worldwide (75% of malignant brain tumors), its most aggressive form is Glioblastoma with a worldwide incidence of 3.21/100,000 individuals. The treatment adopted in both cases presents a series of adverse events, contraindications and significant toxicity, which can lead the patient to death. Based on the exposed scenario, it is evident the need to seek new therapeutic options for both treatments, with the main focus being therapeutic structures, convenient to act in different pharmacotherapeutic aspects. This study proposes to investigate the leishmanicidal and antitumor activity of new synthetic anthraquinone derivatives (DSAQs). For this, nine DSAQs were developed and provided by the Laboratory of Organic Synthesis – UFMG and by the Laboratory of Electrochemistry LEQUI/UFAL. The in vitro toxicity assay was carried out by the MTT method, on macrophages of the J774.A1 lineage, for the evaluation of the DSAQs. The leishmanicidal activity was evaluated by in vitro parasite viability assay, on extracellular promastigotes forms of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. The evaluation of antitumor activity was carried out through cell viability assays on Glioblastomas of the GBM02 lineage, using the MTT method. The assay to evaluate the cytotoxic effect on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was carried out. Subsequently, the most promising DSAQs were submitted to tests of: morphological analysis and cell migration. All assays were performed at the Laboratory of Pharmacology and Immunity (LaFI/ICBS/UFAL). In the MTT assay, DSAQs did not reduce 50% of the cell population. Regarding the promastigote assay, ENSJ841, 848, 849 and 854 showed a statistical reduction in parasite viability for *L. chagasi* species, with ENSJ849 showing a more expressive SI (>35.33) and ENSJ849, 851 and 854 for *L. amazonensis* species, with ENSJ854 with SI>4.68, better result. In GBM02 cell viability, ENSJ650, 845, 848 and 854 showed tumor reduction after 72 hours treatment. DSAQs were not cytotoxic to PBMC. After these tests, only the DSAQs that showed a reduction in GBM02 cells, proceeded to the morphology tests, and showed signs of cell death with the presence of cells with rounded cytoplasm, cell debris, cytoplasmic vacuoles with extravasation of contents due to the rupture of the cell membrane. These selected DSAQs, in the cell migration assay, were able to statistically significantly inhibit it, where treatment with ENSJ650 migrates only 16% of GBM02. In view of the results, it is possible to state that DSAQs induce a leishmanicidal and antitumor action, corroborating with the multitargeted action of quinone derivatives and in the research of new drugs in both areas.

Keywords: Quinones. Anthraquinones. *Leishmania*. Antitumor. Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação estrutural molecular das quinonas.....	21
Figura 2 -	Anel antraquinônico.....	23
Figura 3 -	Lesões causadas por leishmaniose cutânea.....	26
Figura 4 -	Manifestações clínicas da LMC.....	27
Figura 5 -	Indivíduo com hepatoesplenomegalia causada por LV.....	28
Figura 6 -	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , transmissor da leishmaniose.....	30
Figura 7 -	Ciclo Evolutivo do gênero <i>Leishmania</i> spp.....	30
Figura 8 -	Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. A – Macrófago infectado com formas amastigotas. B – Formas promastigotas.....	31
Figura 9 -	Distribuição geográficas das leishmanioses em 2020. A – LC; B – LV.....	31
Figura 10 -	Reação de redução de MTT a Formazan.....	42
Figura 11 -	Esquematização do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.....	43
Figura 12 -	Esquematização do ensaio de viabilidade de parasitos <i>in vitro</i>	44
Figura 13 -	Ressonância magnética demonstrando GBM em hemisfério cerebral esquerdo.....	54
Figura 14 -	Esquema de classificação para tumores gliais segundo a OMS.....	56
Figura 15 -	Mutações genéticas que contribuem no desenvolvimento de GBM primário e secundário.....	58
Figura 16 -	Representação esquemática da resposta imune e inflamatória de GBM.....	59
Figura 17 -	Conversão de TMZ em MTIC.....	61
Figura 18 -	Esquematização do ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT.....	68
Figura 19 -	Esquematização do ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células sanguíneas mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).....	
Figura 20 -	Esquematização do ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02.....	69
Figura 21 -	Esquematização do ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02.....	71
Figura 22 -	Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados antraquinônicos e da TMZ sobre a morfologia de GBM02.....	76

Figura 23 -	Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados sintéticos antraquinônicos e TMZ sobre a migração de GBM02.....	80
Figura 24 -	Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos e da TMZ sobre a migração de GBM02.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estruturas químicas dos derivados antraquinônicos.....	39
Tabela 2 -	Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, Pentamidina e Anfotericina, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774.A1 no ensaio de MTT.....	45
Tabela 3 -	Efeito leishmanicida dos derivados sintéticos antraquinônicos todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM e da Anfotericina e Pentamidina nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 µM contra formas promastigotas de <i>L. chagasi</i>	46
Tabela 4 -	Efeito leishmanicida dos derivados sintéticos antraquinônicos todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM e da Anfotericina e Pentamidina nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 µM contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
Tabela 5 -	Índice de seletividade dos derivados sintéticos antraquinônicos para citotoxicidade em macrófagos J774.A1 <i>versus</i> <i>L. chagasi</i> e macrófagos J774 <i>versus</i> <i>L. amazonensis</i>	48
Tabela 6 -	Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 µM, sobre a viabilidade de glioblastomas da linhagem GBM02, após 48h, no ensaio de MTT.....	72
Tabela 7 -	Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 µM, sobre a viabilidade de glioblastomas da linhagem GBM02, após 72h, no ensaio de MTT.....	73
Tabela 8 -	Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 µM, sobre a viabilidade de células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).....	74
Tabela 9 -	Índice de seletividade dos derivados sintéticos antraquinônicos e da TMZ para citotoxicidade em glioblastomas da linhagem GBM02 <i>versus</i> células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifostato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AnB	Anfotericina B
AnB-D	Desoxicolato de Anfotericina B
ANOVA	Análise de Variância
BHE	Barreira Hematoencefálica
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CDKN2A	Cinase Dependente de Ciclina 2 ^a
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CC₅₀	Concentração Citotóxica Mediana
CI₅₀	Concentração Inibitória Mediana
CO₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Cicloxigenase 2
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle/F12
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSAQs	Derivados Sintéticos Antraquinônicos
EGFR	Fator de Crescimento Epidérmico
e.p.m.	Erro Padrão da Média
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GBM	Glioblastoma
GBM-0	Glioblastoma 0
GOx	Glicose Oxidase
h	Hora
IDH1	Isocitrato Desidrogenase 1
IDH2	Isocitrato Desidrogenase 2
iNOS	Sintase de Óxido Nítrico Induzível
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1

IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IS	Índice de Seletividade
kg	Quilograma
kDNA	Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligrama
MGMT	O6-metilguanina-DNA Metiltransferase
min	Minutos
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
MTIC	5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida
MTT	[3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NF1	Neurofibromatose do Tipo 1
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
NKs	Células Natural Killers
NKT	Células T Natural Killers
Nm	Nanômetro
O₂⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
QT	Quimioterapia
PBS	Tampão Fosfato Salina
PEMT	Fosfatidiletanolamina N-metil-transferase
PDGRF	Receptor de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE2	Prostaglandinas E2
PGGFRA	Receptor de Crescimento Derivado de Plaquetas A
PM	Paramomicina
r.p.m.	Rotações por Minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Radioterapia

s	Segundos
Sb^{III}	Antimoniais Trivalentes
SFB	Soro Fetal Bovino
Sb^v	Antimoniais Pentavalentes
SI	Sistema Imunológico
SNC	Sistema Nervoso Central
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TGF-β	Fator De Crescimento Transformador β
Treg	Células T Reguladoras
Th1	Células T Efetoras 1
Th2	Células T Efetoras 2
TMZ	Temozolomida
TP53	Proteína de Tumor 53
TRL2	Receptores Toll-likes 2
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celcius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	Quinonas.....	21
2.1.1	Antraquinonas.....	23
3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS.....	25
3.1	Revisão da literatura.....	25
3.1.1	Leishmanioses.....	25
3.1.1.1	<i>Transmissão das leishmanioses.....</i>	<i>28</i>
3.1.1.2	<i>Epidemiologia.....</i>	<i>32</i>
3.1.1.3	<i>Tratamento das leishmanioses.....</i>	<i>34</i>
3.2	Objetivos.....	38
3.2.1	Objetivo geral.....	38
3.2.2	Objetivos específicos.....	38
3.3	Material e métodos.....	39
3.3.1	Obtenção das substâncias teste.....	39
3.3.2	Substâncias e Reagentes.....	40
3.3.3	Manutenção das células.....	41
3.3.3.1	<i>Macrófagos J774.A1.....</i>	<i>41</i>
3.3.3.2	<i>Leishmania spp.</i>	<i>41</i>
3.3.4	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	42
3.3.4.1	<i>Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.....</i>	<i>42</i>
3.3.4.2	<i>Ensaio de viabilidade de parasitos in vitro.....</i>	<i>43</i>
3.3.4.3	<i>Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre Leishmania spp.....</i>	<i>44</i>
3.3.5	Análise estatística.....	44
3.4	Resultados.....	45
3.4.1	Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.....	45
3.4.2	Ensaio de viabilidade de parasitos <i>in vitro</i>	46
3.4.3	Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre <i>Leishmania</i> spp.....	47
3.5	Discussão.....	49
3.6	Conclusão.....	53

4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS.....	54
4.1	Revisão da literatura.....	54
4.1.1	Glioblastoma multiforme.....	54
4.1.1.1	<i>Tratamento do Glioblastoma.....</i>	<i>60</i>
4.2	Objetivos.....	64
4.2.1	Objetivo geral.....	64
4.2.2	Objetivos específicos.....	64
4.3	Material e métodos.....	65
4.3.1	Obtenção das substâncias teste.....	65
4.3.2	Substâncias e Reagentes.....	65
4.3.3	Manutenção das células.....	65
4.3.3.1	<i>Glioblastoma GBM02.....</i>	<i>65</i>
4.3.4	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	66
4.3.4.1	<i>Ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT.....</i>	<i>66</i>
4.3.4.2	<i>Ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).....</i>	<i>67</i>
4.3.4.3	<i>Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre GBM02.....</i>	<i>68</i>
4.3.4.4	<i>Ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02.....</i>	<i>69</i>
4.3.4.5	<i>Ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02 – “Scratch”</i>	<i>70</i>
4.3.5	Análise estatística.....	71
4.4	Resultados.....	72
4.4.1	Ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT.....	72
4.4.2	Ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos)	73
4.4.3	Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre GBM02.....	74
4.4.4	Ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02.....	75
4.4.5	Ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02 – “Scratch”	79
4.5	Discussão.....	83

4.6	Conclusão.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

Os derivados quinônicos estão presentes em muitos ativos biológicos e tem importância fundamental no desenvolvimento dos seres vivos. Eles fazem parte de muitos produtos de ocorrência natural e fármacos biologicamente ativos, como Coenzima Q e *Aloe emodim*. Suas subunidades são responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras pesquisas na descoberta de novos fármacos, e funcionalidades específicas (Wang; Zhu; Zou, 2019).

A variedade de atividades biológicas relatadas, é devido ao fato de estarem presente no descobrimento de novos fármacos antiprotozoários, como leishmanicidas, tripanossomicidas e antimaláricos, antitumorais, antibacterianos, antivirais e antifúngicos. A estrutura molecular presente nos derivados quinônicos é capaz de se ligar ou interagir com vários tipos de receptores biológicos, e fornecer ligantes ativos e seletivos para múltiplos alvos biológicos, de modo que exibe boas condições como base de novos compostos ativos (Zhang *et al.*, 2021).

As características dos compostos quinônicos, permitem a possibilidade de pesquisar simultaneamente vários tipos de candidatos farmacológicos, o que favorece o aceleração do desenvolvimento de novos agentes farmacologicamente ativos (Zhang *et al.*, 2021), como exemplo dentre os fármacos derivados quinônicos que possuem a estrutura antraquinônica, a doxorrubicina da classe das antraciclinas, que apresenta atividade antitumoral e antimicrobiana (Tikhomirov *et al.*, 2020). Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento favorável de novos compostos naturais bioativos, incluindo as quinonas e seus derivados, na busca efetiva por medicamentos com atividades antitumoral e antiprotozoários (Da Silva Júnior *et al.*, 2019).

As leishmanioses representam o terceiro maior grupo de doenças transmitidas por vetores no mundo, perdendo apenas para malária e dengue. São consideradas doenças negligenciadas, atingindo em sua maioria indivíduos pertencentes a zonas de países subdesenvolvidos, sendo endêmica nessas regiões, o que leva a indicadores de morbidade e mortalidade inaceitáveis (Oliveira *et al.*, 2020a). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência de casos de leishmaniose mundial é de 700 mil a 1 milhão, o que leva de 20 mil a 30 mil mortes (Hernández-Bojorge *et al.*, 2020).

As leishmanioses são causadas por aproximadamente 20 espécies diferentes relacionadas ao gênero *Leishmania* spp., e classificadas em de acordo com seus principais aspectos clínicos em: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e

leishmaniose mucocutânea (LMC) (Maruyama *et al.*, 2019). A doença é mais comum nas regiões subtropicais, com referências de maior quantidade de casos na América Latina, constando 30% dos casos mundiais (Hernández-Bojorge *et al.*, 2020), e desses 96% de casos são no Brasil (Herrera *et al.*, 2020), com foco de casos progressivos na região Nordeste (Machado *et al.*, 2020). O principal agente etiológico, transmissor da doença na região da América Latina, são flebótomos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) (Oliveira *et al.*, 2020).

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral maligno mais comum, dentre todos os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC), 47,7% são neoplasias malignas relacionadas ao GBM. A taxa de incidência tem aumento com a idade, sendo a maior em indivíduos idosos, com prevalência considerável. Devido ao mau prognóstico, sua agressividade resulta em uma sobrevida global mediana de poucos meses, e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes, mesmo com intensa pesquisa nos últimos anos de novos tratamentos (Klekner *et al.*, 2019).

O GBM e as leishmanioses tem em comum dificuldades e falhas terapêuticas, enquanto GBM tem uma alta complexidade, localização em regiões de difícil acesso, alto índice de resistência a tratamentos, ambiente fortemente imunossupressor e presença da barreira hematoencefálica (BHE) (Di Fillipo *et al.*, 2021). As leishmanioses possuem terapias com limitações devido a indução de resistência aos fármacos pelas espécies, de alto custo, tratamento doloroso e potencialização de efeitos colaterais que podem se tornar graves (Akbari; Oryan; Hatam, 2021), o que também ocorre no tratamento quimioterápico para GBM.

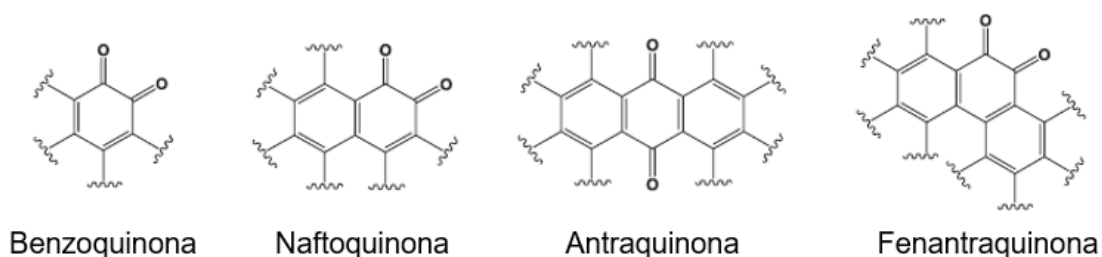
Logo, o planejamento estrutural dos derivados antraquinônicos entram com destaque na procura de novos fármacos, tornando-se de extrema importância para alavancar terapias, que desenvolvam solução farmacológica para os casos de leishmanioses e GBM. A necessidade de novas drogas é urgente, visto que as limitações dos tratamentos em curso, causam abandono da terapia por parte dos pacientes, agravando ainda mais efeitos causados por essas enfermidades. É viável que quanto maior o número de alvos terapêuticos e possíveis modificações estruturais, juntamente o possível surgimento de terapias farmacológicas com baixo custo, diminuição de efeitos colaterais e aumento da eficácia e efetividade, mudem o cenário atual dos pacientes que buscam por melhor qualidade de vida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Quinonas

As quinonas são de origem natural e constituem uma família de substância orgânicas, que se caracterizam por dois grupamentos carbonílicos, que podem posicionar-se em disposição 1,2 (orto-quinona) ou 1,4 (para-quinona), conjugados em anéis insaturados de seis membros. A partir da sua estrutura aromática do anel presente, são classificadas em: Benzoquinonas, possuem um anel benzênico; Naftoquinonas, apresentam um anel naftalénico; Antraquinonas, as que apresentam um anel antracênico; e Fenantraquinonas, as que possuem um anel fenantrênico (**Figura 1**) (Souza, 2018).

Figura 1 – Classificação estrutural molecular das quinonas.



Fonte: Adaptado de Sousa; Lopes; Andrade, 2016.

As principais fontes naturais de quinonas são encontradas em vegetais, presentes em galhos, folhas e raízes, e seus extratos são empregados pela medicina popular, desde a antiguidade, no tratamento de diversos tipos de doenças. Para os seres humanos as quinonas naturais são de vital importância, como também para outros seres vivos, dentre eles artrópodes, fungos, bactérias, algas e vírus (Sousa; Lopes; Andrade, 2016).

Os novos protótipos desenvolvidos com o intuito de opções para terapias, e aumento da gama de novos medicamentos, tem sido extraídos de produtos naturais, que desempenham papel fundamental na medicina tradicional. Devido esse ponto, os derivados quinônicos, fazem parte desses produtos naturais utilizados para novos fins terapêuticos, pois são abundantes na natureza, potencialmente seguros, o que leva a uma terapia barata e estável. Isolados da casca da cinchona, espécie empregada desde a antiguidade na região da Amazônia no tratamento de febre e introduzido na Europa no século XVII para tratar malária. Recentemente, houve aumento de pesquisas que consideram o potencial de compostos naturais bioativos, os principais precursores no

desenvolvimento de novos medicamentos no tratamento de câncer e doenças negligenciadas (Da Silva Júnior *et al.*, 2019).

As quinonas possuem moléculas e eletrófilos altamente redox ativos, o que é indispensável para reatividade em sistemas biológicos, pois seus produtos químicos orgânicos têm alto poder reativo, que permite a esses eletrófilos formarem ligações covalentes com nucleófilos em tecidos, e ainda, compreendem uma classe de intermediários toxicológicos, que interagem sozinhos e reduzem oxigênio para gerar ROS, atuando como pró-oxidante, promovendo reações inflamatórias, ativação do sistema imunológico, oxidação do DNA e propriedades que induzem a toxicidade (Klopčič; Dolenc, 2018).

As atividades biológicas dos derivados quinônicos incluem ação sobre protozoários, incluindo antimalárica, tripanocida e leishmanicida, ação antibacteriana, antifúngica e anticâncer. Vários estudos apontam a atividade antitumoral e antiprotozoários as mais relevantes, devido a muitas substâncias com ação farmacológica possuírem o núcleo quinônico em suas estruturas, gerando investigações para descobertas de novas drogas quinoídicas, com efeitos farmacológicos na terapia do câncer e contra protozoários, com menos citotoxicidade, o que implica na redução de efeitos colaterais (Souza, 2018); (Sieveking *et al.*, 2014).

Os derivados quinônicos podem inibir ou ativar com sucesso um único alvo específico, como também são capazes de atuar simultaneamente em diversos alvos biológicos, devido a isso, existe maior atração na concepção de novas terapias. Nesse contexto, os derivados quinônicos são demonstrados essenciais, devido suas classes de compostos apresentarem ação farmacológica com multi-avos terapêuticos (Cruz *et al.*, 2016).

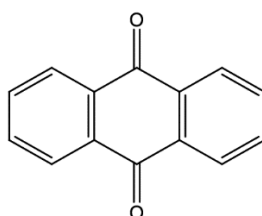
Em relação a atividade leishmanicida, os ensaios de Pérez-Pertejo e colaboradores (2019), corroboram esse efeito contra cepa transgênica da espécie *L. infantum*, e baixa citotoxicidade para células de mamíferos, em derivados quinônicos da classe de naftoquinonas. Araújo e colaboradores (2017), em estudos com derivados de naftoquinonas, também observaram efeitos leishmanicidas, sem afetar a viabilidade de macrófagos. Essas substâncias foram capazes de causar efeito deletério em parasitos das espécies *L. chagasi* e *L. amazonenses*, em formas evolutivas de promastigotas e ainda, em formas amastigotas da espécie *L. chagasi*. Estudos que comprovam o efeito farmacológico contra o parasito de várias espécies causadoras de leishmaniose.

Seus efeitos anticâncer, podem também ser comprovados a partir de ação dos derivados quinônicos, frente ao GBM. O derivado de benzoquinona, 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona, demonstrou atividade antitumoral no GBM da linhagem U87MG e GBM8401, em estudos de Yang e seus colaboradores (2021), retardando o crescimento e suprimindo a formação de colônias em células tumorais. Clementino Neto (2019) em seus ensaios, obteve resultados com derivados da classe de naftoquinonas, 2-N,N'-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, dos quais alguns compostos demonstraram ação antitumoral sobre GBM da linhagem GBM02, com maior eficácia quando comparados ao TMZ, fármaco padrão de tratamento.

2.1.1 Antraquinonas

As antraquinonas (**Figura 2**) são compostos muito utilizados como corantes, devido a uma de suas características ser a de possuir colorações, relacionada as estruturas com um alto grau de conjugações. São utilizadas em grande escala na indústria alimentícia, por serem de origem natural e possuírem menor toxicidade. Entre as principais estão alizarina, purpurina e rubiadina, extraídas da espécie *Rubia tictorum* L. e o ácido carmínico, extraído da espécie *Dactylopius coccus* da fêmea da cochonilha (Oliveira, 2012).

Figura 2 – Anel antraquinônico.



Fonte: Adaptado de Sousa; Lopes; Andrade, 2016.

As antraciclinas representam um grupo de antraquinonas, com efeito antibiótico e usado como antitumoral há décadas. A sua descoberta foi proveniente de culturas de fungos do gênero *Streptomyces*, que deu origem a dois fármacos: daunorrubicina e adriamicina (doxorrubicina), usadas em esquemas antitumorais de sarcomas e carcinomas, dentre outros fármacos da classe tem-se epirrubicina e idarrubicina, classe que demonstra atividades farmacológicas, antimicrobiana e antineoplásica (Oliveira, 2012); (Tikhomirov *et al.*, 2020). Ainda na classe das antraciclinas o fármaco doxorrubicina, também se insere como antitumoral com efeito antimicrobiano. Sua

eficácia já é comprovada em vários esquemas antitumorais, e em estudos de Shokri¹*et al.* (2017), foi possível observar também ação leishmanicida de formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. major*, em ensaios com o próprio fármaco.

Dimmer *et al.* (2019) testaram a atividade antiparasitária de cinco antraquinonas naturais obtidas de *Heterophyllaea lycioides*, através de ensaios com promastigotas de *L. amazonensis*, através de microscopia eletrônica de varredura e bioiluminescência. Como resultado, foi observado alteração na viabilidade celular de tais formas evolutivas para espécie.

A relação da atividade leishmanicida com derivados antraquinônicos está presente em alguns estudos, como Bolognesi e colaboradores (2008) relataram, ao testar os derivados 2-fenoxi-1,4-antraquinona, frente a espécie *L. donovani*, alguns sugeriram atividade. Em 2019, Pérez-Pertejo e colaboradores em estudos comprovaram a ação dos derivados antraquinônicos, 1,4-antraquinonas, sobre cepas da espécie *L. infantum*, demonstrando boa eficiência leishmanicida, destacando melhores resultados para os derivados com uma porção de hidroquinona acetilada. Alguns dos derivados apresentaram ação como inibidores de topoisomerasas 1B, enzimas essenciais presentes no DNA do parasito, o que levou a ação leishmanicida.

Tikhomirov e seus colaboradores (2020) relatam que derivados antraquinônicos testados, como o antra[2,3-b]furano-5,10-diona ligados a diaminas cíclicas, inibem o crescimento de células tumorais, inclusive multirresistentes. Alquilações nas posições 4 e 10 por grupamentos hidroxila, substituição por grupos amino ou halogênios diminuíram sua citotoxicidade. Os derivados com melhores atividades relatadas, apresentaram indução da apoptose, principalmente por inibição das enzimas topoisomerasas 1 e 2, por meio de estresse oxidativo.

Arcella e colaboradores (2018) testaram o efeito da Aloe-Emodin, um composto antraquinônico presente nas folhas de *Aloe arborescens* frente a linhagem de células de GBM U87MG. Aloe-Emodin foi capaz de diminuir a proliferação celular, agindo nas fases S e G2 do ciclo celular, também induziu apoptose e reduziu enzimas responsáveis pela formação de DNA, características de denotam capacidade antitumoral.

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS

3.1 Revisão da literatura

3.1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são classificadas entre as sete espécies causadoras de doenças tropicais, mais importantes do mundo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Elas representam um grave problema de saúde mundial devido ao seu amplo espectro de manifestações clínicas, com muitos desfechos potencialmente fatais (Lópes-Arencia *et al.*, 2019).

Os protozoários da classe Kinetoplastidae (Araújo *et al.*, 2019), da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* são os agentes causais responsáveis pela doença (Zulfiqar; Shelper; Avery, 2017). A transmissão do parasito a mamíferos suscetíveis ocorre por meio da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Antigo Mundo). Considerada uma doença negligenciada, desenvolve várias condições clínicas, devido a mais de 20 espécies pertencentes ao gênero (Araújo *et al.*, 2019).

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças transmissíveis relacionadas principalmente indivíduos que vivem em condições de pobreza, mais comumente em regiões tropicais, o que afeta mais de um bilhão de pessoas no mundo, conferindo deficiência significativa por toda vida, sofrimento e morte, capturando os mais pobres em um ciclo de pobreza e doença, devido as características clínicas retardarem o desenvolvimento físico e cognitivo (Ravera *et al.*, 2018).

O resultado do quadro clínico e a gravidade da doença dependem muito da espécie causadora, como também da resposta do hospedeiro contra o parasito. Indivíduos com problemas como imunodeficiência em casos Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), são mais suscetíveis a formas disseminadas e tendem a ter manifestações mais graves de Leishmaniose (Khadir *et al.*, 2018). Os pacientes com supressão imunológica induzida por doenças cancerígenas, também podem promover o desenvolvimento de leishmaniose, provavelmente pela imunossupressão induzida por quimioterapias antineoplásicas de longo prazo, que podem ser responsáveis pela expansão do parasito e ainda, por um prognóstico mais grave e desfavorável (Schwing *et al.*, 2019). Ainda, variações genéticas entre subespécies de *Leishmania* tem importância determinante para

o desfecho da doença e é responsável também, pela grande diversidade de manifestações clínicas encontradas (Khadir *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas são classificadas como leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (Araújo *et al.*, 2019). A LC denominada leishmaniose tegumentar é caracterizada clinicamente por lesões cutâneas em áreas expostas do corpo, como rosto, braços e pernas como visto na **Figura 3**, que se desenvolvem como pápulas ao longo de semanas a meses após a picada do flebotomíneo, e de acordo com a quantidade, pode-se desenvolver lesões múltiplas pelo corpo, o que também ocorre devido a distribuição linfática. Com o decorrer dos meses, as pápulas aumentam para nódulos que ulceram lentamente. Geralmente, os indivíduos doentes estão sistematicamente bem, apresentando esporadicamente coceira nas lesões, sem queixa de dor. A LC não é uma doença fatal, mas pode levar a uma morbidade substancial, estigmatização social e efeitos psicológicos. Os parasitos são comumente divididos em espécies, dentre essas as endêmicas na América do Sul estão: *Leishmania amazonenses*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Figura 3 – Lesões causadas por leishmaniose cutânea.



Fonte: Adaptado de Murback *et al.*, 2011.

A LMC causa uma resposta imunopatológica expressiva, provocando lesões destrutivas que começam nos lábios, palato e septo nasal (**Figura 4**), agravando congestão nasal deflagrada por secreção ou epistaxe. Uma grande parte dos casos de LMC são

decorrentes de LC que acometeram o indivíduo a décadas atrás, se tornando um fator de risco em casos de lesões acima da cintura, lesões primárias múltiplas ou grandes, e ainda cura retardada dessas lesões. Também é considerada mais comum em indivíduos imunocomprometidos, e pode ser potencialmente fatal, levando a desfiguração permanente, condição que em estágio final destrói a cavidade oronasofaríngea mucosa e cartilagem, afetando a laringe o que causa pneumonia por aspiração, e devido a esses fatores, um diagnóstico e tratamento precoce devem ser priorizados (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Figura 4 - Manifestações clínicas da LMC.



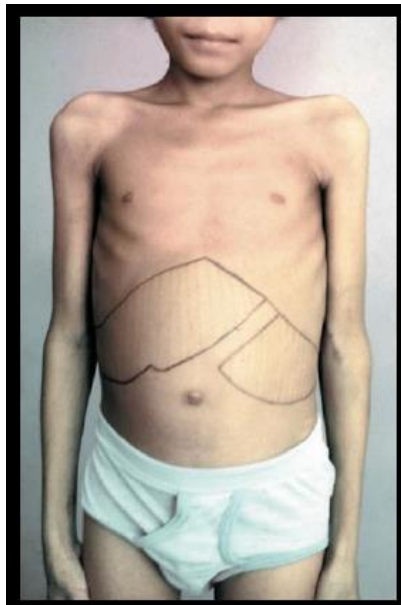
Fonte: Adaptado de Burza; Croft; Boelaert, 2018.

A infecção causada por espécies do subgênero *Viannia* são responsáveis pela progressão da doença e causar LCM, principalmente quando acomete a mucosa da região superior do trato gastrointestinal e respiratório. As espécies *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, são os principais agentes responsáveis pela LCM nas Américas (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

A LV também conhecida popularmente como kala-azar e febre negra, é a forma mais grave da doença, causada principalmente pelos agentes dos gêneros *Leishmania* *donovani* (*L. donovani*), na Índia e no continente da África Oriental, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) em países do mediterrâneo, e *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) e *Leishmania tropica* (*L. tropica*) na região da América do Sul. Seu período de incubação dura de 3 a 8 meses (Torres-Guerrero *et al.*, 2017), e dentre os sintomas clínicos os indivíduos podem demonstrar febre prolongada, anorexia, fraqueza, perda de peso, hepatomegalia,

esplenomegalia como demonstrado na **Figura 5**, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Morais-Teixeira; Rabello; Aguiar, 2019).

Figura 5 – Indivíduo com hepatoesplenomegalia causada por LV.



Fonte: Viotto, 2018.

3.1.1.1 Transmissão das leishmanioses

As leishmanioses são consideradas zoonoses com gerenciamento desafiador em escala global. O protozoário do gênero *Leishmania* é capaz de infectar macrófagos de mamíferos hospedeiros, através da transmissão da doença pelos vetores com vários desses hospedeiros, dentre eles humanos e cães, como também reservatórios, incluindo flebotomíneos (Geroldinger *et al.*, 2020).

A principal transmissão dos parasitos causadores das leishmanioses é vetorial, através da picada do inseto (Díaz-Saez *et al.*, 2021), conhecido popularmente no Brasil como mosquito palha, tatuquira, cangalhinha, birigui, mulambinho e catuqui (Santos, 2020). Nas Américas, a transmissão por meio do mosquito, tem como principal vetor flebotomíneo a espécie *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) (**Figura 6**) (Moraes *et al.*, 2018). Além da transmissão vetorial, existem também vias não vetoriais como transfusão de sangue, reutilização de agulhas, mordida de animais, transmissão sexual e vertical, que são pouco relatadas em áreas endêmicas (Díaz-Saez *et al.*, 2021).

Figura 6 – *Lutzomyia longipalpis*, transmissor da leishmaniose.



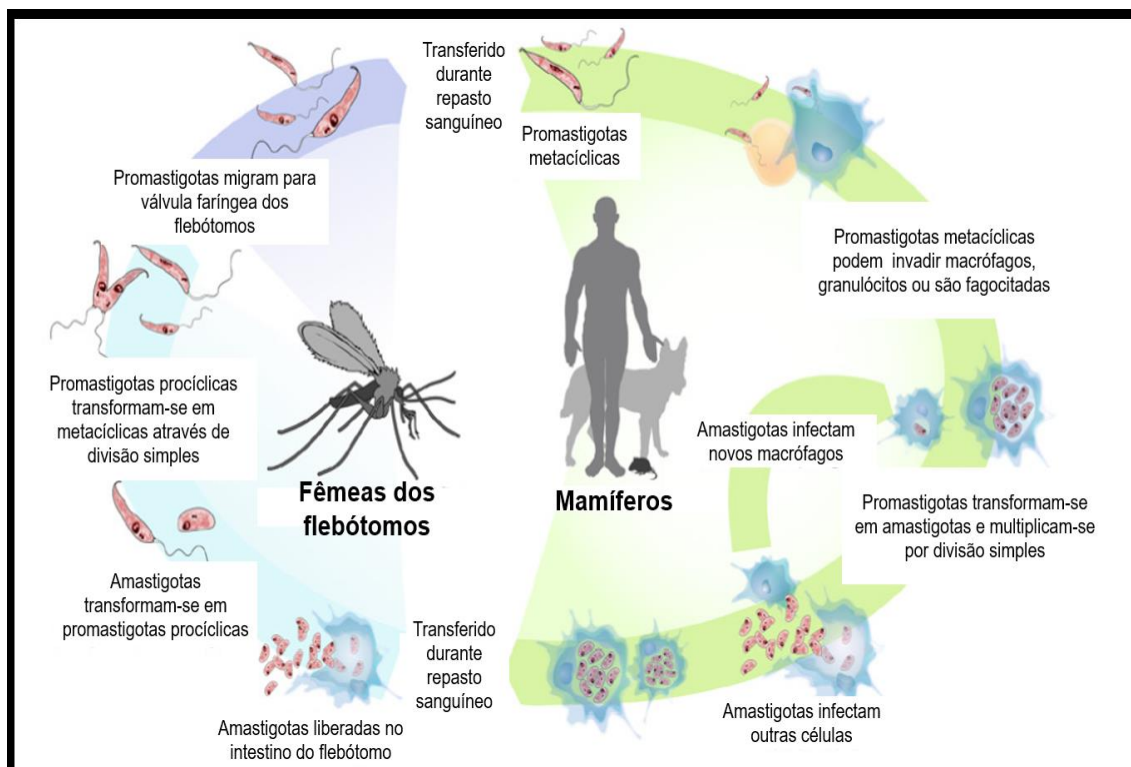
Fonte: Viotto, 2018.

As fêmeas dos flebótomos são os hospedeiros invertebrados, encontrados principalmente em criadouros de animais, lixo a céu aberto, depósitos de matéria orgânica e ambientes úmidos, e os mamíferos silvestres ou domésticos hospedeiros vertebrados, sendo o homem um hospedeiro acidental, pois roedores e canídeos são os animais mais comumente infectados, caracterizando-se como principais reservatórios do parasito (Viotto, 2018).

O ciclo evolutivo do gênero *Leishmania* spp. (**Figura 7**) inicia-se quando os parasitos são injetados na forma de promastigotas, por meio da tromba da fêmea dos flebótomos na pele do hospedeiro vertebrado, assim os neutrófilos são as primeiras células que serão infectadas, a partir da fagocitose dessas promastigotas no local em que houve a inoculação pelo mosquito. Estes neutrófilos sofrem apoptose, e podem ser fagocitados por macrófagos ou células dendríticas, porém também passam a liberar vários parasitos viáveis na circulação, que são fagocitados pelos macrófagos. Dentro dos macrófagos os parasitos, diferenciados em amastigotas, se multiplicam causando a ruptura celular, invadindo a corrente sanguínea e posteriormente mais macrófagos (Salazar *et al.*, 2019).

As amastigotas são inoculadas novamente pelo mosquito durante o repasto sanguíneo das fêmeas, ao se alimentarem do hospedeiro vertebrado infectado, os parasitos se tornam promastigotas na porção posterior do intestino médio do flebótomo e se multiplicam por fissão binária. As promastigotas migram para a porção anterior do intestino médio e infectam um novo hospedeiro quando o repasto sanguíneo acontece novamente (Salazar *et al.*, 2019).

Figura 7 – Ciclo Evolutivo do gênero *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Anversa *et al.*, 2018.

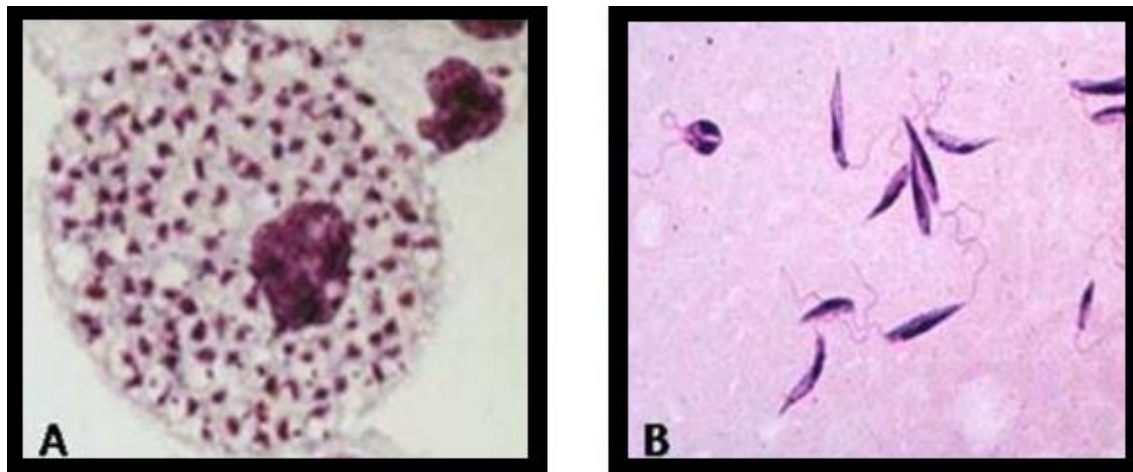
A característica principal do gênero *Leishmania* spp. é a presença do cinetoplasto, encontrado em uma única mitocôndria ramificada, essa estrutura se apresenta em forma de disco contendo uma rede de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) circular, chamada de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Johnston *et al.*, 1999).

A forma amastigota, presente nos hospedeiros vertebrados, geralmente são armazenadas intracelular nos fagolisossomos das células do sistema fagocítico mononuclear (Morea *et al.*, 2021), sobrevivendo e multiplicando-se dentro dessas células. No humano, as células parasitadas podem chegar a órgãos do sistema linfóide, dentre eles baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Os parasitos em forma amastigota, possuem estrutura esférica ou ovoide, com núcleo arredondado, cinetoplasto, aflagelada sem mobilidade, como pode ser observado na **Figura 8-A** (Silva, 2018), tem cerca de 2,5-5,0 μm de diâmetro, contendo um cinetoplasto localizado próximo ao núcleo (Santos, 2020).

A forma promastigota encontrada nos hospedeiros invertebrados (Shrivastava *et al.*, 2019), é caracterizada como extracelular, alongada, flagelada, móvel, medindo cerca de 5-15 μm de comprimento e com cinetoplasto localizado entre o núcleo e sua extremidade anterior (**Figura 8-B**) (Santos, 2020). Anteriormente a transmissão, os parasitas diferenciam-se dentro do tubo digestório do inseto em promastigotas procíclicos

não infecciosos para formas intermediárias de nectomonas. Por último, os parasitas ainda se diferenciam em promastigotas metacíclicas, extremamente infecciosas (Shrivastava *et al.*, 2019).

Figura 8 – Formas evolutivas de *Leishmania* spp. A – Macrófago infectado com formas amastigotas. B – Formas promastigotas.



Fonte: Rocha, 2009.

Durante a infecção causada por *Leishmania* spp. ocorrem vários eventos entre o transmissor e o hospedeiro, que vão ativar a resposta inflamatória e o sistema imunitário. O sistema complemento é um dos primeiros complexos a serem ativados, após a inoculação do parasito pelo vetor, e o processo de opsonização dos parasitos é realizado por componentes do sistema, favorecendo a entrada dos parasitos nos fagócitos, pela fagocitose mediada pelo complemento, porém as promastigotas possuem a camada de lipofosfoglicano (LPG), que impede a sua destruição, além de atraírem células imunes inatas, que realizam fagocitose, para o ponto de inoculação (Silva, 2021).

As células imunes inatas como macrófagos, neutrófilos e células natural killers (NKs), ao reconhecerem as moléculas presentes nos parasitos, ativam cascatas inflamatórias e liberação de citocinas (Valentim-Silva *et al.*, 2020). A resposta protetora imune, é iniciada por ativação da liberação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Cunha *et al.*, 2020), induzindo células T efectoras 1 (Th1) (Pessenda; Silva, 2020), e T efectoras 2 (Th2), mediando secreção de Interferon- γ (IFN- γ), e agindo no favorecimento para o crescimento parasitário, por células infectadas, secretando outras citocinas inflamatórias, como interleucina-12 (IL-12), 1 (IL-1), 17 (IL-17), fator de necrose tumoral α (TNF α) que propiciam ainda a inativação de macrófagos, além de células T reguladoras (Treg) e

fator de crescimento transformador β (TGF- β), o que favorece a exacerbação da resposta infecciosa (Silva, 2021); (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016).

3.1.1.2 Epidemiologia

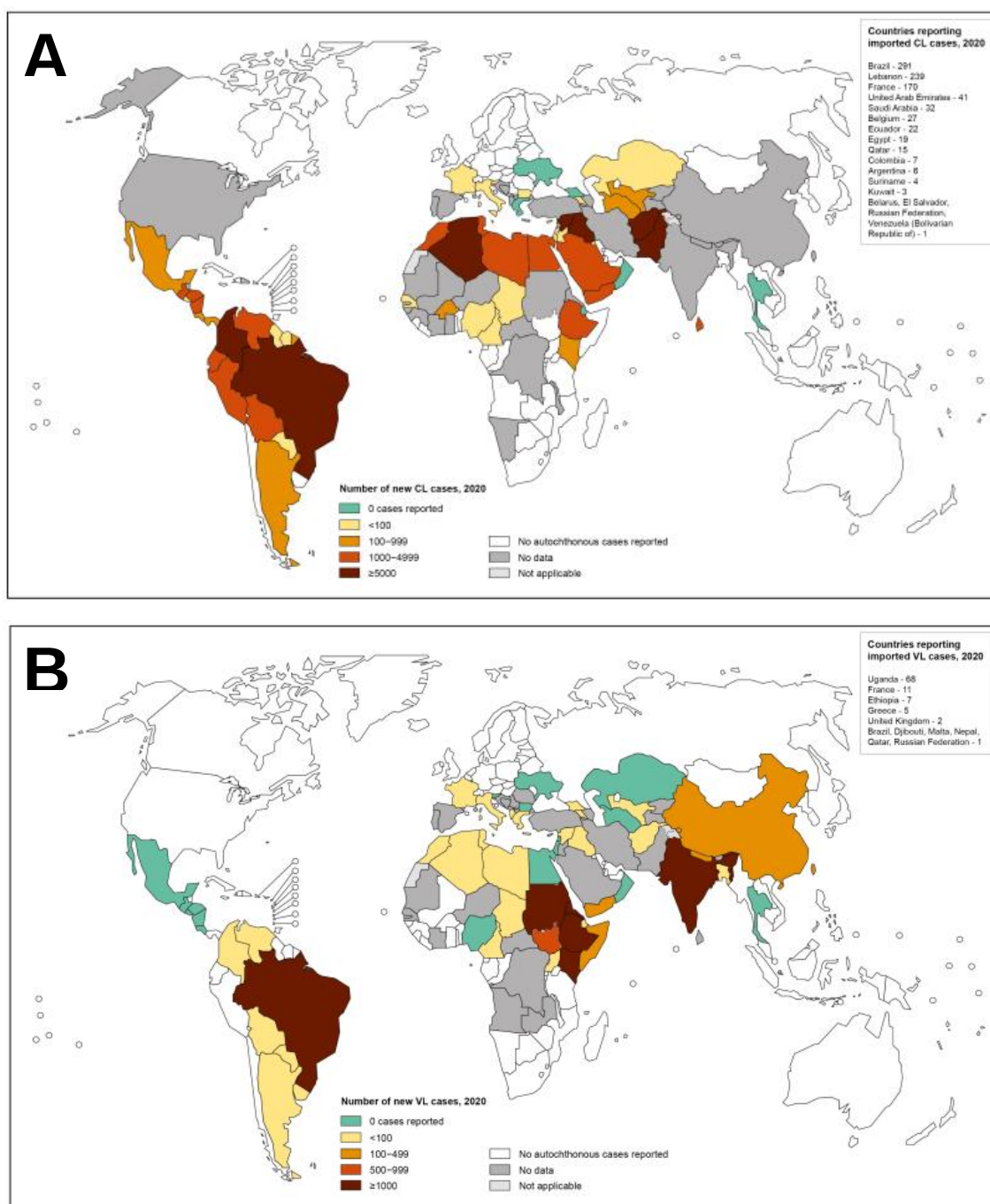
A leishmaniose tem ampla distribuição mundial, presente em 98 países, e cerca de 1 bilhão de indivíduos vivem em áreas endêmicas, correndo risco de adquirir a doença, estimando que a cada ano surgem aproximadamente 1,3 milhões de novos casos, desses 30 mil para LV e mais de 1 milhão para LC (Who, 2023). É uma doença endêmica em continentes como Ásia, África, Américas e região do Mediterrâneo (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

De acordo com as manifestações clínicas da doença, os países demonstrados com mais casos de LV são: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão, com cerca de 90% dos casos totais em todo o mundo (Torres-Guerrero *et al.*, 2017), é considerada fatal caso não haja tratamento, e estima-se que 50 mil a 90 mil de novos casos ocorram em todo o mundo a cada ano (Azevedo *et al.*, 2021). Com relação a LC, no total de 75% dos casos, ocorrem em países das Américas, destacando a relevância epidemiológica desse continente (Herrera *et al.*, 2020). A **Figura 9** mostra a distribuição de LV e LC, segundo dados da OMS.

No continente Americano indivíduos enfermos encontram-se em 19 países, dentre eles a transmissão é considerada estável em países como Colômbia e Venezuela, enquanto que países como Argentina, Brasil e Paraguai apresentam um padrão de transmissão expansivo, com novos territórios afetados pela doença. No Brasil os relatos da doença chegam a 96% de todos os casos no continente Americano, o que torna o país como sendo o mais afetado (Herrera *et al.*, 2020).

O Brasil é um dos maiores focos de LV, com uma incidência anual que varia de 3.455 a 4.456 casos durante os anos de 2013 a 2017 (Dantas-Torres *et al.*, 2020). A doença encontra-se em crescimento e expansão no país, com descrição de casos em humanos nas suas cinco regiões, com atual registro de 3 mil novos casos (Azevedo *et al.*, 2021). Dentre as regiões do Brasil, o Nordeste é onde concentra a maioria dos casos de LV notificada, com média de 1.973 casos por ano, proporção que chega a 52,7% do total de casos no país (Machado *et al.*, 2020).

Figura 9 – Distribuição geográficas das leishmanioses em 2020. A – LC; B – LV.



Fonte: Who, 2023.

A LC também tem o Brasil como um dos países mais afetados, e os casos da doença são verificados em todos os seus estados, onde na região Amazônica cerca de até 70% da população corre o risco de contrair a infecção. Segundo o Ministério da Saúde (MS), entre os anos de 2007 a 2017 foram relatados no país 235.301 casos de LC, dentre os quais 72.395 foram registrados na região Nordeste (Oliveira *et al.*, 2020b).

3.1.1.3 Tratamento das leishmanioses

O tratamento para o controle das leishmanioses é baseado em medicamentos quimioterápicos, associados a toxicidade e efeitos colaterais causados pelos fármacos utilizados, além do custo alto, desenvolve altas taxas de resistência ao parasito como também a doença pode ter recidivas (Mwololo *et al.*, 2015).

Os casos de LC, são mais simples e geralmente se resolvem espontaneamente em menos de dois anos, porém existem espécies que apresentam maior risco de persistência. O tratamento farmacológico, portanto, vai depender de vários fatores bem como localização e gravidade da infecção e estado imunológico do hospedeiro, classificando a doença como simples ou complexa, estabelecendo então o manejo clínico (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

Os pacientes com LC simples, caso necessitem de tratamento, este é feito localmente nas lesões que não se resolvem espontaneamente, ou quando é preciso acelerar a cicatrização e reduzir o risco de cicatrizes. Deste modo, são aplicadas nas lesões injeções de fármacos da classe dos antimoniais pentavalentes (Sb^V), ou se faz o uso de crioterapia. Terapias recomendadas também incluem o uso de paromomicina tópica local, como laser de dióxido de carbono (CO_2), terapia fotodinâmica ou imiquimod, fazendo com que ocorram poucos efeitos adversos. No entanto, alguns pacientes podem evoluir para LC complexa e o tratamento sistêmico é recomendado, como em casos de evolução para LCM e LV (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

A maioria dos tratamentos quimioterápicos sistêmicos disponíveis tem limitações, quanto ao uso em pacientes de alto risco, como idosos, grávidas e pacientes com doenças renais e cardíacas, onde nesses casos não é adequado, pois o tratamento requer longo prazo de hospitalização, o que por sua vez gera um maior gasto sobre os sistemas de saúde, principalmente em regiões endêmicas (Khadir *et al.*, 2018).

Há mais de sete décadas, a terapia medicamentosa sistêmica de primeira linha, ainda permanece com o uso clínico de injeções da classe dos Sb^V , que causam efeitos colaterais graves associados à sua alta toxicidade, além de demonstrar redução da sensibilidade em algumas das espécies do parasito (Wijnant *et al.*, 2017). Os principais fármacos utilizados dos Sb^V em LC e LV são o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]). Os medicamentos dessa classe de comportam como uma pró-droga que é reduzida dentro do organismo a antimoniais trivalentes (Sb^{III}) ativa, um íon metálico limítrofe com alta afinidade para ligantes contendo nitrogênio e sulfidríla. O mecanismo de ação dessa classe provavelmente está relacionado a interação

de Sb^{III} com biomoléculas contendo sulfidrina, incluindo tióis, peptídeos e enzimas presentes nas células do parasito (Roatt *et al.*, 2020).

Os Sb^v embora eficazes, são bastante limitados devido a necessidade de administração parenteral diária, toxicidade grave e falhas no tratamento. Dentre os muitos efeitos colaterais provocados estão: irritação local, distúrbios cardíacos, alterações hepáticas, anorexia, náuseas e vômitos. Além disso, pacientes tratados com diagnósticos de co-infecção apresentam esses efeitos adversos mais graves, com altas taxas de recaída e aumento da mortalidade durante a terapia (Roatt *et al.*, 2020).

A resistência emergente aos Sb^v fez com que fossem adotadas novas estratégias de tratamento alternativo, como exemplo na África oriental, a combinação de Pentostam[®] e o antibiótico da classe dos aminoglicosídeos a paramomicina (PM) foi recomendada como medicamento de primeira linha para tratamento de LV (Roatt *et al.*, 2020). Além da PM outros medicamentos mais recentes, também se tornaram segunda linha para o tratamento, porém também sofrem com limitações semelhantes aos Sb^v incluindo toxicidade, eficácia, custo e via de administração invasiva. Medicamentos estes, como o polieno antifúngico anfotericina B (AnB) e o fosfolípido miltefosina (Wijnant *et al.*, 2017).

A PM é um antibiótico aminoglicosídeo usado pela primeira vez no tratamento de leishmanioses em 2002, na forma de sulfato de paramomicina, e desde então usado para tratar LC, com formulações de uso tópico, e LV, por via parenteral. O custo de tratamento é baixo e devido a leishmaniose afetar principalmente populações de baixa renda, essa é sua principal vantagem. A eficácia do fármaco é alta e tem excelente tolerabilidade, no entanto, os efeitos tóxicos provocam reações de nefrotoxicidade, ototoxicidade e aumento reversível de transaminases hepáticas, além de dor no local da injeção. Apesar da eficácia, algumas espécies do parasito já demonstraram resistência *in vivo*, porém casos ainda não foram relatados (Santana *et al.*, 2021).

A pentamidina pertencente a classe das diamidinas, é um fármaco de segunda escolha como tratamento da leishmaniose. Usado por via intravenosa ou intramuscular, apresenta níveis consideráveis de toxicidade, o que limita a eficácia do tratamento e deflagra resistência dos parasitos à droga. Seu mecanismo de ação ocorre através da união entre a estrutura de diamina e o kDNA do parasito, inibindo os processos de replicação e transcrição. A toxicidade da pentamidina pode causar dor, entumescimento e abscessos estéreis no local de aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, síncope, e hipoglicemia ou hiperglicemia, o que limita o uso do tratamento

em casos de pacientes diabéticos, gestantes e lactantes, crianças menores de um ano de idade, insuficientes renais e hepáticos, doentes cardíacos e indivíduos com hipersensibilidade ao medicamento (Teixeira *et al.*, 2021).

A AnB, atualmente, é o tratamento mais eficaz para leishmaniose, porém a toxicidade alta restringe o seu uso apenas para os casos mais graves da doença, e ainda o custo do tratamento é alto, e não está disponível para maioria dos pacientes (Khadir *et al.*, 2018). Desoxicolato de Anfotericina B (AnB-D) tem um amplo espectro antifúngico, após ocorrência de resistência pelos Sb^v na Índia, se tornou droga de primeira escolha na região, para casos de LV (Roatt *et al.*, 2020).

AnB é um polieno macrolídeo usado há 50 anos como terapia em casos de falha terapêutica, seu mecanismo de ação está associado a ligação da molécula ao ergosterol da membrana plasmática do parasito, aumentando assim sua permeabilidade ao que leva o sucesso da terapia. Sua toxicidade é causada por dois mecanismos principais; o reconhecimento pelo receptor Receptores Toll-likes 2 (TLR 2), que desencadeia a liberação de células inflamatórias, o que causa ao indivíduo febre, artralgia, dores gastrointestinais e cefaleia, sintomas após a infusão da droga. Também é capaz de causar vasoconstricção na arteríola aferente e posterior captação pelo tubo renal, causando hipocalcemia, hipomagnesemia, acidose tubular renal, acidose, poliúria e hiperazotemia. Devido a isso, foram desenvolvidas formulações para reduzir a toxicidade, dentre elas a associação a lipídios, onde o desoxicolato é substituído por lipídios que circundam os monômeros AB, fato que reduz sua absorção por tecidos suscetíveis, reduzindo assim a toxicidade, principalmente renal (Galvis *et al.*, 2020).

O fármaco miltefosina foi originalmente desenvolvido como droga para quimioterapia antineoplásica, e posteriormente comprovada sua ação em LV e LC, como primeiro tratamento de via oral. Em geral, é uma droga bem tolerada, mas também tem apresentado efeitos tóxicos nos pacientes, como nefrotoxicidade toxicidade gastrointestinal e hepatotoxicidade, necessitando de acompanhamento dos níveis enzimáticos relacionados durante o tratamento. A miltefosina é teratogênica e tem propriedades abortivas, o que limita o uso do fármaco em grávidas, além de ter demonstrado em alguns estudos, resistência por algumas espécies (Santana *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação da miltefosina não é totalmente compreendido, porém é visto que pode atuar bloqueando o citocromo C oxidase levando a mudanças no potencial da membrana mitocondrial dos parasitos, o que reduz o consumo de oxigênio e níveis de adenosina trifostato (ATP), mas também por inibir a fosfatidiletanolamina N-metil-

transferase (PEMT) e assim a biossíntese de fosfatidilcolina. Outros mecanismos atuam desativando canais de Ca^{2+} da membrana plasmática, através da esfingosina com ação direta em acidocalcissomos, que resulta no acúmulo de Ca^{2+} . Ainda, a metilfosina pode deflagrar apoptose nas formas promastigotas do parasito (Peixoto *et al.*, 2020).

A alta toxicidade e resistência dos parasitos com relação aos fármacos utilizados, gera uma necessidade urgente de novas drogas, capazes de eliminar o parasito e acelerar com segurança a cura da doença, que possam ser viáveis para uso em sistemas de saúde com poucos recursos (Wijnant *et al.*, 2017). O desenvolvimento de novos fármacos, busca uma terapia de combinação de drogas antileishmania, considerado como objetivo para redução da taxa e limite de falha pelo tratamento, incluindo também inibir a propagação de parasitos resistentes aos medicamentos (Mwololo *et al.*, 2015).

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial leishmanicida de derivados sintéticos antraquinônicos: ENSJ 650, ENSJ 841, ENSJ 842, ENSJ 845, ENSJ 848, ENSJ 849, ENSJ 850, ENSJ 851 e ENSJ 854 através de modelos experimentais *in vitro*.

3.2.2 Objetivos específicos

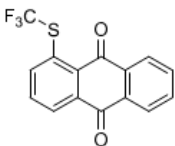
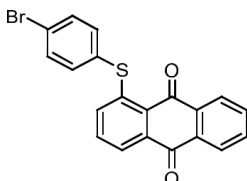
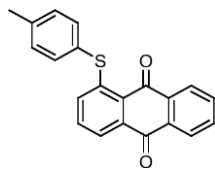
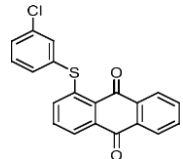
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos derivados sintéticos antraquinônicos para macrófagos da linhagem J774;
- Avaliar a ação dos derivados sintéticos antraquinônicos sobre formas promastigotas extracelulares das espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, quanto a multiplicação dos parasitos.

3.3 Material e métodos

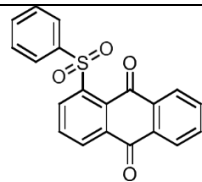
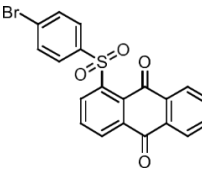
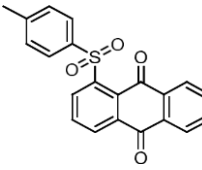
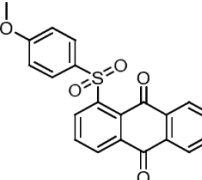
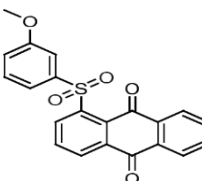
3.3.1 Obtenção das substâncias teste

As substâncias para teste utilizadas foram previamente sintetizadas a partir de antraceno-9,10-diona, desenvolvidas pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e cedidas pelo Professor Dr Eufrânio Nunes da Silva Júnior e pela Proferrosa Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart, do Laboratório de Eletroquímica da Universidade Federal de Alagoas (LEQUI/UFAL), resultando em nove derivados sintéticos antraquinônicos (DSAQs): 1-{3-[(trifluorometil)sulfanil]benzeno-1-sulfonil}antraceno-9,10-diona (ENSJ 650), 1-[(4-bromofenil)sulfonil]antraceno-9,10-diona (ENSJ 842), 1-[(3-clorofenil)sulfonil]antraceno-9,10-diona (ENSJ 845), 1-(benzenosulfonil)antraceno-9,10-diona (ENSJ 848), 1-(4-bromobenzeno-1-sulfonil)antraceno-9,10-diona (ENSJ 849), 1-(4-metilbenzeno-1-sulfonil)antraceno-9,10-diona (ENSJ 850), 1-(4-metoxibenzeno-1-sulfonil)antraceno-9,10-diona (ENSJ 851), 1-(3-metoxibenzeno-1-sulfonil)antraceno-9,10-diona (ENSJ 854) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Estruturas químicas dos derivados antraquinônicos.

Denominação	Fórmula química	Massa Molecular (MM)	Estrutura Química
ENSJ 650	C ₁₅ H ₇ F ₃ O ₂ S	308,01 g/mol	
ENSJ 841	C ₂₀ H ₁₁ BrO ₂ S	393,97 g/mol	
ENSJ 842	C ₂₁ H ₁₄ O ₂ S	330,07 g/mol	
ENSJ 845	C ₂₀ H ₁₁ ClO ₂ S	350,02 g/mol	

Continua

Denominação	Fórmula química	Massa Molecular (MM)	Estrutura Química
ENSJ 848	C ₂₀ H ₁₂ O ₄ S	348,05 g/mol	
ENSJ 849	C ₂₀ H ₁₁ BrO ₄ S	425,06 g/mol	
ENSJ 850	C ₂₁ H ₁₄ O ₄ S	362,06 g/mol	
ENSJ 851	C ₂₁ H ₁₄ O ₅ S	378,06 g/mol	
ENSJ 854	C ₂₁ H ₁₄ O ₅ S	378,06 g/mol	

Fonte: Autor, 2023.

3.3.2 Substâncias e Reagentes

Pentamidina, Anfotericina (AnF), Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich), meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich), meio de cultura Schneidr's (Sigma-Aldrich), soro fetal bovino (SBF, CUT-LAB), tampão fosfato salina (PBS, Sigma-Aldrich), aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich), piruvato (Sigma-Aldrich), L-Glutamina (Sigma-Aldrich), Dimetilformamida (DMF 0,1%, Sigma-Aldrich), Dimetilsufóxido (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich), Triton™ X-100, [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich).

3.3.3 Manutenção das células

3.3.3.1 Macrófagos J774.A1

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos *in vitro* em garrafas de cultura, com 10 mL com meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), e suplementação com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) piruvato e 1% (v/v) aminoácidos não essenciais, mantidos com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade. No momento dos experimentos os macrófagos foram depositados em tubos Falcon para posterior centrifugação por 5 minutos em temperatura de 4°C a 1500 rpm, logo após foi descartado o sobrenadante, e o pellet formado foi ressuspenso em meio RPMI. Para o plaqueamento dos macrófagos, a amostra foi diluída em meio RPMI (1:100), e a contagem realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 40x (Nikon Eclipse Si).

3.3.3.2 *Leishmania* spp.

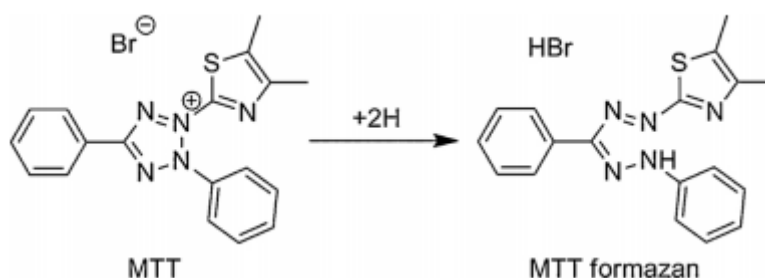
Culturas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77LTB0016) foram cedidas pelo Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ) e de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA). Os parasitos, em suas formas evolutivas de promastigota, foram mantidas *in vitro* em garrafas de cultura, com 5 mL de meio Schneider's, e suplementação com 10% (v/v) de SFB, 2% (v/v) de L-glutamina e 2% (v/v) de urina masculina humana filtrada, ambientados a 27°C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (Shel Lab). No momento dos experimentos, os parasitos foram depositados em tubos Falcon para posterior centrifugação por 10 minutos em temperatura de 25°C a 3500 rpm, logo após foi descartado o sobrenadante, e o pellet formado foi ressuspenso em meio Schneider's. Para o plaqueamento dos parasitos, a amostra foi diluída em meio Schneider's (1:1000), e a contagem realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 40x (Nikon Eclipse Si).

3.3.4 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*

3.3.4.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (Mosmann, 1983)

O ensaio de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] tem como base a redução do sal de tetrazólio (amarelo, solúvel em água) em Formazan (roxo, insolúvel) (**Figura 10**). Essa redução só é possível se as mitocôndrias celulares estiverem viáveis, promovendo ao ensaio colorimétrico, quantificar essa viabilidade celular (Karakas; Ari; Ulukaya, 2017).

Figura 10 – Reação de redução de MTT a Formazan.



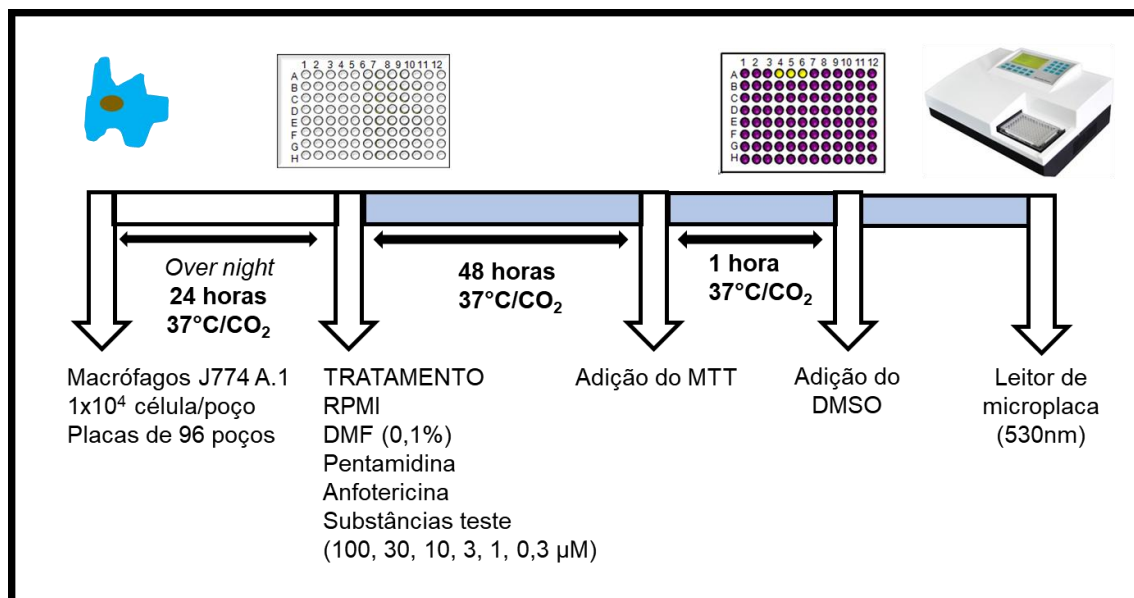
Fonte: Grela; Kozłowskab; Grabowiecka, 2018.

Em uma microplaca com 96 poços foram plaqueados macrófagos da linhagem J774.A1, numa densidade de 1×10^4 células por poço, mantidas com meio RPMI e em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, em *over night* para melhor aderência antes do tratamento. As células foram tratadas com as substâncias teste nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 µM, além dos fármacos padrões: pentamidina e anfotericina nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,1 µM e ainda os controles: RPMI (meio), DMF 0,1% (solvente), DMSO 0,1% (solvente) e lise (Triton™ X-100) utilizado como padrão de morte celular, pois é capaz de promover a lise das células.

Após o tratamento, as células foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente por um período de 48 h. Ao término do período de incubação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado a cada poço 100 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL e reincubadas por 1 h em estufa, sob temperatura controlada (37°C) e 5% de CO₂, para que ocorra a reação de redução do MTT a Formazan. 1 h antes da adição do MTT, o sobrenadante foi desprezado nos poços com o controle de lise e adicionado Triton™ X-100. Logo após a reincubação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas com 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO), solvente capaz de solubilizar o

Formazan encontrado no interior das células viáveis. Por fim, para a avaliação quantitativa, os poços foram analisados em um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm (*ThermoPlate*) (**Figura 11**).

Figura 11 – Esquematisação do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.

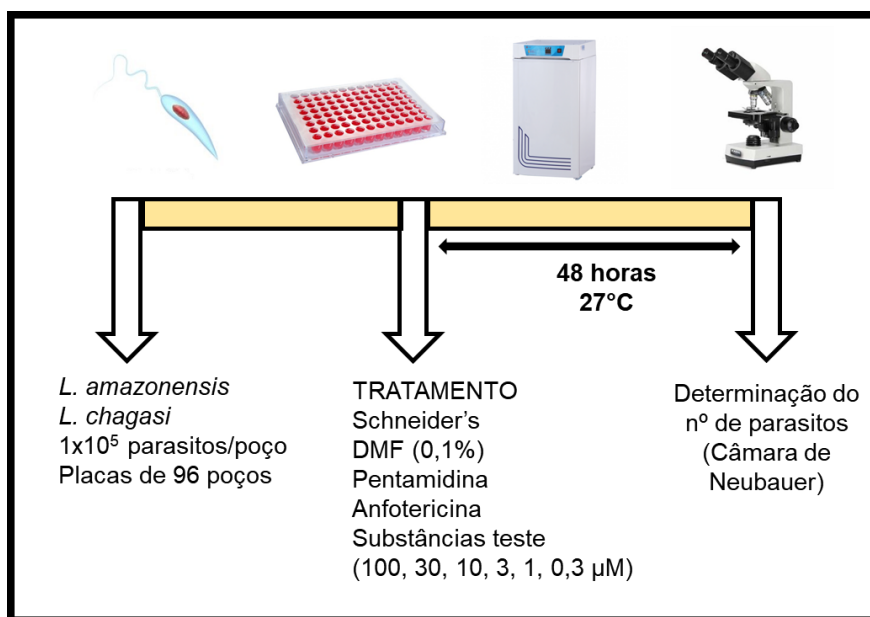


Fonte: Autor, 2023.

3.3.4.2 Ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro* (Ávila *et al.*, 1997)

As formas promastigotas das espécies de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram plaqueadas para cultura, em placas de 96 poços numa concentração de 1×10^5 parasitos/poço num volume de 100 µL, com meio Schneider's suplementado com 10% (v/v) de SFB, 2% (v/v) de L-glutamina e 2% (v/v) de urina masculina humana filtrada. O tratamento com os fármacos padrão pentamidina e anfotericina, e os nove DSAQs foram adicionados em duplicata, para cada concentração: 100, 30, 10, 3, 1 e 0,1 µM, e ainda os controles: Schneider's (meio), DMF 0,1% (solvente), DMSO 0,1% (solvente), num volume de 100 µL, adicionados aos poços com as formas promastigotas, completando o volume de 200 µL. A placa então, foi incubada em estufa BOD a 27°C por um período de 48 horas, e ao final desse período os parasitos de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram homogeneizados, e o número de parasitos foi determinado a partir da diluição das amostras em duplicata, em meio Schneider's (1:1000), e a contagem realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 40x (Nikon Eclipse Si) (**Figura 12**).

Figura 12 – Esquemática do ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*.



Fonte: Autor, 2023.

3.3.4.3 Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre *Leishmania* spp.

O cálculo do índice de seletividade de cada derivado, foi realizado para avaliar se os DSAQs apresentam mais ação em *Leishmania* spp. do que em macrófagos da linhagem J774.A1, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de seletividade (IS)} = \frac{\text{Concentração Citotóxica 50\% (CC}_{50})}{\text{Concentração Inibitória 50\% (CI}_{50})}$$

Quanto maior o valor numérico de IS, mais seletivo o derivado será para *Leishmania* spp. do que para os macrófagos.

3.3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos serão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. Os valores dos resultados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 7.

3.4 Resultados

3.4.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

A **Tabela 2** mostra o efeito dos DSAQs sobre macrófagos da linhagem J774.A1. A Concentração Citotóxica Mediana (CC₅₀), que corresponde a concentração média capaz de causar morte celular, foi calculada juntamente com a toxicidade máxima em porcentagem (%), correspondente a quantidade de morte celular na maior concentração utilizada (100 µM), dos DSAQs e fármacos padrão testados como controle, Pentamidina e Anfotericina. De acordo com as concentrações testadas de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, Pentamidina obteve citotoxicidade superior a concentração máxima testada (100 µM), com CC₅₀ baixa de 18,30±5,80, assim como Anfotericina, que demonstrou CC₅₀ igual a 70,67±3,05 µM (concentração que causa 50% de citotoxicidade na viabilidade macrófagos) e citotoxicidade máxima de 78,94±1,82%. Com relação aos DSAQs, todos demonstraram-se com CC₅₀ superior a 100 µM, e suas citotoxicidade máxima correspondem a menos de 40%. ENSJ845 apresentou a menor porcentagem, com relação a citotoxicidade máxima, de 26,59±2,56%, seguido de ENSJ849 com 27,27±2,52% de redução da população celular. O DSAQ com maior redução celular na maior concentração utilizada foi ENSJ842 com 38,22±4,38%, seguido de ENSJ841 com 32,02±6,95%.

Tabela 2 - Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, Pentamidina e Anfotericina, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774.A1 no ensaio de MTT.

Substâncias	CC ₅₀ (µM ± E.P.M.) ^a	Citotoxicidade Máxima (% ± E.P.M.) ^b
Pentamidina	18,30 ± 5,80	100 ± 0,00***
Anfotericina	70,67 ± 3,05	78,94 ± 1,82***
ENSJ 650	>100	30,08 ± 4,58*
ENSJ 841	>100	32,02 ± 6,95***
ENSJ 842	>100	38,22 ± 4,38***
ENSJ 845	>100	26,59 ± 2,56**
ENSJ 848	>100	30,91 ± 1,37***
ENSJ 849	>100	27,27 ± 2,52**
ENSJ 850	>100	28,30 ± 2,22**
ENSJ 851	>100	28,67 ± 1,68**
ENSJ 854	>100	33,45 ± 5,10***

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Citotóxica de 50% (CC₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. ND: Não determinado Citotoxicidade máxima para células até a concentração de 100µM em comparação com o grupo DMF.

3.4.2 Ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*

A **Tabela 3** demonstra o efeito dos DSAQs sobre formas promastigotas de *L. chagasi*, juntamente com fármacos padrões utilizados: Pentamidina e Anfotericina. Todas as substâncias teste foram utilizadas nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100µM, os DSAQs ENSJ650, 842, 850 e 851 não demonstraram efeito, já ENSJ841, 845, 848, 849, 854 mostraram efeito, com valor mais expressivo de porcentagem de efeito máximo para os ENSJ848 e 849, ambos com 97,50±5,00% de inibição, seguido de ENSJ841 com 90% de inibição e ENSJ854 com 85,00±5,77%. Com relação a CI_{50} o DSAQs com menor concentração à demonstrar efeito foi ENSJ849 com 2,83±0,29µM, resultado mais expressivo, seguido de ENSJ845 com concentração de 21,50±6,36µM. Ambos os fármacos padrões, foram utilizados nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100µM, e obtiveram efeito máximo, com 100% de redução de parasitos, na concentração máxima utilizada (100µM), e CI_{50} de 0,60±0,10µM para Pentamidina e 0,07 ± 0,01µM para Anfotericina.

Tabela 3 - Efeito leishmanicida dos derivados sintéticos antraquinônicos todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µM e da Anfotericina e Pentamidina nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 µM contra formas promastigotas de *L. chagasi*.

Substâncias	CI_{50} (µM ± E.P.M.) ^a	Efeito Máximo (% ± E.P.M) ^b
Pentamidina	0,60 ± 0,10	100,00 ± 0,00***
Anfotericina	0,07 ± 0,01	100,00 ± 0,00***
ENSJ 650	>100	ND
ENSJ 841	69,00 ± 0,00	90,00 ± 0,00***
ENSJ 842	>100	ND
ENSJ 845	21,50 ± 6,36	65,00 ± 10,00***
ENSJ 848	26,33 ± 4,16	97,50 ± 5,00***
ENSJ 849	2,83 ± 0,29	97,50 ± 5,00***
ENSJ 850	>100	ND
ENSJ 851	>100	ND
ENSJ 854	71,33 ± 4,04	85,00 ± 5,77***

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando ***p < 0,001, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

ND: Não determinado erro máximo para formas promastigotas até a concentração de 100µM em comparação com o grupo DMF.

Na avaliação do efeito sobre *L. amazonensis* dos DSAQs foram usadas as mesmas concentrações para *L. chagasi* (**Tabela 4**), assim como os fármacos padrões, estes corresponderam 100% de efeito máximo na maior concentração utilizada (100µM), e CI_{50}

de $8,50 \pm 0,40 \mu\text{M}$ e $0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$, para Pentamidina e Anfotericina, respectivamente. Com relação ao efeito dos DSAQs, ENSJ650, 841, 842, 845, 850 e 851, demonstraram pouco (ENSJ850 e 851) ou nenhum efeito máximo na maior concentração utilizada. ENSJ848, 849 e 854 demonstraram efeito máximo, com resultado mais expressivo para ENSJ854 com $95,16 \pm 6,18\%$, seguido de ENSJ851 com $92,00 \pm 9,24\%$, e dentre as CI_{50} menor concentração de $21,33 \pm 4,04 \mu\text{M}$ para ENSJ 854, seguido de $72,00 \pm 7,00 \mu\text{M}$ para ENSJ851.

Tabela 4 - Efeito leishmanicida dos derivados sintéticos antraquinônicos todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μM e da Anfotericina e Pentamidina nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 μM contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Substâncias	CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{E.P.M.}$) ^a	Efeito Máximo (% $\pm \text{E.P.M.}$) ^b
Pentamidina	$8,50 \pm 0,40$	$100,00 \pm 0,00^{***}$
Anfotericina	$0,07 \pm 0,01$	$100,00 \pm 0,00^{***}$
ENSJ 650	>100	ND
ENSJ 841	>100	ND
ENSJ 842	>100	ND
ENSJ 845	>100	ND
ENSJ 848	>100	$20,43 \pm 7,45$
ENSJ 849	$87,50 \pm 7,78$	$56,45 \pm 11,02^{***}$
ENSJ 850	>100	$38,67 \pm 9,24^{***}$
ENSJ 851	$72,00 \pm 7,00$	$92,00 \pm 9,24^{***}$
ENSJ 854	$21,33 \pm 4,04$	$95,16 \pm 6,18^{***}$

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média $\pm$ erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $^{***}p < 0,001$, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

ND: Não determinado erro máximo para formas promastigotas até a concentração de $100 \mu\text{M}$ em comparação com o grupo DMF.

3.4.3 Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre *Leishmania* spp.

A **Tabela 5** descreve o índice de seletividade dos fármacos padrões e DSAQs, com relação aos efeitos leishmanicida, frente a promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, e efeito citotóxico sobre macrófagos da linhagem J774.A1.

É possível observar que Pentamidina possui maior IS para *L. chagasi* e menor para *L. amazonensis*, já Anfotericina possui IS expressivo para promastigotas de ambas as formas de *Leishmania*. Dentre os DSAQs ENSJ849 apresentou maior IS, com >35,33 vezes mais seletivo para *L. chagasi*. Em *L. amazonensis* ENSJ854 foi o mais seletivo com IS igual a >4,68 vezes mais seletivo para espécie.

Alguns dos DSAQs não tiveram seus IS determinados, por não inibirem 50% de *Leishmania* spp. e macrófagos, impossibilitando a realização do cálculo. Estes são: em *L. chagasi* ENSJ650, 842, 850 e 851; em *L. amazonensis* ENSJ650, 841, 842, 845, 848 e 850.

Tabela 5 – Índice de seletividade dos derivados sintéticos antraquinônicos para citotoxicidade em macrófagos J774.A1 versus *L. chagasi* e macrófagos J774 versus *L. amazonensis*.

Substâncias	*IS para <i>L. chagasi</i>	*IS para <i>L. amazonensis</i>
Pentamidina	30,50	2,18
Anfotericina	1009,57	1009,57
ENSJ 650	-	-
ENSJ 841	>1,44	-
ENSJ 842	-	-
ENSJ 845	>4,65	-
ENSJ 848	>3,80	-
ENSJ 849	>35,33	>1,14
ENSJ 850	-	-
ENSJ 851	-	>1,38
ENSJ 854	>1,40	>4,68

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Notas: *IS: Índice de Seletividade. Calculado a partir da razão entre os valores de CC₅₀ de macrófagos J774.A1 e CI₅₀ de promastigotas de *Leishmania* spp. (-): A substância não desenvolve efeito deletério nos macrófagos J774.A1 ou *Leishmania* spp.

3.5 Discussão

As leishmanioses são um problema de saúde pública, relacionado a uma das infecções mais endêmicas em algumas regiões do mundo, correspondendo a 1 milhão de casos por ano, fato que gera impacto diretamente na vida dessa população. A busca incessante para novas medidas de tratamento, apresenta inúmeras barreiras, dentre elas falta de eficácia e segurança, o que gera uma corrida para encontrar novos fármacos com o intuito de preservar a qualidade de vida dos pacientes como também, eliminar os parasitos (Nafari *et al.*, 2020).

Os novos fármacos descobertos para as terapias costumam priorizar pela ação em múltiplos alvos terapêuticos, que é o caso de derivados de quinonas naturais, devido a estrutura designar formas de atuar em várias áreas (Espinosa-Bustos *et al.*, 2020). Os compostos de origem natural destinados ao desenvolvimento de novos fármacos, tem contado cada vez mais com recentes metodologias que priorizam isolamento, identificação e ensaios mais modernos e eficientes. Com isso, técnicas e métodos que garantam efetividade, impeçam o avanço de doenças, seletividade, fácil administração, economicamente satisfatórios e poucos efeitos adversos, são as mais designadas para tais estudos (González *et al.*, 2020).

Os ensaios *in vitro* são os que mais apresentam características favoráveis, na descoberta de novos medicamentos, pois a utilização de culturas celulares, além de analisar atividades citotóxicas, permite demonstrar a eficácia, seletividade e elucidação de possíveis mecanismos de ação. As culturas celulares utilizadas, são viáveis e reprodutíveis, além de existirem diversas linhagens de células em distintos tecidos disponíveis, o que possibilita de forma favorável a realização de vários ensaios biológicos, garantindo sucesso na obtenção de resultados com veracidade (González *et al.*, 2020).

Os primeiros ensaios a serem realizados para descoberta de novos efeitos farmacológicos, em compostos isolados e modificados estruturalmente são ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Os derivados antraquinônicos foram recentemente sintetizados e até então não havia referências a respeito de sua citotoxicidade. Desta forma, o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT com macrófagos da linhagem J774.A1 foi o primeiro a ser realizado, visando analisar a toxicidade das substâncias a nível celular. Este ensaio é amplamente aplicado em linhas celulares de mamíferos, bactérias e fungos (Grela; Kozłowska; Grabowiecka, 2018).

Os DSAQs foram submetidos ao ensaio de MTT em seis concentrações diferentes (0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μM) demonstrando em comum, baixo efeito citotóxico, e esse estatisticamente significativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) apenas na maior concentração utilizada de 100 μM , e nenhum composto conseguiu reduzir metade da população total de células, impossibilitando o cálculo de CC_{50} . Também os fármacos padrão utilizados, Anfotericina e Pentamidina, não obtiveram efeito citotóxico frente a essas células. Dentre os DSAQs, ENSJ842 demonstrou maior porcentagem de citotoxicidade na maior concentração utilizada (100 μM), e as modificações estruturais realizadas, formando, por exemplo, ENSJ841 e ENSJ842, que demonstrou menor porcentagem de inibição celular, comparada a todos os compostos, diminuíram essa citotoxicidade, mensurando que a modificação é de grande melhoria, frente ao nível citotóxico desses compostos.

Os resultados obtidos com o ensaio de MTT corroboram com testes realizados por Geroldinger *et al.* (2018), onde macrófagos J774 foram expostos a tratamento com derivados quinônicos: antraceno, antraquinona e endoperóxidos antracênicos, demonstrando baixa citotoxicidade frente a essas células, com CC_{50} de respectivamente, $>400 \mu\text{M}$, $116.69 \pm 24.29 \mu\text{M}$ e $43.80 \pm 36.12 \mu\text{M}$ para o derivado AcEP1117.

A partir destes resultados, foi viável a utilização das substâncias testadas nesse trabalho, frente a ação leishmanicida e antitumoral. A *Leishmania* spp. possui duas formas evolutivas celulares diferentes, dentre elas a promastigota, presente no flebotomíneo transmissor da leishmaniose, responsável pela infecção do mamífero hospedeiro (Sunter; Gull, 2017). Os estudos na descoberta de novos agentes leishmanicidas são realizados através de ensaios *in vitro*, dentre eles, utilizando formas promastigotas em culturas axênicas, destinados a testar a suscetibilidade de amostras de *Leishmania* spp. a novos tratamentos, analisando fatores bioquímicos responsáveis pela interação do fármaco com as promastigotas (Miranda, 2011).

O ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*, foi realizado com intuito de expor as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* ao tratamento com os DSAQs, duas espécies diferentes, que acometem indivíduos com diferentes formas de leishmaniose, LV e LC, respectivamente. Os fármacos padrão utilizados, demonstraram possivelmente efeito leishmanicida estatisticamente significativo (*** $p < 0,001$), em ambas as espécies. Os DSAQs demonstraram redução estatisticamente significativa (*** $p < 0,001$) da viabilidade celular dessas promastigotas, para *L. chagasi* em presença principalmente, nas modificações estruturais realizadas para formação do composto ENSJ849, possuindo

melhor CI_{50} , e ainda a estrutura dos compostos ENSJ841, 845, 848 e 854 que também obtiveram redução da viabilidade dos parasitos. Para a espécie de *L. amazonensis* destaque para formação estrutural de ENSJ851, demonstrando melhor resultado, pela concentração de CI_{50} , objetivando os derivados ENSJ854, corroborando com seu resultado para *L. chagasi*, e ENSJ849, que também demonstram estatisticamente significativa (***) $p < 0,001$ possível ação leishmanicida frente a promastigotas dessas espécies utilizadas no ensaio.

O cálculo para obtenção do valor de IS, tem critério de demonstrar a seletividade de um determinado composto, entre as células de um indivíduo com as células referenciadas de infecção, como expõe nas leishmanioses, referentes aos macrófagos, células hospedeiras dos parasitos. Os valores obtidos de IS, são direcionados para futuras comparações de bioatividade de acordo com séries de compostos. Estruturas que representam IS maior que 10, podem ser otimizados com intuito de sua melhoria, a partir de estudos futuros estudos pré-clínicos, e considerados possíveis candidatos ao desenvolvimento de novas farmacoterapias (Pérez-Pertejo *et al.*, 2019).

O IS demonstrou que os DSAQs possuem maior afinidade pelos parasitos do que por macrófagos da linhagem J774.A1. Os derivados ENSJ854, 848, 845 e 841 demonstram, respectivamente, seletividade maior que 1,40, 3,80, 4,65 e 1,44 vezes por *L. chagasi* do que por macrófagos, e dentre os DSAQs testados, o único que representa $IS > 10$, sugerindo uma possível ação leishmanicida, é o ENSJ849, demonstrando maior que 35,33 vezes mais seletividade para espécie do que por macrófagos. Para a espécie de *L. amazonensis*, os derivados ENSJ849, 851 e 854 demonstram seletividade maior que 1,14, 1,38 e 4,68 vezes pelos parasitos do que pelos macrófagos, respectivamente. Os fármacos padrão utilizados demonstram $IS > 10$ para ambas as espécies, exceto Pentamidina, que apresenta $> 2,18$ vezes seletividade para *L. amazonensis*, do que macrófagos.

Os dados relacionados a ação leishmanicida frente a formas promastigotas, assemelham-se a estudos de Shokri *et al.* (2017), onde utilizando testes com o fármaco doxorrubicina, também obteve ação citotóxica para promastigotas da espécie *L. major*, obtendo CI_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$. Mendonça *et al.* (2018) também realizou ensaios com derivados quinônicos, 1,4-naftoquinonas, sobre formas promastigotas da espécie *L. infantum* e *L. amazonensis*, obtendo efeitos de redução da viabilidade celular desses parasitos, com CI_{50} de 0,73 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as espécies.

Os DSAQs demonstraram possíveis atividades leishmanicidas, corroborando com estudos que relacionam o núcleo quinônico a uma estrutura privilegiada, apresentando ação farmacológica com multi-alvos terapêuticos (Cruz *et al.*, 2016); (Souza, 2018). A possível atividade desses derivados, pode estar relacionada ao mecanismo de ação do grupamento farmacofórico dos derivados quinônicos, que formam ligações covalentes com núcleos em tecidos, que podem estar relacionadas a ligações com o kDNA, do parasito, causando sua oxidação, além de propriedades que induzem a citotoxicidade (Klopcic; Dolenc, 2019).

Com os resultados, foi possível descrever propriedades leishmanicidas em algumas substâncias DSAQs, corroborando com ensaios já publicados desses efeitos para outros derivados quinônicos e antraquinônicos. Assim, estes resultados contribuem para o desenvolvimento e descobrimento de novos fármacos leishmanicidas, implicando que substâncias derivadas antraquinônicas com outros arranjos estruturais, possam demonstrar a possibilidade do surgimento de novas drogas com melhores efeitos farmacológicos e menos toxicidade.

3.6 Conclusão

A avaliação dos resultados dos ensaios de toxicidade dos novos derivados sintéticos antraquinônicos, serviu como base para concluir que estes não demonstram citotoxicidade relacionada aos macrófagos. Alguns desses derivados, possuem prováveis efeitos potenciais leishmanicidas, apresentando propriedades citotóxicas para formas promastigotas, das espécies *Leishmania chagasi* (ENSJ841, 848, 849 e 854) e *Leishmania amazonensis* (ENSJ849, 851 e 854), principalmente com ENSJ849.

Por fim, os resultados obtidos dão suporte a pesquisa de novos fármacos leishmanicidas, no intuito de que o desenvolvimento dessas novas modificações estruturais, podem trazer uma gama de novos tratamentos farmacológicos em diversas esferas.

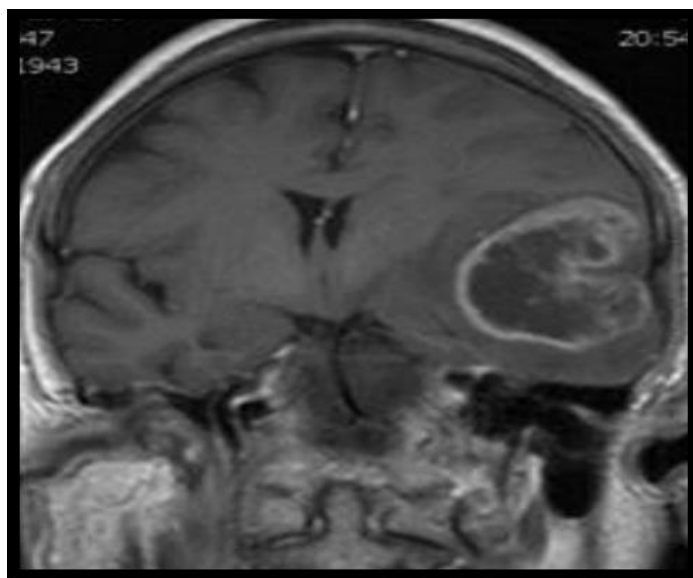
4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS ANTRAQUINÔNICOS

4.1 Revisão da literatura

4.1.1 Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) (**Figura 13**) é o subtipo histológico mais comum de glioma maligno. O glioma é o tumor intrínseco de mais agressividade que ocorre com frequência no sistema nervoso central (SNC) humano, de origem no neuroepitélio, sendo a sexta principal causa de morte mundial associada ao câncer, responsável por 75% de todos os tumores cerebrais malignos. O GBM está relacionado a altas taxas de morbimortalidade em todo mundo, o que leva a um quadro social severo e ônus na economia (Hou; Tang, 2020).

Figura 13 – Ressonância magnética demonstrando GBM em hemisfério cerebral esquerdo.



Fonte: Silva, Reis, Correia, 2018.

Os casos registrados de GBM em maior número são no continente Norte Americano, Austrália, Europa do Norte e Ocidental (Tan *et al.*, 2020). A incidência mundial do GBM é de 3,21 por 100.000 indivíduos (Kudulaiti *et al.*, 2021). No Brasil, o conjunto de registros de câncer de base populacional, registros hospitalares e sistema de informação sobre mortalidade do DataSUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde), realizam a vigilância sobre câncer, o que estimou no ano de 2016, 5.440

novos casos de câncer em homens e 4.830 em mulheres, relacionado ao SNC, correspondendo a um risco de 5,50 novos casos por cada 100 mil homens e 4,68 a cada 100 mil mulheres (Mira Neto, 2018).

As apresentações clínicas do GBM são muito variáveis, os tumores cerebrais se enquadram também em doenças neurológicas, não só em doenças neoplásicas, devido a propagação pelo SNC, e quanto maior seu crescimento, mais pressão intracraniana, o que desencadeia uma série de manifestações sintomatológicas, dentre elas as principais são cefaleias, náuseas e vômitos. A anatomia do tumor e sua localização, quando relacionadas com estruturas presentes no SNC, dependendo dessa interação, induzem alguns défices neurológicos, como hemiparesia, perda de sensibilidade, alterações visuais, perturbações na linguagem, e ainda convulsões, que podem ser comuns em $\frac{1}{4}$ dos indivíduos portadores de GBM. Alterações nas funções cognitivas, orientação temporo-espacial e problemas de perda de memória, são estados que condicionam e comprometem a independência motora de pacientes com a neoplasia (Silva, 2020).

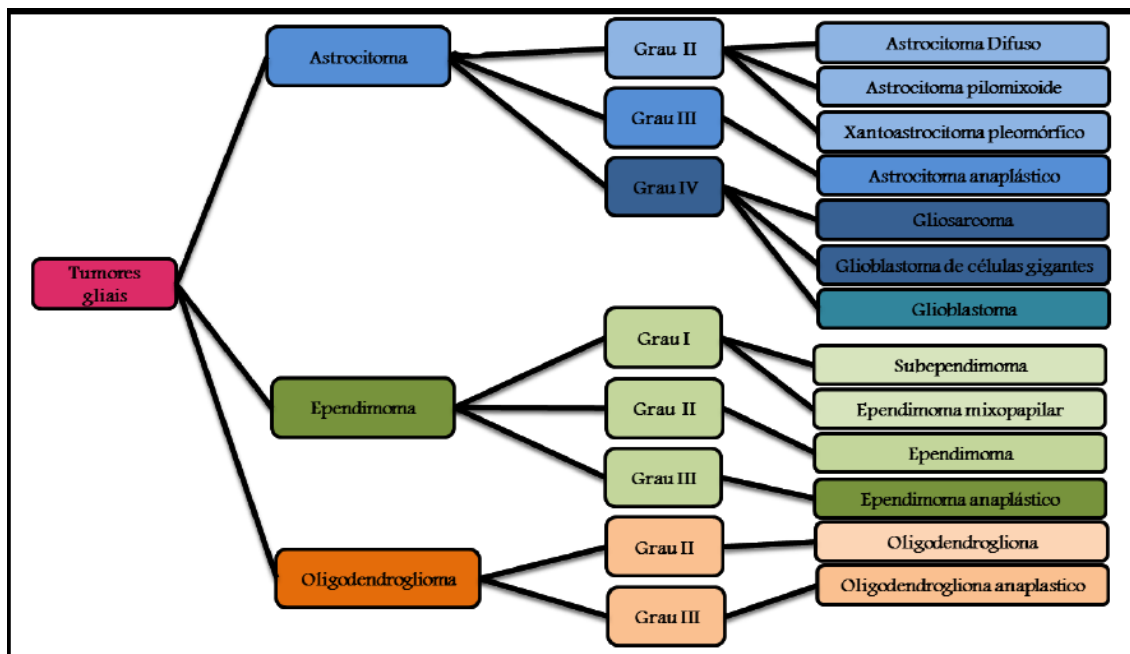
O tumor raramente cresce fora do SNC, porém a capacidade de aumentar difusamente dentro dele é alta, fator que contribui para seu alto comportamento maligno. A invasão no cérebro está associada a mobilidade celular, estimulada por muitos receptores de fator de crescimento que estão desregulados ou amplificados em casos de GBM, e redundâncias em sua cascata de sinalização é crucial para que as células presentes contornem qualquer bloqueio, devido quando há bloqueio de uma via, outra ser ativada (Picariello *et al.*, 2019).

Os fatores de risco para GBM estão relacionados a exposição à radiação ionizante, como principal e único fator de risco potencialmente conhecido. Associações com histórias de atopia, alergias e outras condições adjacentes ao sistema imunológico (SI) também foram identificadas, porém não existem razões biológicas elucidadas. Existem síndromes genéticas raras associadas ao GBM, dentre elas a síndrome de Li-Fraumeni e a síndrome de Lynch, mas elas respondem por <1% dos casos (Tan *et al.*, 2020).

A OMS desenvolveu uma classificação para tumores gliais considerando suas características histológicas e as células de origem (**Figura 14**), promovendo grupos caracterizados por morfologia, parâmetros moleculares de diagnóstico e mutações comuns. Com isso, os gliomas infiltrantes difusos, incluindo os de origem astrocítica, oligodendroglial, e os mistos (astrocíticos e oligodendrogliais), compõe um único grupo. Os gliomas difusos infiltrantes de grau II, tem atipias citológicas isoladas; os que apresentam anaplasias e atividade mitótica são considerados de grau III; e os que

demonstram proliferação microvascular e/ou necrose, pertencem ao grupo de grau IV, como é o caso do GBM (Viana, 2019).

Figura 14 – Esquema de classificação para tumores gliais segundo a OMS.



Fonte: Adaptado de Freitas, 2017.

O GBM demonstra semelhanças morfológicas e de expressão gênica com células gliais, incluindo oligodendrócitos, astrócitos e seus precursores. O mau prognóstico para os pacientes inclui um microambiente inflamatório, que constitui células benignas, como imunológicas e fibroblastos, que interferem na alta da malignidade, por meio de uma modulação na proliferação de células mutadas e angiogênese (Silveira *et al.*, 2017).

A histopatologia do GBM demonstra focos de necrose celular, proliferação endotelial e trombose vascular, alto poder proliferativo e atividade mitótica, pleomorfismo celular e grande atipia celular. Células gigantes e multinucleadas prevalecem juntamente com lesões de alto grau de celularidade e pleomorfismos nucleares. O diagnóstico diferencial a partir da histologia se dá pela melhor caracterização do tecido, devido à alta vascularização presente, com áreas necróticas e exacerbação da atividade mitótica (Baroni, 2014).

O prognóstico dos pacientes portadores, demonstra sobrevida relativa em cinco anos de 5,6% e sobrevida global mediana de 12 a 15 meses. Alguns fatores influenciam no prognóstico do tumor como: idade, sexo, status de desempenho Karnofsky, extensão da ressecção do tumor, plano de tratamento, e vários biomarcadores, incluindo mutações

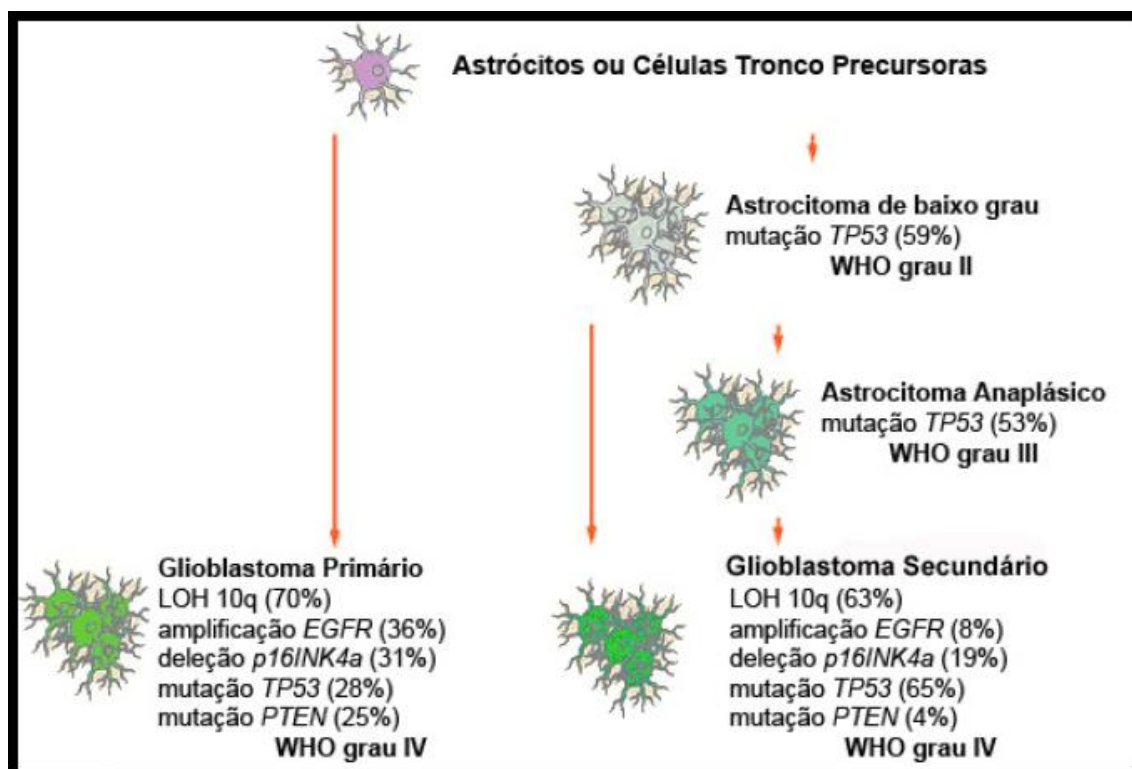
na enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) e 2 (IDH2), transcriptase reversa da telomerase (TERT), status de metilação do promotor do gene O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Kudulaiti et al., 2021). O EGFR é uma molécula indispensável para a angiogênese e tumorigênese. Pertencente à família do receptor de tirosina quinase, quando ativado induz a sinalização para liberação de responsáveis por regular processos de proliferação, angiogênese, migração e apoptose de numerosos tumores (Zhu *et al.*, 2021).

O neuropatologista alemão Hans Joachim Sherer em 1940, desenvolveu uma classificação para GBM, podendo ser distinguido em primário e secundário (**Figura 15**). Atualmente, é visto que estes tipos de GBM diferem-se em suas entidades patológicas que evoluem por diferentes vias genéticas, afetam pacientes em idades variadas e refletem no prognóstico e resposta farmacológica. O GBM primário corresponde por mais de 90% dos casos, abrangendo indivíduos com mais de 55 anos, geralmente sem evidência de um precursor menos maligno, ocasionados por alterações genéticas na super expressão de EGFR, mutação no gene PTEN (homólogo da fosfatase e tensina), perda do cromossomo p10 e deleções no inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A). GBM secundário evolui a partir de astrocitoma ou oligodendroglioma de baixo grau inicial, atingindo pacientes mais jovens (média = 40 anos) e desenvolve mais precocemente, mutações na IDH1 e na proteína de tumor 53 (TP53) e perda do cromossomo 19q. Mais recentemente a OMS constatou um subtipo raro de GBM o Glioblastoma 0 (GBM-0), com componente oligodendroglioma, que possui áreas semelhantes a oligodendroglioma anaplásico, característico de GBM, e áreas de necrose sem proliferação microvascular (Tamimi; Juweid, 2017).

O GBM também pode ser classificado com base na sua expressão gênica, configurando quatro subtipos: clássico, mesenquimal, proneural e neural. Cada subtipo contém alterações e perfis de expressão genéticos distintos, como no clássico vemos mutações no EGFR, TP53, IDH1 e perda do cromossomo p10. Mutações de neurofibromatose do tipo 1 (NF1), aumento de expressão de astrócitos e marcadores microgliais são comuns nos mesenquimais, assim como proneural apresenta mutação em receptor de crescimento derivado de plaquetas A (PDGRFA) e IDH1, além de expressão elevada de genes proneurais em oligodendrócitos e presença de alterações em TP53, receptor de crescimento derivado de plaquetas (PDGRF) e IDH1. O subtipo neural tem grande relação com os marcadores astrocítico e oligodendrocítico, e consistem em TERT.

Existem fortes relações entre os subtipos e as diferentes formas de tratamento de acordo com a agressividade da terapia, onde os benefícios são maiores para o subtipo clássico e pouco ou nenhum para o proneural (Tamimi; Juweid, 2017); (Waters *et al.*, 2019).

Figura 15 – Mutações genéticas que contribuem no desenvolvimento de GBM primário e secundário.



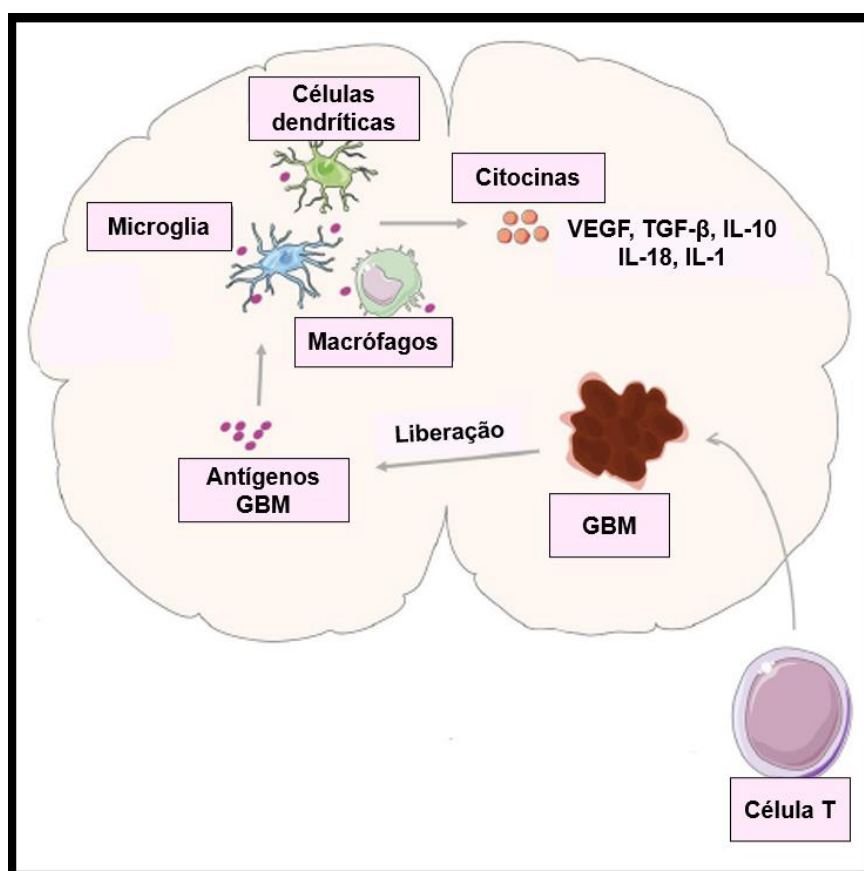
Fonte: Montaldi, 2009.

A angiogênese robusta, radorresistência e invasão celular são características interferentes do GBM no seu potencial imunossupressor e múltiplos mecanismos de feedback inflamatório, juntamente com fatores de mutação dos seus subtipos. Entretanto, fatores como necrose extensa e imunossupressão também estão associados a letalidade, resistência e mau prognóstico (Waters *et al.*, 2019). A ativação da atividade inflamatória eleva níveis de produção de ácido araquidônico, o que deflagra a presença de seus produtos como a cicloxigenase 2 (COX-2), induzida por esses estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento, fonte mais importante na formação de prostanóides e de prostaglandinas E2 (PGE2), presentes em doenças proliferativas como o câncer (Venturin *et al.*, 2020).

A presença de um microambiente imunossupressor se torna obstáculo para terapias, com a grande quantidade de células imunes infiltradas, incluindo uma associação

de células do glioma, microglia e macrófagos, células supressoras derivadas de mieloides, células T e granulócitos, facilitam a liberação de mediadores inflamatórios, que também são produzidos por células de GBM (**Figura 16**), o que causa expressão de citocinas e quimiocinas, induzindo a sinalização pró-inflamatória, no que aumenta a proliferação, invasão, resistência a apoptose, manutenção de propriedades semelhantes as células-tronco, resistência as farmacoterapias empregadas e angiogênese de GBM, alavancando o aumento da capacidade tumoral (Waters *et al.*, 2019).

Figura 16 – Representação esquemática da resposta imune e inflamatória de GBM.



Fonte: Adaptado de Huang *et al.*, 2017.

A imunidade adaptativa no microambiente tumoral, faz com que haja o recrutamento de células imunes como linfócitos T e B, células dendríticas, e as células efectoras da imunidade inata, NKs e macrófagos. Dentre os linfócitos T, há presença de TCD4⁺, TCD8⁺, e a liberação de Th1, 2 e 17 e Treg, este contribuí para o ambiente imunossupressor e desenvolvimento de células neoplásicas, juntamente com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Scholl, 2019).

4.1.1.1 Tratamento do Glioblastoma

O GBM possui extensa heterogeneidade intertumoral e intratumoral além das células tumorais altamente invasivas, o que o torna um tumor incurável e o padrão de tratamento, inclui cirurgia, radiação e poucos quimioterápicos minimamente efetivos, no entanto, esses recursos apenas prolongam a sobrevida. Na maioria dos casos, inevitavelmente o tumor recorre rapidamente, o que reflete em uma sobrevida de dois anos de 15%, recidiva causada por células de GBM resistentes a radiação e quimioterápicos, que não foram retiradas no processo cirúrgico, e migraram para o parênquima cerebral (Maturi *et al.*, 2019).

O acompanhamento da progressividade ou regressão das células tumorais, tem como padrão ouro a técnica de ressonância magnética, considerada amplamente como ferramenta de imagem mais precisa para o diagnóstico de GBM. Apesar de muitas modalidades de terapia padrão existirem atualmente, o GBM tem se mostrado resistente a todas as elas (Meulenaere *et al.*, 2019). Mesmo com significativos avanços em técnicas cirúrgicas, a causa de danos neurológicos é presente, devido à dificuldade de ressecção completa de todas as células cancerígenas, o que influencia a recidiva de GBM (Liang *et al.*, 2021).

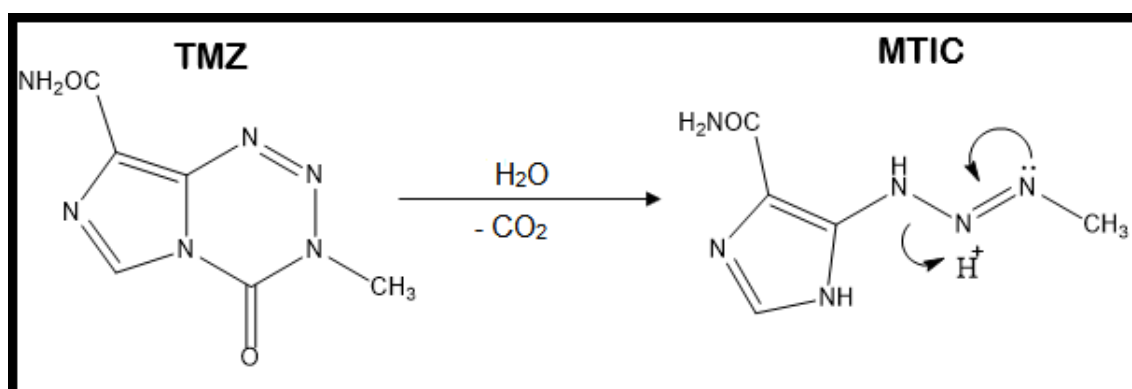
A quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) são utilizadas após medidas cirúrgicas, com o intuito de prevenir a recorrência de GBM, porém, a quimiorradiação não é um tratamento imediato após a ressecção cirúrgica, devido retardar ou impedir a cicatrização da incisão. O período entre o momento da cirurgia e o tratamento de quimiorradiação, que é em torno de um mês, está relacionado a recidivas de GBM. Alguns tratamentos injetáveis ou implantáveis, que utilizam a tecnologia de liberação sustentada, têm sido administrados na cavidade de ressecção do tumor, no entanto, foram observadas poucas vantagens para os pacientes, devido aos frequentes efeitos colaterais emergentes e ainda, o tempo de sobrevida que foi prolongado em somente dois meses (Liang *et al.*, 2021).

O tratamento com RT está associado a melhor qualidade de vida e a um benefício de sobrevida em casos de GBM. Ultimamente a radiação utilizada tem diferentes tipos, porém o padrão é a que se utiliza de um feixe externo, feita por cinco dias por semana, com duração entre cinco ou seis semanas, onde, em casos de GBM é feita diretamente no local e na área ao redor do tumor, considerando que uma radiação local ainda pode ser usada com o intuito de aumentar a convencional, visando o tratamento do tumor e proteção de células saudáveis, presentes nas regiões que o rodeiam (Reinke, 2019).

Os agentes antineoplásicos usados no tratamento de GBM mais comuns são uso de derivados de platina como cisplatina e carboplatina, nitrosureias como carmustina e lomustina, e principalmente agentes alquilantes como temozolomida (TMZ), dacarbazina e procarbazina. Ainda existem esquemas que utilizam irinotecano, vincristina, hidroxiureia e cloroquina (Batista Netto; Silva; Nascimento, 2019).

O protocolo mais utilizado pós ressecção cirúrgica consiste em seções de RT concomitante ao fármaco antineoplásico TMZ {3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-d]-[1,2,3,5]-tetrazina-8-carboxamida} (Ylanan *et al.*, 2021), derivado da dacarbazina, é um pró-fármaco e após ser hidrolisado no plasma se torna convertido em 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), seu metabólito ativo (**Figura 17**) (Yan *et al.*, 2016). A dose utilizada é de 75mg/m² diárias num período de seis semanas juntamente com a RT, utilizando pausas por volta de quatro semanas, com uso de seis ciclos de consolidação. As doses de 150 mg/m² e de 200mg/m² também são empregadas respectivamente, no primeiro ciclo e do segundo ao sexto ciclo, com pausas de 23 dias (Batista Netto; Silva; Nascimento, 2020). Mesmo com a agressividade do tratamento frente as células malignas, o prognóstico ainda permanece ruim com mediana de sobrevida livre de progressão de 6,2-7,5 meses e mediana de sobrevida global de 14,6-20,5 meses (Ylanan *et al.*, 2021).

Figura 17 – Conversão de TMZ em MTIC.



Fonte: Adaptado de Clementino Neto, 2019.

O TMZ é um derivado da mitozolamide, que age como quimioterápico alquilante, e seu mecanismo de ação ocorre pela metilação do DNA, esgotando MGMT, fundamental enzima de reparo, o uso oral demonstra boa capacidade de penetração. Devido a propriedade lipofílica, atravessa a BHE, e assim, consegue agir em tumores do SNC e metástases cerebrais. Tem alta atividade antitumoral e alguns estudos demonstram que

dentre outros fármacos é o esquema que menos apresenta efeitos toxicológicos em tratamento de gliomas de alto grau, com efeitos adversos relacionados a toxicidade hematológica e náuseas, porém a resposta clínica não demonstra total eficiência (Godoy, 2018); (Reikne, 2019).

Alguns tratamentos injetáveis ou implantáveis, que utilizam a tecnologia de liberação sustentada, têm sido administrados na cavidade de ressecção do tumor, como o fármaco carmustina, no entanto, foram observadas poucas vantagens para os pacientes, devido aos frequentes efeitos colaterais emergentes e ainda, o tempo de sobrevida que foi prolongado em somente dois meses (Liang *et al.*, 2021). A carmustina empregada, possui variação de apresentação como implantes sólidos biodegradáveis, posicionados sobre a cavidade cirúrgica após ressecção, liberando topicamente o fármaco por 21 dias, embora demonstrem eficácia, deflagram efeitos como convulsões, infecções no SNC, edemas intracranianos e ainda atrasa a cicatrização decorrente da ressecção (Batista Netto; Silva; Nascimento, 2020).

A escolha principal como uso extensivo do TMZ, disponibiliza opções viáveis apenas em casos de intolerância ou progressão e reincidiva tumoral, dentre esses fármacos como exemplo, o uso de irinotecano, etoposídeo e cisplatina, tem modesta eficácia como antineoplásicos terapêuticos adjuvantes. A carmustina e também a lomustina, utilizados como outros esquemas, ainda empregam efeitos tóxicos que podem causar nos pacientes vômitos, náuseas, erupções cutâneas, mielossupressão e fibrose pulmonar, inviabilizando a preferência na terapia (Batista Netto; Silva; Nascimento, 2020).

A imunoterapia também tem sido empregada no tratamento de GBM progressivo e recorrente de pacientes que não responderam ao tratamento de RT com TMZ. O fármaco bevacizumabe, anticorpo monoclonal, tem sido utilizado desde o ano de 2009 como agente único, que age diminuindo a vasculatura tumoral através do efeito direto no VEGF extracelular, que resulta em queda da angiogênese e tumorigênese. O acompanhamento clínico demonstra algumas falhas no tratamento, que podem estar relacionadas a baixa eficácia do bevacizumabe em atravessar a BHE, fazendo com que sejam necessárias várias administrações do fármaco, além da citotoxicidade fora do alvo tumoral causar aumento de reações adversas, e desistência da continuidade do tratamento por parte dos pacientes (Sousa *et al.*, 2019).

O uso de procedimentos agressivos como cirurgia, RT e QT, contudo, aponta ainda pouco aumento na sobrevida de pacientes com gliomas malignos, o que por sua vez é relacionado a gliomas de alto grau, demonstrando recorrência do tumor, o que corrobora

com a extrema necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas para prolongar a sobrevida dos pacientes e melhorar sua qualidade de vida. Novos esquemas terapêuticos precisam ser descobertos para uma escolha quimioterápica mais adequada, com foco em básicos efeitos quimioterápicos, eficazes e seguros, no intuito de otimizar a evolução do tratamento do câncer (Çetin; Biltekin; Degirmencioglu, 2019).

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral em glioblastoma de derivados sintéticos antraquinônicos: ENSJ 650, ENSJ 841, ENSJ 842, ENSJ 845, ENSJ 848, ENSJ 849, ENSJ 850, ENSJ 851 e ENSJ 854 através de modelos experimentais *in vitro*.

4.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* dos derivados sintéticos antraquinônicos sobre a viabilidade de glioblastomas da linhagem GBM02;
- Avaliar o efeito citotóxico dos derivados sintéticos antraquinônicos sobre mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos);
- Avaliar a ação dos derivados sintéticos antraquinônicos sobre os aspectos morfológicos de glioblastomas da linhagem GBM02;
- Avaliar a ação dos derivados sintéticos antraquinônicos sobre a migração celular de glioblastomas da linhagem GBM02.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Obtenção das substâncias teste

As mesmas estruturas derivadas antraquinônicas utilizadas nos ensaios para averiguação da atividade leishmanicida (**Tabela 1**), foram submetidas também aos ensaios antitumorais de glioblastoma.

4.3.2 Substâncias e Reagentes

Temozolomida (TMZ, Sigma-Aldrich), Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich), meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich), meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle/F12 (DMEM/F12, Gibco), soro fetal bovino (SBF, CUT-LAB), tampão fosfato salina (PBS, Sigma-Aldrich), aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich), piruvato (Sigma-Aldrich), L-Glutamina (Sigma-Aldrich), Tripsina (Sigma-Aldrich), Dimetilformamida (DMF 0,1%, Sigma-Aldrich), Dimetilsufóxido (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich), Triton™ X-100, [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich), Histopaque (Sigma-Aldrich), Metanol (Sigma-Aldrich), Teste de coloração panótico rápido (Laborclin), Balsamo do Canadá (Dinamica), etanol 70% (Ciclo Farma).

4.3.3 Manutenção das células

4.3.3.1 Glioblastoma GBM02

Culturas de células de glioblastoma GBM02, foram cedidas pelo Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN-RJ). A linhagem de tumor humano foi adquirida a partir de amostras cirúrgicas, no laboratório pertencente ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-RJ), sob o protocolo CEPHUCFF No. 002/01. As células de GBM02 foram cultivadas em garrafas de cultura com 10 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle/F12 (DMEM/F12), suplementadas com 10% (v/v) de SBF, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 0,1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, e mantidas com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade. No momento dos experimentos as células foram depositadas em tubos Falcon para posterior centrifugação por 4 minutos em temperatura de 3°C a 1500 rpm,

logo após foi descartado o sobrenadante, e o pellet formado foi ressuspensão em meio DMEM/F12. Para o plaqueamento das células, a amostra foi diluída em meio DMEM/F12 (1:100), e a contagem realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 40x (Nikon Eclipse Si).

4.3.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

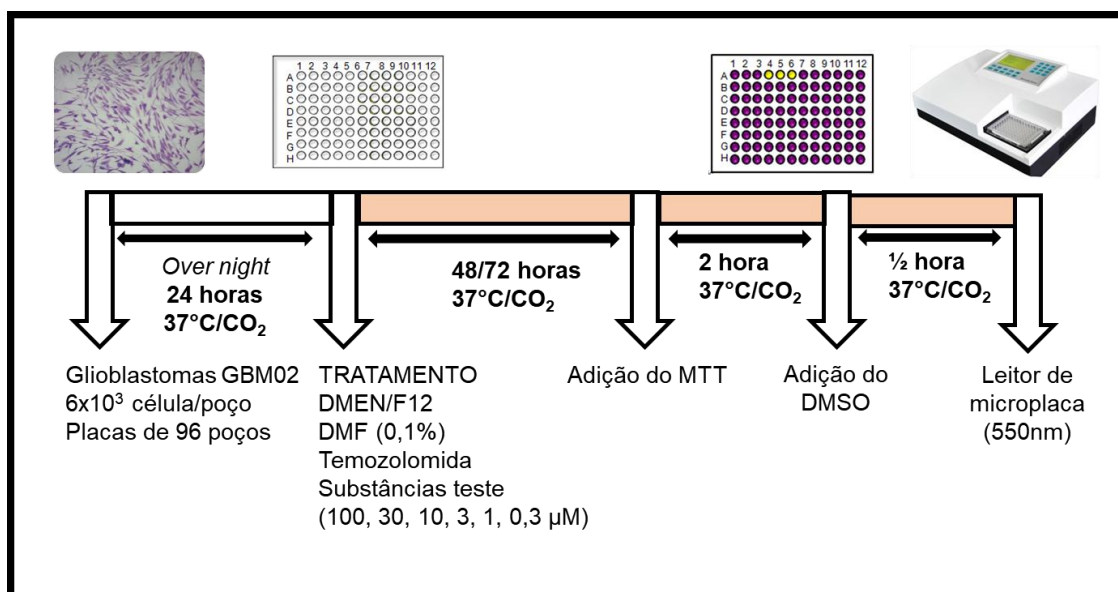
4.3.4.1 Ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT (Mosmann, 1983)

O ensaio possui o mesmo embasamento do realizado com macrófagos da linhagem J774.A1. Foram usadas placas de 96 poços onde as células GBM02 foram plaqueadas, utilizando a concentração de 6×10^3 células a cada 100 μL de meio DMEM/F12, em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 , em *over night* para melhor aderência antes do tratamento. As células foram tratadas com as substâncias teste nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM , além do fármaco padrão: TMZ nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 μM , e ainda os controles: DMEM/F12 (meio), DMF 0,1% (solvente), DMSO 0,1% (solvente) e lise (Triton™ X-100).

Após o tratamento, as células foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente por um período de 48 h e 72 h. Ao término do período de incubação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado a cada poço 50 μL de solução de MTT a 0,5 mg/mL e reincubadas por 2 h em estufa, sob temperatura controlada (37°C) e 5% de CO_2 , para que ocorra a reação de redução do MTT a Formazan. 2 h antes da adição do MTT, o sobrenadante foi desprezado nos poços com o controle de lise e adicionado Triton™ X-100. Logo após a reincubação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas com 50 μL de DMSO. Por fim, para a avaliação quantitativa, os poços foram analisados em um leitor de microplacas no comprimento de onda 530 nm (*ThermoPlate*) (**Figura 18**).

A concentração de cada derivado responsável por inibir 50% da viabilidade de GBM02 (CI_{50}), em 48 e 72 h, foi calculada baseada em uma comparação com o controle DMF 0,1% (controle do veículo na maior concentração, cujas células foram consideradas 100% viáveis).

Figura 18 – Esquematisação do ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT.



Fonte: Autor, 2023.

4.3.4.2 Ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos) (Ulmer et al., 1984)

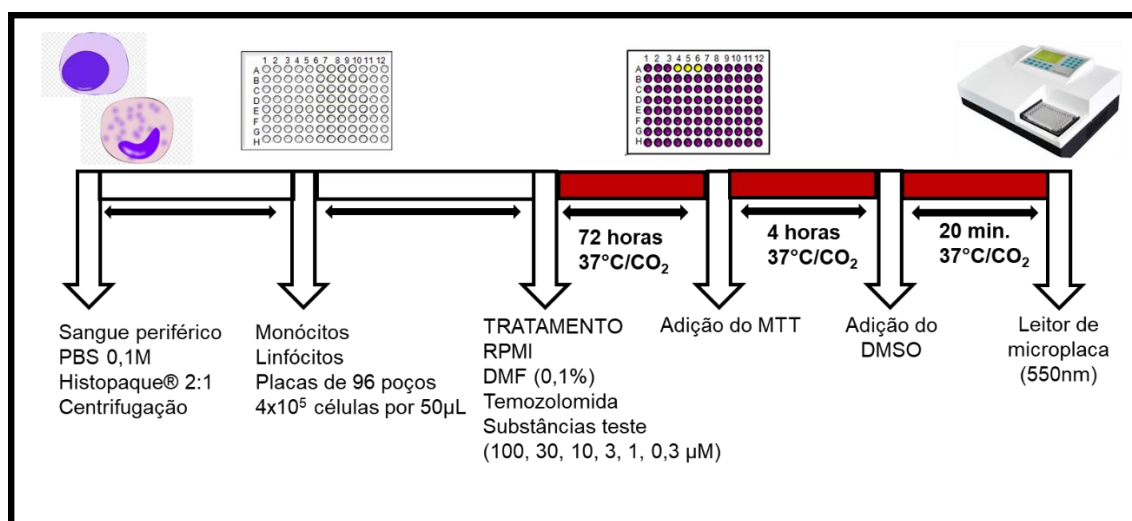
Amostras de sangue periférico foram coletadas a partir de bolsas de sangue de doadores voluntários do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA/UFAL), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), pela Plataforma Brasil, sob o protocolo de número: 6.094.651/2023. Posteriormente, essas amostras foram diluídas em PBS 0,1M em volumes iguais, formando uma solução, a qual foi adicionada a um tubo falcon que continha histopaque®, em proporção de 2:1. Após, as amostras foram centrifugadas a 2.837rpm, por um período de 30 minutos a uma temperatura de 26°C, que devido a densidade do histopaque®, dividiu-se formando diferentes camadas visíveis: inferior contendo hemácias; intermediária contendo células mononucleares sanguíneas e histopaque®; e superior contendo soro. A partir de então, a região intermediária foi removida e submetida a mais duas centrifugações de 10 minutos cada, a 2.136 e 1.638 rpm em temperatura de 26 °C, para que o histopaque® fosse totalmente eliminado e restasse apenas as células sanguíneas, monócitos e linfócitos.

As soluções com monócitos e linfócitos isolados, na concentração de 4x10⁵ células por 50µL, foram cultivadas em placas de 96 poços com meio RPMI. Logo em seguida, as células foram tratadas com as substâncias teste nas concentrações de 100, 30,

10, 3, 1 e 0,3 μM , além do fármaco padrão: TMZ nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 μM , e ainda os controles: DMEM/F12 (meio), DMF 0,1% (solvente), DMSO 0,1% (solvente) e lise (Triton™ X-100), posteriormente incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 , durante o período de 72 horas.

Após a incubação, foi adicionado 20 μL de MTT (5mg/mL) por cada poço, e estas novamente incubadas durante 4 horas em estufa, nas mesmas condições citadas anteriormente. Logo após a reincubação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas com 200 μL de DMSO e ocorrer a reação. Por fim, passados 20 minutos, para a avaliação quantitativa, os poços foram analisados em um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm (*ThermoPlate*), descrito na **Figura 19**.

Figura 19 – Esquematização do ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células sanguíneas mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).



Fonte: Autor, 2023.

4.3.4.3 Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre GBM02

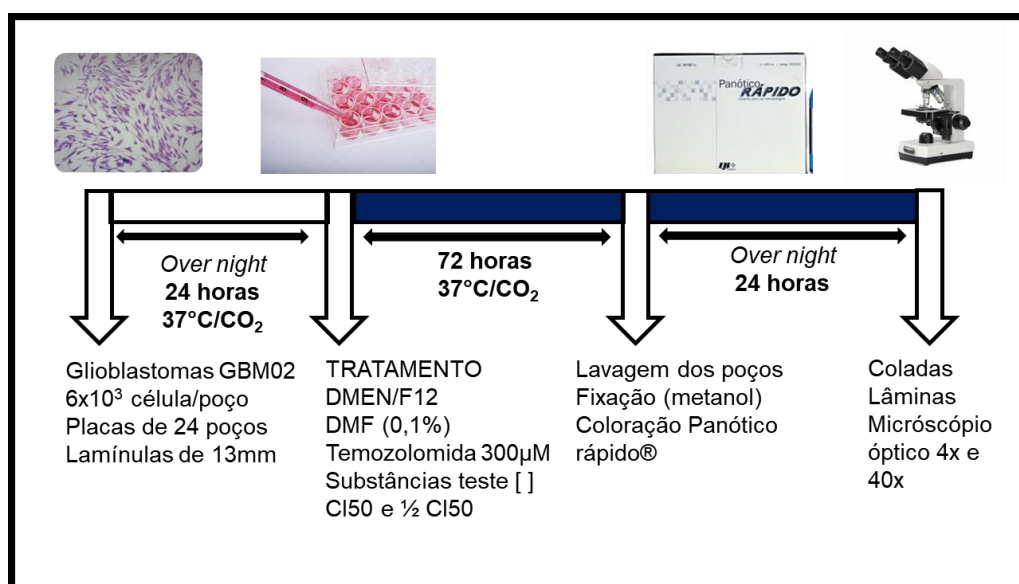
O cálculo do índice de seletividade dos DSAQs, foi realizado para avaliar se sua ação é maior em GBM02 do que em células mononucleares sanguíneas. Assim como para ação leishmanicida, quanto maior o valor numérico de IS, mais seletivo o derivado será para GBM02, utilizando-se da mesma fórmula para cálculo.

4.3.4.4 Ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02

As células de GBM02 foram plaqueadas na concentração de 6×10^3 células por poço, contendo 500 μL de DMEM/F12, em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm aderidas. Os tratamentos foram realizados, após incubação das células por 24 horas para que estas ficassem aderidas. Os derivados ENSJ 650, 845, 848 e 854 foram utilizados nas concentrações de suas respectivas CI_{50} e $\frac{1}{2} \text{CI}_{50}$: 20 e 10 μM ; 70 e 30 μM ; 70 e 30 μM e 80 e 40 μM , além de TMZ na concentração de 300 μM , seguindo da incubação destas placas nas mesmas condições já descritas, em estufa de CO_2 por um período de 72 horas.

Transcorrido as 72 horas, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas com PBS, três vezes seguidas, e fixadas com metanol durante 2 minutos. Na sequência as células fixadas foram coradas com panótico rápido® (triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e solução de tiazinas 0,1%). Ao final da coloração as lamínulas foram lavadas com água destilada, secas durante um *over night* de 24 horas, e coladas nas lâminas com balsamo do Canadá®. As microfotografias representativas do aspecto morfológico de GBM02 após os tratamentos foram obtidas através de microscópio óptico, nas objetivas de 10x e 40x como mostra a **Figura 20**.

Figura 20 – Esquematização do ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02.



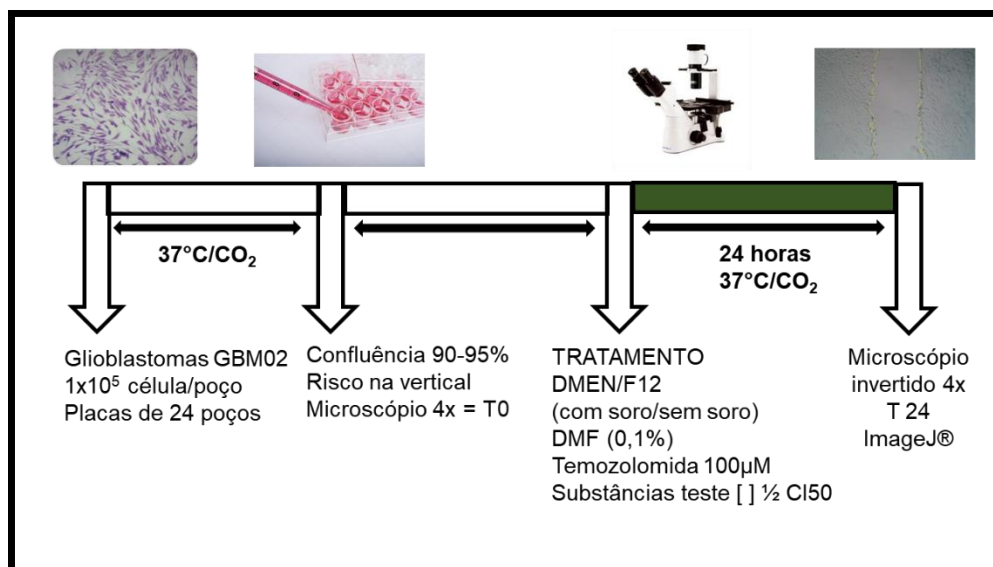
Fonte: Autor, 2023.

4.3.4.5 Ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02 – “Scratch” (Lyang; Park; Guan, 2007)

O ensaio de *Scratch* foi realizado, a partir do plaqueamento das células de GBM02 em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células por poço, com 400 μ L de DMEM/F12. Após *over night* as células são aderidas aos poços, e espera-se que atinja uma confluência nos poços, entre 90 a 95%, para que seja realizado o ensaio. Primeiramente realiza-se um risco na vertical, com uma ponteira de 200 μ L, no centro de cada poço, no intuito de formar uma região sem células, após, o sobrenadante é retirado, para eliminar células em suspensão e em seguida é colocado mais 400 μ L meio DMEM/F12, esse momento é denominado T0 para que sejam realizadas microfotografias de cada poço, com o auxílio de microscópio óptico invertido, nas objetivas de 4x, e marcando o local fotografado.

O tratamento é seguidamente realizado com os derivados ENSJ: 650, 845, 848 e 854, na concentração de suas respectivas $\frac{1}{2}$ CI₅₀: 10 μ M; 30 μ M; 30 μ M e 40 μ M, TMZ na concentração de 100 μ M, DMF 0,1% e meio DMEM/F12, estes suplementados sem presença de soro fetal bovino, no intuito de evitar ou minimizar a proliferação celular, o que poderia gerar um viés para a investigação de possível efeito antimigratório. Após este passo, as placas foram armazenadas nas mesmas condições já citadas em estufa de CO₂, por um período de 24 horas. Passado o período de incubação, foi realizada a segunda captura de imagens e T24, das mesmas áreas fotografadas anteriormente, utilizando o mesmo microscópio e objetiva, realizando a verificação qualitativa da resposta subsequente dos tratamentos sobre a migração de GBM02 para região que estava sem células (**Figura 21**).

Figura 21 – Esquematização do ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02.



Fonte: Autor, 2023.

A análise quantitativa, foi determinada com o auxílio do programa ImageJ®, que determina a área vazia dos poços no T0 e T24, juntamente com a porcentagem de inibição da migração celular nos diferentes grupos de tratamentos, sendo obtida de maneira indireta considerando tais áreas, e utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de migração de GBM02} = 100 - \frac{\text{Área vazia em T24} \times 100}{\text{Área vazia em T0}}$$

4.3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos serão expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.) e as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. Os valores dos resultados foram considerados significativos quando *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 7.

As imagens de microscopia óptica do ensaio de morfologia, obtidas de campos microscópicos aleatórios, e do protocolo do *scratch*, foram analisadas utilizando o software Fiji ImageJ®, versão 2.0.0/2015.

4.4 Resultados

4.4.1 Ensaio de viabilidade de GBM02 pelo método de MTT

O ensaio de ação antitumoral sobre GBM foi realizado após 48h de tratamento (**Tabela 6**), e após 72 h (**Tabela 7**). Após 48h, o TMZ, fármaco padrão utilizado, não demonstrou atividade, onde não foi possível demonstrar sua CI_{50} e sua porcentagem de citotoxicidade máxima na maior concentração utilizada (900 μ M). Para os DSAQs, não foi possível obter a CI_{50} , pois suas citotoxicidades máximas não chegaram a 50%. No momento de 72h após o tratamento, o TMZ também continuou nas mesmas condições, e dentre os DSAQs ENSJ650, 845, 848 e 854 demonstraram efeito antitumoral, no qual destaca-se ENSJ650 com CI_{50} de $22,00 \pm 2,83 \mu$ M e citotoxicidade máxima de $56,71 \pm 2,55$. ENSJ845, 848 e 854 demonstraram CI_{50} de $75,00 \pm 4,24$, $76,50 \pm 9,19$ e $84,00 \pm 4,24 \mu$ M, respectivamente e citotoxicidade máxima de $54,93 \pm 3,39$, $55,90 \pm 5,67$ e $56,14 \pm 3,74\%$, respectivamente.

Tabela 6 - Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μ M, e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 μ M, sobre a viabilidade de glioblastomas da linhagem GBM02, após 48h, no ensaio de MTT.

Substâncias	CI_{50} (μ M $\pm$ E.P.M.) ^a	Citotoxicidade Máxima (% $\pm$ E.P.M.) ^b
TMZ	>900	NT
ENSJ 650	>100	$42,31 \pm 2,09^{***}$
ENSJ 841	>100	$22,91 \pm 2,27^{***}$
ENSJ 842	>100	$28,52 \pm 4,14^{***}$
ENSJ 845	>100	$28,36 \pm 6,98^{***}$
ENSJ 848	>100	$35,90 \pm 3,13^{***}$
ENSJ 849	>100	$43,11 \pm 4,72^{***}$
ENSJ 850	>100	$44,23 \pm 1,44^{***}$
ENSJ 851	>100	$23,24 \pm 10,38^{***}$
ENSJ 854	>100	$47,11 \pm 1,36^{***}$

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média $\pm$ erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $***p < 0,001$, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

NT: Não determinado Citotoxicidade máxima para células até a concentração de 100 μ M em comparação com o grupo DMF.

Tabela 7 - Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μ M, e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 μ M, sobre a viabilidade de glioblastomas da linhagem GBM02, após 72h, no ensaio de MTT.

Substâncias	CI ₅₀ (μ M $\pm$ E.P.M.) ^a	Citotoxicidade Máxima (% $\pm$ E.P.M.) ^b
TMZ	>900	NT
ENSJ 650	22,00 $\pm$ 2,83	56,71 $\pm$ 2,55***
ENSJ 841	>100	29,80 $\pm$ 5,58***
ENSJ 842	>100	31,44 $\pm$ 4,26***
ENSJ 845	75,00 $\pm$ 4,24	54,93 $\pm$ 3,39***
ENSJ 848	76,50 $\pm$ 9,19	55,90 $\pm$ 5,67***
ENSJ 849	>100	33,01 $\pm$ 6,94***
ENSJ 850	>100	29,04 $\pm$ 1,19***
ENSJ 851	>100	31,08 $\pm$ 3,64***
ENSJ 854	84,00 $\pm$ 4,24	56,14 $\pm$ 3,74***

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Inibitória de 50% (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média $\pm$ erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando ***p < 0,001, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

NT: Não determinado Citotoxicidade máxima para células até a concentração de 100 μ M em comparação com o grupo DMF.

4.4.2 Ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos derivados antraquinônicos sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos)

A **Tabela 8** demonstra a viabilidade celular, após tratamento com os DSAQs e o fármaco padrão TMZ, de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) (monócitos e linfócitos). TMZ não demonstrou citotoxicidade estatisticamente significativa no ensaio realizado, assim também como a maioria dos DSAQs, com porcentagens menores que 15%, e CC₅₀ maior que a concentração máxima utilizada (100 μ M). ENSJ848, 851 e 854 obtiveram maiores reduções na população total de células, 14,48 $\pm$ 6,20, 18,72 $\pm$ 7,24% e 16,37 $\pm$ 3,00%, respectivamente.

Tabela 8 - Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos, todos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μM , e da TMZ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 μM , sobre a viabilidade de células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).

Substâncias	CC ₅₀ ($\mu\text{M} \pm \text{E.P.M.}$) ^a	Citotoxicidade Máxima (% $\pm \text{E.P.M.}$) ^b
TMZ	>900	NT
ENSJ 650	>100	4,21 $\pm$ 5,19
ENSJ 841	>100	12,65 $\pm$ 4,37
ENSJ 842	>100	11,27 $\pm$ 6,45
ENSJ 845	>100	1,18 $\pm$ 3,74
ENSJ 848	>100	14,48 $\pm$ 6,20*
ENSJ 849	>100	1,64 $\pm$ 3,29
ENSJ 850	>100	4,66 $\pm$ 2,21
ENSJ 851	>100	18,72 $\pm$ 7,24**
ENSJ 854	>100	16,37 $\pm$ 3,00*

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Citotóxica de 50% (CC₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média $\pm$ erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01, comparado ao grupo DMF usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

NT: Não determinado Citotoxicidade máxima para células até a concentração de 100 μM em comparação com o grupo DMF.

4.4.3 Avaliação da seletividade dos derivados antraquinônicos sobre GBM02

A seletividade avaliada com relação ao DSAQs e sua ação em GBM02 e em monócitos e linfócitos está expressa na **Tabela 9**. Foi possível identificar que os DSAQs demonstram seletividade para células de GBM, com ENSJ845, 848 e 854 expressando respectivos IS, maiores que 1,33, 1,31 e 1,19 vezes mais seletivos para GBM02 do que para células sanguíneas. O destaque dentre os derivados foi ENSJ650 que possuiu IS maior que 4,55 vezes mais seletivo para GBM02 do que para monócitos e linfócitos. A TMZ apresentou CI₅₀ maior que 900 μM , e os outros DSAQs apresentaram CI₅₀ maiores que 100 μM , não sendo possível realizar o cálculo de IS.

Tabela 9 – Índice de seletividade dos derivados sintéticos antraquinônicos e da TMZ para citotoxicidade em glioblastomas da linhagem GBM02 versus células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos).

Substâncias	*IS para GBM02
TMZ	-
ENSJ 650	>4,55
ENSJ 841	-
ENSJ 842	-
ENSJ 845	>1,33
ENSJ 848	>1,31
ENSJ 849	-
ENSJ 850	-
ENSJ 851	-
ENSJ 854	>1,19

Fonte: Autor, 2023.

Notas: *IS: Índice de Seletividade. Calculado a partir da razão entre os valores de CC_{50} de células sanguíneas (monócitos e linfócitos) e CI_{50} de glioblastomas GBM02 (após 72 horas). (-): A substância não desenvolve efeito deletério em GBM02 (após 72 horas) ou células sanguíneas.

4.4.4 Ensaio de avaliação do efeito dos derivados antraquinônicos sobre a morfologia de GBM02

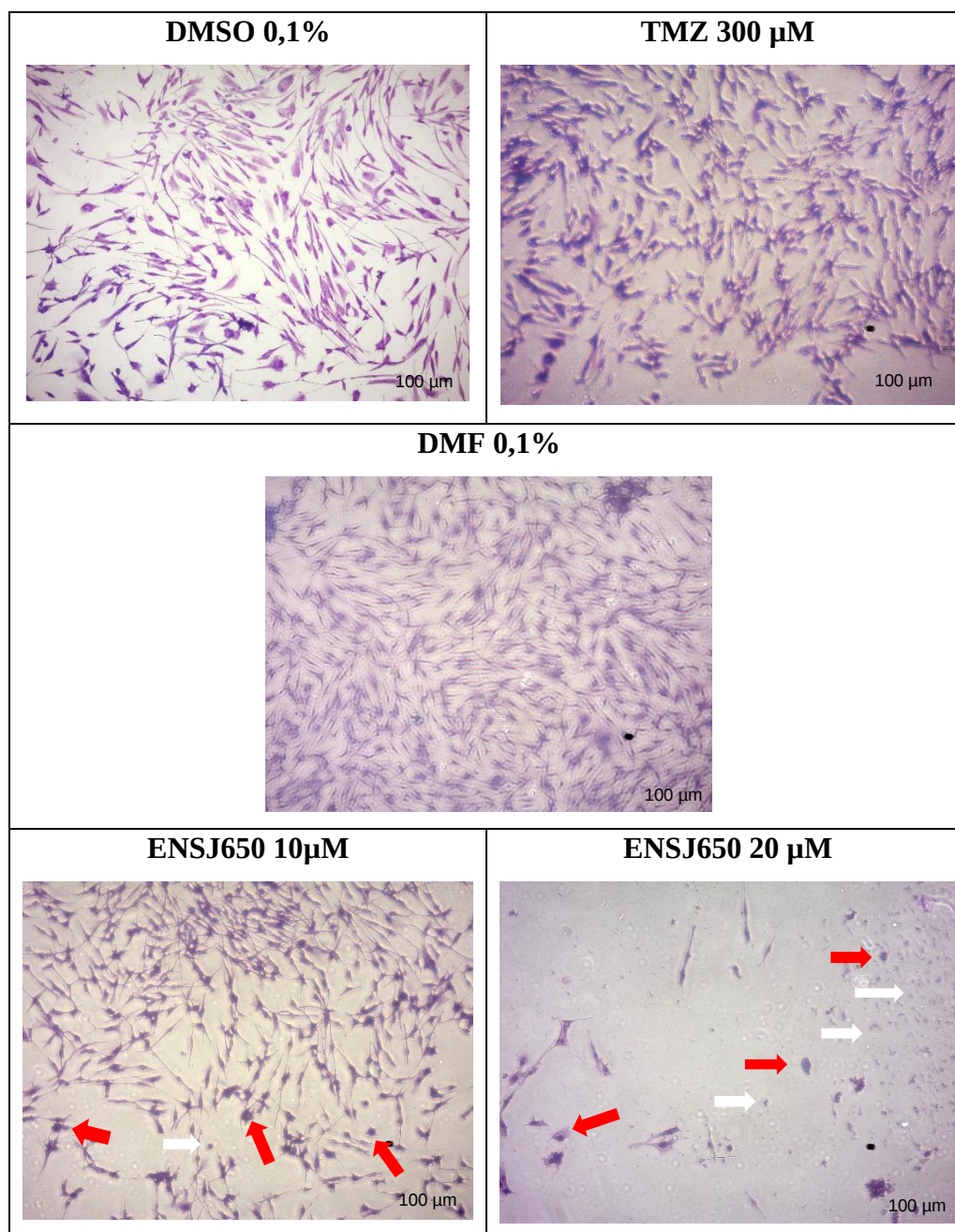
Os DSAQs que se mostraram mais ativos para ação antitumoral sobre GBM02, menor citotoxicidade em monócitos e linfócitos, foram selecionados para avaliação de alterações no aspecto morfológico. As células tumorais foram tratadas com os DSAQs ENSJ650, 845, 848 e 854, e após 72 horas foram avaliadas as estruturas celulares.

Na **Figura 22A** pode-se observar que as células que receberam tratamento com os solventes DMSO 0,1% e DMF 0,1% apresentam sua morfologia protoplasmática, com prolongamento alongados que são características típicas celulares de GBM02, assim como a TMZ, na dose de 300 μ M, que não alterou morfológicamente essas células tumorais. As imagens relacionadas com os tratamentos com os DSAQs, nas concentrações referentes as suas CI_{50} e $\frac{1}{2} CI_{50}$: ENSJ650 em 20 e 10 μ M, ENSJ845 e 848 em 70 e 30 μ M e ENSJ854 em 40 e 80 μ M, apontam redução no número de células, morfologia atípica juntamente com citoplasma celular arredondado (setas vermelhas) e aparecimento de *debris* (setas brancas). Destaque para o derivado ENSJ650, que apresenta resultado de citotoxicidade tumoral em menores concentrações.

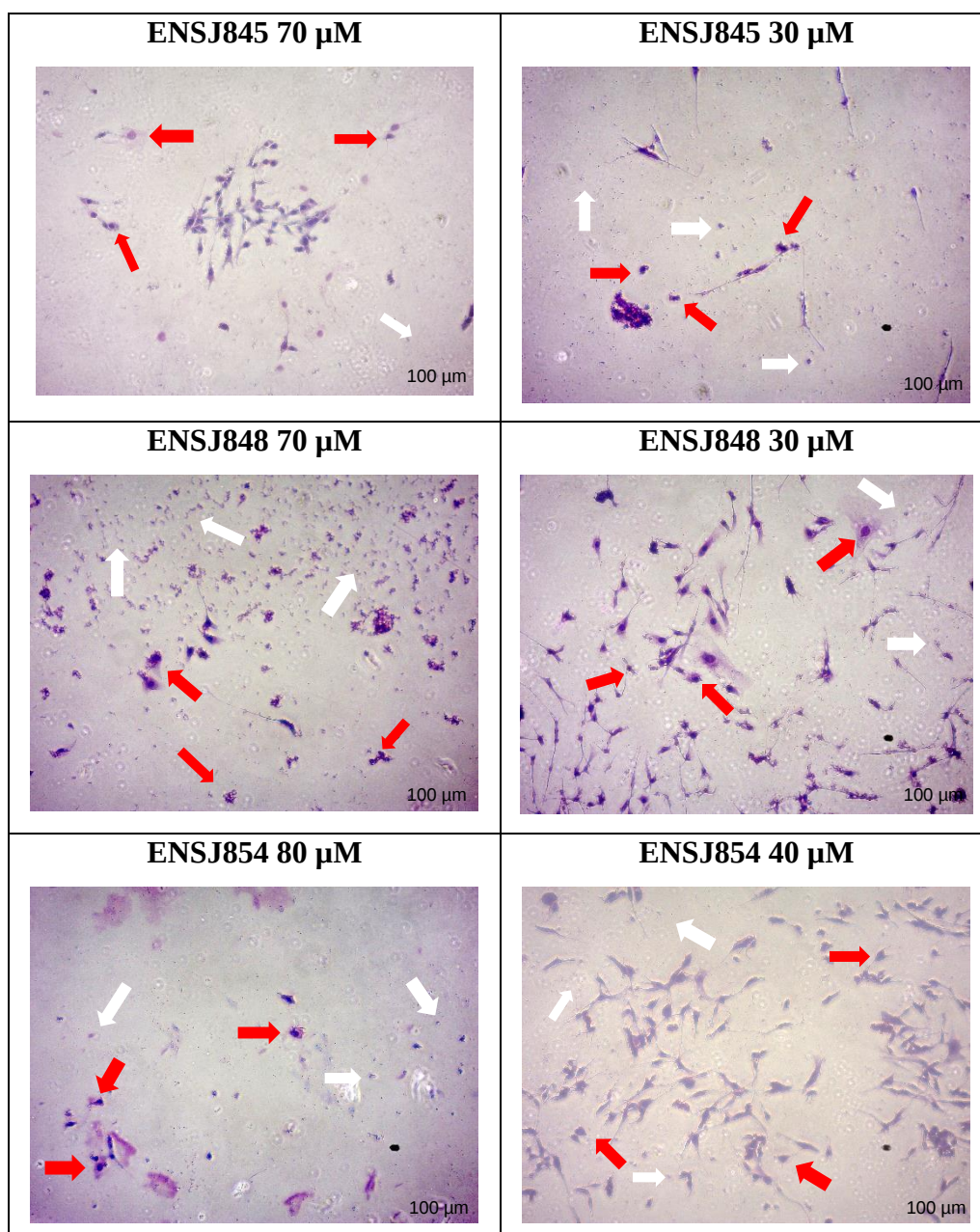
Os tratamentos com os DSAQs, também ocasionaram perda de conteúdo citoplasmático através do rompimento da membrana nuclear, com extravasamento do seu conteúdo (setas azuis), e formação de vacúolos citoplasmáticos (setas verdes) (**Figura 22B**), principalmente nas maiores concentrações utilizadas.

Figura 22 – Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados antraquinônicos e da TMZ sobre a morfologia de GBM02.

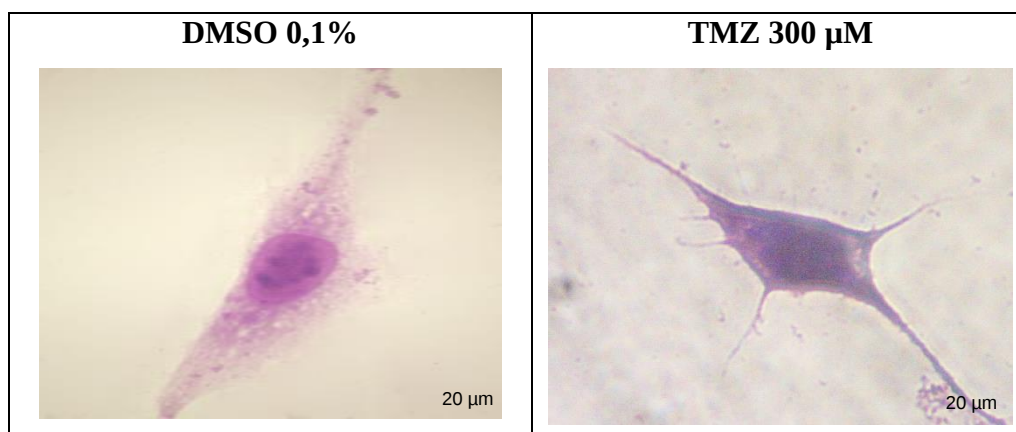
(A)



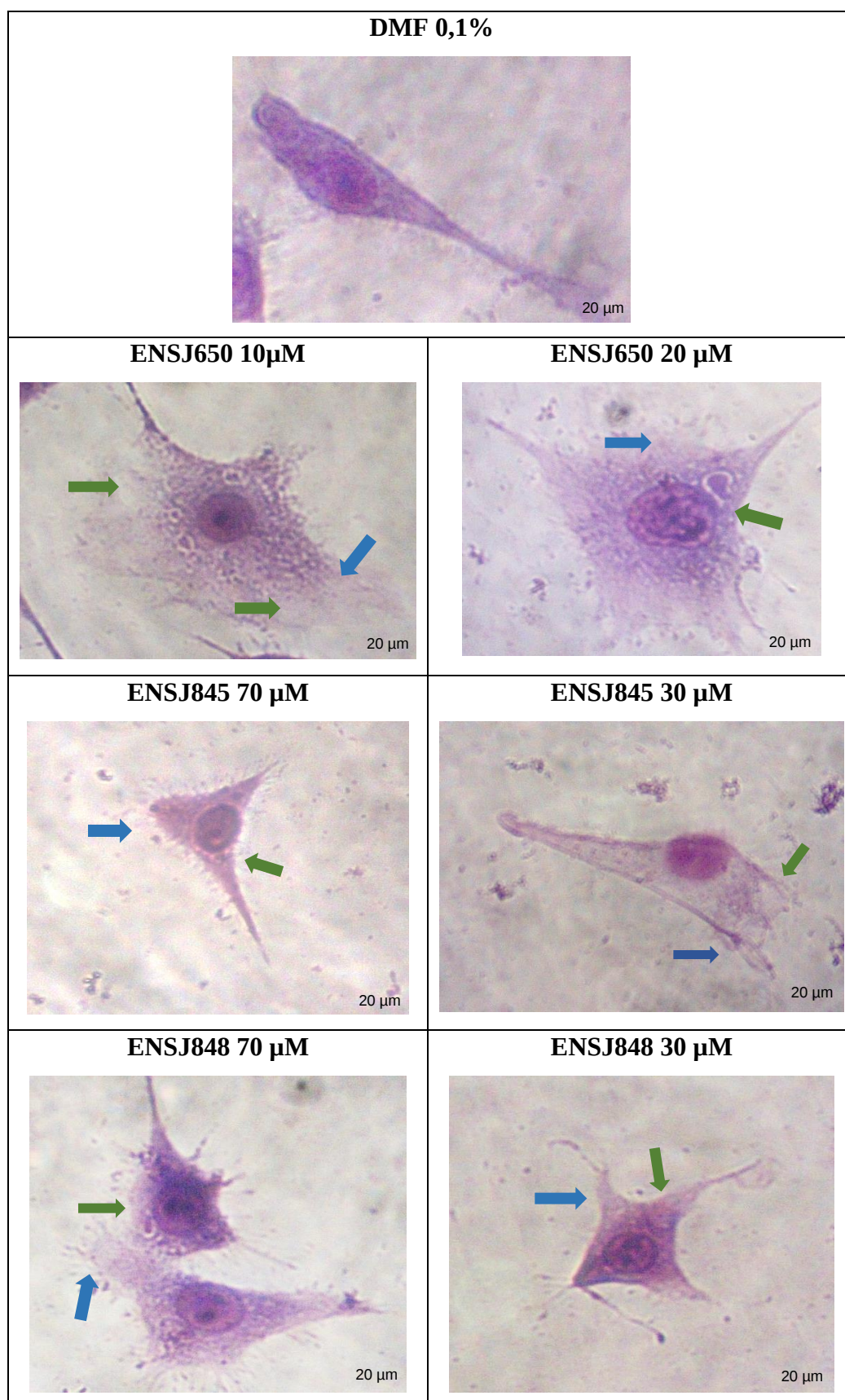
Continua



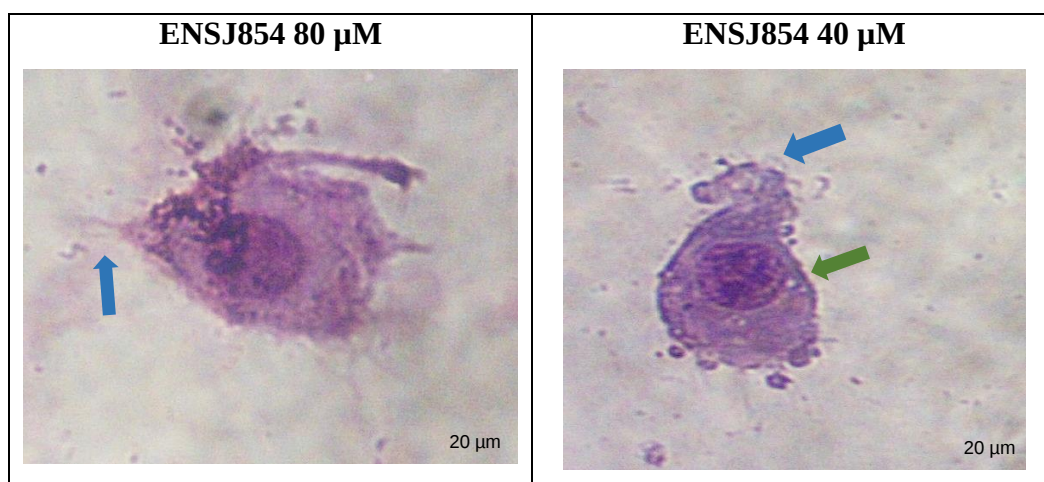
(B)



Continua



Continua



Fonte: Autor, 2023.

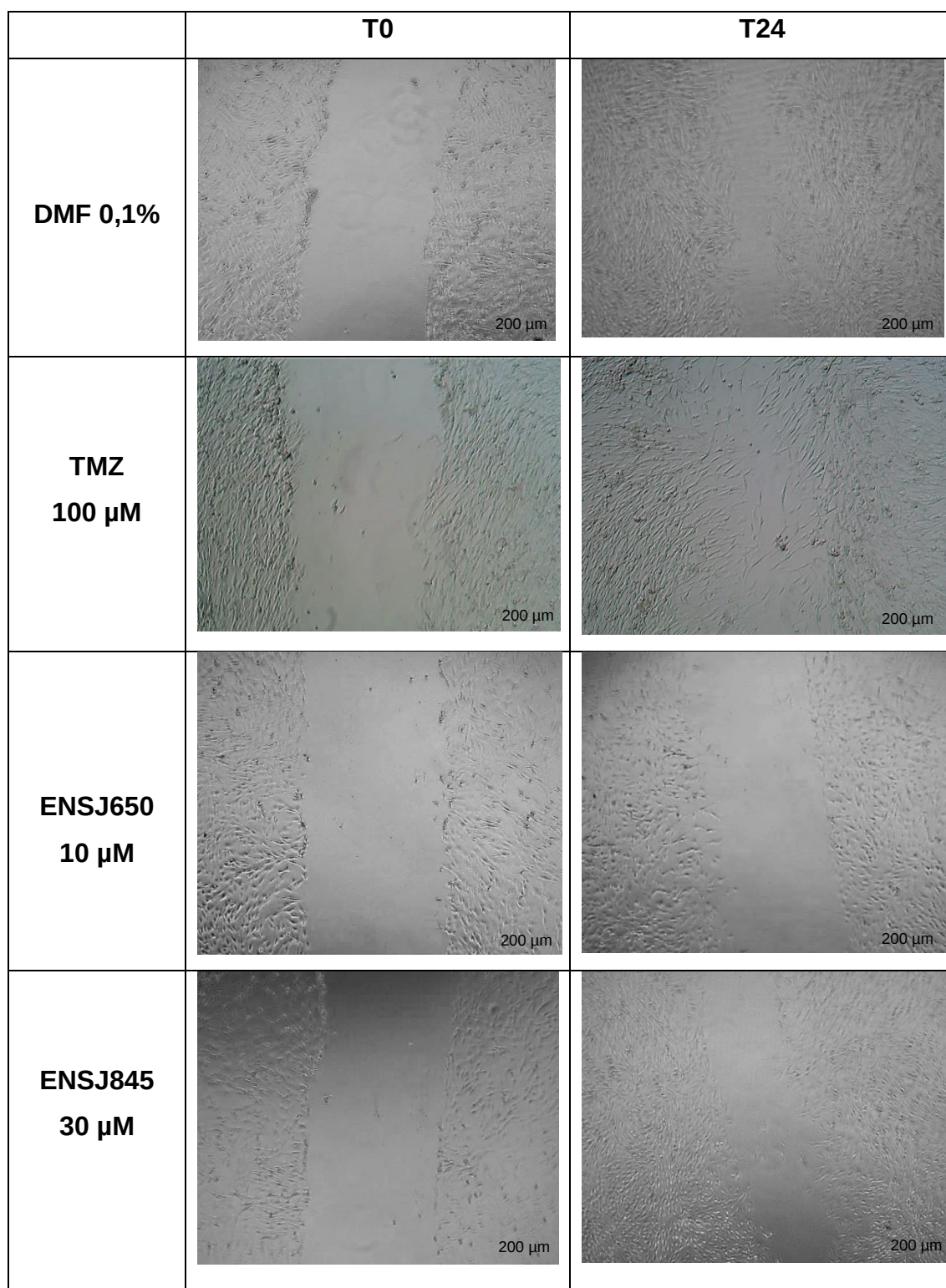
Notas: Imagens de células de GBM02, na concentração de 1×10^5 células por poço, tratadas com ENSJ650, 845, 848 e 854, por 72h, corados com panóptico rápido. A análise dos aspectos morfológicos de GBM02, foi realizada através de microfotografias obtidas em microscópio óptico, no aumento de 10x (A) e 40x (B). As setas coloridas indicam: vermelhas – células com citoplasma arredondado ou amorfas; brancas – *debris* celulares; verdes – vacúolos citoplasmáticos/ perda de conteúdo; azuis – rompimento de membrana nuclear/ extravasamento de conteúdo.

4.4.5 Ensaio de avaliação do efeito antimigratório dos derivados antraquinônicos sobre GBM02 – “Scratch”

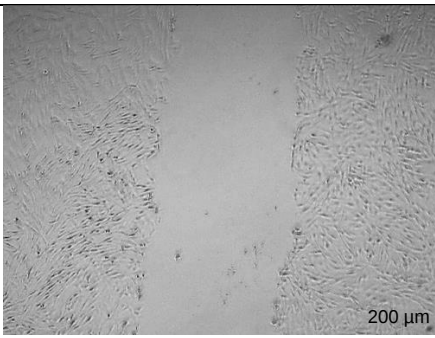
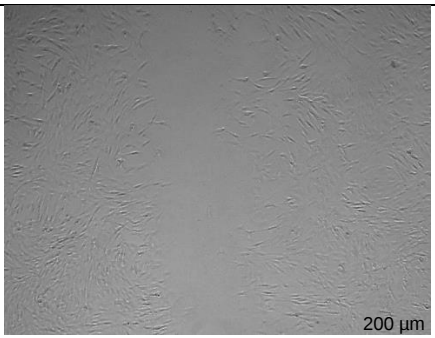
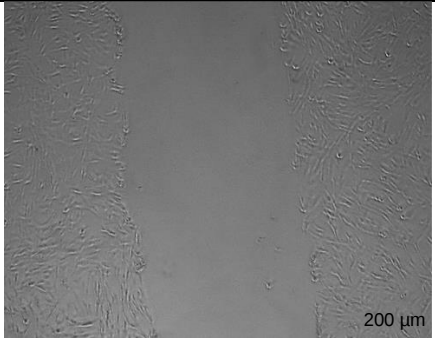
No ensaio de avaliação do efeito antimigratório sobre GBM02, foram utilizados, assim como no ensaio de avaliação da morfologia celular, os DSAQs ENSJ650, 845, 848 e 854, devido a sua provável atividade citotóxica sobre GBM02, além de não apresentar efeito deletério em monócitos e linfócitos, como analisados nos ensaios anteriores, assim sendo, possuem maior seletividade para células tumorais.

A migração celular, passadas 24 horas de tratamento com os DSAQs, demonstrou tendência a diminuição, comprovado visualmente quando comparado os dois tempos (T0 e T24) observando as microfotografias (**Figura 23**), principalmente no tratamento com ENSJ650, o que mais reduziu estatisticamente significativa ($***p < 0,001$) a capacidade migratória dessas células em menor concentração, com 16% de migração (**Figura 24**). ENSJ845 migrou 29,38%, ENSJ848 migrou 51,14% e ENSJ854 migrou 51,85%, em relação ao grupo controle DMF 0,1%, reduziram a capacidade de migração de forma estatisticamente significativa ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$). O fármaco TMZ, não demonstrou inibição da migração celular, mantendo o perfil de deslocamento, e migrando 85,22% de células em tratamento, não demonstrando efeito antimigratório.

Figura 23 – Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados sintéticos antraquinônicos e TMZ sobre a migração de GBM02.



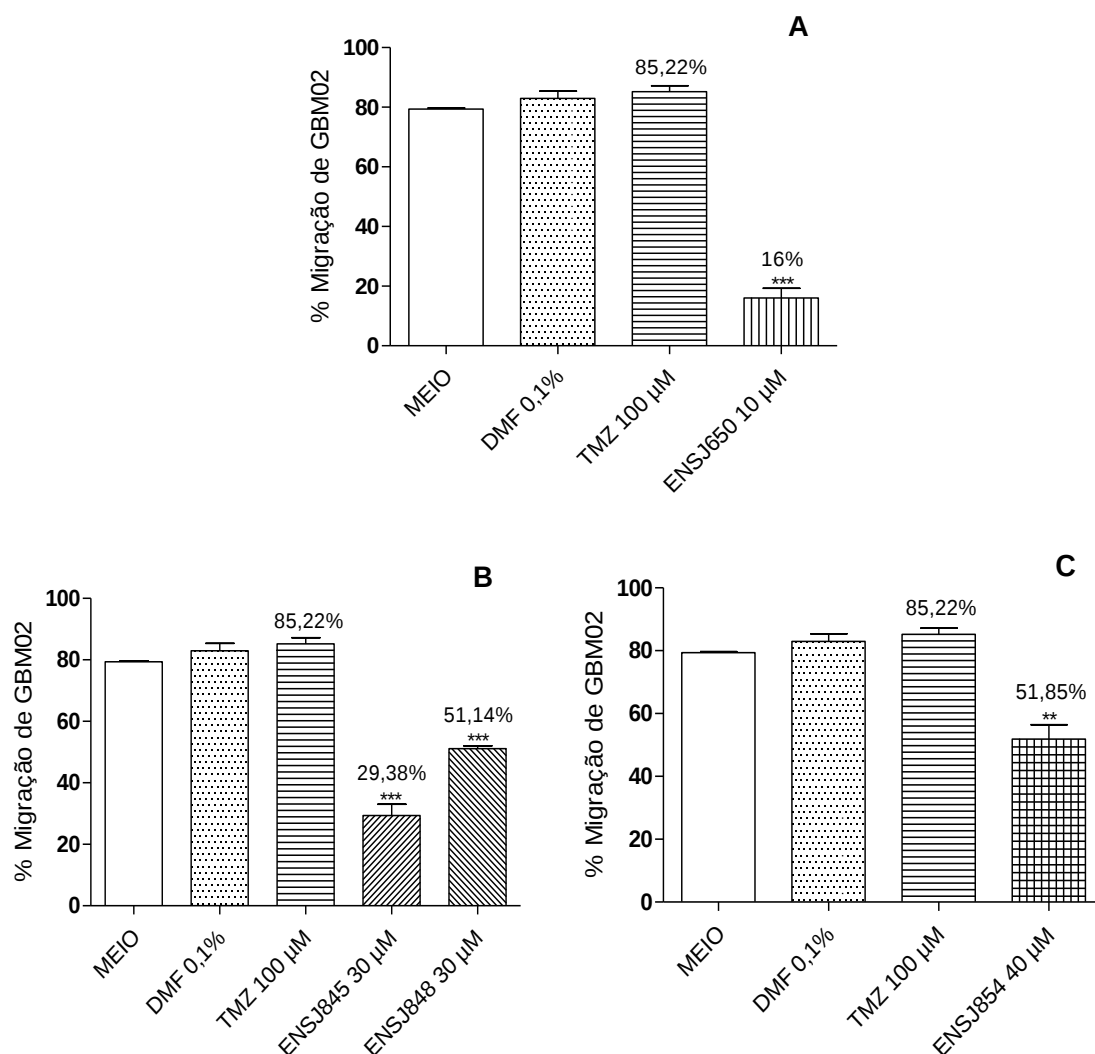
Continua

	T0	T24
ENSJ848 30 μM		
ENSJ854 40 μM		

Fonte: Autor, 2023.

Notas: Análise qualitativa da migração de GBM02 realizada através de microfotografias obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 24 – Efeito dos derivados sintéticos antraquinônicos e da TMZ sobre a migração de GBM02.



Fonte: Autor, 2023.

Nota: A – Efeito do ENSJ650 na concentração 10 µM e TMZ na concentração de 100 µM; B – Efeito dos ENSJ845 e ENSJ848 na concentração de 30 µM e TMZ na concentração de 100 µM; C – Efeito do ENSJ854 na concentração de 40 µM e TMZ na concentração de 100 µM. Os valores de porcentagem de migração de GBM02 foram significativos quando **p<0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo DMF 0,1%, usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

4.5 Discussão

O GBM é um dos tumores mais letais que cometem indivíduos, em que mesmo com o tratamento a sobrevida média dos pacientes é relativamente baixa. Os tratamentos disponíveis apresentam inúmeras barreiras, principalmente falta de eficácia, pois as células possuem resistência, e segurança, devido à alta citotoxicidade em células saudáveis do organismo em que atuam. Existe um cenário, com grande evolução e vasta gama de estudos voltados ao desenvolvimento de novos fármacos, pois é de extrema urgência preservar a qualidade de vida dos pacientes em farmacoterapias prontamente eficazes (Lim *et al.*, 2020).

A ação de novos fármacos, vem sendo debatida a partir do pressuposto em que moléculas testadas, para serem promissores, devem possuir uma espécie de multiação, com vários alvos farmacológicos, o que de pronta partida é encontrado em derivados quinônicos, por exemplo, de origem natural, que conseguem o feito de atuar em inúmeras modalidades terapêuticas (Espinosa-Bustos *et al.*, 2019).

A descoberta de novos fármacos, tem cada vez mais se voltado a produtos de origem natural, devido a adequação de metodologias modernizadas e eficazes, para essa identificação, encaminhando o processo a um patamar onde pode-se acompanhar o avanço de doenças, caracterizadas por necessitar de especificidade, efetividade e segurança. Com isso, ensaios que garantem analisar atividades citotóxicas, eficácia, seletividade e elucidação de prováveis mecanismos de ação, se destacam, como é o caso de ensaios *in vitro*. O sucesso na obtenção de resultados confiáveis é uma das características associadas aos ensaios biológicos *in vitro*, devido a viabilidade e reprodução favorável de diversas linhagens celulares em tecidos distintos disponíveis (González *et al.*, 2020).

Os ensaios realizados para avaliar a atividade antitumoral dos DSAQs, frente a GBM, foram realizados primeiramente com o ensaio de viabilidade de GBM02, utilizando-se do método colorimétrico MTT. O ensaio foi realizado primeiramente, com a exposição das células ao tratamento por 48 horas, mediante a ação esperada, os DSAQs reduziram estatisticamente significativa (* $p < 0,001$) a viabilidade tumoral na maior concentração utilizada (100 μM), porém não foi possível o cálculo de CI_{50} , devido a citotoxicidade celular não alcançar 50% da população de células. Os resultados de citotoxicidade máxima foram mais expressivos do que a TMZ. Analisando os resultados, uma tendência a efeito antitumoral com 48 horas, seria dos DSAQs ENSJ650, 849, 850 e 854, devido a esse fator, o ensaio foi realizado com o tratamento perdurando por 72 horas.

No ensaio de viabilidade celular de GBM02 após 72 horas, foi possível observar um efeito antitumoral estatisticamente significativo ($***p<0,001$), porém os derivados que puderam reduzir metade da população celular e obter suas CI_{50} foram ENSJ650, 845, 848 e 854, para os demais não foi possível o cálculo da CI_{50} . ENSJ650 demonstra entre os derivados, uma menor concentração para reduzir 50% da população tumoral de células.

Sirazhetdinova *et al.* (2020) testou uma série de derivados antraquinônicos, com substituições estruturais para formação de hidroxiquinonas, frente a GBM da linhagem SNB-19, utilizando o método de MTT, após 72 horas de tratamento, obteve-se CI_{50} entre $5,77\pm 0,23$ e $41,8\pm 5,27$ μM , demonstrando atividade antitumoral destes compostos, corroborando com resultados encontrados para linhagem de GBM02 frente ao tratamento com os DSAQs. Yang *et al.* (2021) ao analisar Coenzima Q0, uma benzoquinona, observou-se que ela conseguiu inviabilizar células de GBM da linhagem GBM8401, pelo método de MTT após 24 horas de tratamento, obtendo uma CI_{50} de 16,3 μM , confirmando o potencial de derivados de quinonas a provável inibição tumoral.

A ação antitumoral com redução da viabilidade dessas células é o ponto inicial para pesquisa de novas substâncias antineoplásicas, porém é de grande necessidade, cada vez mais, que esses novos fármacos não afetem as células saudáveis do organismo humano. Visto isso, foi-se necessário a realização do ensaio de avaliação do efeito citotóxico dos DSAQs sobre células mononucleares sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos), utilizando o ensaio colorimétrico de MTT.

O ensaio de avaliação da viabilidade de PBMC após o tratamento com os DSAQs e a TMZ, foi realizado após 72 horas, tempo determinado de possível ação antitumoral destes derivados, e demonstrou que o fármaco padrão TMZ, não desenvolveu atividade citotóxica, assim como os derivados, apenas ENSJ848, 851 e 854 reduziram estatisticamente significativa ($*p<0,05$, $**p<0,01$) na maior concentração utilizada (100 μM) a porcentagem de células, porém nenhum dos DSAQs reduziu 50% a população celular, demonstrando $CC_{50} > 100$ μM , e indicando que as modificações estruturais realizadas para formação dos DSAQs, não trouxeram efeitos citotóxicos.

Walter e seus colaboradores (2020) submeteram a quinona estilpondina ao ensaio de PBMC, e obtiveram como resultado estatisticamente significativo, uma baixa atividade deletéria dessas células, e ainda em outro ensaio foi comprovado que não demonstraram efeito hemolítico, e então, não desenvolvendo efeito nocivo a PBMC. Assim corroborando com os dados obtidos através do ensaio com os DSAQs, que também apresentaram pouca citotoxicidade frente ao ensaio de PBMC.

A análise do IS para qual seriam mais seletivos os DSAQs, seja para células de GBM02 ou PBMC, correspondeu que ENSJ845, 848 e 854 demonstram maior seletividade de citotoxicidade para células tumorais, com um $IS < 2$, o que quando comparado ao derivado ENSJ650, este possui um $IS > 4,55$, fundamentando uma molécula mais promissora a ação antitumoral. Resultados não expressos da TMZ, devido sua concentração ser maior para cálculo de CI_{50} do que a utilizada (900 μM).

O IS é importante para o descobrimento de novos fármacos antitumorais, devido a grande quantidade de efeitos colaterais, e eficácia terapêutica limitada devido a dosagens, serem relacionados diretamente a um baixo IS, quando este demonstra atividade mais propensa as células tumorais do que as células integrantes do organismo, direciona a molécula de estudo para o desenvolvimento de um novo tratamento, pois um processo difícil encontrar fármacos com citotoxicidade apenas direcionada aos tumores (Kumar *et al.*, 2020).

Com isso, os derivados ENSJ650, 845, 848 e 854 foram selecionados para prosseguir com demais testes, devido a possível atividade antitumoral apresentada, pressuposto de não apresentar ação deletéria em monócitos e linfócitos.

O processo de apoptose é o fator principal para destruição de seletivas células defeituosas ou danificadas do organismo, podendo ocorrer a partir de vias principais, dentre elas, via do retículo endoplasmático, via do receptor de morte e via mitocondrial, realizando por fim proteólise de compostos celulares e ativando a caspase-3, importantes para o processo de morte celular (Turovsky; Varlamova, 2021).

As células tumorais de GBM tem como característica evasão a apoptose, possuindo uma resistência considerável a indução da morte celular, devido a super expressão de proteínas anti-apoptóticas e redução do nível de algumas proteínas envolvidas na pró-apoptose, o que impede as vias direcionadas a morte celular, formando assim, uma das principais causas de fracasso dos fármacos utilizados na terapia. Com isso, é necessária uma abordagem terapêutica inovadora para evitar resistência das células tumorais, de forma que os novos compostos tenham o poder de indução da apoptose, garantindo sucesso na remoção do tumor (Ghaemi *et al.*, 2020). O ensaio de avaliação da morfologia de GBM02 após o tratamento com os DSAQs, foi realizado com o intuito de observar a nível celular se esses derivados são capazes de induzir a apoptose, observando sinais dessa indução nas células tumorais.

As células de GBM02 foram expostas ao tratamento com os DSAQs, ENSJ650, 845, 848, e 854, durante 72 horas, em duas concentrações, suas CI_{50} , e devido essa

concentração ter a capacidade de matar 50% da população celular, metade dessa concentração, na intenção de ter uma melhor visão de campo dessas células.

Os DSAQs demonstraram possível efeito de indução a morte celular, principalmente na concentração de suas CI_{50} . Foram observadas células com citoplasma arredondado e amorfo, presença de restos celulares, vacúolos citoplasmáticos com extravasamento de conteúdo e recorrente perda de conteúdo celular pelo rompimento de membrana, provando que as modificações estruturais realizadas para formação dos DSAQs, podem estar relacionadas a indução de morte celular, o que poderia ser analisado, se existe ativação de algumas das vias de indução de apoptose ou/e inativação das atividades desenvolvidas por GBM para desenvolver sua resistência a morte celular programada. A TMZ não modificou as estruturas celulares tumorais.

Yu *et al.* (2021) demonstrou resultados propícios para indução de apoptose em linhagem celular U251 de GBM, de 2-metoxi-6-acetil-7-metiljuglona, um derivado quinônico, a partir da ativação diretamente de quinona oxidoredutase 1, relacionada a morte celular programada, além de induzir rápida geração de íons e acúmulo citosólico de prótons nessas células, relacionando aos resultados encontrados com DSAQs.

A sobrevida limitada e o mal prognóstico para pacientes com GBM, caracteriza-se pela terapia utilizada atualmente não atingir grande quantidade de células tumorais, que infiltram o tecido ao redor do tumor, fato comum em GBM. Essas células muitas vezes, não são retiradas pela ressecção cirúrgica, nem alcançadas pela radioterapia, pois são fora do volume tumoral. O GBM é capaz de realizar uma migração infiltrativa de suas células, através de mecanismos, no tecido em que o tumor se originou, aproveitando o espaço perivascular de vasos sanguíneos já existentes, fato que gera diversas dificuldades para ação da quimioterapia, além de aumentar o risco evidente dessas células tumorais migrarem para outros tecidos e órgãos, causando o desenvolvimento de metástases (Lange *et al.*, 2022).

O ensaio de avaliação do efeito antimigratório de células de GBM (*Scratch*), foi realizado justamente com o intuito de verificar se os DSAQs, seriam capazes de possível efeito antimigratório para com essas células. Foi utilizada a metade da concentração da CI_{50} de ENSJ650, 845, 848 e 854, com o intuito de evitar morte celular tumoral, pois o objetivo é apenas visualizar qualitativamente e quantitativamente se essas células migraram para outra área ou não, na presença do tratamento com os derivados. Os DSAQs demonstraram estatisticamente significativo ($***p<0,001$, $**p<0,01$) provável ação de evitar a migração celular, dentre estes o ENSJ650 foi o que mais diminuiu a capacidade

migratória, em menor concentração do que os demais, corroborando com o ensaio de viabilidade de GBM02, demonstrando ser o com maior possível ação antitumoral.

Em estudos realizados por Hernández-Rodríguez e colaboradores (2022), ao analisar o efeito antimigratório da perezona, que possui o grupamento farmacofórico quinônico, foi visto que o derivado foi capaz de reduzir esse efeito, relacionando com os achados referentes ao derivados quinônicos.

A ação antitumoral desses derivados, se unem a outros efeitos terapêuticos relacionados ao grupo dos derivados quinônicos. Uma possível justificativa, poderia estar relacionada ao fato de que o grupamento farmacofórico desses derivados, podem formar ligações covalentes com núcleos de células tumorais, mais precisamente a nível de DNA, o que causaria uma reação oxidativa, e também, indução de citotoxicidade (Klopcic; Dolenc, 2019).

Os resultados demonstram possíveis efeitos antitumorais em alguns DSAQs, corroborando com outros ensaios e resultados satisfatórios dispostos na literatura, envolvendo a classe de derivados quinônicos e antraquinônicos, contribuindo para o descobrimento e desenvolvimento de novas farmacoterapias, que busquem seletividade, segurança, eficácia e maior perspectiva de vida aos indivíduos com GBM.

4.6 Conclusão

A avaliação dos resultados dos ensaios antitumorais dos novos derivados sintéticos antraquinônicos, serve como base para uma seletividade para GBM do que células sanguíneas periféricas (monócitos e linfócitos), quando analisamos ENSJ650, 845, 848 e 854, demonstrando propriedades citotóxicas e antimigratórias para glioblastoma da linhagem GBM02.

Por fim, os resultados obtidos dão suporte a pesquisa de novos fármacos antitumorais, buscando características principalmente em estruturas multiterapêuticas, estratégias cada vez mais oportunas, na busca de novos fármacos antitumorais.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. *et al.* Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80-86, 2021.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281-289, 2018.
- ARAÚJO, M.V. *et al.* Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N, N'-dialkylamino-1, 4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 46-51, 2017.
- ARAÚJO, I.A.C. *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 67-73, 2019.
- ARCELLA, A. *et al.* Effects of aloe emodin on U87MG glioblastoma cell growth: *In vitro* and *in vivo* study. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1160-1167, 2018.
- ÁVILA, J.L. *et al.* Specific inhibitory effect of 3-deazaneplanocin. A against several *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* strains Am. **Journal Tropical Medicinal**, v. 57, n. 4, p. 407-412, 1997.
- AZEVEDO, R. *et al.* Leishmaniose Visceral no Brasil: o que é preciso saber. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 1, n. 3, p. 24-31, 2021.
- BARONI, Mirella. **Silenciamento do gene GDF15 e resposta à radioterapia e ao tratamento com temozolamida em linhagens celulares de glioblastoma**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- BATISTA NETTO, J.; SILVA, TF.; NASCIMENTO, G.V. Glioblastoma: patogênese e tratamento. Revisão da literatura. **JBNC-Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 30, n. 3, p. 233-243, 2019.

BEKESCHUS, S. *et al.* Gas plasma exposure of glioblastoma is cytotoxic and immunomodulatory in patient-derived GBM tissue. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 813, 2022.

BOLOGNESI, M.L. *et al.* Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1, 4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1, 4-anthraquinone derivatives bearing anti-trypansomal and anti-leishmanial activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 7, p. 2272-2276, 2008.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 393, n. 10174, p. 872-873, 2019.

CHEN, H. *et al.* Comprehensive landscape of STEAP family functions and prognostic prediction value in glioblastoma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 4, p. 2988-3000, 2021.

CLEMENTIDO NETO, José. **Atividade antitumoral de derivados 2-n,n'-Dialquilamino-1,4-Naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02), in vitro**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

CRUZ, E.H.G. *et al.* Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. **European journal of medicinal chemistry**, v. 122, p. 1-16, 2016.

CUNHA, C.F. *et al.* Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+ CD56+ NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229400, 2020.

ÇETIN, A.; BILTEKIN, B.; DEGIRMENCIOGLU, S. Ellagic acid enhances the antitumor efficacy of bevacizumab in an in vitro glioblastoma model. **World Neurosurgery**, v. 132, p. e59-e65, 2019.

DA SILVA JÚNIOR, Eufrânio N. *et al.* Synthesis of quinones with highlighted biological applications: A critical update on the strategies towards bioactive compounds with emphasis on lapachones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 863-915, 2019.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International journal for parasitology**, v. 50, n. 3, p. 171-176, 2020.

DÍAZ-SÁEZ, V. *et al.* Seasonal dynamics of phlebotomine sand flies and autochthonous transmission of *Leishmania infantum* in high-altitude ecosystems in southern Spain. **Acta Tropica**, v. 213, p. 105749, 2021.

DI FILIPPO, L.D. *et al.* Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 168, p. 76-89, 2021.

DIMMER, J. *et al.* Natural anthraquinones as novel photosensitizers for antiparasitic photodynamic inactivation. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152894, 2019.

ESPINOSA-BUSTOS, C. *et al.* New aryloxy-quinone derivatives with promising activity on *Trypanosoma cruzi*. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 1, p. 1900213, 2020.

FREITAS, Tatiana Emy de. Avaliação de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de Rutênio associados a AINES e seu impacto na via eicosanoides. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

GALVIS, M. C. R. *et al.* Effectiveness and safety of amphotericin B deoxycholate, amphotericin B colloidal dispersion, and liposomal amphotericin B as third-line treatments for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a retrospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 2, p. 274, 2020.

GEROLDINGER, G. *et al.* Activation of artemisinin and heme degradation in *Leishmania tarentolae* promastigotes: A possible link. **Biochemical pharmacology**, v. 173, p. 113737, 2020.

GHAEMI, S. *et al.* Inhibiting the expression of anti-apoptotic genes BCL2L1 and MCL1, and apoptosis induction in glioblastoma cells by microRNA-342. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109641, 2020.

GODOY, Antonio Carlos Cavalcante. **Estudo de genes preditores de radiosensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida**. Tese (Doutorado em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

GONZALEZ, K. *et al.* Involvement of the inflammasome and Th17 cells in skin lesions of human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (viannia) panamensis*. **Mediators of inflammation**, v. 2020, 2020.

GRELAA, E.; KOZLOWSKAB, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, p. 303–311, 2018.

HERNÁNDEZ-BOJORGE, S.E. *et al.* Epidemiology of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Nicaragua. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 11, p. e00192, 2020.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* *In vitro* and computational studies of perezona and perezona angelate as potential anti-glioblastoma multiform agents. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1565, 2022.

HERRERA, G. *et al.* An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. **Scientific data**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2020.

HOU, X.; TANG, W. Pseudogene PA2G4P4 promotes oncogene PA2G4 expression and nuclear translocation to affect glioblastoma cell viability and apoptosis. **Life Sciences**, v. 265, p. 118793, 2021.

HUANG, J. *et al.* Immune checkpoint in glioblastoma: promising and challenging. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 242, 2017.

JOHNSTON, David A. *et al.* Genomics and the biology of parasites. **Bioessays**, v. 21, n. 2, p. 131-147, 1999.

KARAKAS, D.; ARI, F., ULUKAYA, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 919-925, 2017.

KESHAV, P.; GOYAL, D.K.; KAUR, S. Antileishmanial potential of immunomodulator gallic acid against experimental murine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 10-11, p. e12875, 2021.

KHADIR, F. *et al.* Therapeutic control of leishmaniasis by inhibitors of the mammalian target of rapamycin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006701, 2018.

KLEKNER, A. *et al.* Significance of liquid biopsy in glioblastoma—A review. **Journal of biotechnology**, v. 298, p. 82-87, 2019.

KLOPCIC, I.; DOLENC, M.S. Chemicals and drugs forming reactive quinone and quinone imine metabolites. **Chemical research in toxicology**, v. 32, n. 1, p. 1-34, 2018.

KUDULAITI, N. *et al.* A nomogram for individualized prediction of overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a real-world retrospective cohort study. **BMC surgery**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.

KUMAR, P. *et al.* Development of novel ruthenium (ii)–arene complexes displaying potent anticancer effects in glioblastoma cells. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 38, p. 13294-13310, 2020.

LANGE, F. *et al.* Galvanotactic migration of glioblastoma and brain metastases cells. **Life**, v. 12, n. 4, p. 580, 2022.

LIANG, P. *et al.* Spatiotemporal combination of thermosensitive polypeptide fused interferon and temozolomide for post-surgical glioblastoma immunochemotherapy. **Biomaterials**, v. 264, p. 120447, 2021.

LIM, Eun-Jung *et al.* Crosstalk between GBM cells and mesenchymal stemlike cells promotes the invasiveness of GBM through the C5a/p38/ZEB1 axis. **Neuro-oncology**, v. 22, n. 10, p. 1452-1462, 2020.

LÓPEZ-ARENCIBIA, A. *et al.* *In vitro* activity of 1H-phenalen-1-one derivatives against *Leishmania* spp. and evidence of programmed cell death. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2019.

LYANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329 – 333, 2007.

MACHADO, C. A. L. *et al.* Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: a cross-sectional study. **Acta Tropica**, v. 208, p. 105520, 2020.

MARUYAMA, S.R. *et al.* Non-*Leishmania* parasite in fatal visceral leishmaniasis–like disease, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 11, p. 2088, 2019.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MATURI, N.P. *et al.* A molecularly distinct subset of glioblastoma requires serum-containing media to establish sustainable bona fide glioblastoma stem cell cultures. **Glia**, v. 68, n. 6, p. 1228-1240, 2020.

MENDONÇA, D.V.C. *et al.* Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology research**, v. 117, n. 2, p. 391-403, 2018.

MEULENAERE, V. *et al.* Adjuvant therapeutic potential of tonabersat in the standard treatment of glioblastoma: A preclinical F98 glioblastoma rat model study. **PloS one**, v. 14, n. 10, p. e0224130, 2019.

MIRA NETO, Raimundo de Almeida. **Avaliação da atividade antineoplásica de chalconas sintéticas utilizando modelos de glioblastomas *in vitro* e docking molecular para topoisomerase-II- α e tubulina.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2018.

MIRANDA, Luciana de Freitas Campos. **Sensibilidade ao antimônio pentavalente *in vitro* de amostras de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

MOREA, E.G.O. *et al.* Exploring TERRA during *Leishmania major* developmental cycle and continuous *in vitro* passages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 573-586, 2021.

MORAES, C.S. *et al.* Second blood meal by female *Lutzomyia longipalpis*: enhancement by oviposition and its effects on digestion, longevity, and *Leishmania* infection. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

MORAIS-TEIXEIRA, E.; RABELLO, A.; AGUIAR, M. M. G. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of fexinidazole against New World *Leishmania* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2318-2325, 2019.

MONTALDI, Ana Paula de Lima. **Avaliação da resposta celular mediada pelo quimioterápico temozolamida associada ao inibidor do reparo do DNA metoxiamina em linhagens de glioblastoma.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURBACK, N.D.N. *et al.* American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, p. 55-63, 2011.

MWOLOLO, S.W. *et al.* *In vitro* activity and in vivo efficacy of a combination therapy of diminazene and chloroquine against murine visceral leishmaniasis. **Journal of biomedical research**, v. 29, n. 3, p. 214, 2015.

NAFARI, A. *et al.* Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. **Parasite epidemiology and control**, v. 10, p. e00156, 2020.

OLIVEIRA, Alex Antonio de. **Estudos visando à síntese de compostos contendo núcleos triazólicos, chalcônico e naftoquinônico**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OLIVEIRA, E.F. *et al.* Spatio-temporal modeling of visceral leishmaniasis in Midwest Brazil: An ecological study of 18-years data (2001–2018). **Plos one**, v. 15, n. 10, p. e0240218, 2020(a).

OLIVEIRA, R.S. *et al.* Clinical, epidemiological and climatic factors related to the occurrence of cutaneous leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 557-565, 2020(b).

PEIXOTO, F. *et al.* Evaluation of the ability of miltefosine associated with topical GM-CSF in modulating the immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, 2020.

PÉREZ-PERTEJO, Y. *et al.* Antileishmanial activity of terpenylquinones on *Leishmania infantum* and their effects on *Leishmania* topoisomerase IB. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 70-79, 2019.

PESSENDA, G.; SILVA, J.S. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. **Parasite immunology**, v. 42, n. 7, p. e12722, 2020.

PICARIELLO, H.S. *et al.* Myosin IIA suppresses glioblastoma development in a mechanically sensitive manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 31, p. 15550-15559, 2019.

RAMOS, G.S. *et al.* Antileishmanial activity of fullerol and its liposomal formulation in experimental models of visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111120, 2021.

RAVERA, M. *et al.* Organometallic compounds in the discovery of new agents against kinetoplastid-caused diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 459-482, 2018.

REINKE, Adalisa. **Avaliação da viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio de células GL261 expostas a temozolamida associada a nanopartículas de ouro**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2019.

ROATT, B.M. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

ROCHA, Marcelle Neves. **Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos**. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

SALAZAR, J. *et al.* Semi-automatic detection of the evolutionary forms of visceral leishmaniasis in microscopic blood smears. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, p. 012135, 2019.

SANTANA, W. *et al.* Exploring innovative leishmaniasis treatment: Drug targets from pre-clinical to clinical findings. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 9, p. e2100336, 2021.

SANTOS, Joice Castelo Branco. **Avaliação da Atividade Antiparasitária de Compostos Sintéticos à Base de Bisfosfonatos em *Leishmania Amazonensis***. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

SCHWING, A. *et al.* *Leishmania* infection: Misdiagnosis as cancer and tumor-promoting potential. **Acta tropica**, v. 197, p. 104855, 2019.

SCHOLL, Juleti Nathali. **Avaliação do papel desempenhado por vesículas extracelulares derivadas de glioblastoma na modulação do sistema imune e na progressão tumoral**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

SHOKRI, A. *et al.* Promising antileishmanial effectiveness of doxorubicin and Doxil against *Leishmania major*: An *in vitro* assay. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 6, p. 544-548, 2017.

SHRIVASTAVA, R. *et al.* Deletion of a single LeishIF4E-3 allele by the CRISPR-Cas9 system alters cell morphology and infectivity of *Leishmania*. **Mosphere**, v. 4, n. 5, p. e00450-19, 2019.

SIEVEKING, I. *et al.* 2-Phenylaminonaphthoquinones and related compounds: Synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 17, p. 4609-4620, 2014.

SILVA, João Flávio Monteiro. **Avaliação do potencial leishmanicida de derivados Ftalimido-1,4-Naftoquinonas e Ftalimido-1,2,3-Triazolil-1,4-Naftoquinonas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

SILVA, Cátia Filipa Araújo e. **Estado funcional e qualidade de vida como objetivos no tratamento do glioblastoma**. Dissertação (Mestrado em Ciências Medicina) – Universidade do Porto, Porto, 2020.

SILVA, Priscila de Cássia. **Efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2021.

SILVA, J.N.; REIS, V.O.; CORREIRA, E.L. Alterações do metabólito colina (Cho) na espectroscopia por ressonância magnética no glioblastoma multiforme (GBM). **Saber Científico**. 2018.

SILVEIRA, E.F. *et al.* Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl) ethyl) thiazolidin-4-ones exhibit selective *in vitro* antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Chemico-Biological Interactions**, v. 266, p. 1-9, 2017.

SIRAZHETDINOVA, N.S. *et al.* 1-Hydroxyanthraquinones containing aryl substituents as potent and selective anticancer agents. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2547, 2020.

SOUSA, F. *et al.* Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 309, p. 37-47, 2019.

SOUSA, E.T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, p. 486-495, 2016.

SOUZA, Alan Gonçalves de. **Síntese de novos derivados quinolonocarboxamídicos conjugados a quinonas visando à avaliação de sua atividade anticâncer**. Monografia (Bacharelado em Química) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

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

TAMIMI, A.F.; JUWEID, M. Epidemiology and outcome of glioblastoma. **Exon Publications**, p. 143-153, 2017.

TAN, A.C. *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 4, p. 299-312, 2020.

TIKHOMIROV, A.S. *et al.* Amides of pyrrole- and thiophene-fused anthraquinone derivatives: A role of the heterocyclic core in antitumor properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112294, 2020.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 1-15, 2017.

TUROVSKY, E.A.; VARLAMOVA, E.G. Mechanism of Ca^{2+} -dependent pro-apoptotic action of selenium nanoparticles, mediated by activation of Cx43 hemichannels. **Biology**, v. 10, n. 8, p. 743, 2021.

ULMER, A.J. *et al.* Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on percoll. **Immunobiology**, v. 166, p. 238 – 250, 1984.

VALENTIM-SILVA, J.R. *et al.* Antileishmanial drugs activate inflammatory signaling pathways via toll-like receptors (docking approach) from *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 85, p. 106640, 2020.

VENTURIN, G.L. *et al.* Regulatory effect of pge2 on microbicidal activity and inflammatory cytokines in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 6, p. e12713, 2020.

VIANA, Max Denisson Maurício. **Atividade Imunomoduladora de Derivado Sintético**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas e da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

VIOTTO, Marcos Antônio. **Leishmaniose visceral: Etiologia, diagnóstico e tratamento**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2018.

WALTER, L.O. *et al.* Involvement of the NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways in cell death triggered by stypoldione, an o-quinone isolated from the brown algae *Stypopodium zonale*. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 1297-1309, 2022.

WANG, Y.; ZHU, S.; ZOU, L. Recent advances in direct functionalization of quinones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 12, p. 2179-2201, 2019.

WATERS, M.R. *et al.* RelB acts as a molecular switch driving chronic inflammation in glioblastoma multiforme. **Oncogenesis**, v. 8, n. 6, p. 1-14, 2019.

WIJNANT, G. *et al.* Efficacy of paromomycin-chloroquine combination therapy in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00358-17, 2017.

WHO. **Control of leishmaniases**. WHO Technical Report Series. Geneve: WHO; 2020. OMS. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 26 de julho de 2023.

YAN, Y. *et al.* Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 35, n. 1, p. 1-14, 2016.

YANG, H. *et al.* Coenzyme Q0, a novel quinone derivative of *Antrodia camphorata*, induces ROS-mediated cytotoxic autophagy and apoptosis against human glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 155, p. 112384, 2021.

YLANAN, A.M.D. *et al.* Intraoperative radiotherapy for glioblastoma: A systematic review of techniques and outcomes. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 93, p. 36-41, 2021.

YU, J. *et al.* 2-Methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (MAM) induced programmed necrosis in glioblastoma by targeting NAD (P) H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 336-347, 2020.

ZHANG, L. *et al.* Recent advances of quinones as a privileged structure in drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113632, 2021.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug discovery today**, v. 22, n. 10, p. 1516-1531, 2017.

ZHU, Y. *et al.* Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway. **Life Sciences**, v. 270, p. 119112, 2021.