



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HILDA CAROLINE DO NASCIMENTO SANTOS
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS

MACEIÓ - AL

2021



HILDA CAROLINE DO NASCIMENTO SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Bacharel em Farmácia.

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

MACEIÓ - AL

2021

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Hilda Caroline do Nascimento.
Avaliação da atividade leishmanicida de derivados tiossemicarbazônicos / Hilda
Caroline do Nascimento Santos. – 2021.
56 f. : il. color.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 47-56.

1. Leishmaniose. 2. Tiossemicarbazônicos. 3. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDU: 615:547.288.3

HILDA CAROLINE DO NASCIMENTO SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS

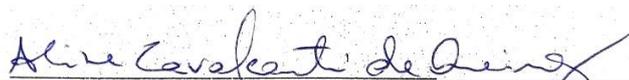
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia do Instituto de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Alagoas, como parte dos requisitos para a
obtenção de grau de Bacharel em Farmácia.

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

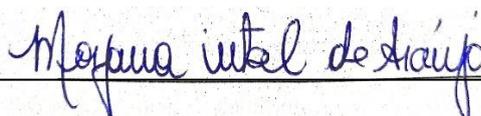


Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (ICBS - UFAL)

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz (UFAL – Campus Arapiraca)



Dra. Morgana Vital de Araújo

Aos meus pais, que são meus maiores exemplos e a
razão de tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela saúde que me concede para que eu possa ir em busca dos meus sonhos, e a Nossa Senhora por ser a luz que ilumina meus caminhos.

Aos meus pais, Júnior e Lila, por todo o amor, dedicação, educação e apoio. Sou grata por todos os esforços e sacrifícios que fizeram com que eu chegasse até aqui. A vocês, dedico todas as minhas conquistas, pois são a razão de tudo.

À minha família como um todo, mas em especial ao meu avô Zeca, por todo o seu amor dedicado a mim, a minha tia e melhor amiga Allane, por todo o apoio e incentivo não só ao longo da faculdade, mas durante a vida, e ao meu tio Dinho, que é a minha maior saudade.

À Thallys Emanuel, por toda paciência, ajuda, amor e incentivo.

Aos amigos que fiz ao longo da vida e da faculdade.

À minha alcateia: Alina, Lilyana e Taise, com quem pude dividir cada momento ao longo desses 5 anos, inclusive as noites em claro estudando.

À minha orientadora Profa. Dra. Magna Suzana, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, pela orientação e competência ao longo deste trabalho e de outros.

À minha “Coori” da vida, Amanda Evelyn, pela disponibilidade em sempre me ajudar, pela dedicação em cada trabalho que realizo e solicito sua ajuda, pelas diversas discussões sobre nossas queridas amastigotas, pelas “caixas altas” que me ensinam tanto e por me inspirar e me ajudar a ser uma pesquisadora melhor.

À Morgana Vital, que me ensinou tanto e que desde o início tem a minha admiração! Por todas as vezes que usou a frase: “Vá, menina Hylda, você tem condições”. Sou grata por todos os ensinamentos, apoio e disponibilidade de sempre. Você é inspiração.

À Profa. Dra. Aline Cavalcanti, por todos os ensinamentos.

Ao “cara que sabe tudo” Anderson Leite, pelo aprendizado diário que tenho com ele e por toda a ajuda.

Aos amigos de iniciação científica, companheiros de fluxo e principalmente de pia: Alisson, Shakira e Izabelly.

A todos que fazem o Laboratório de Farmacologia e Imunidade: Karoline (Zini), Flávio, Zeca, Mariana, Max, Kaycke, Suellen, Gessyca, Alyne, Rafael, Márcio e Diogo.

À Érica Rodrigues, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coordenado pelo Professor Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Dra. Lídia Moreira Lima.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo do céu." (Ec 3-1).

RESUMO

A leishmaniose é um grupo de doenças negligenciadas que atinge principalmente países emergentes. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida através do repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo fêmea. Este parasito apresenta duas formas evolutivas: promastigotas, forma flagelada e são encontradas no tubo digestivo do vetor, e amastigotas, ou aflageladas, encontradas nos tecidos dos vertebrados. A doença apresenta duas principais formas clínicas: a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral, sendo esta última a de maior gravidade, pois, compromete vísceras e pode levar o paciente a óbito. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose é endêmica em 102 países ou territórios. Apesar da grande complexidade da doença, o arsenal terapêutico ainda é bastante limitado, baseado no uso de antimonialis pentavalente como fármacos de primeira escolha e como de segunda escolha, anfotericina B lipossomal e pentamidina. Porém, esses fármacos apresentam problemas como alta citotoxicidade, efeitos adversos significativos e a com indução de resistência parasitária. Diante desta realidade, surge a necessidade de buscar por novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas, que apresentem uma baixa toxicidade e um alto efeito leishmanicida. O presente estudo avaliou a citotoxicidade de 19 derivados (T1 à T19) tiossemicarbazônicos e da pentamidina frente a macrófagos da linhagem J774.A1, nas concentrações de 100, 30, 10 e 3 μM , onde foi possível traçar a Concentração Letal (CL_{50}) e determinar o efeito citotóxico máximo dos derivados. Na concentração máxima testada, ou seja, em 100 μM , T13, T14, T15 e T16 não apresentaram danos a célula hospedeira e na concentração de 10 μM , os derivados T5, T8 e T13 não apresentaram efeito citotóxico. Tendo como base esses resultados, foi realizado um “screening farmacológico a fim de avaliar o potencial leishmanicida na concentração de 10 μM frente a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*, onde os T8, T10, T11, T12 e T18 apresentaram efeito máximo acima de 60%, sendo $71,2 \pm 2,5\%$; $61,3 \pm 8,9\%$; $68,5 \pm 6,4\%$; $64,9 \pm 1,3\%$ e $61,3 \pm 8,9\%$, respectivamente. Como T8 foi o derivado que apresentou um efeito leishmanicida elevado ao mesmo tempo que não causou danos aos macrófagos, este pode ser considerado como promissor para estudos posteriores de determinação da Concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) e avaliação deste como candidato a protótipo de fármacos leishmanicidas.

Palavras-chave: Leishmaniose. Tiossemicarbazônicos. Atividade leishmanicida.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected diseases that affects mainly emerging countries. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted through the blood meal performed by the female sand fly. It has two evolutionary forms: promastigotes, which have a flagellum and are found in the digestive tract of the vector, and amastigotes, or no flagellated, found in vertebrate tissues. The disease has two main clinical forms: cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis, the latter being the most serious, as it compromises viscera and can lead the patient to death. According to the World Health Organization, leishmaniasis is endemic in 102 countries or territories. Despite the great complexity of the disease, the therapeutic arsenal is still quite limited, based on the use of pentavalent antimonies as drugs of first choice and liposomal amphotericin B and pentamidine as second choice drugs. However, these drugs have problems such as high cytotoxicity, significant adverse effects and parasitic resistance. In view of this problematic reality, emerges the need of searching for new candidates for prototypes of leishmanicidal drugs, which have a low toxicity and a high leishmanicidal effect. The present study evaluated the cytotoxicity of 19 thiosemicarbazonic derivatives (T1 to T19) and pentamidine against macrophages of the J774.A1 strain, in the appropriate 100, 30, 10 and 3 μM , where it was possible to trace the Lethal Concentration (CL_{50}) and determine the maximum cytotoxic effect of the derivatives. At the maximum concentration tested, that is, at 100 μM , T13, T14, T15 and T16 showed no damage to the host cell and at the concentration of 10 μM , derivatives T5, T8 and T13 did not show cytotoxic effect. Based on these results, a pharmacological screening was carried out in order to assess the leishmanicidal potential at a concentration of 10 μM against the amastigote form of *Leishmania amazonensis*, where the compounds T8, T10, T11, T12 and T18 showed a maximum effect above 60%, $71.2 \pm 2.5\%$; $61.3 \pm 8.9\%$; $68.5 \pm 6.4\%$; $64.9 \pm 1.3\%$ and $61.3 \pm 8.9\%$, respectively. As T8 was the derivative that showed a high leishmanicidal effect while not causing damage to macrophages, it can be considered as promising for further studies to determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and its evaluation as a candidate for drug prototype leishmanicides.

Keywords: Leishmaniasis. Thiosemicarbazonic. Leishmanicidal activit.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito dos derivados Tiocarbohidrazidas, Tiossemicarbazidas e da pentamidina (todos nas concentrações de 100, 30, 10 e 3 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT. 35**
- Tabela 2 - Efeito leishmanicida dos derivados Tiocarbohidrazidas e Tiossemicarbazidas e da Pentamidina contra formas amastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 10 μ M. 42**
- Tabela 3 - Efeito citotóxico e leishmanicida dos derivados Tiocarbohidrazidas e Tiossemicarbazidas contra macrófagos da linhagem J774.A1 e formas amastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 10 μ M. 44**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Vetor e Ciclo biológico	14
2.2 Epidemiologia	17
2.3 Formas Clínicas	20
2.3 Tratamento da Leishmaniose	24
2.4 Tiossemicarbazonas	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 Avaliação da viabilidade celular	34
5.2 Avaliação do efeito leishmanicida <i>in vitro</i>	41
5.3 Citotoxicidade e Efeito leishmanicida	44
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções crônicas, não contagiosas de transmissão vetorial e pertencentes ao grupo das doenças negligenciadas, que são enfermidades que atingem em sua maioria países emergentes (ALMEIDA; SANTOS, 2011; OPAS/OMS, 2019). São consideradas uma das mais importantes pelo fato de ocuparem a quinta posição no *ranking* de ocorrência mundial (WHO, 2010).

São conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania* sendo mais de 20 patogênicas ao homem (MORAIS, 2015) que são transmitidas através do repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo fêmea (HARHAY, 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS) acredita que as leishmanioses ocupam o segundo lugar nas doenças transmitidas por inseto que mais causam letalidade no mundo (HANDLER et al., 2015).

A doença apresenta duas principais formas clínicas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), sendo esta última a de maior gravidade devido ao parasitismo generalizado causado no sistema linfático, o que pode levar o paciente a óbito caso não ocorra o tratamento (MORAIS, 2015; OMS, 2016). A LT se caracteriza por apresentar úlceras na pele e/ou mucosas (GOTO; LINDOSO, 2012).

De acordo com a OMS, 102 países são ditos como endêmicos para as leishmanioses. No período de 2001-2017, nas Américas, foram registrados 940.369 casos novos de LT, com uma média anual de 55.317 casos. Em 2017, 49.959 casos foram reportados à Organização Pan-Americana da Saúde, e destes, 72,6% foram reportados pelo Brasil. A LV é endêmica em 12 países, e no mesmo período foram registrados 59.769 casos, sendo uma média de 3.516 casos por ano e destes, 96% foram reportados pelo Brasil (OPAS/OMS, 2019).

Há relatos da existência e de um número crescente de casos de coinfeção *Leishmania*-HIV, sendo registrados desde da década de 1980 casos em 35 países (MONGE-MAILLO et al., 2014). Na Índia, a prevalência de LV-HIV aumentou de 0,88% em 2000 para 2,18% em 2006 (SINGH, 2014). No Brasil, a incidência dessa coinfeção aumentou de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012 (LINDOSO et al., 2014). Fatores relacionados ao hospedeiro e ao ambiente podem justificar essa coinfeção, pois a *Leishmania* e o HIV compartilham um mecanismo imunopatológico, comprometendo células dendríticas e macrófagos, o que leva a replicação e

aceleração da progressão de ambas as doenças (GARG et al., 2009; BERNIER et al., 1995). A imunossupressão também é um fator importante para o desenvolvimento da LV (ALVAR et al., 1997; MOLINA et al., 2003).

O ciclo de vida da *Leishmania* sp. é digenético, isto é, só completa o seu ciclo evolutivo passando pelo menos em dois hospedeiros, sendo um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. Apesar do protozoário ser infectante durante todo seu estágio de vida, o vetor que transmite a forma mais infectante, que é a promastigota metacíclica (KANSAL et al., 2012). Dentre os hospedeiros vertebrados, tem-se uma ampla variedade de roedores, cães e humanos (KEVRIC et al., 2015).

Apesar da grande complexidade da doença, os fármacos disponíveis para o tratamento medicamentoso ainda são limitados e nenhum deles apresenta um resultado totalmente satisfatório (ALVING, 1983; ALVAR et al., 2006). Como fármacos de primeira escolha são utilizados os antimoniais pentavalentes, (GOTO; LINDOSO, 2010), a anfotericina e a pentamidina são usadas como segunda alternativa (Brasil, 2017). Apesar do uso da anfotericina B ser uma alternativa de segunda escolha em casos refratários aos antimoniais, esse fármaco apresenta uma alta toxicidade que pode apresentar febre, disfunção renal e levar o paciente a óbito (MONZOTE, 2009). O desenvolvimento da anfotericina B lipossomal minimizou estes efeitos adversos, porém, o custo desse tratamento é deveras elevado. De forma geral, esses fármacos apresentam problemas desde alta citotoxicidade, a necessidade de hospitalização, indução de resistência parasitária e custo elevado (ZULFIQAR, 2017; AKBARI, 2017).

Devido a esses problemas e limitações encontrados na terapia medicamentosa para o tratamento das leishmanioses, o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) vem por meio deste trabalho propor a avaliação da atividade leishmanicida dos derivados Tiossemicarbazônicos na busca por novos protótipos de fármacos que possuam um potencial leishmanicida ao mesmo tempo que uma baixa citotoxicidade, melhorando assim o arsenal terapêutico no tratamento das leishmanioses.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vetor e Ciclo biológico

A transmissão das leishmanioses é vetorial e ocorre através de fêmeas de flebotomíneos da ordem Díptera, família Psychodidae, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). São conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Figura 1). Eles se alimentam de fontes naturais de açúcar, mas só as fêmeas são hematófagas, porque precisam de sangue para a ovogênese (KILLICK-KENDRICK, 1999). A doença é transmitida através da realização do repasto sanguíneo (BRASIL, 2017).

O clima tropical e a densa área silvestre do Brasil, possui condições ideais para abrigar diversas espécies de flebotomíneos. São conhecidas 927 espécies, e destas, podem ser encontradas 260 no Brasil (ALEXANDER, 2000). Dentre todas essas espécies catalogadas, 19 delas são vetores das leishmanioses, e destas, duas espécies recebem uma atenção maior: *L. longipalpis* e *L. cruzi* (SANTOS et al., 1998; RANGEL & LAINSON, 2003).

Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo *L. longipalpis*.

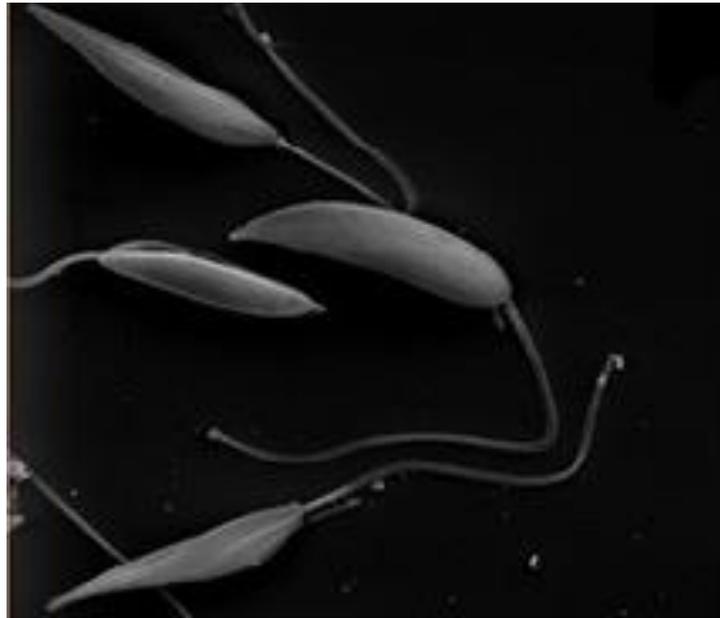


Fonte: BRASIL, 2017.

No seu ciclo biológico, o parasito *Leishmania* se apresenta em duas formas evolutivas: a forma extracelular promastigota (Figura 2), que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela que está relacionada à sua locomoção, e a forma amastigota (Figura 3), que é

ovalada, não apresenta flagelo visível e é encontrada no interior dos fagolisossomos dos macrófagos (SACKS; KAMHAWI, 2001).

Figura 2 - Forma evolutiva extracelular: promastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: SILVA, 2014.

Figura 3 - Forma evolutiva intracelular: amastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: AUTORA, 2019.

O ciclo evolutivo da *Leishmania* spp. inicia-se quando a fêmea do flebótomo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. O vetor por sua vez, ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas e, em seu trato digestivo, estes se rompem liberando os parasitos que se alojam em diferentes partes do intestino médio, tornando-se agora a forma promastigota procíclica. No intestino do vetor ocorre diferenciação destas formas em promastigota nectomonas, que através do seu flagelo permanecem aderidas ao epitélio intestinal, onde ainda se dividem, migram e originam formas curtas denominadas haptomonas. Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolve-se no intestino médio (AFONSO, 2013).

Em seguida, as leishmanias migram para a porção anterior do tubo digestivo do inseto, onde passa por um processo de metaciclogênese, originando as formas promastigotas metacíclicas, que adquirem a capacidade infectante (SILVA, 2017). A metaciclogênese é um processo em que ocorrem modificações na membrana da *Leishmania* em sua forma promastigota, como o alongamento da molécula Lipofosfoglicano (LPG) e a ação da glicoproteína (gp63) correspondendo aos principais fatores de virulência do protozoário (LEITE, 2018; KAYE; SCOTT, 2011).

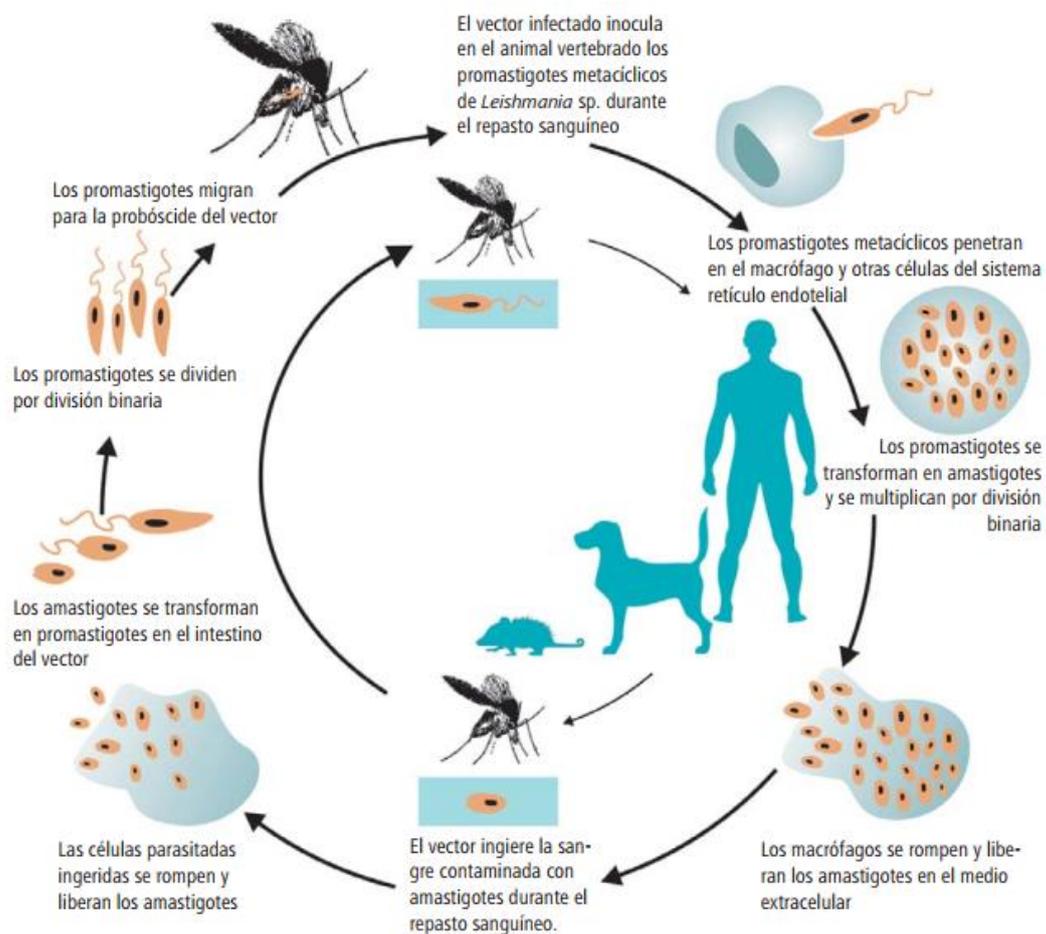
As leishmanias migram para a probóscide do inseto vetor (agora infectado) que ao realizar o repasto sanguíneo, transmite os parasitos para o hospedeiro vertebrado. Formas promastigotas são regurgitadas através da picada e, após um período de quatro a oito horas, são fagocitadas pelos macrófagos e neutrófilos do hospedeiro. As leishmanias são resistentes à ação do sistema complemento devido as moléculas de LPG e gp63 que estão presentes em sua superfície, e com isso elas são fagocitadas por células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Inicialmente são internalizadas por neutrófilos, devido ao pequeno processo inflamatório gerado, e após estes sofrerem apoptose são fagocitados, levando os parasitos para o interior dos macrófagos sem ativá-los (LEITE, 2018; KAYE; SCOTT, 2011).

Nos macrófagos infectados, os parasitos se alojam em fagossomos, conhecidos por vacúolos parasitóforos, os quais rapidamente adquirem composição e função semelhantes aos dos fagolisossomos. No interior desses vacúolos, promastigotas se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária até que haja o rompimento da célula hospedeira. Livres, as formas amastigotas infectam rapidamente células adjacentes. Estas se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (KAYE; SCOTT, 2011).

O que viabiliza a sobrevivência das formas amastigotas de *Leishmania* na célula hospedeira, é que essas formas possuem mecanismos apropriados que controlam e/ou impedem

a resposta do sistema imunológico do hospedeiro, alguns deles são a expressão de moléculas coestimuladoras, produção de citocinas e quimiocinas, inibição do processo de apresentação de antígenos e inibição de apoptose da célula infectada (BOGDAN, 2000).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado da Universidade Federal de Goiás.

2.2 Epidemiologia

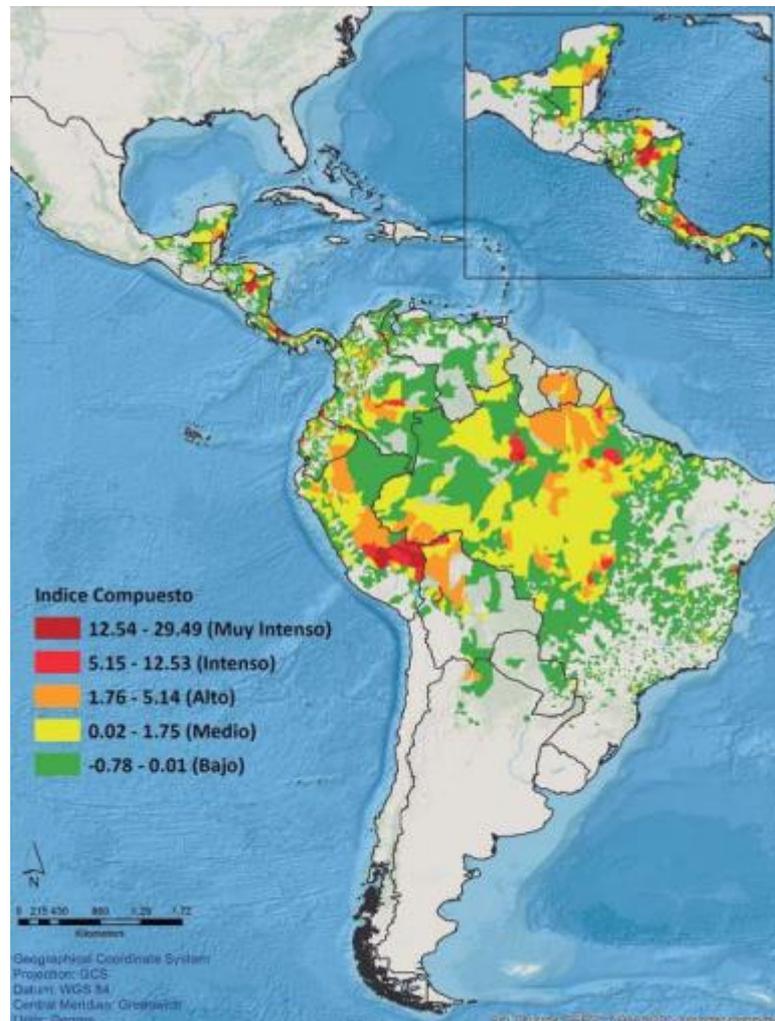
A leishmaniose está presente nos cinco continentes e é endêmica em 102 países (OPS/OMS, 2019), destacando-se os países em desenvolvimento, uma vez que a parasitose

possui relação direta com a falta de recursos (WHO, 2014). São registrados 1,3 milhões de casos e de 20.000 a 30.000 mortes ao ano. Cerca de 90% dos casos de LV está concentrada entre Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia. 95% dos casos de LC ocorrem entre as Américas, Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. Nas Américas, foram registrados casos de leishmaniose desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (OPS/OMS, 2019).

No Brasil, são registrados casos da doença nas cinco regiões, mas as maiores incidências são observadas na região Norte e Nordeste. Para LV a região nordeste é a que possui a maior quantidade de caso, sendo notificados em 2018 2.197 casos, e 836 na região norte. Para LT a região norte é a mais endêmica com 8.515 casos e a região nordeste é a segunda mais endêmica, apresentado 4.415 notificações da doença (SINAN, 2018).

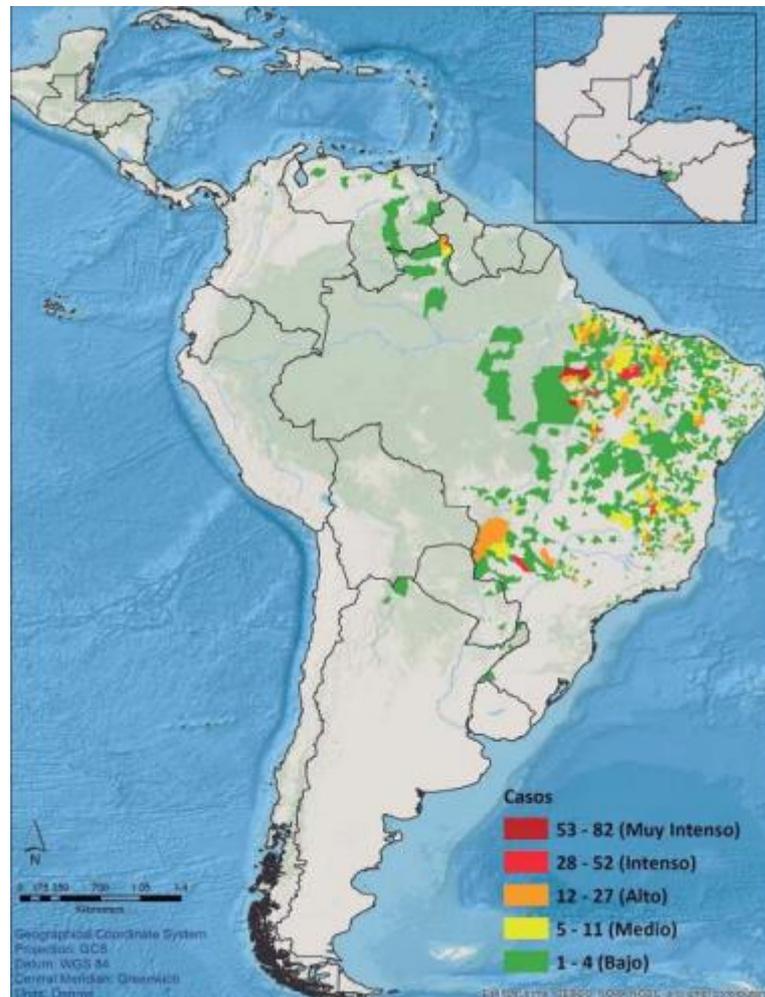
Um dos motivos ligados ao aumento da incidência de LV, são os fatores de riscos individuais, como a expansão da epidemia do HIV (FURLAN, 2010). Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas espalhadas por todo o mundo estejam infectadas com o HIV e que, pelo menos, um terço desta população viva em áreas endêmicas para a LV. Em áreas endêmicas, a infecção pelo HIV aumenta de 100 a 2.320 vezes o risco de desenvolvimento da LV (ALVAR et al., 2008). Em 2011 no Nordeste, um estudo realizado registrou 2.164 casos de LV e destes, 7,12% eram coinfectados com o HIV (BARBOSA et al., 2014).

Figura 5 - Estratificação de risco de leishmaniose cutânea e mucosa segundo nível administrativo subnacional, Américas, 2017.



Fonte: SisLeish-OPS/OMS, 2017.

Figura 6 - Número de casos de leishmaniose visceral segundo nível administrativo subnacional, Américas, 2017.



Fonte: SisLeish-OPS/OMS, 2017.

2.3 Formas Clínicas

As leishmanioses podem ser classificadas em duas formas gerais: LT, que apresenta três formas clínicas específicas: a cutânea (LC), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LM) (RATH et al., 2003), e a LV, que é a forma mais grave da doença (CECÍLIO et al., 2014).

O rumo clínico da doença depende de alguns fatores, como por exemplo, o estado imunológico e nutricional do paciente, a espécie de *Leishmania*, a quantidade de parasitos que foi inoculada, a patogenicidade e infectividade do parasito (LIMA, 2018; KUMAR; NYLÉN, 2012).

A LT está entre as doenças infecciosas de maior relevância no mundo. Ela é dermatológica e devido a sua alta capacidade de causar deformidades, é preocupante e requer muita atenção, podendo também ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2010; SKRABA et al., 2014). Após a lesão inicial, realizada pelo flebotômico, forma-se uma mácula, que a partir de duas semanas pode apresentar um nódulo e/ou pápula eritematosa pequena e pruriginosa (GOTO; LINDOSO, 2012).

No Brasil foram registradas sete espécies do parasito responsáveis pela LT: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) shawi* e *L. (Viannia) lindenbergi* (GUERRA et al. 2015). Já a LV é causada pela *L. (L.) chagasi* (FIGUEIREDO et al., 2010).

A LC (Figura 7) geralmente é a primeira a apresentar-se, onde dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, pode evoluir para as outras formas clínicas (LINDOSO et al., 2012). Além de ser a forma mais frequente é a menos grave, responsável por formar lesões bem localizadas, indolores, ulcerativas ou nodulares, formato arredondado com bordas bem delimitadas, que podem medir de milímetros até centímetros, pelas diversas partes do corpo onde ficam expostas ao flebotômico (BRASIL, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; OMS, 2014). O período de incubação é variável, podendo haver uma evolução após um período de 1-12 semanas e é comum que haja a cura espontânea, porém, casos reincidentes não são raros (AMATO et al., 2008; BRASIL, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; OLIVEIRA-NETO et al., 1998).

A LCD (Figura 8) é uma forma grave, rara, e sua ocorrência está associada a resistência ao tratamento e a dificuldade da resposta imune celular frente à *Leishmania* (BRASIL, 2010). É caracterizada por lesões metastáticas, não ulceradas e geralmente é causada pela *L. amazonensis* (DA ROCHA; PETRONI, 2017, p. 40-55), podendo afetar a face e cobrir todo o corpo (RATH et al., 2003). Alguns sintomas apresentados pelos pacientes acometidos são: febre, linfadenopatia acentuada e obstrução das vias aéreas quando a mucosa está afetada. Não há registros de cura espontânea (REITHINGER et al., 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Na LM (Figura 9) há o comprometimento da mucosa de forma mais frequente, sendo este observado principalmente na região da nasofaringe. Podem ocorrer em alguns casos prurido e inchaço, onde gradativamente aparecerão lesões secundárias nos lábios, cavidade oral, faringe e laringe (KHEZZANI E BOUCHEMAL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017). São causadas principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* (DA ROCHA; PETRONI,

2017) e quando o tratamento não é adequado, o quadro evolui para úlceras com aspectos necróticos, ocorrendo a destruição da cartilagem e linfadenopatia acentuada, o que pode levar o paciente a óbito (KHEZZANI E BOUCHEMAL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A LV (Figura 10), popularmente conhecida como calazar, febre dundun ou esplenomegalia tropical (FIGUEIREDO et al., 2010), é considerada a forma clínica mais grave, por afetar órgãos e tecidos hematopoiéticos (fígado, baço, medula óssea, linfonodos, entre outros) (OPS/OMS, 2019). Os indivíduos acometidos apresentam sintomas de febre de longa duração, perda de peso, astenia, anemia, hepatoesplenomegalia, entre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2010; ROCHA et al., 2015).

Essa forma clínica da leishmaniose afeta principalmente crianças menores de cinco anos, podendo haver uma associação entre o estado nutricional e outras condições de imunossupressão. Habitualmente, o período de incubação se dá entre 2 semanas e 2 meses (OPS/OMS, 2019).

Figura 7 - Leishmaniose Cutânea.



Fonte: BRASIL, 2007

Figura 8 - Leishmaniose Cutânea Difusa.



Fonte: BRASIL, 2006.

Figura 9 - Leishmaniose Mucocutânea.



Fonte: BRASIL, 2006.

Figura 10 - Indivíduo com Leishmaniose Visceral.



Fonte: WHO, 2015.

2.3 Tratamento das Leishmanioses

Desde o século XX que se busca a cura para a leishmaniose, porém, por ser uma doença negligenciada, torna-se pouco atrativa para o lucro da indústria farmacêutica, o que resulta em investimentos baixos para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (EVANS; KEDZIERSKI, 2012; BRASIL, 2010).

São recomendados para o tratamento de primeira escolha o antimoniato de N-metilglucamina, que são utilizados desde a Segunda Guerra Mundial (RATH et al., 2003), para segunda escolha são indicados o uso da anfotericina B lipossomal, que é a única opção no tratamento de gestantes, e pentamidina (BRASIL, 2017) .

Dos antimoniais pentavalentes, antimoniato de N-metilglucamina é o único que é comercializado no Brasil e distribuído pela rede de saúde pública, com o nome comercial de Glucantime (Sanofi-Aventis). O tempo de duração do tratamento é de no mínimo vinte dias (MS, 2013), mas é necessário adequar o esquema terapêutico à realidade do paciente, levando-se em consideração além da forma clínica, aspectos epidemiológicos como idade e presença de doenças de base (SCHULBACH & CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

O antimonial pentavalente (Sb^{5+}) é administrado como pró-fármaco que precisa sofrer processos que permitam a sua redução a antimonial trivalente (Sb^{3+}) que a forma leishmanicida do fármaco. O grupamento tiol, presente na membrana dos lisossomos, consegue realizar essa redução, que ocorre de forma mais favorável em um ambiente de pH reduzido e de maior temperatura, o que explica o fato do fármaco ter ação apenas sobre a forma amastigota. O próprio parasito apresenta grupamentos proteicos em sua membrana que também permitem a

redução de Sb^{5+} (FRÉZARD et al., 2009). A forma Sb^{3+} por sua vez irá interagir com enzimas: aquelas envolvidas na redução do estado oxidativo da célula, aumentando o nível de “estresse” celular gerando a morte celular por apoptose; ou a outras responsáveis pela via glicolítica do parasito tendo ação direta sobre o mesmo (LIMA, 2017).

A Organização Mundial de Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, pois apesar de sua eficácia, este fármaco apresenta efeitos adversos indesejáveis como a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e um potencial teratogênico, o que limita sua administração em mulheres grávidas (NEVES et al., 2011; OMS, 2014). Mialgias, dores abdominais e alterações cardiológicas são também efeitos adversos observados com frequência em pacientes que utilizam esses fármacos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; OMS, 2014). Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento da resistência de parasitos (RATH et al., 2003; SERENO et al., 1998).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico, descoberto em 1953 e isolado em 1955, produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* (WU, 1994; DISMUKES, 2000; RATH et al., 2003; FILIPPIN; SOUZA, 2006). Seu mecanismo de ação é através da interação com ergosterol, um esteroide constituinte da parede celular. Essa interação altera fortemente a membrana através da formação de poros e canais iônicos, causando danos oxidativos nesta e aumentando sua permeabilidade. Isso leva à perda de íons, principalmente potássio, e outros componentes importantes para a sobrevivência do parasito (ZYGMUNT, 1966; SOKOLANDERSON et al., 1986; BEGGS, 1994; GAUGHAN et al., 1995; WANG, 1997; HUANG et al., 2002).

O uso da formulação convencional de anfotericina B é limitado, devido aos efeitos tóxicos gerados (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977; FILIPPIN; SOUZA, 2006). Sintomas e problemas como febre, cianose, hipotensão, hipertensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento renal e anemia são observados nesse tipo de formulação (BERMAN, 1998; SCHÖFFSKI et al., 1998; ROBERTS, 2003; BRASIL, 2017).

Uma nova formulação desenvolvida foi a anfotericina B lipossomal, que é menos tóxica, difere da convencional em forma, tamanho, composição lipídica, farmacocinética, biodistribuição (DISMUKES, 2000) e é bem absorvida pelos macrófago (VAN ETTEN et al., 1998), e pelo sistema histiomonocítico, onde o parasito reside (GROLL et al., 2000; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Apesar de ter uma toxicidade reduzida, o fármaco possui ainda efeitos adversos, mas com menor frequência e intensidade. Com isso, a dose é de 2 a 5 mg/kg/dia, a depender da forma clínica, sem limite de dose máxima diária, até atingir a dose total de 25 a 40 mg/kg, dependendo da resposta clínica (BRASIL, 2017). Portanto, o bom perfil de segurança do fármaco o torna uma opção viável no tratamento da leishmaniose (RAPP et al., 2003; SOLOMON et al., 2013; MISTRO et al., 2017).

Também utilizada como segunda escolha, a pentamidina é um derivado sintético da amidina, que já se mostrou ser eficaz contra protozoários patogênicos, e dentre eles, espécies de *Leishmania*. Sua descoberta como antiprotozoário se deu através da procura por derivados hipoglicemiantes que pudessem comprometer o metabolismo energético de parasitos (TRACY, WEBSTER Jr, 2001).

Apesar de seu mecanismo de ação ainda não ser totalmente claro, é possível que ele ocorra através da inibição de diferentes processos celulares. Pode ser um inibidor competitivo do transporte da arginina ou um inibidor não competitivo do transporte da putrescina e espermidina. A pentamidina catiônica também pode ligar-se preferencialmente ao DNA do cinetoplasto e interferir na replicação e transcrição em nível mitocondrial. Ela também induz mudanças estruturais nas mitocôndrias dos parasitos (WERBOVETZ, 2006; COELHO et al., 2007; BOURREAU et al., 2009). O fator limitante do uso da pentamidina é a sua toxicidade, que gera alterações cardiológicas, nefrotoxicidade, hipotensão, mialgias, além de já se ter tido relatos de óbitos repentinos (RATH et al., 2003).

2.4 Tiossemicarbazonas

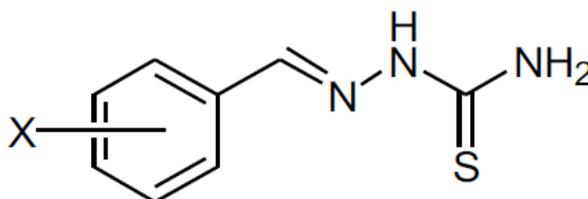
As tiossemicarbazonas são um grupo de moléculas pertencentes a classe das iminas ($-C=N$), conhecidas também como base de Schiff, que são de uma importância significativa na química. Elas apresentam em sua estrutura (Figura 11) átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) e são consideradas como ligantes orgânicos (LOBANA et al., 2009).

Ao serem sintetizadas, as tiossemicarbazonas demonstram grande interesse farmacológico. Porém, se houver outras reações na estrutura geral da classe, é possível gerar outros derivados que possuam outras funções químicas e/ou biológicas (ALMEIDA JÚNIOR, 2017).

Sua atividade biológica se deve a sua estrutura, pois, a presença de átomos de N e S do tipo sp^2 , permite uma deslocalização eletrônica direcionada para estes átomos, favorecendo a coordenação com metais de transição (BERALDO, 2004). São descritas na literatura inúmeras aplicações biológicas, que vão desde atividade anticancerígena até antimalárica (BERALDO, 2004).

As tiocarbohidrazidas são análogos estruturais que mais se aproximam das tiossemicarbazidas, e são utilizadas como antituberculosos e preparações antivirais, além de possuírem alta atividade antimicrobiana (M. KRITSANIDA et al., 2002; B.S. HOLLA et al, 2001; S. SUTRADHAR et al., 2013). As tiossemicarbazidas são os derivados mais simples da hidrazina do ácido tiocarbâmico, com uma ampla variedade de aplicações médicas, como atividades anti-inflamatória (TIPERCIUC et al, 2013), antiviral (CIHAN-ÜSTÜNDAĞ et al, 2016), antifúngica (SIWEK et al, 2012), antibacteriana (KALHOR et al, 2013) e anticâncer (ARORA et al, 2014).

Figura 11 - Estrutura base dos tiossemicarbazônicos.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a citotoxicidade e o efeito leishmanicida *in vitro* dos derivados Tiocarbohidrazidas e Tiossemicarbazidas, visando o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar efeitos citotóxicos destes derivados em macrófagos da linhagem J774. A1;
- Avaliar o efeito leishmanicida dos derivados sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*.

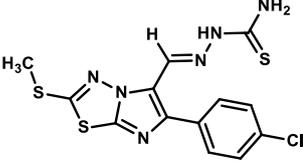
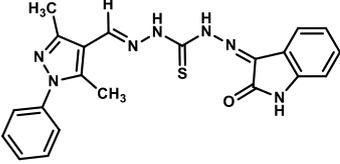
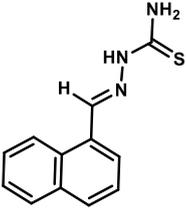
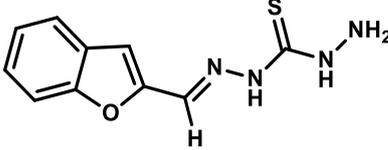
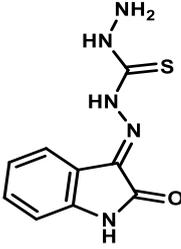
4. MATERIAIS E MÉTODOS

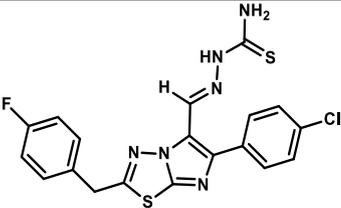
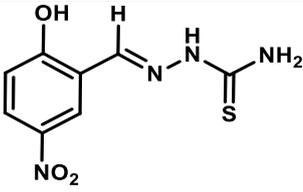
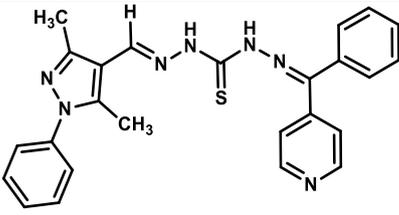
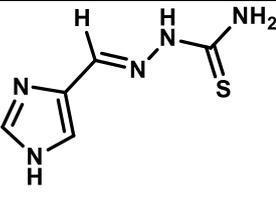
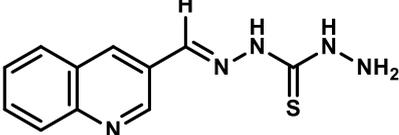
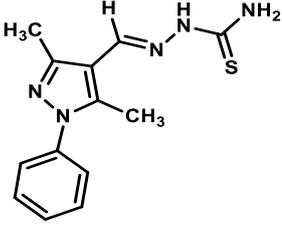
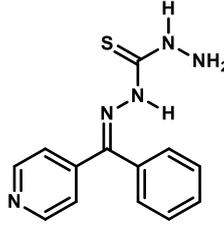
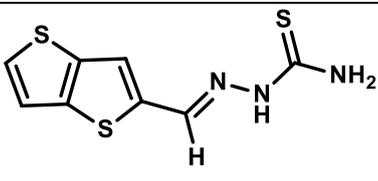
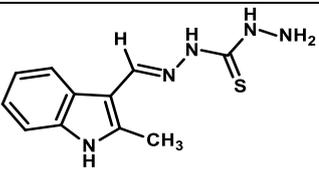
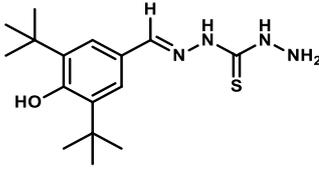
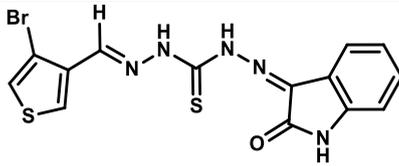
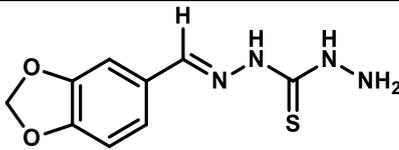
4.1 Parasitos: Foram utilizadas cepas *L. amazonenses* (MHOM/BR/1977/LTB0016). As formas promastigotas foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio Schneider com 10% de SFB e suplementado com 2% de urina humana e 2 mM de L-glutamina, armazenadas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 27 °C.

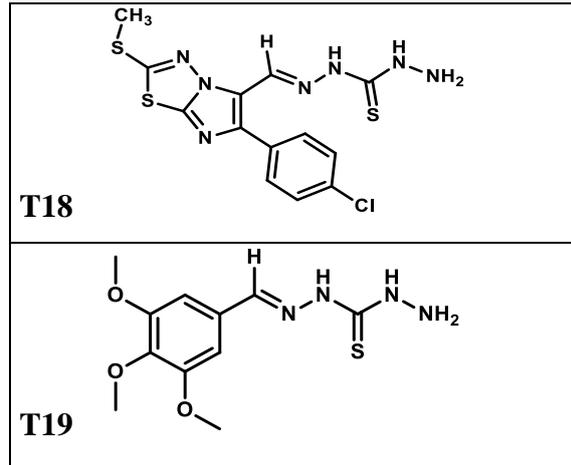
4.2 Fármaco e Reagentes: O fármaco padrão utilizado neste trabalho, pentamidina, foi provinda da Sigma®, como os reagentes que se seguem, Meio Schneider, Soro Fetal Bovino (SFB) e Meio Dulbecco Modificado por Eagle (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM). Os derivados a serem testados e a pentamidina foram preparadas empregando DMSO 0,1% (Sigma) como veículo.

4.3 Substâncias: Os derivados Tioacarbohidrazidas e Tiossemicarbazidas (Figura 12) utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Laboratório de avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coordenado pelo Professor Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Dra. Lídia Moreira Lima.

Quadro 1 – Estrutura química das substâncias

TIOSSEMICARBAZIDAS	TIOCARBOHIDRAZIDAS
<p>T1</p> 	<p>T2</p> 
<p>T5</p> 	<p>T3</p> 
	<p>T4</p> 

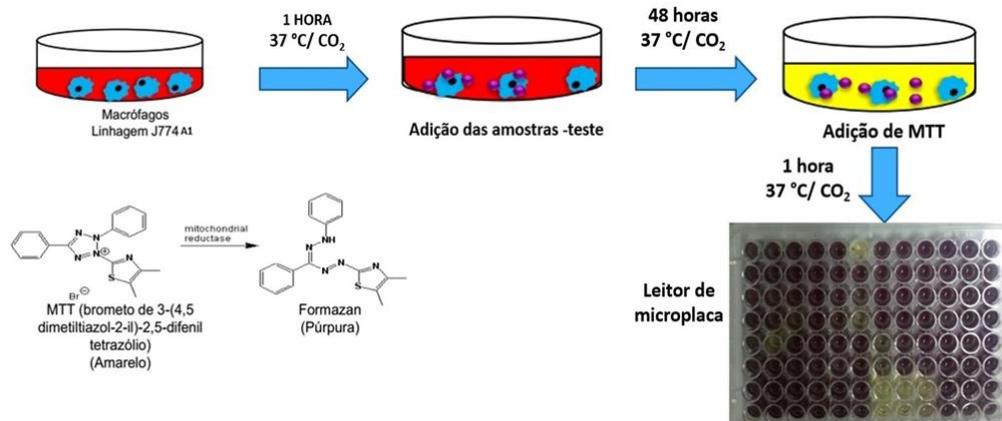
<p>T7</p> 	
<p>T11</p> 	<p>T6</p> 
<p>T12</p> 	<p>T8</p> 
<p>T16</p> 	<p>T9</p> 
<p>T17</p> 	<p>T10</p> 
	<p>T13</p> 
	<p>T14</p> 
<p>T15</p> 	



4.4 Manutenção de linhagem de células: Foram utilizados macrófagos da linhagem J774.A1 provenientes do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para os ensaios *in vitro* de determinação da viabilidade celular e de formas amastigotas. Essa linhagem foi mantida em garrafas de cultura com 5 mL de meio RPMI com 10% SFB a 37 °C com 95% umidade e 5% CO₂.

4.5 Ensaio de viabilidade celular: Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 1 hora, para adesão dos macrófagos à placa. Em seguida as células foram submetidas ao tratamento com a adição de diferentes concentrações dos derivados solubilizados em Dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e diluídos nas concentrações de 100, 30, 10 e 3 μ M em meio de cultura. Nos poços utilizados como controles, as células cultivadas somente com meio de cultura suplementado com 10% de SFB (Gibco-Life) ou células cultivadas na presença do veículo (DMSO, Sigma) das substâncias na concentração máxima utilizada que é de 0,1%. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, que consiste na redução deste sal a cristais de formazan por células viáveis e posterior leitura em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias testadas foi determinada comparando cada tratamento ao padrão de viabilidade obtido nas culturas controle (DMSO).

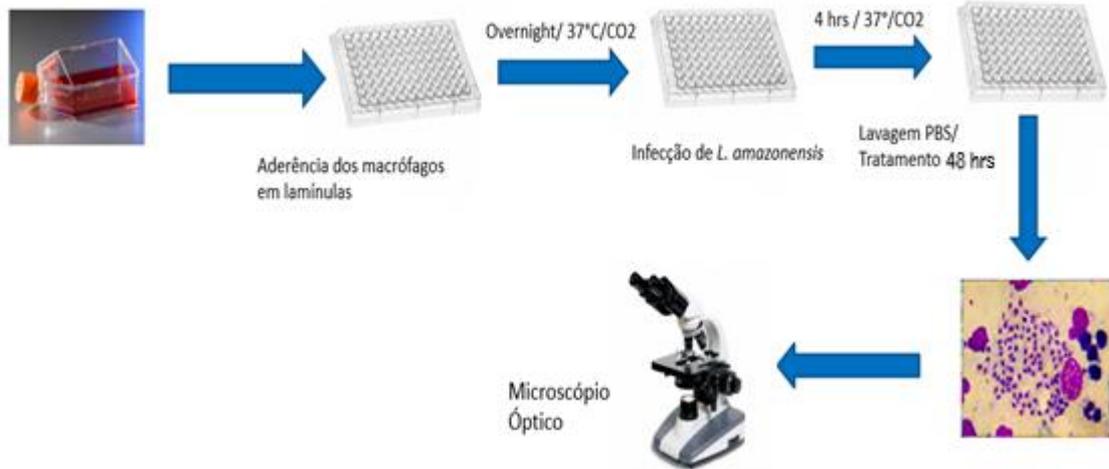
Figura 12 - Ensaio de MTT



Fonte: AUTORA, 2020.

4.6 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*: Macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas de vidro estéreis e infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa infectada foi incubada por 4 horas em estufa de CO₂ a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este tempo de infecção, os macrófagos foram “lavados” com PBS para remoção dos parasitos não fagocitados. Os macrófagos infectados foram cultivados com RPMI suplementado com 10% de SFB, na presença ou não da concentração dos derivados testados e foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período, os poços contendo as lamínulas foram lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol por 3 minutos e em seguida coradas com GiemsaMay-Grünwald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100X (imersão) (NUNES et al, 2005).

Figura 13 - Ensaio para a atividade leishmanicida (forma amastigota)



Fonte: AUTORA, 2020.

4.7 Análise Estatística: Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram verificados por Análise de Variância (One-Way ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett no programa GraphPad Prisma[®] 5.01 e os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em relação ao diluente das substâncias DMSO 0,01%.

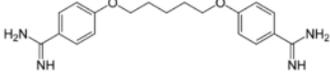
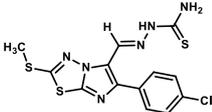
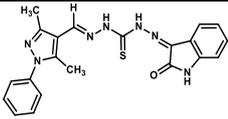
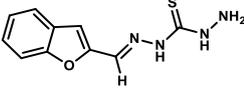
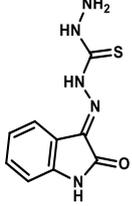
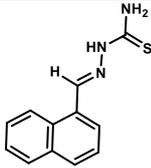
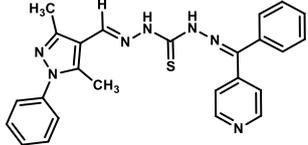
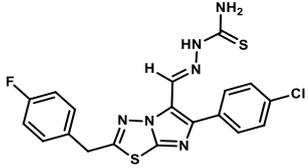
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

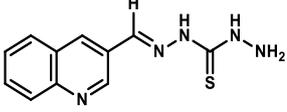
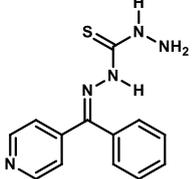
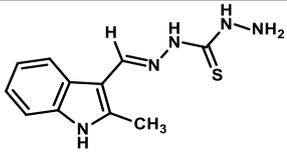
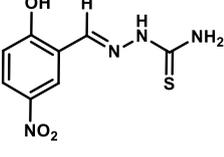
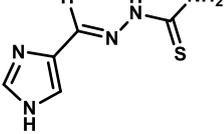
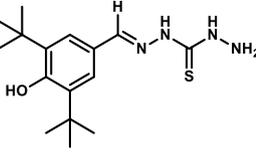
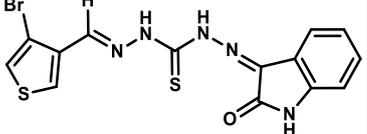
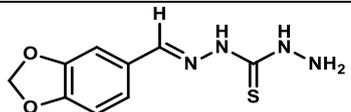
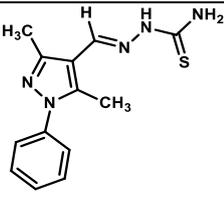
5.1 Avaliação da viabilidade celular

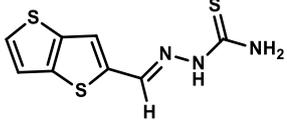
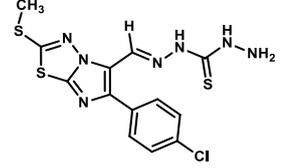
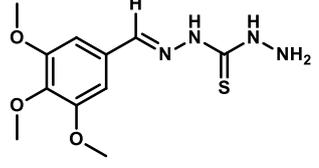
Inicialmente foi avaliada a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774.A1, através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), um método colorimétrico que se fundamenta na avaliação da atividade metabólica dos macrófagos. Esta atividade é expressa na redução do metabolismo do MTT, realizada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A ação da succinato desidrogenase resulta na formação de cristais de formazan, estes cristais são insolúveis em água e uma de suas características é possuir a coloração arroxeadada, que pode ser quantificada por leitura da absorbância num comprimento de onda de 550nm em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

Foram testados 19 derivados, de T1 a T19 e o fármaco padrão, pentamidina, nas concentrações de 100, 30, 10 e 3 μM . Foi calculado também a concentração letal 50% (CL_{50}), que é a concentração capaz de matar 50% das células, e seu efeito citotóxico máximo. A CL_{50} dos derivados T1, T3, T5, T7, T8, T10, T12 e T18, foi de $24,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$; $71,2 \pm 2,0 \mu\text{M}$; $27,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$; $61,3 \pm 2,1 \mu\text{M}$; $74,3 \pm 3,6 \mu\text{M}$; $72,8 \pm 3,5 \mu\text{M}$; $16,3 \pm 2,6 \mu\text{M}$; $97,3 \pm 2,6 \mu\text{M}$; onde apresentaram uma citotoxicidade máxima de: $74,3 \pm 1,2\%$; $76,3 \pm 0,3\%$; $74,3 \pm 3,8\%$; $83,6 \pm 0,3\%$; $70,2 \pm 4,0\%$; $63,7 \pm 2,1\%$; $78,8 \pm 0,5\%$; $51,6 \pm 1,1\%$; respectivamente. Os derivados T2, T4, T6, T9, T11, T17 e T19 não apresentaram CL_{50} até a máxima concentração testada (100 μM), mas apresentaram citotoxicidade de $42,8 \pm 3,8\%$; $12,1 \pm 8,6\%$; $49,1 \pm 3,7\%$; $45,5 \pm 5,4\%$; $37,4 \pm 7,4\%$; respectivamente. Já T13, T14, T15 e T16 também não demonstraram toxicidade até a concentração de 100 μM e não causaram danos à célula hospedeira (Tabela 1). A pentamidina apresentou uma CL_{50} de $3,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e um efeito citotóxico máximo de $77,7 \pm 0,6\%$. Os resultados foram comparados ao DMSO (0,1%), o veículo utilizado para solubilizar os derivados, e que não possui citotoxicidade significativa para as células hospedeiras.

Tabela 1 - Efeito dos derivados Tiocarbohidrazidas, Tiossemicarbazidas e da pentamidina (todos nas concentrações de 100, 30, 10 e 3 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774. A1 no ensaio de MTT.

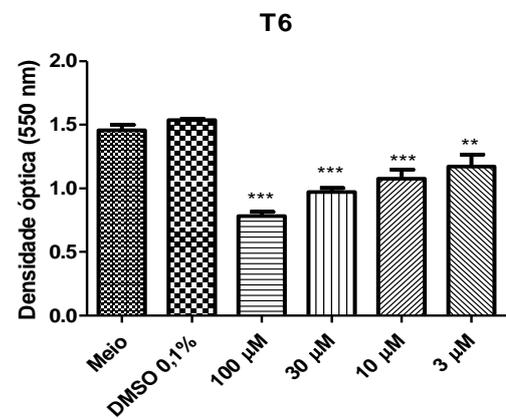
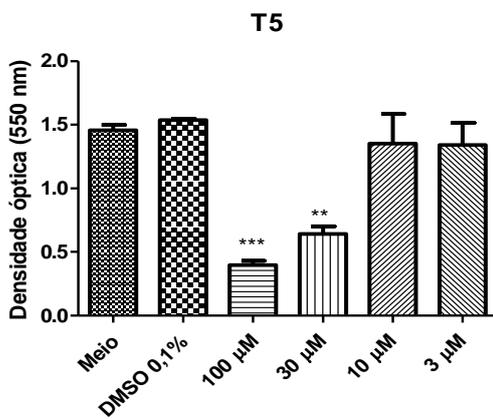
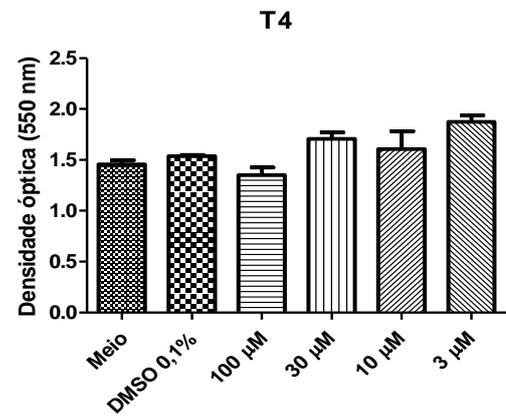
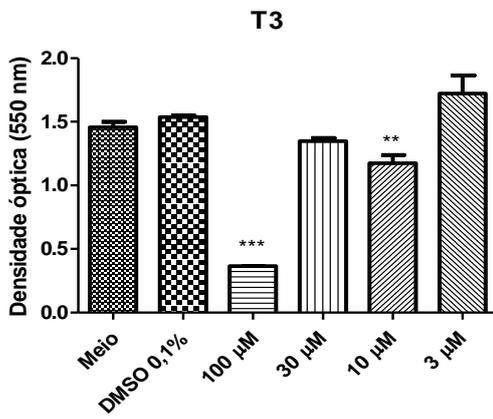
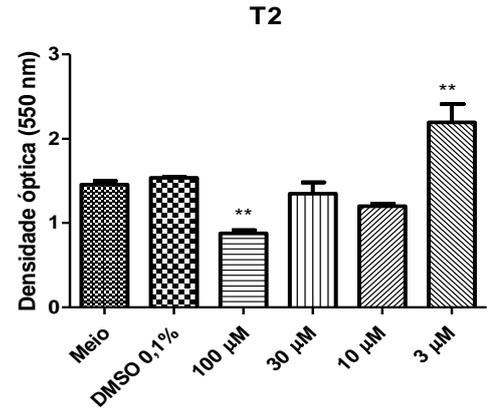
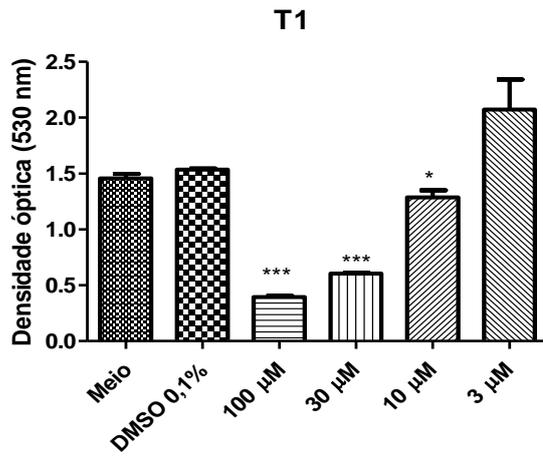
Tratamento	Estrutura	CL ₅₀ (μ M \pm E.P.M.) ^a	Citotoxicidade Máxima (% \pm E.P.M) ^b
Pentamidina		3,3 \pm 0,4	77,7 \pm 0,6***
T1		24,6 \pm 0,3	74,3 \pm 1,2***
T2		>100	42,8 \pm 3,8**
T3		71,2 \pm 2,0	76,3 \pm 0,3***
T4		>100	12,1 \pm 8,6
T5		27,5 \pm 1,8	74,3 \pm 3,8***
T6		>100	49,1 \pm 3,7***
T7		61,3 \pm 2,1	83,6 \pm 0,3***

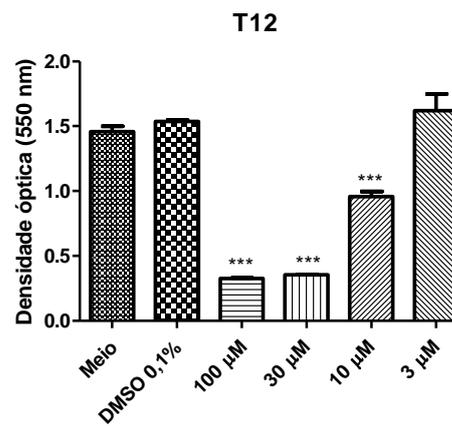
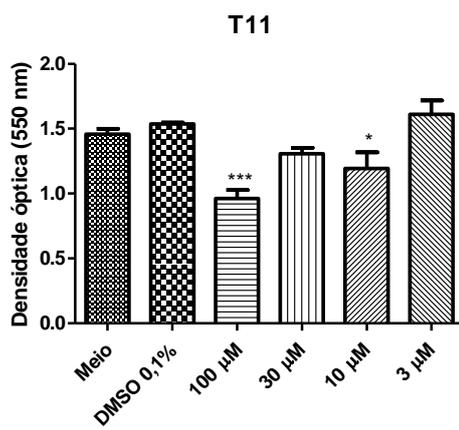
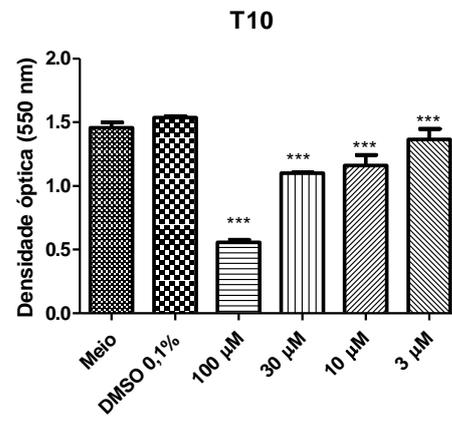
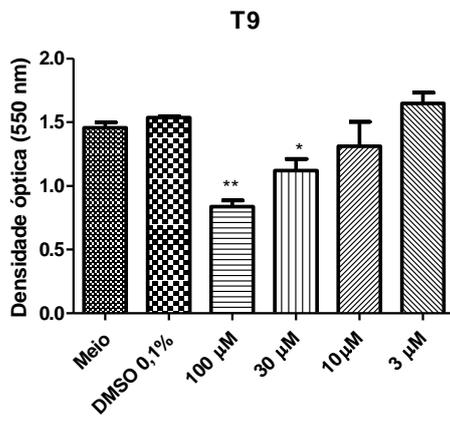
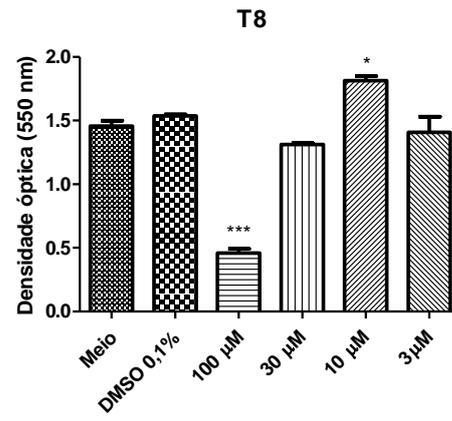
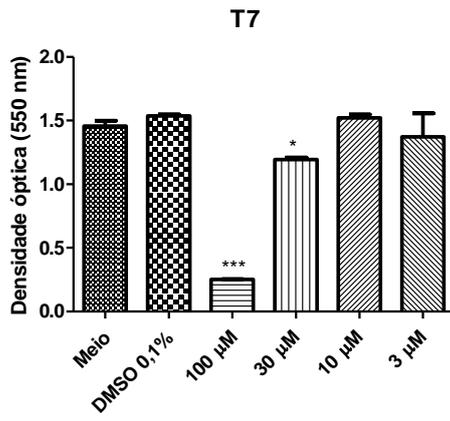
T8		$74,3 \pm 3,6$	$70,2 \pm 4,0^{***}$
T9		>100	$45,5 \pm 5,4^{**}$
T10		$72,8 \pm 3,5$	$63,7 \pm 2,1^{***}$
T11		>100	$37,4 \pm 7,4^{***}$
T12		$16,3 \pm 2,6$	$78,8 \pm 0,5^{***}$
T13		>100	NA
T14		>100	NA
T15		>100	NA
T16		>100	NA

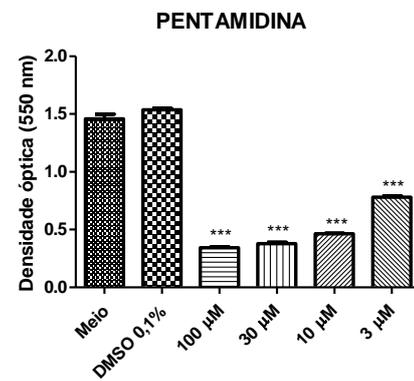
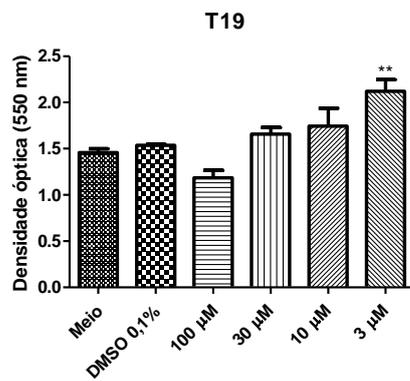
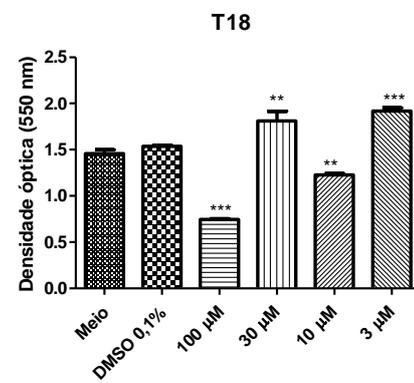
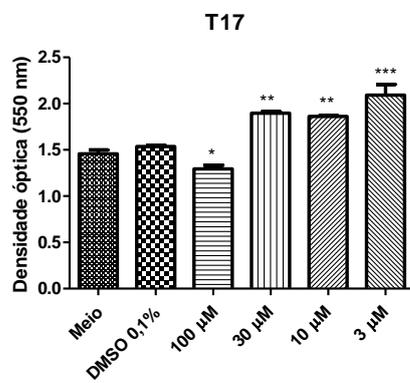
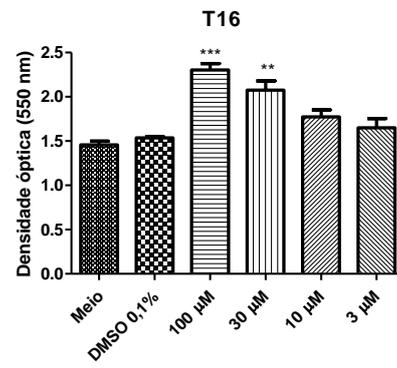
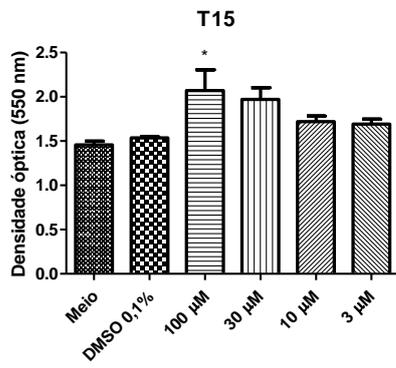
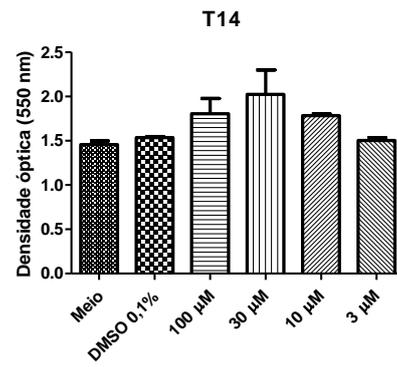
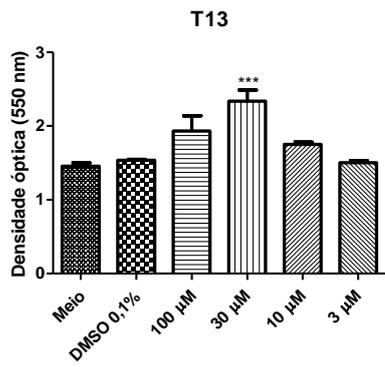
T17		>100	15,7 ± 4,5*
T18		97,3 ± 2,6	51,6 ± 1,1***
T19		>100	22,9 ± 9,5

Os resultados referem-se a: ^a Concentração Letal de 50 % (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^b Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001.

Figura 14 - Efeito dos Tiocarbohidrazidas, Tiossemicarbazidas e da Pentamidina (todos nas concentrações de 100, 30 e 10 e 3 μM) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774.A1 no ensaio de MTT.





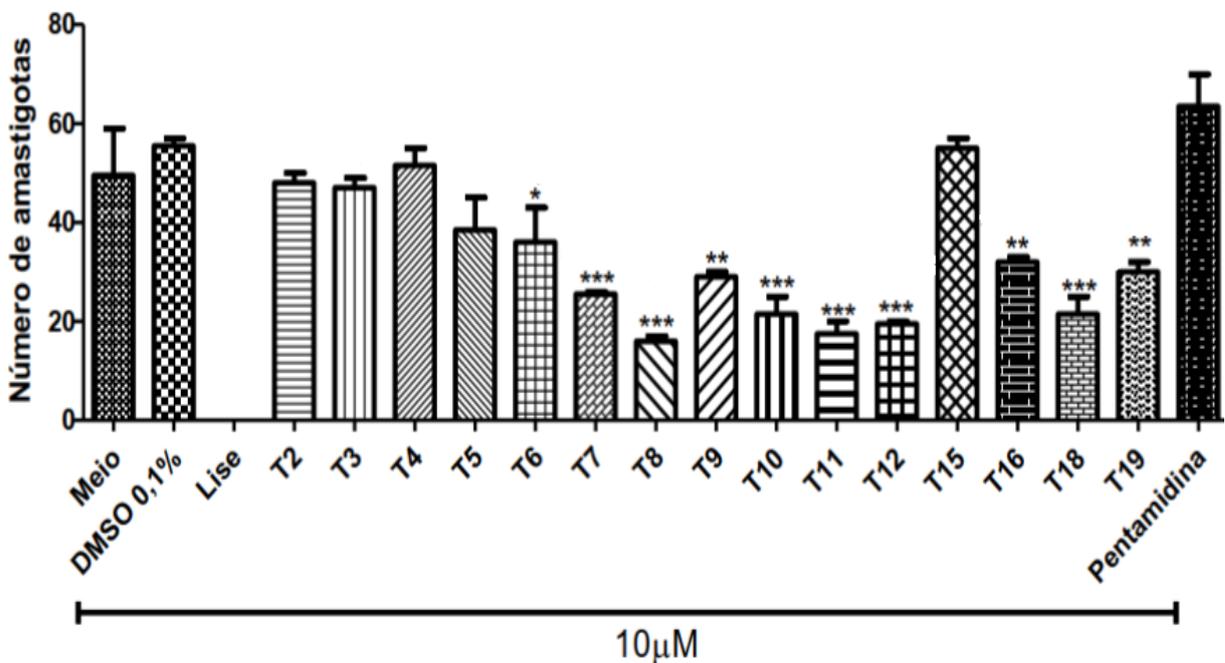


Os resultados representam à média \pm erro padrão de triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

5.2 Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro*

Após a investigação do possível efeito citotóxica dos derivados para as células hospedeiras, foram realizados ensaios para avaliar a atividade leishmanicida desses derivados frente a forma amastigota de *L. amazonensis*, através de um *screening* na concentração de 10 μ M com os 19 derivados e a pentamidina. Dentre os analisados, os derivados T8, T10, T11, T12 e T18 apresentaram efeito máximo acima de 60%, sendo $71,2 \pm 2,5\%$; $61,3 \pm 8,9\%$; $68,5 \pm 6,4\%$; $64,9 \pm 1,3\%$ e $61,3 \pm 8,9\%$, respectivamente (Figura 16 e Tabela 2), sendo considerados promissores para a realização de ensaios posteriores, onde foi possível traçar a CI_{50} .

Figura 15 - Efeito leishmanicida dos Tiocarboidrazidas e Tiossemicarbazidas e da Pentamidina contra formas amastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 10 μ M.



Os resultados representam à média \pm erro padrão de triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Tabela 2 - Efeito leishmanicida dos Tiocarbohidrazidas e Tiossemicarbazidas e da Pentamidina contra formas amastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 10 μ M.

Tratamento	Efeito Máximo
LASSBio	(% \pm E.P.M)
Pentamidina	NA
T1	-
T2	13,5 \pm 5,1
T3	15,3 \pm 5,1
T4	6,7 \pm 9,5
T5	30,6 \pm 16,5
T6	35,1 \pm 17,8*
T7	54,0 \pm 1,3****
T8	71,2 \pm 2,5****
T9	47,7 \pm 2,5**
T10	61,3 \pm 8,9****
T11	68,5 \pm 6,4****
T12	64,9 \pm 1,3****
T13	-
T14	-
T15	2,2 \pm 3,2
T16	42,3 \pm 2,5**
T17	-
T18	61,3 \pm 8,9****
T19	45,9 \pm 8,1**

Os resultados referem-se a: Média \pm erro padrão da média do efeito máximo em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. NA: não foi possível calcular o efeito máximo. (-): Composto provocou lise nos macrófagos.

Comparando os resultados apresentados é possível observar que T1 e T18 possuem a mesma substituição, a diferença é que T1 é uma tiossemicarbazona e T18 uma tiocarbohidrazida, onde a amina (NH_2) terminal, provavelmente, contribui para o incremento na atividade. Entre os tiossemicarbazônicos T1 e T7, a introdução de um fluorocicloexano, que é um grupo lipofílico, ao grupo imidazotiazol, favoreceu o incremento no efeito de T7.

O heterociclo imidazol (nitrogênios na posição 1-4), apresentou os melhores efeitos. Alterações nas posições dos nitrogênios não favoreceram a atividade em T16, por exemplo, que possui o heterociclo pirazol (nitrogênios na posição 3-4). Além disso, modificações que geraram um heterociclo imidazotiazol não foram relativamente significantes (como em T1), mas, a inserção de grupamentos lipofílicos influenciou positivamente no aumento da atividade biológica, como observado em T7.

O composto T11 apresentou o melhor resultado da série (tiossemicarbazonas), ou seja, o que demonstrou possuir um efeito leishmanicida maior, e embora a lipofilicidade tenha mostrado ser importante para o efeito, esta não foi observada quando comparada a T5. No entanto, a presença de grupos elétron-retiradores (NO_2) presente em T11, pode estar relacionado ao efeito observado. A substituição por um tienotiofeno resultou em um derivado completamente inativo (T17).

Os heterociclos quinolina e indol (T8 e T10) apresentaram os melhores resultados da série das tiocarbohidrazidas. As quinolinas possuem atividade farmacológica já descrita na literatura para diversas patologias, dentre elas, é possível citar os fármacos antimaláricos: quinina, cloroquina, mefloquina, entre outros (BAWA et al., 2010; KUMAR et al., 2009). Frente as leishmanioses, seu potencial farmacológico também já vem sendo estudado (ANTINARELLI et al., 2016; COIMBRA et al., 2016; RAMÍREZ-PRADA et al., 2017). Já o indol é um importante sistema heterocíclico, por estar inserido em proteínas e por servir de modelo estrutural para vários fármacos. A incorporação de um núcleo indol em derivados medicinais têm dado a esse heterociclo um amplo espectro de atividades biológicas (SHARMA et al., 2010).

Ainda observando T10 e agora T4, percebe-se que a alteração da metila para carbonila na posição 2 do indol, reduziu a atividade. Isso deve-se, possivelmente, ao grupo elétron-retirador que gerou tautomerismo. Já a modificação do oxigênio em T3 para um nitrogênio em T10, favoreceu a atividade.

A modificação do heterociclo indol para 1,3-benzodioxol não favoreceu a atividade leishmanicida do composto T15, que apresentou um dos menores efeitos, porém, modificações como as substituições nas posições 3, 4 e 5 do benzeno por grupamento metoxila (T19) aumentou o efeito, mesmo que de forma moderada.

As substituições com tiofeno (T14) resultou em um composto completamente inativo, quando comparado com os T4 e T2, que são fracamente ativos.

5.3 Citotoxicidade e efeito leishmanicida

A fim de avaliar a janela terapêutica, e como havíamos avaliado a citotoxicidade máxima em 100 μM , investigamos uma possível toxicidade em 10 μM , isto é, na mesma concentração em que foi realizado o *screening* para avaliar a atividade leishmanicida. Comparando essas duas concentrações, foi possível perceber a redução do efeito tóxico à célula hospedeira, principalmente nos derivados que demonstraram efeito leishmanicida acima de 60%, como T10 que reduziu de 63,7% para 24,4%, T11 de 37,4% para 22,2%, T12 de 78,8% para 37,6 e T18 de 51,6% para 20,2%.

Tabela 3 - Efeito citotóxico e leishmanicida dos Tiocarboidrazidas e Tiossemicarbazidas contra macrófagos da linhagem J774.A1 e formas amastigotas de *L. amazonensis*, ambos na concentração de 10 μM .

Tratamento	Citotoxicidade (% \pm E.P.M)	Efeito leishmanicida (% \pm E.P.M)
T1	16,0 \pm 0,5	-
T2	21,8 \pm 1,1	13,5 \pm 5,1
T3	23,5 \pm 8,9**	15,3 \pm 5,1

T4	-	6,7 ± 9,5
T5	NA	30,6 ± 16,5
T6	30,0 ± 4,6***	35,1 ± 17,8*
T7	1,8 ± 1,5	54,0 ± 1,3***
T8	NA	71,2 ± 2,5***
T9	2,5 ± 0	47,7 ± 2,5**
T10	24,4 ± 12,7***	61,3 ± 8,9***
T11	22,2 ± 12,4*	68,5 ± 6,4***
T12	37,6 ± 5,7***	64,9 ± 1,3***
T13	NA	-
T14	22,9 ± 2,9	-
T15	25,4 ± 5,8	2,2 ± 3,2
T16	-	42,3 ± 2,5**
T17	-	-
T18	20,2 ± 0,5**	61,3 ± 8,9***
T19	-	45,9 ± 8,1**

Os resultados referem-se a Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. NA: Substância não foi tóxica para os macrófagos. (-): Não foi possível calcular o efeito máximo.

6. CONCLUSÕES

Uma série de derivados tiossemicarbazônicos foram avaliados quanto a ação leishmanicida na concentração de 10 μM , a fim de observar um possível efeito leishmanicida. Inicialmente investigamos a viabilidade celular, usando macrófagos da linhagem j774, e alguns deles apresentaram uma baixa citotoxicidade ou até mesmo nenhum efeito tóxico, tais como T5, T8 e T13. Em seguida investigamos o efeito destes derivados sobre a viabilidade do parasito usando formas amastigota de *L. amazonensis* na concentração de 10 μM . Os derivados T8, T10, T11, T12 e T18 apresentaram um efeito máximo acima de 60%, sendo, 71,2%, 61,3%, 68,5%, 64,9% e 61,3%, respectivamente. A partir dos resultados, foi possível notar que dos 19 deriva testados, o T8 foi considerado o mais promissor, podendo servir de modelo estrutural para o desenho de novos proótipos de fármacos leishmanicidas, pois além de não apresentar citotoxicidade para os macrófagos, foi ativo contra a forma intracelular de *L. amazonensis* na concentração de 10 μM . Por fim, para melhor investigar o efeito leishmanicida, novos estudos serão realizados usando faixa de concentrações inferiores a 10 μM , a fim de determinar a CI_{50} a partir de curva concentração-resposta, bem como realizar a mesma curva para o efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. M. S. “Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana”. 2013. 172f. Tese de Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.
- ALMEIDA JÚNIOR, Antônio Sérgio Alves; et al. **Avaliação da atividade esquistossomicida e análise ultraestrutural de derivados indol-tiossemicarbazonas**. 2017.
- ALMEIDA, Olga Laura Sena; SANTOS, Jussamara Brito. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, vol.86, no.3, May/June, 2011.
- ALVAR J.; et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Rev**. 2008; 21(2):334-59.
- ALVAR J.; et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev**. 1997; 10(2):298–319.
- ALVAR, J.; et al. Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2006. **Academic Press**. London, 223-274.
- ALVING, C. R. Delivery of liposomeencapsulated drugs to macrophages. **Pharmacology&Therapeutics** 1983, 22, 407.
- AMATO, V.S.; et al. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, **Int Jour Infec Dis**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2008.
- ANTINARELLI, L. M. R. et al Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p 10-16, 2016.

- ARORA S.; AGARWAL S.; SINGHAL S. Anticancer activities of thiosemicarbazides/thiosemicarbazones: a review. **Int J Pharm Pharm Sci** 6(9), 34–41, 2014.
- ASHER, I.M.; SCHURARTZMAN, G. Amphotericin B. Anal. **Profiles Drug Subst.**, v. 6, p. 1-42, 1977.
- BALANÑA-FOUCE, R.; et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen Pharmacol.**, v. 30, p. 435, 1998.
- BARBOSA, I. R.; et al. Aspectos da Coinfecção Leishmaniose visceral e HIV no Nordeste do Brasil. **Revista Baiana de Saúde Pública**, 37(3), 672-687. 2014.
- BAWA, S.; et al. Structural modifications of quinoline based antimalarial agentes: recente developments. **J. Pharm. Bioallied Sci**, v. 2, p.4-71, 2010.
- BERALDO H.; GAMBINI D. Mini-rev. **Med. Chem.** 2004, 4, 31.
- BERALDO, H.; **Quim. Nova**, 2004, 27, 461.
- B. S. Holla.; P. M. Akberali.; M. K. **Shivananda**, **Il Farmaco** 2001, 56, 919–927.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Curr. Opin. Infec. Dis.**, v. 11, p. 707-710,1998.
- Bernier R.; Turco S.J.; Olivier M. Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **J Virol.** 1995;69(11):7282–7285.
- BOGDAN, C.; et al. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000.
- BOURREAU; et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. **J. Infect Dis.**, v. 199, p. 576-9, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília, DF, 2017. V. 3

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ª ed. ver. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 190p. 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2010.

CECÍLIO, P.; et al. Deception and Manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, out. 2014.

CIHAN-ÜSTÜNDAĞ, G.; et al. Synthesis and antiviral properties of novel indolebased thiosemicarbazides and 4-thiazolidinones. **Bioorg Med Chem** 24(2):240–246. 2016.

COELHO, A. C.; et al. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 3030-2, 2007.

COIMBRA, E. S.; et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50-57, 2016.

DA ROCHA, Gustavo Pereira; PETRONI, Tatiane Ferreira. Leishmaniose visceral, tegumentar americana e leishmaniose cutânea. **Revista Saúde UniToledo**, v. 1, n. 2, 2017.

DA SILVA, Amanda Evelyn. **Estudo da atividade leishmanicida de derivados 4-aminoquinolínicos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2014.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 653-7, 2000.

- EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**. 2012.
- FIGUEIREDO, F.B.; et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2010;43(1):98-9.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molec**. 2009; 14(7): 2317-2336.
- FURLAN, M.B.G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiol Serv Saúde**. 2010;19(1):15-24.
- GARG, R.; et al. Tremblay MJ. Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009;3(5): e441.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther**. v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.
- GROLL, A.H.; et al. Distribution of lipid formulations of amphotericin B into bone marrow and fat tissue in rabbits. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 408-410, 2000.
- GUERRA, J. A. O.; et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12-19, 2015.
- HANDLER, M. Z.; et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy dermatology**. 73, 2015.
- HARHAY, M. O. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in paras., Oxford**, v. 27, n.9, p. 403-409, 2011.
- KALHOR, M.; et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some novel thiosemicarbazides, 1,2,4-triazol-3-thiols and their S-substituted derivatives. **Iran J Pharm Res** 14(1):67-75. 2015.

- KANSAL, S.; et al. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2650–2660, 2012.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015/07/01/ 2015.
- KHEZZANI, B.; BOUCHEMAL, S. Demographic and spatio-temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Souf oasis (Eastern South of Algeria): Results of 13 years. **Acta Tropica**, v. 166, p. 74-80, 2017.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol** 17(3): 279-289. 1999.
- KRITSANIDA, Marina. et al. Synthesis and antiviral activity evaluation of some new 6-substituted 3-(1-adamantyl)-1, 2, 4-triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazoles. **Il Farmaco**, v. 57, n. 3, p. 253-257, 2002.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 8, p. 1–10, 2012.
- LEITE, A. C. L.; et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1-30, 2018.
- LINDOSO, J.A.; et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014;8(9):e 3136.
- LINDOSO, J. A. L.; et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, Auckland, v. 3, p. 69-77, 2012.
- LOBANA, T.S.; et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals - An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 977-1055, 2009.
- MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. The quarterly. **Journal of Medicine**, Oxford, v. 107, p. 7-14, 2013.

MINISTÉRIO S. **Manual da vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Saúde. Distrito Federal, Brasil. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia. Departamento de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças Negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

MISTRO, S.; et al. Cost-effectiveness of liposomal amphotericin B in hospitalized patients with mucocutaneous leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health.**, 27 oct. 2017.

MOLINA, R.; Gradoni, L.; ALVAR J. HIV and the transmission of leishmania. **Ann Trop Med Parasit**. 2003; 97(Suppl 1):29–45.

MONGE-MAILLO, B.; et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014;8(8):e 3021.

MONZOTE, L.; et al. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal** 2009, 1, 9.

MORAIS, Rayana Carla Silva de. **Aplicability of real time PCR technique for *Leishmania* species characterization**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

NEVES, L.O.; et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**. 2011; 86: 1092-110.

NUNES, M. P., et al. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Microbes and Infection**. v. 7, p.78-85, 2005.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, p. 846-849, 1998.

Organização Mundial Da Saúde. **Leishmaniasis**. Disponível em:

<<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

Organização Mundial Da Saúde. **Leishmaniasis**. Geneve, 2014. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2020.

Organização Mundial da Saúde. **Informe Leishmanioses** N° 4 - Julho de 2016. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-leish-informe-epidasamericas.pdf>>. Acesso em: 18 de Dezembro de 2019.

Organização Mundial da Saúde. **Informe Leishmanioses** N° 7 - Março de 2019. Disponível em:<<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cdeleish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso em 18 de Dezembro de 2019.

Organización Panamericana de la Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS; 2019.

RAMÍREZ-PRADA, J. et al. Synthesis of novel quinoline based 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as potential anticâncer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 237-254, 2017.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2003. 367 p.

RAPP, C.; et al. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis contracted in Djibouti and resistant to meglumine antimoniate. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 96, n. 3, p. 209-11, aug., 2003.

RATH, S.; et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. **Quim. Nov.** v. 26, p. 550–557, 2003.

REITHINGER, R.; et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

ROBERTS, W. L. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexam and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.**, p. v. 126, p. 129-42, 2003.

ROCHA, T.J.; et al. Perfil epidemiológico relacionado aos casos de letalidade por leishmaniose visceral em Alagoas: uma análise entre os anos de 2007 a 2012. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. 2015;36(1):17-20.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-483, 2001.

SANTOS, S. O.; et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis, **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 315–317, 1998.

SCHÖFFSKI, P.; et al. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomized study. **BMJ**, v. 317, p. 379-84, 1998.

SCHUBACH A, Conceição-Silva F. Estado da arte no tratamento da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. **Leishmanioses do continente americano**, Brasil 391-398. 2014.

SERENO, D.; et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Ag. Chem.** v. 42, p. 3097–3102, 1998.

SHARMA, U.; et al. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 678-704, 2010.

SILVA, S. C. **Estudo comparativo de cepas de Leishmania Infantum – Avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da expressão de micrornas em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Rio Preto, Minas Gerais, 2017.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Tabulação de dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-viscerallv/11334-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em 12 de janeiro de 2020.

SINGH, S. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. **IJID**. 2014; 29:103–112.

SIWEK, A. Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. **J Mol Model** 18(9):4159–4170. 2012.

SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun., 2004.
- SOLOMON, M.; et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 68, n. 2, p. 284-9, feb., 2013.
- SUTRADHAR, S.; MALIHA, A. M.; HUMERA, A. Res. J. Pharm., **Biol. Chem. Sci.** 2013, 4, 878–887.
- TIPERCIUC, B.; et al. New anti-inflammatory thiazolyl-carbonylthiosemicarbazides and thiazolyl-azoles with antioxidant properties as potential iNOS inhibitors. **Arch Pharm Res** 36(6):702–714. 2013.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750-750, 2017.
- TRACY, J. W.; WEBSTER Jr. L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: amebiasis, trichomoniasis, trypanosomiasis, leishmaniasis, and other protozoal infections. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (Eds). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1097-1113.
- UNSAI TAN, O.; et al. Synthesis and antimycobacterial activities of some new Nacylhydrazone and thiosemicarbazide derivatives of 6-methyl-4,5- dihydropyridazin-3(2H)-one. **Med Chem Res** 21:2388–2394. 2012.
- VAN ETTEN, E. W. M.; et al. Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and Fungison against peritoneal macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2437-2439, 1998.
- WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. **Curr. Opin. Investig Drugs**, v. 7, p. 147-57, 2006.
- WHO. **Control of leishmaniasis**. WHO Technical Report Series. Geneve: WHO; 2010. 949. Pág 1–186. OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 17 de dezembro de 2019.

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.