

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA**

**Ayla das Chagas Almeida**

**Efeito de derivados de triazóis e seus sais em espécies de *Leishmania*  
associadas a manifestação visceral e estudos de modo de ação sobre o  
parasito**

**Juiz de Fora  
2021**

**Ayla das Chagas Almeida**

**Efeito de derivados de triazóis e seus sais em espécies de *Leishmania* associadas a manifestação visceral e estudos de modo de ação sobre o parasito**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora  
2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Ayla das Chagas.

Efeito de derivados de triazóis e seus sais em espécies de *Leishmania* associadas a manifestação visceral e estudos de modo de ação sobre o parasito / Ayla das Chagas Almeida. -- 2021. 137 f. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. *Leishmania*. 2. Sais triazólicos. 3. Mitocôndria. 4. Autofagia. 5. *In vivo*. I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. da Silva, Adilson David, coorient. III. Título.

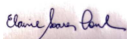
## AYLA DAS CHAGAS ALMEIDA

### EFEITO DE DERIVADOS DE TRIAZÓIS E SEUS SAIS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ASSOCIADAS A MANIFESTAÇÃO VISCERAL E ESTUDOS DE MODO DE AÇÃO SOBRE O PARASITO.

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27 08 2021 / / .

#### BANCA EXAMINADORA:

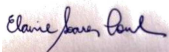


---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Soares Coimbra**

**Orientadora**


**Universidade Federal de Juiz de Fora**



---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia de Almeida Machado**

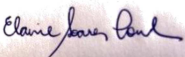
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**



---

**Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

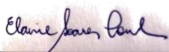
**Universidade Federal de Minas Gerais**



---

**Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus, por me dar força, equilíbrio e realizações nessa jornada.

Aos meus pais, pelo incentivo, em especial minha mãe por sempre estar ao meu lado e torcer para que tudo dê certo.

À minha avó, pelo cuidado e amor de uma vida inteira.

À minha irmã Tati, por sempre me apoiar e acreditar em mim.

Ao Daniel, pelo amor e companherismo, deixando essa caminhada muito mais leve.

À professora Elaine, pela orientação, pelo apoio, pela amizade em todos os momentos e por ter me ensinado tanto.

Ao professor Adilson, pela coorientação e por viabilizar a síntese de tantos compostos.

Às professoras do Laboratório de Parasitologia, pela convivência e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia pelas ajudas, risadas e aprendizados compartilhados. Em especial à Paty por todo apoio nessa caminhada, à Bárbara e Daniela por toda ajuda nos experimentos *in vivo* e Luciana pela ajuda nos ensaios de citometria e dicas compartilhadas.

À técnica Cristina, por todo auxílio no Laboratório de Parasitologia.

À Raissa, minha parceira de projeto, amiga, sempre muito disponível para ajudar e compartilhar.

Ao Nicolas, pela ajuda e conhecimentos compartilhados.

Ao professor Edézio, pelos ensinamentos e ajuda com os ensaios *in vivo*.

Ao Thiago e a professora Rossana Melo, pelas análises e parceria na Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao professor Eduardo Coelho e suas alunas, pelas análises bioquímicas realizadas.

À Banca Examinadora pela participação e contribuição ao trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP).

À Universidade Federal de Juiz de Fora, funcionários e professores.

À Capes, FAPEMIG, CNPq pelo financiamento.

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença progressiva e potencialmente fatal, caso não tratada. Porém, o tratamento disponível apresenta graves efeitos adversos, longo tempo de duração e variabilidade na eficácia. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade de 34 derivados 1,2,3-triazólicos e seus sais, em espécies de *Leishmania* associadas a manifestação visceral da doença, bem como a toxicidade em células de mamíferos, estudos de modo de ação e efeito no modelo murino. A triagem dos compostos foi realizada com a espécie *L. (L.) amazonensis*, classicamente associada a leishmaniose cutânea, mas também relatada em casos de leishmaniose visceral. Posteriormente, o composto mais promissor foi avaliado em diferentes cepas de *L. (L.) infantum*, classicamente associada a manifestação visceral. A atividade antipromastigota de *Leishmania* spp. e em macrófagos foi avaliada pela técnica do MTT e a atividade anti-amastigota por fluorimetria na cepa transfectada com RFP ou por contagem dos parasitos após coloração com Giemsa. Para os estudos de modo de ação, foram utilizados marcadores específicos e analisados por fluorimetria, citometria de fluxo, microscopia de fluorescência ou microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os sais de derivados triazólicos exibiram expressiva atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo os mais seletivos aqueles contendo 10 átomos de carbono na cadeia lateral do triazol. Dentre os compostos avaliados, elegeu-se o sal triazólico **25c** para continuidade dos estudos. O composto exibiu expressiva atividade em cepas de *L. (L.) infantum*, oriundas de humano e de cães, com valores de  $CI_{50}$  abaixo de 10  $\mu$ M e índice de seletividade entre 6-9 para o parasito. Além disso, não exibiu toxicidade nas hemácias de humanos (18,75 - 300  $\mu$ M). Estudos de modo de ação indicaram a mitocôndria como o principal alvo do composto **25c** a 4,55  $\mu$ M em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, associados ao aumento da produção de EROs mitocondrial e total, hiperpolarização, inchaço mitocondrial e acúmulo de corpúsculos lipídicos. Não ocorreu aumento da exposição de fosfatidilserina e fragmentação de DNA em promastigotas tratadas com o composto **25c**, o que não indicou a ocorrência de apoptose-like. O processo de necrose também foi descartado, uma vez que a permeabilidade e integridade da membrana plasmática dos parasitos não foi alterada após o tratamento. Estudos de autofagia demonstraram a ocorrência de autofagia em promastigotas tratadas com o composto **25c**. O composto **25c** a 7,92  $\mu$ M ocasionou diminuição de EROs, não interferiu na produção de NO e ocasionou diminuição dos níveis de interleucina-10 em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*. Estudos *in silico* demonstraram a boa biodisponibilidade oral do composto **25c**, que a 20 mg/Kg diminuiu a carga parasitária no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*. Estudos de toxicidade em camundongos mostraram que o composto **25c** a 50 mg/Kg não induziu toxicidade hepática e renal, ao contrário, apresentou a capacidade de reestabelecer as condições fisiológicas dos camundongos infectados. Esses resultados demonstram o potencial *in vitro* e *in vivo* do sal triazólico e estimulam mais estudos sobre sua ação *in vivo* e em diferentes modelos animais.

Palavras-chave: *Leishmania*. Sais triazólicos. Mitocôndria. Autofagia. *In vivo*.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a progressive disease and potentially fatal if untreated. However, current treatment has serious adverse effects, long-term treatment, and variability in effectiveness. The objective of this work was to analyze the activity of 34 1,2,3-triazole derivatives and their salts against *Leishmania* species associated with visceral manifestation of the disease, as well as toxicity in mammalian cells, mode of action studies and effect on murine model. The screening of the compounds was performed against the species of *L. (L.) amazonensis*, classically associated with cutaneous leishmaniasis, but also reported in cases of visceral leishmaniasis. Posteriorly, the most promising compound was evaluated in different strains of *L. (L.) infantum*, classically associated with visceral manifestation. The antipromastigote activity of *Leishmania* spp. and macrophages was evaluated by the MTT technique and the antimastigote activity by fluorimetry in the RFP transfected strain or parasite count after Giemsa staining. For the mode of action studies, specific markers were used and analyzed by fluorometry, flow cytometry, fluorescence microscopy or transmission electron microscopy (TEM). The triazolium salts showed significant activity in the promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, and the most active compounds had 10 carbon atoms in the triazole side chain. These also had the smallest toxic effects to macrophages. Among the evaluated compounds, the triazole salt, **25c**, was chosen to continue the tests. This compound showed significant activity in human and dog *L. (L.) infantum* strains, with IC<sub>50</sub> values below 10 µM and selectivity index between 6-9 for the parasite. In addition, it did not exhibit human red blood cell toxicity up to the maximum concentration tested (18.75- 300 µM). Mode of action studies have indicated mitochondria as the main target of compound **25c** at 4.55 µM in promastigote forms of *L. (L.) infantum*, associated with increased production of mitochondrial and total ROS, mitochondrial hyperpolarization, and lipid bodies accumulation. Phosphatidylserine exposure and DNA fragmentation in promastigotes treated with compound **25c** did not occur, excluding the occurrence of apoptosis cell death. In the same way, occurrence of necrosis was rule out, since both the permeability and integrity of the plasma membrane were not affected by compound **25c**. Studies of autophagy were performed and autophagic vacuoles were detected after treatment with compound **25c**. The compound **25c** at 7.92 µM decreased of levels ROS and did not interfere in the NO production and induced decrease of IL-10 interleukin levels in infected macrophages. *In silico* studies have demonstrated pharmacokinetic parameters and good oral bioavailability of compound **25c**, stimulating the *in vivo* test by this route of administration. The compound at 20 mg/Kg decreased parasitic load in the spleen and liver of *L. (L.) infantum* infection in BALB/c mice. Toxicity studies in mice showed that compound **25c** at 50 mg/Kg did not induce hepatic, renal toxicity, on the contrary, it reestablished the physiological conditions of infected mice. These results demonstrate the *in vitro* and *in vivo* potential of the triazole salt and encourage further studies on its action *in vivo* and in different animal models.

Keywords: *Leishmania*. Triazolium salts. Mitochondria. Autophagy. *In vivo*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global das leishmanioses clássicas e atípicas.....	16
Figura 2 - Casos de Leishmaniose Visceral nos principais países das Américas. ....	17
Figura 3 - Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>L. (L.) infantum</i> .....	18
Figura 4 - Representação esquemática das principais organelas em formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 5 - Macho de <i>Lutzomyia longipalpis</i> . ....	20
Figura 6 - Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> .....	22
Figura 7 - Estrutura dos fármacos utilizados para leishmaniose. ....	27
Figura 8 - Estrutura dos triazóis e do sal 1,2,3 triazólico.....	35
Figura 9 - Desenho esquemático da síntese dos derivados e sais triazólicos.....	41
Figura 10 - Efeito do composto <b>25c</b> e da miltefosina após 24 h de interação com hemácias humanas .....	66
Figura 11 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em 6 (A), 24 (B) e 72 h (C) de incubação. ....	68
Figura 12 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	69
Figura 13 - Alterações do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratadas e tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h. ..	70
Figura 14 - Avaliação da produção de superóxido mitocondrial em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratadas e tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 24 h, utilizando o reagente MitoSox.....	71
Figura 15 - Avaliação da produção de EROs totais e do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> pré incubadas com o antioxidante NAC por 1 h e, posteriormente, não tratadas e tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h. ....	72
Figura 16 - Acúmulo de corpúsculos lipídicos em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratadas e tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h, utilizando o reagente Nile Red.....	73
Figura 17 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em 6 (A), 24 (B) e 72 h (C) de incubação.....	74



Figura 18 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h, utilizando citometria de fluxo. ....	74
Figura 19 - Exposição de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratadas e tratadas com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h, utilizando a dupla marcação anexina/PI e avaliação por citometria de fluxo.. ....	76
Figura 20 - Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas após tratamento com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h.. ....	77
Figura 21 - Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos em promastigotas após tratamento com o composto <b>25c</b> a 4,55 µM por 72 h.....	78
Figura 22 - Ultraestrutura de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratadas e tratadas com composto <b>25c</b> .....	80
Figura 23 - Alterações ultraestruturais da mitocôndria de <i>L. (L.) infantum</i> induzidas pelo composto <b>25c</b> . ....	82
Figura 24 - Vacúolos autofágicos dentro do citoplasma de <i>L. (L.) infantum</i> promastigotas tratados com composto <b>25c</b> .....	83
Figura 25 - Produção de EROs totais em macrófagos não infectados e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após 72 h de tratamento com o composto <b>25c</b> , utilizando o reagente H2DCFDA.. ....	84
Figura 26 - Produção de NO em macrófagos não infectados e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após 72 h de tratamento com o composto <b>25c</b> , por meio do método de Griess .....	83
Figura 27 - Dosagem de TNF e IL-10 em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após 72 h de tratamento com o composto <b>25c</b> .....	84
Figura 28 - Avaliação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos após 10 dias de tratamento com o composto <b>25c</b> , miltefosina ou água (controle)....	88
Figura 29 - Análises bioquímicas de camundongos não infectados tratados com água (CNI) e com o composto <b>25c</b> a 50 mg/Kg e de camundongos infectados, tratados com água (CI), miltefosina a 20 mg/Kg e composto <b>25c</b> a 10 e 20 mg/Kg..	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos compostos 1,2,3-triazólicos e seus sais correspondentes.....	42
Tabela 2 - Avaliação do efeito de derivados 1,2,3-triazólicos sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e sobre macrófagos murinos...	61
Tabela 3 - Efeito do composto <b>25c</b> sobre formas promastigotas e amastigotas de diferentes cepas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	65
Tabela 4 - Determinação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto <b>25c</b> .....	87
Tabela 5 - Peso relativo do baço e do fígado de camundongos não infectados tratados com o composto <b>25c</b> ou com água.....	82
Tabela 6 - Análises hematológicas de camundongos não infectados e infectados tratados com o composto <b>25c</b> e com água.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BHI	“Brain Heart Infusion” Infusão de cérebro e coração
BSA	“Bovine Serum Albumin” Albumina bovina sérica
Caco-2	Carcinoma coloretal
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para 50 % das células
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50 % do crescimento parasitário
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CYP	Citocromo
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” Ácido desoxirribonucleico
DNDi	“Drugs for Neglected Diseases initiative” Iniciativa medicamentos para doenças negligenciadas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	“Carbonyl cyanide 4- (trifluoromethoxy)phenylhydrazone” Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
FITC	“Fluorescein Isothiocyanate” Isotiocianato de fluoresceína
HBA	“Hydrogen Bond Acceptor” Aceptor de ligação de hidrogênio
HBD	“Hydrogen Bond Donor” Doador de ligação de hidrogênio
H <sub>2</sub> DCFDA	“2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate 2',7' diacetato de diclorofluoresceína
HIV	“Human Immunodeficiency Virus” Vírus da imunodeficiência Humana
IL-10	Interleucina-10
INF- $\gamma$	Interferon-gama
IS	Índice de seletividade
JC-1	“5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide” Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolocarbonianina
LDA	“Limiting Dilution Assay” Ensaio de diluição limitante
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água
LPG	Lipofosfoglicano

LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MTT	“3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NAC	N-acetilcisteína
NO	“Nitric Oxide” Óxido nítrico
PBS	“Phosphate Buffered Saline” Tampão fosfato salino
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PI	“Propidium Iodide” Iodeto de Propídeo
RFP	“Red Fluorescent Protein” Proteína fluorescente vermelha
rpm	Rotações por minuto
RPMI	‘Roswell Park Memorial Institute’ Instituto parque memorial Roswell
Sb	Antimônio
SC	Soro de Cavalo
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate” Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- $\beta$	“Transforming Growth Factor Beta” Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF	“Tumor Necrosis Factor” Fator de necrose Tumoral
VP	Vacúolo Parasitóforo
WHO	“World Health Organization” Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 O parasito <i>Leishmania spp</i> .....	18
1.1.1 Espécies de <i>Leishmania</i> associadas a manifestação visceral.....	22
1.2 Manifestações clínicas .....	23
1.3 Tratamento.....	25
1.4 Morte celular em protozoários .....	30
1.5 Triazóis.....	35
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 Objetivo Geral .....	38
2.2. Objetivos específicos .....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 Desenho Experimental .....	40
3.2 Compostos sintéticos .....	40
3.3 Cultivo do parasito.....	44
3.4 Manutenção da infectividade do parasito .....	45
3.5 Ensaio <i>in vitro</i> .....	45
3.5.1 Ensaio de toxicidade em macrófagos peritoneais murinos.....	46
3.5.2 Efeito dos compostos em formas promastigotas de <i>Leishmania spp</i> .....	46
3.5.3 Efeito dos compostos em formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania spp</i> .....	47
3.5.4 Determinação do índice de seletividade.....	48
3.5.5 Ensaio de toxicidade em hemácias de humanos.....	48
3.5.6 Ensaio de modo de ação do composto <b>25c</b> sobre promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> ITMAP 263.....	49
3.5.6.1 Análise da alteração do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em promastigotas.....	49

3.5.6.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total e mitocondrial em promastigotas.....	50
3.5.6.3 Avaliação do efeito de antioxidante sobre a produção de EROs totais e do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas .....	51
3.5.6.4 Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos em promastigotas .....	51
3.5.6.5 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas ...	52
3.5.6.6 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas.....	52
3.5.6.7 Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas .....	53
3.5.6.8 Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos em promastigotas.....	54
3.5.6.9 Avaliação ultraestrutural de promastigotas.....	54
3.5.7 Estudo do modo de ação do composto <b>25c</b> sobre macrófagos não infectados e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> ITMAP 263 .....	55
3.5.7.1 Determinação dos níveis de EROs em macrófagos não infectados e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> .....	55
3.5.7.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos não infectados e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> ITMAP 263 .....	56
3.5.7.3 Determinação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-10 (IL-10) em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> ITMAP 263 .....	56
3.6 Análises <i>in silico</i> .....	57
3.7 Ensaios <i>in vivo</i> .....	57
3.7.1 Efeito <i>in vivo</i> do composto <b>25c</b> sobre o modelo murino de leishmaniose visceral .....	57
3.7.2 Ensaio de toxicidade aguda em camundongos BALB/c .....	58
3.8 Análises estatísticas .....	58
3.9 Considerações éticas .....	59
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
4.1 Parte I. Avaliação dos triazóis e seus sais em <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	60
4.1.1 Triagem dos triazóis e seus sais em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e toxicidade em macrófagos murinos .....	60

4.2 Parte II. Seleção e estudos com o composto <b>25c</b> em <i>L. (L.) infantum</i> .....	64
4.2.1 Atividade <i>in vitro</i> do composto <b>25c</b> sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i> .....	65
4.2.2 Toxicidade <i>in vitro</i> sobre hemácias humanas.....	66
4.3 Estudos do modo de ação do composto <b>25c</b> sobre <i>Leishmania infantum</i> ITMAP 263 .....	66
4.3.1 Avaliação da função mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratadas com composto <b>25c</b> .....	66
4.3.2 Avaliação do efeito do composto <b>25c</b> sobre o acúmulo de corpúsculos lipídico .....	72
4.3.3 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas tratadas com o composto <b>25c</b> .....	73
4.3.4 Avaliação da exposição de fosfatidilserina .....	75
4.3.5 Avaliação da fragmentação do DNA .....	76
4.3.6 Avaliação do efeito do composto <b>25c</b> sobre o acúmulo de vacúolos autofágicos .....	77
4.3.7 Análise ultraestrutural em promastigotas tratadas com o composto <b>25c</b> .....	78
4.4 Estudo do modo de ação do composto <b>25c</b> sobre amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i> .....	84
4.4.1 Avaliação da produção de EROs e NO em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> .....	84
4.4.2 Avaliação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-10 (IL-10) em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> .....	85
4.5 Estudo <i>in silico</i> de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto <b>25c</b> .....	86
4.6 Efeito <i>in vivo</i> do composto <b>25c</b> sobre o modelo murino de leishmaniose visceral .....	88
4.7 Ensaio de toxicidade aguda em camundongos BALB/c .....	89
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>104</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>1045</b>
<b>ANEXO A- Certificados CEUA .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO B- Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE A- Produções científicas diretas .....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE B- Produções científicas indiretas .....</b>	<b>136</b>



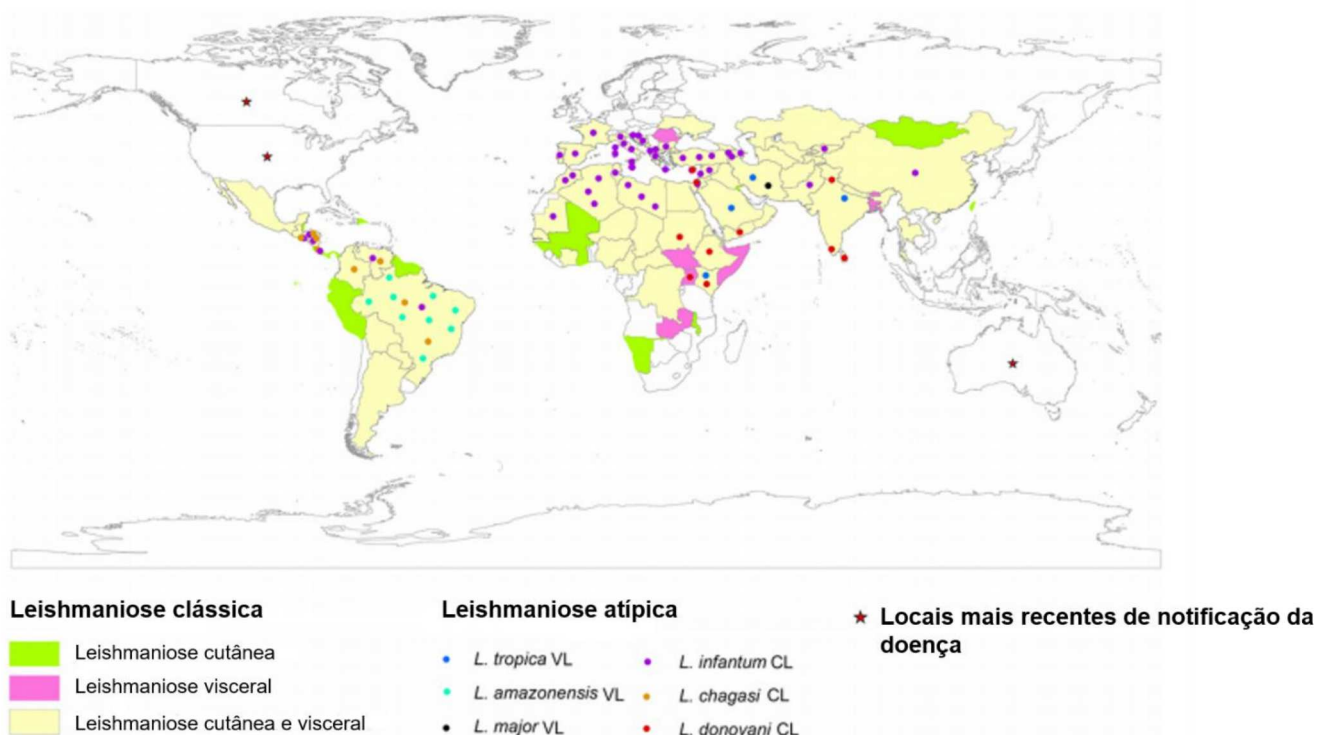
## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas e negligenciadas causadas por mais de 20 espécies do parasito *Leishmania*, transmitidos pelo inseto vetor, flebotomíneo (WHO, 2021). Afetam 92 países com mais de 1 bilhão de pessoas expostas em áreas de risco (WHO, 2018) e fatores como deslocamento populacional, pobreza, má nutrição, falta de recursos, mudanças climáticas e ambientais estão associadas a expansão da doença (WHO, 2021).

As leishmanioses apresentam três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave e fatal, caso não tratada (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). A LV também é reconhecida por outros nomes, como "kala-azar" na Índia (palavra hindu que em sânscrito se refere a febre negra, nomeada assim em razão do escurecimento da pele, nas extremidades e abdômen, na forma indiana da doença) ou "febre Dum Dum" (devido ao fato de terem sido isolados parasitos de um paciente em Dum Dum, Calcutá, Índia); leishmaniose visceral americana, calazar neotropical ou calazar (América latina) e calazar infantil (mediterrâneo) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; STEVERDING, 2017). Existem várias discussões sobre relatos da ocorrência da LV no mundo antes do século 19, incluindo aqueles com sintomas sugestivos da doença, como febre e esplenomegalia (STEVERDING, 2017). Na América do Sul, o registro do primeiro caso ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Posteriormente (1934), em estudos sobre febre amarela, foram detectados no Brasil os primeiros casos de LV em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LV apresenta uma taxa de incidência de 50 a 90 mil novos casos anuais (WHO, 2021). É causada principalmente pelas espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*, e excepcionalmente, pelas espécies dermatrópicas, como *L. amazonensis*, *L. tropica* e *L. major* (THAKUR et al., 2018) (Figura 1). Em 2019, a maioria dos casos de LV foi reportada em países como Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão, Sudão do Sul, Iraque e Nepal (Figura 1) (WHO, 2021). Índia, Nepal e Bangladesh, países que eram responsáveis por mais de 50 % da carga global de LV (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018; SINGH et al., 2014), participam atualmente de

um programa de eliminação da doença, baseado na detecção e tratamento das pessoas acometidas e no controle do inseto vetor (PICADO et al., 2012). Esse programa vem contribuindo para a diminuição nas taxas de incidência global da LV (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018).

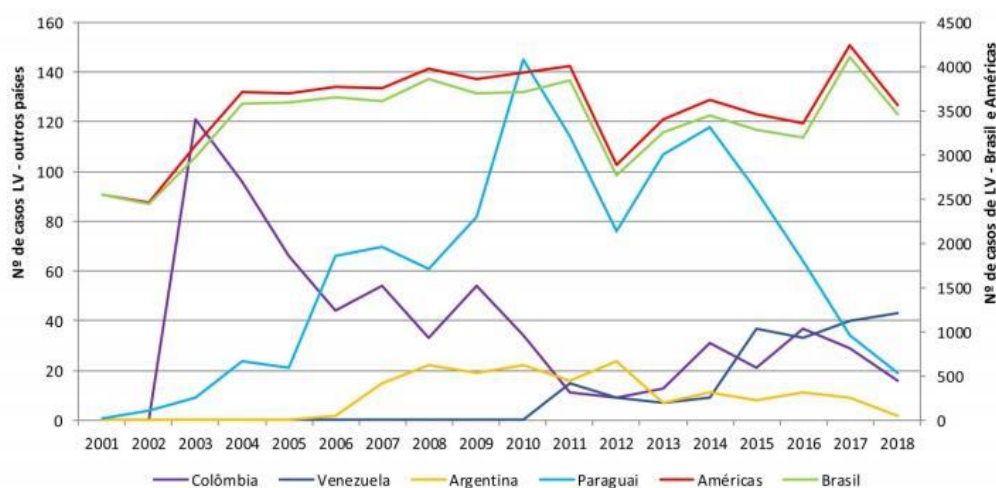


**Figura 1 - Distribuição global das leishmanioses clássicas e atípicas.** Fonte: Adaptado de THAKUR et al. 2018.

Em relação ao Brasil, este apresenta altos índices de LV em seu território, com aproximadamente 85 mil casos confirmados desde a década de 90 (BEZERRA et al., 2018). No ano de 2019, apresentou 2.529 novos casos de LV e uma taxa de mortalidade de 9% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O Brasil representa mais de 96% na incidência de LV estimada na América Latina (Figura 2), exibindo a maioria dos casos nas regiões Norte e Nordeste do país (BEZERRA et al., 2018; BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018; PAHO/WHO, 2019). Em muitos países em desenvolvimento, a LV acomete principalmente crianças (MURRAY et al., 2005; NAUFAL SPIR et al., 2017), geralmente associadas a fatores de risco como má nutrição e pobreza (LIMA et al., 2018). No Brasil, tem sido observado uma diminuição na incidência de LV em crianças, possivelmente relacionada a uma melhora no estado nutricional e do sistema

imunológico dessas, como resultado da implementação de programas sociais e de saúde nos últimos anos (LIMA et al., 2018). Em contrapartida, aumento dos casos de LV visceral em adultos vem ocorrendo e estão associados à coinfeção com HIV, representando um dos maiores desafios para o controle da infecção (LIMA et al., 2018).

Em 2006, foi implementado o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), visando a redução do número de casos e da mortalidade da doença, com medidas relacionadas ao diagnóstico e tratamento precoce das pessoas acometidas, promoção de atividades de educação em saúde, e redução da população de reservatórios e do inseto transmissor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Apesar das medidas, observou-se aumento dos casos em humanos e expansão da doença em áreas urbanas (BEZERRA et al., 2018; ZUBEN e DONALÍSIO, 2016). Os principais problemas identificados na execução das diretrizes do PCLV estão associados a falta de recursos financeiros e humanos e a resistência da população sobre medidas de controle para o reservatório canino e para a eliminação do inseto vetor (ZUBEN e DONALÍSIO., 2016). Os cães são os principais reservatórios domésticos de espécies de *Leishmania* associadas a manifestação visceral nas Américas e exercem importância epidemiológica na transmissão da doença (ALVES et al., 2018; COSTA et al., 2000). Em outras regiões, como na Índia, o cão não é considerado um importante reservatório, visto a transmissão ser de caráter antroponótico, na qual a principal fonte de infecção é o ser humano (ALVES et al., 2018; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

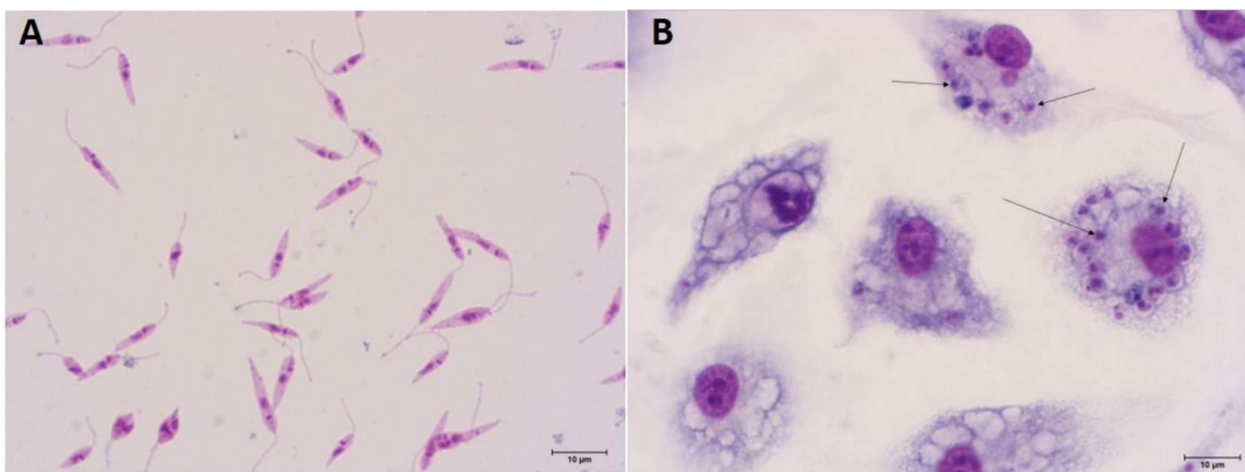


**Figura 2 - Casos de Leishmaniose Visceral nos principais países das Américas.** Fonte: PAHO, 2019

### 1.1 O parasito *Leishmania spp*

O gênero *Leishmania spp* está associado a protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família *Trypanosomatidae*, que apresentam como característica estrutural a presença do cinetoplasto, caracterizado como DNA extranuclear presente dentro da única mitocôndria (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004; VICKERMAN, 1976).

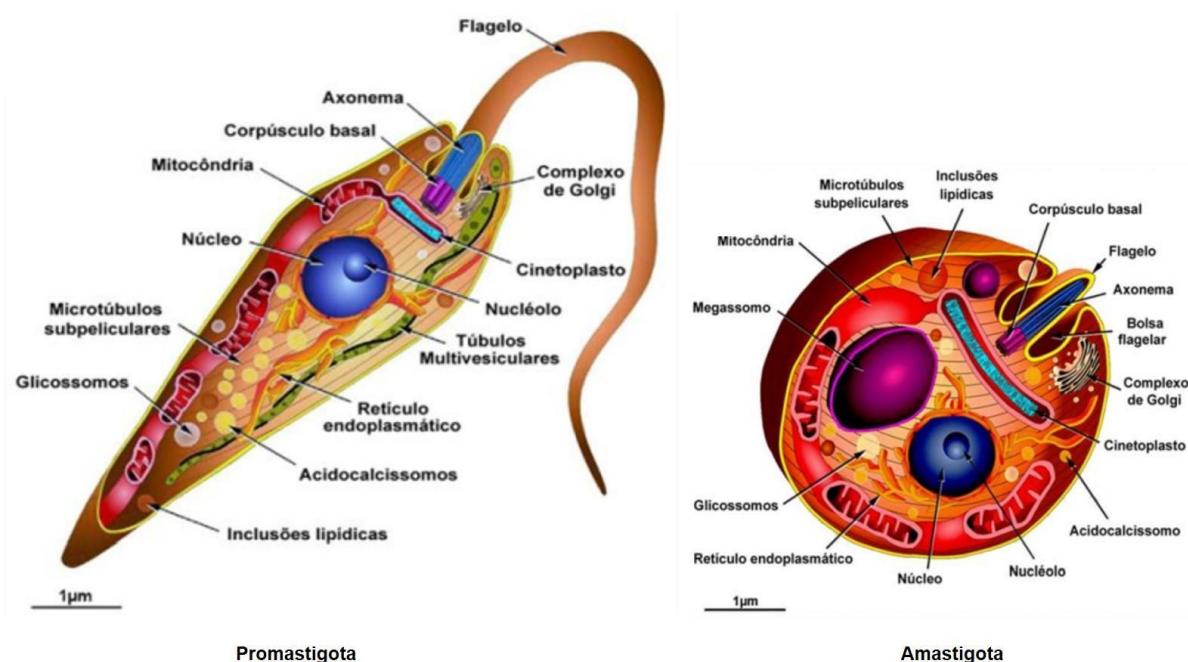
O parasito *Leishmania spp* apresenta duas formas biológicas principais, promastigotas encontradas no intestino do inseto vetor e amastigotas dentro de células fagocíticas dos mamíferos (Figura 3). A morfologia de promastigotas é definida como células alongadas (10-20  $\mu\text{m}$ ) com extenso flagelo móvel na porção anterior que proporciona movimento pelo intestino do inseto vetor (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015; SUNTER e GULL, 2017), enquanto amastigotas são intracelulares obrigatórios, menores (3–5  $\mu\text{m}$ ), arredondadas e exibem flagelo intracitoplasmático (DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012; SUNTER e GULL, 2017).



**Figura 3 - Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *L. (L.) infantum*.** As formas amastigotas estão dentro dos macrófagos peritoneais murinos após 72h de infecção, conforme indicado pelas setas. Aumento de 1000x. Fonte: próprio autor.

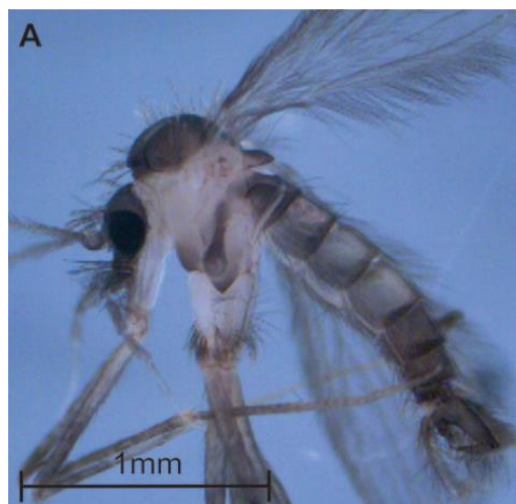
Ambas formas biológicas do parasito compartilham de semelhantes unidades estruturais básicas (Figura 4), tais como membrana plasmática, núcleo localizado posteriormente ao cinetoplasto (DNA mitocondrial), única mitocôndria e complexo de Golgi, retículo endoplasmático, bolsa flagelar e flagelo (SUNTER e GULL, 2017). Além disso, estruturas especiais como glicosomo e acidocalcissoma

também são reportadas e estão associadas às enzimas da via glicolítica e ao armazenamento de cálcio e fósforo, respectivamente (DE SOUZA, 2002).



**Figura 4 - Representação esquemática das principais organelas em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.** Fonte: adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

O ciclo de vida do parasito envolve os hospedeiros mamíferos, representados pelos humanos, animais silvestres, peri-domésticos ou domésticos, e hospedeiros invertebrados (DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012), denominados genericamente de flebotomíneos. Os flebotomíneos são insetos pequenos (1,5-2 mm) (Figura 5), que habitam principalmente regiões tropicais e subtropicais (DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012; SHARMA e SINGH, 2008). As fêmeas de flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo, são os vetores responsáveis pela transmissão do parasito *Leishmania* spp (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012). No Brasil, *Lutz. longipalpis* é considerada como a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão da LV em humanos e em cães. Além desta, *Lutz. cruzi*, tem sido considerada como vetor da LV no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e, ainda *Lutz. migonei*, tem sido investigada em registros de casos autóctones da doença, mas sem a presença das espécies anteriormente citadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

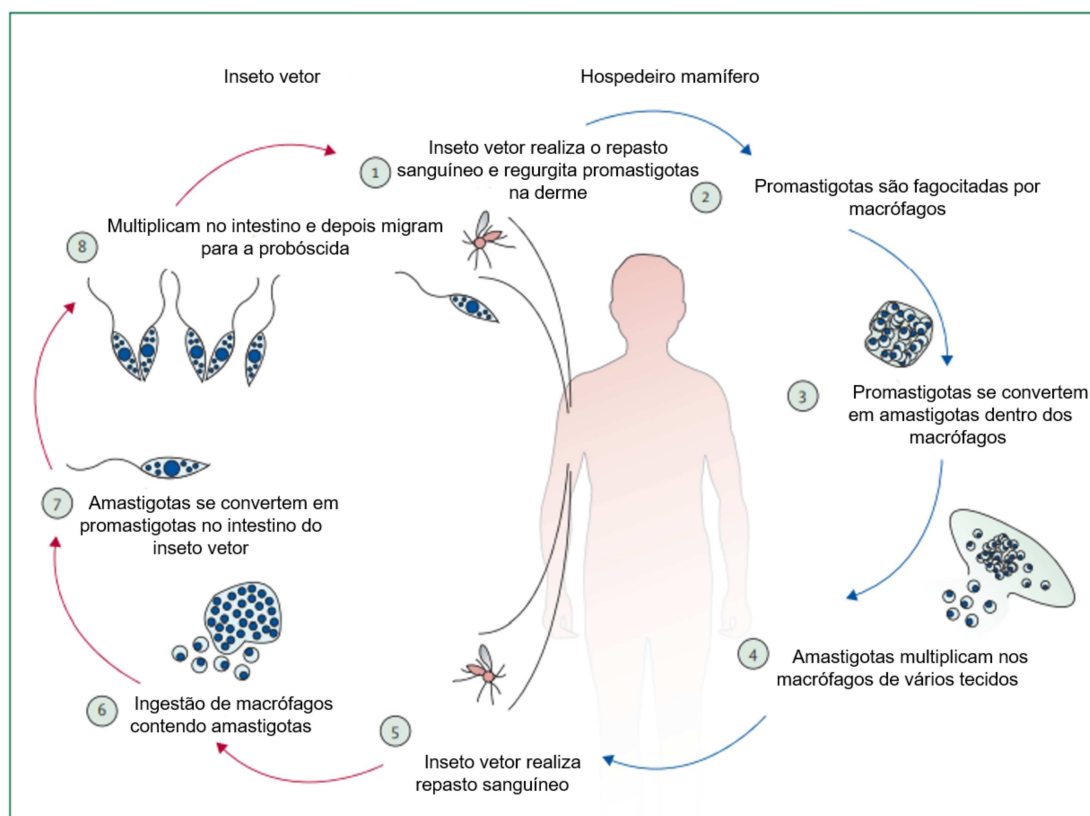


**Figura 5 - Macho de *Lutzomyia longipalpis*.** Fonte: SOUZA, BRAZIL e ARAKI, 2017.

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos regurgitam promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero (Figura 6). Proteínas presentes na saliva do inseto vetor, como apirase e maxadilina, podem desempenhar papel importante no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp ao interferirem na homeostase e na resposta imune do hospedeiro (ABDELADHIM, KAMHAWI e VALENZUELA, 2014; GOMES et al., 2002). Promastigotas são rapidamente fagocitadas por células residentes e por aquelas recrutadas para o local da infecção (CARLSEN et al., 2015), como neutrófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018). O macrófago tem sido considerado como a principal célula associada ao desenvolvimento e persistência do parasito (CARLSEN et al., 2015). Uma vez dentro das células hospedeiras, promastigotas dentro do vacúolo parasitóforo se diferenciam em amastigotas (MOAL e LOISEAU, 2015). Essa diferenciação é induzida pela formação do fagolisossomo, através da fusão do lisossomo da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo (MATTE e DESCOTEAUX, 2016; MOAL e LOISEAU, 2015). O vacúolo parasitóforo (VP) pode exibir diferentes morfologias. Comumente, amastigotas pertencentes ao complexo *L. donovani* residem em VPs pequenos e individuais, enquanto amastigotas do complexo *Leishmania mexicana* (espécies *L. (L) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) pifanoi*) replicam em VPs grandes e coletivos (KIMA e DUNN, 2005; KIMA, 2007). É importante ressaltar, que no início da infecção, as formas promastigotas utilizam de estratégias para escapar da ação do sistema imune inato. Uma das evasões mais bem descritas, envolve a interferência na fusão e maturação do fagolisossomo, pela molécula

lipofosfoglicano (LPG), presente na superfície do parasito. Dessa forma, promastigotas evadem da ação microbicida dos macrófagos até se diferenciarem em amastigotas (MORADIN e DESCOTEAUX, 2012). Amastigotas são adaptadas às condições encontradas nos fagolisossomos acídicos (MORADIN e DESCOTEAUX, 2012), assim, proliferam por divisão binária simples até a ruptura da célula hospedeira, ocasionando a captação de amastigotas por outras células e a propagação da infecção (LODGE e DESCOTEAUX, 2005). Na LV, após a ruptura dos macrófagos residentes infectados, amastigotas se disseminam pela corrente sanguínea e infectam células do sistema fagocítico mononuclear (sistema retículo endotelial) de órgãos como baço, fígado, medula óssea, linfonodos e intestino (STEVERDING, 2017).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando fêmeas do inseto vetor ao realizarem o repasto sanguíneo ingerem macrófagos infectados com amastigotas (Figura 6). No intestino do flebotomíneo, sob menor temperatura e maior pH, amastigotas são diferenciadas em promastigotas procíclicos, que apresentam flagelo mais curto que corpo celular e grande capacidade replicativa (SUNTER e GULL, 2017). Após sucessivas diferenciações, ocorre a metaciclogênese, originando os promastigotas metacíclicos, que apresentam longos flagelos, migram para a probóscida e infectam o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (BATES, 2018; DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012; SUNTER e GULL, 2017). Estudos anteriores mostraram que após o segundo repasto sanguíneo do inseto vetor infectado ocorre a formação de uma maior população de promastigotas metacíclicas, potencializando a transmissão do parasito para os hospedeiros mamíferos (BATES, 2018; SERAFIM et al., 2018).



**Figura 6 - Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.** Fonte: Adaptado de REITHINGER et al., 2007.

### 1.1.1 Espécies de *Leishmania* associadas a manifestação visceral

Existem diversas espécies de *Leishmania* relatadas na literatura e muitas são patogênicas para os mamíferos (AKHOUNDI et al., 2016). Classicamente, foram divididas em subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com a região colonizada pelo parasito no intestino do inseto vetor, e complexos, baseados em características biológicas e bioquímicas dos parasitos (LAINSON E SHAW, 1987). Com a inserção de diferentes técnicas moleculares, a classificação de *Leishmania* vêm incitando discussões e modificações ao longo do tempo (AKHOUNDI et al., 2016; SCHÖNIAN, MAURICIO e CUPOLILLO, 2010).

O complexo *L. donovani* está associado classicamente a LV e três espécies são implicadas como agentes etiológicos, dependendo da região: (i) *L. (L). donovani* (LAVERAN e MENSIL, 1903), presente na Índia, Ásia e África; (ii) *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908), comum na região do Mediterrâneo e Ásia central e a *L. (L). chagasi* (CUNHA e CHAGAS, 1937), presente na Américas (MURRAY et al., 2005). A primeira está envolvida em um ciclo antroponótico e as duas outras, em ciclo antropozoonótico.



Vale ressaltar que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* eram consideradas espécies diferentes, presentes no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente, entretanto por meio de técnicas genéticas e enzimáticas, passaram a ser consideradas sinônimas e a *L. (L.) chagasi* tem sido referida como *L. (L.) infantum chagasi* ou simplesmente *L. (L.) infantum* (MAURICIO et al., 1999; MOMEN, GRIMALDI e DEANE, 1987).

O complexo *L. mexicana* é classicamente associado a leishmaniose cutânea no Novo mundo (MURRAY et al., 2005). Dentre as espécies deste complexo, destaca-se a *L. amazonensis*, a qual está associada a um amplo espectro de manifestações clínicas na América do Sul, variando da forma cutânea simples à anérgica cutânea difusa, cujo prognóstico e tratamento são mais complicados. Além disto, esta espécie tem sido também, ocasionalmente, associada a LV em humanos (BADARÓ, 1988; BARRAL et al., 1991; ALEIXO et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2007; THAKUR et al., 2018), bem como identificada em cães com sinais clínicos de LV (Governador Valadares-MG, Bauru-SP, Cambé-PR, Araçatuba-SP) (SANCHES et al., 2016; TOLEZANO et al., 2007, VALDÍVIA et al., 2017). Apesar de ainda merecerem maiores estudos, esses dados colocam em evidência a importância desta espécie no contexto da LV e sugerem que o agente responsável pela LV no Brasil pode não estar restrito apenas à *L. (L.) infantum chagasi* mas também incluir a *L. (L.) amazonensis* (BADARÓ, 1988, SANCHES et al., 2016).

## 1.2 Manifestações clínicas

A LV apresenta diferentes manifestações clínicas, dependendo das características do hospedeiro mamífero, tais como, estado imunológico (COLMENARES et al., 2002), fator nutricional, idade e fator genético (AKILOV, KHACHEMOUNE e HASAN, 2007; LINDOSO et al., 2016) e da espécie de *Leishmania* envolvida (MURRAY et al., 2005).

As infecções assintomáticas de LV são normalmente identificadas por meio de testes sorológicos ou testes cutâneos em indivíduos sem manifestações clínicas (SINGH et al., 2014), ocorrendo principalmente em áreas endêmicas e em indivíduos adultos imunocompetentes (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). A forma oligossintomática ou subclínica é caracterizada por sintomas discretos, tais como tosse, mal-estar, diarreia e discreta hepatoesplenomegalia também pode estar

presente. Essa condição clínica frequentemente evolui para a cura espontânea (BADARÓ et al., 1986). A forma clássica da LV é uma manifestação progressiva que normalmente apresenta um período de incubação de 2 semanas a oito meses, e em alguns casos, pode exibir sintomas após alguns anos da infecção inicial. Os sintomas característicos são febre irregular persistente e esplenomegalia; mas com o desenvolvimento da infecção são comuns perda de peso, pancitopenia, hepatomegalia e hipergamaglobulinemia, (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). Dentro de dois anos, sem tratamento, cerca de 75 a 95% das pessoas acometidas evoluem para a morte (READY, 2014), como resultado de infecções bacterianas secundárias e anemia grave (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). A doença apresenta maior gravidade em crianças, idosos e portadores de doenças imunossupressoras (DRIEMEIER et al., 2015).

A leishmaniose dérmica pós calazar é uma complicação que pode ocorrer após a cura clínica dos pacientes que apresentaram LV. É decorrente da progressiva proliferação do parasito na pele, ocasionando lesões nodulares no corpo, geralmente na região da face (READY, 2014). Ocorre principalmente na Índia e no Sudão, pela infecção com *L. (L.) donovani*. Raramente acontece em pessoas infectadas por *L. (L.) infantum*, e quando ocorre, estão associadas a imunossupressão (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). No Brasil, foram reportados casos raros de pós calazar, que estavam relacionados a coinfeção com HIV (BITTENCOURT et al., 2003; CARNAÚBA et al., 2009).

A coinfeção LV/HIV é reportada em mais de 35 países, com número de casos crescentes na Índia, Brasil e Etiópia (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018). Apresenta sintomas atípicos, tais como comprometimento gastrointestinal, renal e dos pulmões. Esplenomegalia, comum em pacientes com LV, pode estar ausente na coinfeção com HIV. Além disso, é comum a progressão dos sintomas do HIV (MENON et al., 2016), caracterizando uma condição de difícil tratamento (MURRAY et al., 2005).

Manifestações cutâneas atípicas associadas a *L. (L.) infantum* já foram relatadas no Norte da África, em regiões da Europa e nas Américas, principalmente na América Central, em pacientes que não apresentaram quadro de leishmaniose visceral anteriormente. A doença se manifesta tipicamente como pequenos nódulos cutâneos não ulcerados localizados na face e nas extremidades (BELLI et al., 1999; PONCE et al., 1991; SALVIONI et al., 2017). Os casos são, predominantemente,

autóctones e acometem hospedeiros imunocompetentes (THAKUR et al., 2018). Por outro lado, espécies de *Leishmania* classicamente associadas a manifestações cutâneas vem sendo reportadas como causadoras de leishmaniose visceral atípica (THAKUR et al., 2018). As principais espécies relatadas são: *L. (L.) tropica* em países como, Índia, Arábia Saudita, Irã, Quênia e Israel (KHANRA et al., 2012; MAGILL et al., 1993; ALBORZI, RASOULI e SHAMSIZADEH, 2006; MEBRAHTU et al., 1989; OREN et al., 1991; THAKUR et al., 2018), a espécie *L. (L.) major* relatada no Irã (KARAMIAN et al., 2007; THAKUR et al., 2018) e *L. (L.) amazonensis* no Brasil, como anteriormente citada neste trabalho (BARRAL et al., 1991; ALEIXO et al., 2006; THAKUR et al., 2018).

Como citado anteriormente, o cão representa o principal reservatório doméstico na transmissão da LV no Brasil. Os cães infectados com *L. (L.) infantum* podem exibir, desde a falta dos sinais clínicos, até manifestações variadas característicos da leishmaniose visceral canina (ALVAR et al., 2004). Interessantemente, os principais sinais clínicos nos cães são diferentes dos humanos e incluem lesões na pele, onicogribose e inflamação ocular. De forma semelhante aos humanos podem também apresentar perda de peso, apatia, linfadenomegalia, e comprometimento de órgãos, como fígado, baço, medula óssea e rim (ALVAR et al., 2004; VILAS et al., 2014).

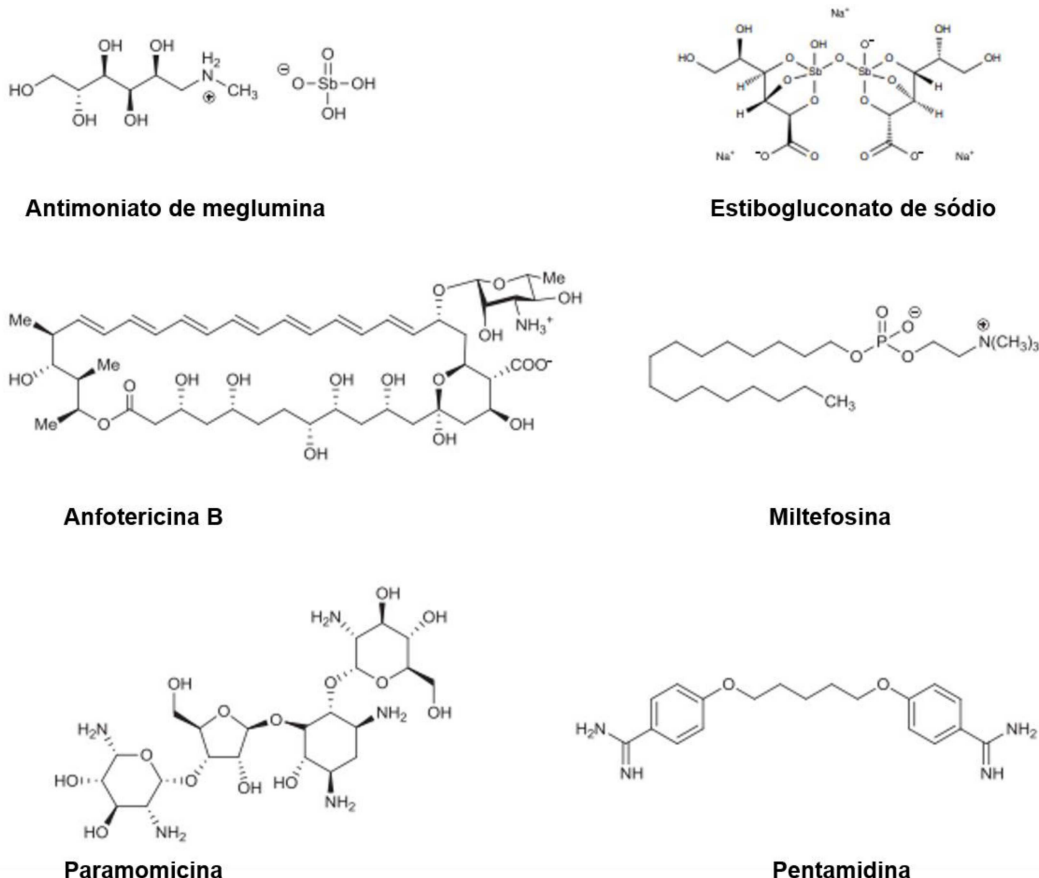
### 1.3 Tratamento

O tratamento atual das leishmanioses apresenta muitas limitações, relacionadas a terapia prolongada, administração parenteral, efeitos adversos intensos e o alto custo de algumas formulações (DE MENEZES et al., 2015). Pacientes sintomáticos de LV caso não recebam tratamento, na maior parte dos casos, evoluem para o óbito. No entanto, além das limitações do tratamento já citados, a eficácia dos fármacos com ação antileishmanial apresenta grande variabilidade, de acordo com a resposta imune do paciente, com a localização geográfica e a espécie de *Leishmania* adquirida, que acabam por diferenciar o critério e as recomendações do tratamento da LV nas diferentes regiões. Somada a essa complexidade do tratamento das leishmanioses, as indústrias farmacêuticas demonstraram, durante muito tempo, pouco interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, devido ao alto custo desse processo, e como essas doenças negligenciadas afetam

principalmente população de baixa renda e precisam ter preços acessíveis, não garantiam um bom retorno financeiro (TROUILLER et al., 2002).

Os antimoniais pentavalentes (Figura 7) são considerados a primeira linha do tratamento da LV em todo mundo, exceto em regiões onde foi reportada resistência parasitária (SUNDAR e AGARWAL, 2018), como em Bihar, Índia, em que 65% dos pacientes não responderam ao tratamento, devido à resistência parasitária (SUNDAR et al., 2000; TASLIMI, ZAHEDIFARD e RAFATI, 2016). Duas formulações parenterais são disponíveis, estibogluconato de Sódio (Pentostan) e antimoniato de meglumina (Glucantime) (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018). No Brasil, apenas o Glucantime é comercializado. Apresentam eficácia variada de acordo com a região e a espécie de *Leishmania* envolvida (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019; HALDAR, SEN e ROY, 2011).

O mecanismo de ação dos antimoniais não é totalmente esclarecido. Acredita-se que os antimoniais pentavalentes Sb (V), para exercerem expressivo efeito antileishmanial, precisam ser reduzidos para a forma trivalente Sb (III), que é mais ativa e tóxica. Essa conversão pode ocorrer pelo parasito na forma amastigota ou dentro dos macrófagos (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Os compostos parecem agir nas funções metabólicas do parasito intracelular, interferindo na glicólise e oxidação de ácidos graxos (MONZOTE, 2009). Estudos de mecanismos de ação também indicam a ação dos antimoniais sobre o sistema glutational/tripanonotona redutase, deixando o parasito mais susceptível ao estresse oxidativo (AMEEN, 2007; CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 1995). De forma complementar, pode induzir apoptose-like em amastigotas, via estresse oxidativo e aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (HALDAR, SEN e ROY, 2011; SUDHANDIRAN e SHAHA, 2003). Os antimoniais exibem graves efeitos adversos, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e pancreatite. Outros efeitos indesejáveis como vômitos, mialgia, letargia e dores abdominais estão associados a capacidade desses compostos em acumularem nos tecidos (DE MENEZES et al., 2015).



**Figura 7 - Estrutura dos fármacos utilizados para leishmaniose.** Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al., 2018.

Anfotericina B (Figura 7) é um antifúngico com potente atividade antileishmanial. É utilizado como terapia de primeira escolha em regiões com resistência a antimoniais pentavalentes (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018). A eficácia é bem alta, com poucos casos de resistência relatados, principalmente em pacientes imunocompetentes (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018).

O principal mecanismo de ação da anfotericina B tem como alvo o ergosterol, presente na membrana plasmática do parasito (TASLIMI, ZAHEDIFARD e RAFATI, 2016). Essa ligação leva a desorganização da membrana e a formação de poros, ocasionando o influxo de íons. Outro possível mecanismo, é a auto-oxidação do fármaco, produzindo radicais livres, que afetam o parasito (PURKAIT et al., 2012). A anfotericina B convencional apresenta muitos efeitos adversos, relacionados a sua administração intravenosa, além de nefrotoxicidade e miocardite, requerendo, em muitos casos, a hospitalização e monitoramento do paciente (CHAKRAVARTY e

SUNDAR, 2019; DE MENEZES et al., 2015). As formulações lipídicas, que foram desenvolvidas posteriormente, apresentam como vantagem, a menor toxicidade. Agem de forma direcionada em órgãos, como baço e fígado, permitindo a entrega de uma maior quantidade de fármaco e mais rapidamente (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019). No entanto, exibem alto custo para o completo tratamento do paciente (~3.000 dólares) se comparado com a anfotericina B convencional (~100 dólares) ou antimoniais pentavalentes (~ 200 dólares) (DE MENEZES et al., 2015). Além disto, apresentam instabilidade a altas temperaturas, dificultando a utilização em muitas regiões endêmicas (AMEEN 2007; DE MENEZES et al., 2015). Mesmo com os preços preferenciais oferecidos a países endêmicos por meio das negociações entre a Organização Mundial de Saúde e a indústria responsável, o tratamento permanece oneroso (NO, 2016).

A miltefosina (Figura 7) é o único medicamento oral disponível para o tratamento da LV. Inicialmente, seu uso foi aprovado na Índia e posteriormente, estendido para diferentes países, como Alemanha, Colômbia e Bangladesh (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018). Exibe variabilidade na eficácia em diferentes espécies de *Leishmania* e áreas geográficas (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019). A diminuição da eficácia foi relatada na Índia e Nepal, após anos de uso (GOYAL et al., 2018), levando a introdução da anfotericina B lipossomal como terapia de escolha para tratamento da LV no subcontinente indiano (CHAKRAVARTY e SUNDAR et al., 2018). Em estudos realizados no Brasil, baixa eficácia da miltefosina foi relatada em pacientes com *L. (L.) infantum* (CARNIELLI et al., 2018).

Em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com o Ministério da Saúde aprovaram o uso da miltefosina no Brasil para o tratamento da leishmaniose visceral canina (Milteforan™, Virbac). Estudos recentes demonstraram a melhora dos sinais clínicos de cães infectados tratados com Milteforan e redução da infectividade (NOGUEIRA et al., 2019). No entanto, apesar de promover melhora nos sinais e sintomas clínicos nos cães, a cura parasitológica não foi observada em estudos anteriores (ANDRADE et al., 2011).

O mecanismo de ação parece envolver vários alvos moleculares (DORLO et al., 2012). Interfere na modulação de receptores de superfície, na sinalização celular, e em processos que culminam na sua morte do parasito por apoptose-like (DORLO et al., 2012; MONZOTE et al., 2009). Alteração do potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA são alguns dos eventos observados no parasito

após tratamento com miltefosina (NO, 2016). Apresenta longo tempo de meia vida, favorecendo o surgimento de resistência ao medicamento (SUNDAR, CHAKRAVARTY e MEENA, 2018). Além disso, por exibir efeitos teratogênicos, é contraindicada em grávidas, e a contracepção é necessária, por no mínimo três meses, após o tratamento com esse fármaco (MONZOTE, 2009). Efeitos tóxicos gastrointestinais são comumente relatados (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019).

A paramomicina (Figura 7) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019). A formulação parenteral é comumente utilizada para o tratamento da LV, já que a administração por via oral é fracamente absorvida (NO, 2016). Pode ser utilizada isolada ou em associação com outro fármaco. Apresenta eficácia variada entre as diferentes regiões (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019).

O mecanismo de ação parece estar envolvido na inibição da síntese proteica, interferência na permeabilidade da membrana plasmática do parasito e disfunção mitocondrial (MONZOTE, 2009; HALDAR, SEN e ROY, 2011). Apesar da vantagem do baixo custo, exibe uma série de efeitos adversos, tais como, dor no local da aplicação, nefrotoxicidade e ototoxicidade (DE MENEZES et al., 2015).

A pentamidina (Figura 7) é atualmente utilizada como terapia de segunda escolha para a LV (NO, 2016), sendo uma alternativa em casos de falha no tratamento com os antimoniais pentavalentes (MONZOTE, 2009). Apresenta eficácia variável entre diferentes espécies de *Leishmania* e regiões. Na Índia, exibe eficácia reduzida no tratamento da leishmaniose visceral, não sendo mais recomendado seu uso no local (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019).

O mecanismo de ação está baseado na interferência na síntese de DNA do parasito, induzindo mudanças morfológicas no cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial (GOTO e LINDOSO, 2010). Pentamidina é altamente tóxica, desencadeando efeitos adversos, como hipoglicemia, hipotensão, miocardite, nefrotoxicidade e pancreatite associada a diabetes mellitus (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019; DE MENEZES et al., 2015).

Atualmente, a recomendação do tratamento da LV no Novo Mundo é baseada nos antimoniais pentavalentes, anfotericina B convencional ou lipossomal, dependendo das condições do paciente. Em casos de coinfeção com HIV, gravidez, comorbidades, falha renal ou hepática, entre outras situações, é preferido a anfotericina B lipossomal (PAHO, 2018). No subcontinente indiano é indicado o uso

da anfotericina B lipossomal em dose única ou em terapia combinada. Na Ásia Central e Região do Mediterrâneo a escolha terapêutica é a anfotericina B lipossomal, enquanto no leste da África é recomendada a associação de antimonial pentavalente com paramomicina. Casos de leishmaniose dérmica pós calazar na Índia são tratados com miltefosina ou com anfotericina B, enquanto na África, apenas casos mais severos são tratados, por meio dos antimoniais pentavalentes ou anfotericina B lipossomal (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2019).

Nos últimos anos, com as parcerias público-privadas entre órgãos como, a Organização Mundial de Saúde, instituições financeiras e as indústrias farmacêuticas, o interesse e financiamento para o desenvolvimento de novos fármacos para as doenças negligenciadas aumentou, no entanto, ainda tem sido considerado um processo de desenvolvimento lento e desigual (COHEN, STURGEON, COHEN, 2014). No processo de desenvolvimento de novos fármacos para a LV, a fase pré-clínica, associada a avaliação *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo*, é etapa fundamental antes de iniciar os ensaios em humanos. Nesse sentido, diferentes modelos murinos, como camundongos BALB/c e hamsters, são utilizados para avaliar a ação de novas moléculas e o aspecto imunológico da doença, embora nenhum deles reproduza com exatidão a leishmaniose visceral humana (BALAÑA-FOUCE et al., 2019). A susceptibilidade a infecção por *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum* no modelo murino está relacionada a resposta imune celular do tipo Th2, com o envolvimento de citocinas, como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10, associadas a progressão da doença (SAMANT et al., 2021). Estudo anterior demonstrou a ação da miltefosina em hamsters infectados com *L. (L.) donovani*, que levou a supressão da resposta Th2 e ao aumento dos níveis de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF, resultando no controle e cura da infecção nos animais (GUPTA et al., 2012).

#### **1.4 Morte celular em protozoários**

A morte celular pode ocorrer de forma acidental ou regulada (GALLUZI et al., 2018). A morte celular acidental ocorre por meio de danos físicos, químicos ou mecânicos, como alta temperatura, variação extrema de pH, ou tensão de cisalhamento, caracterizando uma morte imediata, sem o envolvimento de uma maquinaria molecular específica. A morte celular regulada depende de uma maquinaria molecular, podendo ser programada, diante de situações fisiológicas,



como desenvolvimento e renovação de tecidos, ou ser originada devido a perturbações no microambiente intracelular ou extracelular (BASMACIYAN e CASANOVA, 2019). Em relação aos aspectos morfológicos da célula, a morte celular pode ser classicamente dividida em três categorias: apoptose, necrose ou autofagia, sendo amplamente reconhecidas em metazoários (GALLUZZI et al., 2018). Durante muito tempo, os mecanismos de morte em protozoários foram pouco explorados, sendo considerados apenas processos não regulados. No entanto, a morte celular regulada em protozoários passou a ser reconhecida após a constatação de características bioquímicas e fenotípicas comuns aos processos de morte em metazoários (BASMACIYAN, AZAS e CASANOVA, 2017).

A apoptose é um tipo de morte celular regulada bem descrita na literatura em metazoários. Ocorre por meio de duas principais vias de iniciação: extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca envolve a interação de ligantes extracelulares a receptores de morte, tais como TNFR1 (“TNF receptor 1”) e CD95/Fas, localizados na superfície da célula alvo, induzindo caspases iniciadoras da apoptose como 8 e 10 (GALLUZZI et al., 2007). A via intrínseca depende, principalmente, de moléculas liberadas pela mitocôndria e fatores pró apoptóticos (BASMACIYAN, AZAS e CASANOVA, 2018). Estímulos promotores de morte, oriundos de diferentes locais, como núcleo, citosol e retículo endoplasmático, induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que por sua vez, libera proteínas do espaço intermembrana no citosol, como citocromo c, endonuclease G, proteínas Bcl2, entre outras. A proteína citocromo c promove ativação da caspase-9 iniciadora, enquanto a endonuclease G, independente de caspases, promove danos ao núcleo da célula (GALLUZZI et al., 2007). A partir desse ponto, as duas vias convergem e resultam em uma fase em comum, com a ativação de caspases 3, 6 e 7, que exibem ação proteolítica e clivam substratos específicos, desempenhando um processo importante na execução da apoptose (FISCHER, JÄNICKE, SCHULZE-OSTHOFF, 2003; GALLUZZI et al., 2007; MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014). A fase final da execução desse processo leva a alterações morfológicas nas células como, diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação de DNA, formação de corpos apoptóticos, despolarização mitocondrial e exposição de fosfatidilserina (HENRY, HOLLVILLE e MARTIN, 2013).

Em protozoários, muitas proteínas e eventos importantes da apoptose em metazoários, ainda não estão confirmados ou presentes, tais como caspases e

receptores de morte (BASMACIYAN, AZAS e CASANOVA, 2017). O envolvimento das metacaspases dos tripanossomatídeos, que exibem propriedades estruturais semelhantes a caspases de metazoários, ainda não está esclarecido no processo de morte celular (MENNA-BARRETO, 2019). Dessa forma, devido ao não esclarecimento de constituintes e eventos clássicos que ocorrem na apoptose em metazoários, o termo *apoptose-like* é considerado mais aceitável em protozoários (MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014). Características de *apoptose-like* vem sendo descritas por diversos autores, através da indução de estresse celular, por meio do tratamento com drogas, peróxido de hidrogênio e choque térmico (ALZATE et al., 2006; DAS, MUKHERJEE e SHAHA, 2001; PARIS et al., 2004;). A mitocôndria desempenha papel importante na iniciação da apoptose (MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014), assim como proteínas com papel funcional na apoptose também já foram relatadas em *Leishmania* spp., como a endonuclease G (BASMACIYAN e CASANOVA, 2019; MENNA-BARRETO, 2019). As principais características fenotípicas observadas na *apoptose-like* são fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina, despolarização da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c (MENNA-BARRETO, 2019).

Interessantemente, o processo de apoptose em *Leishmania* spp. também desempenha papel importante no estabelecimento, manutenção e disseminação da infecção no hospedeiro mamífero, via sinalização celular e exposição de fosfatidilserina (LÜDER et al., 2010). Promastigotas utilizam dessa estratégia para a infecção inicial em neutrófilos, e posteriormente em macrófagos. Nas primeiras horas de infecção, os neutrófilos são recrutados para o local da infecção, fagocitam o parasito e rapidamente entram em apoptose. Assim, os neutrófilos infectados funcionam como “cavalos de Troia”, ao recrutarem macrófagos, via sinalização celular, e ao expressarem fosfatidilserina, estimulando a fagocitose pelos macrófagos e o estabelecimento da infecção nesses (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Por sua vez, as formas amastigotas mimetizam células em apoptose, ao exporem a fosfatidilserina, garantindo a propagação da infecção pelas células do sistema fagocítico mononuclear (WANDERLEY et al., 2006). É importante ressaltar que o processo de apoptose induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , que inibem a atividade microbicida dos macrófagos e favorecem a persistência e manutenção da infecção (BASMACIYAN e CASANOVA, 2019).

Morte celular por necrose, por muito tempo, foi considerado apenas um evento não regulado ou acidental ocorrido por injúria. No entanto, estudos recentes em metazoários indicam que a necrose pode ocorrer de forma regulada, chamada necrose regulada ou necroptose (BERGHE et al., 2014; FUCHS e STELLER, 2015). A necroptose é induzida pela ligação de moléculas sinalizadoras, como TNF (“Tumor necrosis factor”) a diferentes receptores de morte, tal como TNFR1 (“TNF receptor 1”). Após essa ligação, RIPK1 (“receptor interacting protein kinases 1”) e RIPK3 (“receptor interacting protein kinases 3”) interagem resultando na formação de um complexo funcional, chamado necrossoma. RIPK3 promove a fosforilação e oligomerização de MLKL (“mixed lineage kinase domain-like”), que se transloca para a membrana plasmática e forma poros. Isso induz um influxo de íons de cálcio e sódio, ocasionando um aumento da pressão osmótica e a consequente ruptura da membrana plasmática (DHURIYA e SHARMA, 2018; FUCHS e STELLER, 2015). A necroptose pode ocorrer quando a apoptose está inibida, por inativação de caspases, ou para ativar a resposta imune, diante de infecções virais, bacterianas ou parasitárias, provocando a morte de células infectadas com os patógenos (BARBOSA et al., 2018). Importaneamente, as espécies reativas de oxigênio (EROS) também apresentam importância na formação do complexo necrossoma e na indução da necroptose (DHURIYA e SHARMA, 2018; ZHANG et al., 2017). As principais características de necrose e necroptose são inchaço das células e das organelas, vacuolização no citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular (FUCHS e STELLER, 2015; MENNA BARETO, 2019).

Em tripanossomatídeos a perda da integridade da membrana plasmática é a característica mais marcante de necrose, como resultado da indução de estresse químico ou físico. O estresse oxidativo também pode induzir necrose, ao interferir no potencial de membrana mitocondrial e na maior produção de EROs, que pode levar a peroxidação lipídica e lise celular (MENNA-BARRETO et al., 2019). Recentemente, estudos mostraram a importância da necrose regulada no controle da replicação de diferentes espécies de *Leishmania* spp. por macrófagos (LUZ et al., 2016; LUZ et al., 2018) e neutrófilos, representando uma nova estratégia na regulação da infecção por protozoários (BARBOSA et al., 2018).

Autofagia é um processo catabólico intracelular e regulado, em que ocorre a retenção de componentes da própria célula, como citosol e organelas, para a degradação e reciclagem nos lisossomos (ELMORE, 2007). Os três tipos de autofagia

atualmente descritos são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperona (MENNA BARRETO, 2019). A macroautofagia, também chamada autofagia, é um processo não seletivo e o mais comum, em que vesículas com dupla membrana chamadas autofagossomo englobam material intracelular para fusão, degradação e reciclagem dos componentes nos lisossomos (BRENNAND, RICO e MICHELS., 2012; ELMORE, 2007). Na microautofagia, o lisossomo engloba diretamente o material intracelular, formando vesículas com única membrana dentro dos lisossomos. Por último, a autofagia mediada por chaperona, considerado o processo mais seletivo de autofagia, em que moléculas específicas são degradadas pelos lisossomos após ligação com chaperonas (MENNA BARRETO, 2019). Estudos genéticos identificaram mais de 30 genes relacionados a autofagia (ATG). O gene ATG8 é amplamente utilizado para monitoramento de autofagia, por se manter associado a membrana do autofagossomo até a fusão e degradação nos lisossomos (BRENNAND, RICO e MICHELS., 2012).

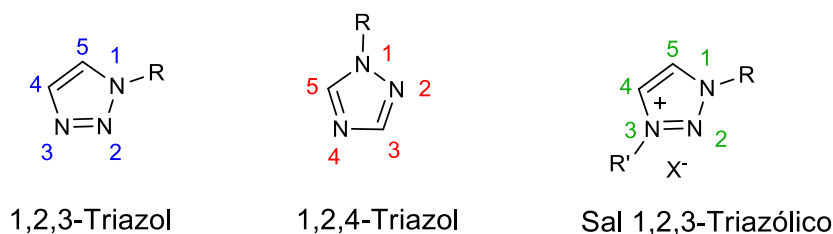
A autofagia pode ocorrer em diferentes processos fisiológicos como, privação de nutrientes, crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (PROTO, COOMBS e MOTTRAM, 2013). Também pode desempenhar papel importante nas células sob estresse e na homeostase mitocondrial, representando um mecanismo para tentar evitar a morte celular (ELMORE, 2007). No entanto, o constante estímulo de autofagia pode levar ao desequilíbrio homeostático e consequentemente a morte celular (MENNA-BARRETO, 2019). Ainda assim, a autofagia pode anteceder e ativar outros tipos de morte celular, como a apoptose (MARIÑO et al., 2014). A principal característica na morfologia de células em autofagia é o aumento da vacuolização, criando autofagossomos e autolisossomos (PROTO, COOMBS e MOTTRAM, 2013).

O processo de autofagia em *Leishmania* spp. pode estar associado a privação de nutrientes ou a diferenciação do parasito, como na metaciclogênese e na formação de amastigotas no hospedeiro mamífero. Além disso, a autofagia pode estar envolvida no aumento da virulência em *Leishmania* spp., sendo considerada um promissor alvo para novas terapias (BASMACIYAN et al., 2018). Estudo demonstrou que promastigotas de *L. major* com o gene ATG5 defeitivo, gene importante para a formação do autofagossomo dependente de ATG8, apresentaram redução na virulência e disfunção mitocondrial (WILLIAMS et al., 2012). No entanto, é importante

ressaltar que muitas ATGs presentes na via de metazoários ainda não foram encontradas em tripanossomatídeos (MENNA-BARRETO, 2019).

### 1.5 Triazóis

Triazóis são compostos orgânicos contendo anel aromático com 3 átomos de nitrogênio e dois de carbono. Existem duas formas isoméricas 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis, sendo o último mais pesquisado ao longo do tempo (Figura 8) (DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017; MELO et al., 2006). Variadas atividades biológicas do isômero 1,2,4-triazol foram reportadas na literatura, como antibacteriana, antioxidante, anticonvulsivante, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (SHNEINE e ALARAJI, 2016). Com a descoberta de métodos de obtenção mais eficientes, o isômero 1,2,3-triazol se tornou um protótipo atrativo (BOZOROV, ZHAO, AISA, 2019; MELO et al., 2006). Além disso, é considerado estável mesmo em ambientes oxidantes ou redutores, e como possuem propensão em formar ligação de hidrogênio, apresentam maior solubilidade, o que pode favorecer a ligação a alvos biomoleculares (DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017; FOREZI et al., 2021).



**Figura 8 - Estrutura dos triazóis e do sal 1,2,3 triazólico.** Fonte: próprio autor.

Diferentes atividades biológicas de derivados 1,2,3-triazóis foram reportadas na literatura, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e antiparasitária (ANGAJALA et al., 2016; DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017, GILANDOUST et al., 2018; PATIL et al., 2010; TIAN et al., 2018). Inclusive, derivados 1,2,3-triazóis com propriedades antibacterianas são atualmente comercializados (Cefatrizina e Tazobactam) (DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017; FOREZI et al., 2021).

Em relação à ação dos derivados 1,2,3-triazóis em *Leishmania* spp, também existem vários relatos na literatura (EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017). Derivado 1,2,3-triazol exibiu atividade em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* (CI<sub>50</sub> de 14,64 e 17,78 µM, respectivamente), sem interferir na viabilidade dos macrófagos peritoneais (CC<sub>50</sub> de 547,88 µM) (ALMEIDA-SOUZA et al., 2020). Em outro estudo, a inserção do grupo 1,2,3-triazol na molécula de tiosemicarbazona, melhorou a atividade em *L. major* (CI<sub>50</sub> em promastigotas= 0,14 µM e CI<sub>50</sub> em amastigotas= 1,0 µM), mantendo os efeitos não tóxicos sobre as células Vero (CC<sub>50</sub>= 508,8 µM) (TEMRAZ et al., 2018). Outro trabalho demonstrou a atividade de 1,2,3-triazol conjugado sob formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani* (CI<sub>50</sub> = 16,4 e 8,3 µM, respectivamente), no entanto exibiu efeito tóxico sobre as células THP1 (CC<sub>50</sub> de 10,10 µM) (TARAWNEH et al., 2018).

Também podem ser obtidos sais de triazóis (Figura 8), os quais podem exibir maior solubilidade e biodisponibilidade que os precursores não iônicos (EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017). Estudos anteriores demonstraram a melhora das atividades antibacteriana, antiviral e antitumoral com a formação de sais de triazóis (CHALLA et al., 2012; COLE et al., 2011, ZHAO et al., 2012;). Apesar das propriedades físico-químicas vantajosas dos sais, as atividades biológicas ainda são pouco exploradas, incluindo em *Leishmania* spp (DE SOUZA-FAGUNDES et al., 2018; EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017, FLETCHER et al., 2018). Nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados promissores com a pesquisa de derivados triazóis ou seus sais (GLANZMANN et al., 2018; STROPPIA et al., 2017). Em um desses estudos, um sal 1,2,3 triazólico funcionalizado com hidroxila e com 10 átomos de carbono na cadeia lateral exibiu expressiva atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (CI<sub>50</sub>= 15,6 e 1,0 µM, respectivamente), com baixo efeito tóxico sobre macrófagos murinos (CC<sub>50</sub>= 115,9 µM) (STROPPIA et al., 2017). Além disso, por meio de estudos de modo de ação, foi possível verificar que a morte celular de promastigotas tratadas com esse sal foi mediada via apoptose-like e necrose (STROPPIA et al., 2017).

Esses promissores resultados estimularam a realização deste presente trabalho, que se dedicou a avaliar o efeito do tamanho da cadeia lateral, dos diferentes grupos funcionais e ânions na estrutura e a ação dos novos compostos sobre as espécies associadas a manifestação visceral da doença. Inicialmente, a triagem foi

realizada com a espécie *L. (L.) amazonensis*, sendo que o uso da cepa *L. (L.) amazonensis* transfectada com a proteína fluorescente vermelha (RPF) permitiu avaliar a ação de todos os compostos, por meio de fluorimetria, na forma amastigota intracelular, de maneira mais rápida e sem utilizar a contagem manual do parasito. Assim, o composto selecionado na triagem foi avaliado na espécie *L. (L.) infantum*, classicamente associada a leishmaniose visceral e, posteriormente, realizados os estudos de modo de ação sobre o parasito e efeito no modelo murino de leishmaniose visceral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de derivados de 1,2,3-triazóis e seus sais em *Leishmania* spp., assim como a toxicidade em células de mamíferos. Selecionar o composto mais promissor para estudos de modo de ação, *in silico*, e no modelo murino de leishmaniose visceral.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a toxicidade dos triazóis e seus sais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;

2.2.2 Realizar a triagem dos triazóis e seus sais em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*;

2.2.3 Avaliar a relação entre a estrutura e a atividade dos compostos;

2.2.3 Selecionar o composto mais promissor biologicamente e quimicamente dentre os testados;

2.2.4 Avaliar o efeito do composto selecionado sob formas promastigotas e amastigotas de diferentes cepas de *L. (L.) infantum*;

2.2.5 Determinar a toxicidade do composto selecionado em eritrócitos humanos;

2.2.6 Realizar estudos de modo de ação do composto selecionado em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, relacionados a estudos de apoptose-like, autofagia e necrose;

2.2.7. Realizar análise ultraestrutural de promastigotas tratadas com o composto selecionado por meio de microscopia eletrônica de transmissão;

2.2.8 Avaliar a ação do composto selecionado sob a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em macrófagos infectados e não infectados com *L. (L.) infantum*;

2.2.9 Realizar a dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*

2.2.10 Realizar estudos *in silico* sobre a biodisponibilidade oral e propriedades farmacocinéticas do composto selecionado;

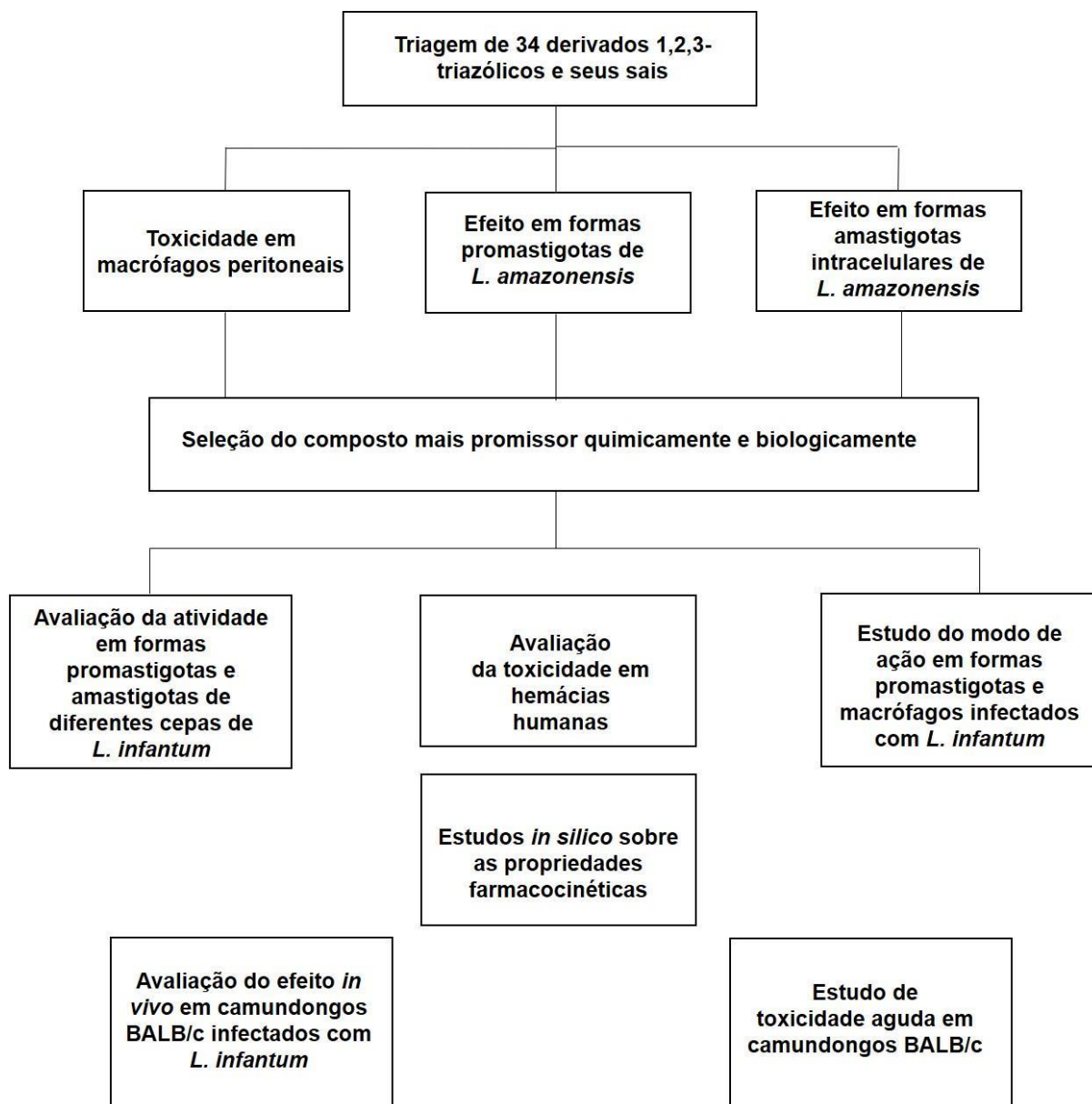


2.2.11 Avaliar a ação do composto selecionado no modelo murino de leishmaniose visceral experimental;

2.2.12 Avaliar a toxicidade aguda do composto selecionado em camundongos BALB/c;

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Desenho Experimental

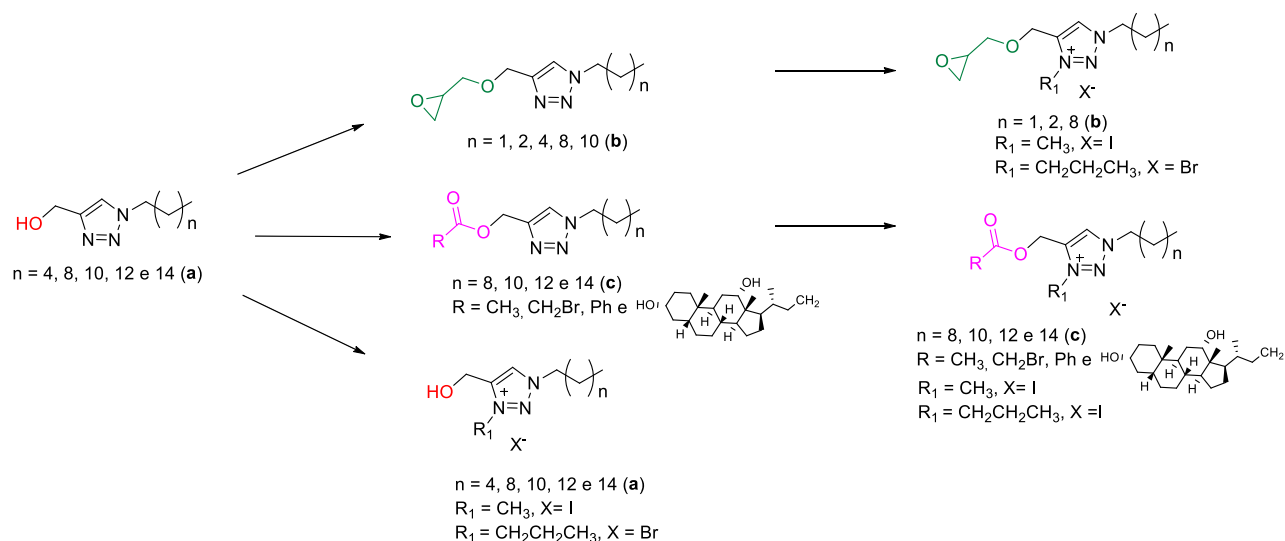


### 3.2 Compostos sintéticos

Neste trabalho foram testados 34 derivados 1,2,3-triazólicos e seus sais correspondentes, sintetizados pelo grupo do Professor Adilson David da Silva do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para melhor compreensão dos diferentes grupos ligados ao anel triazólico, os compostos foram divididos em triazóis funcionalizados com hidroxila (a),

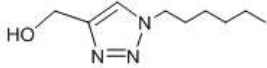
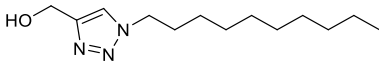
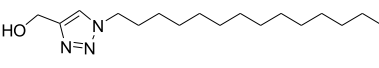
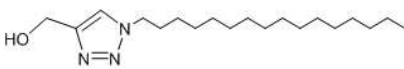
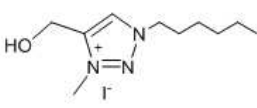
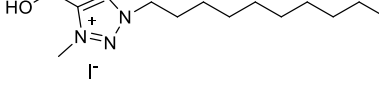
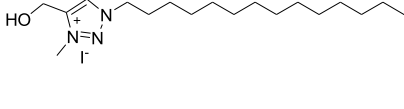
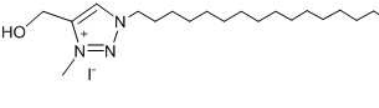
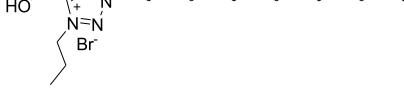
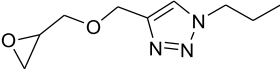
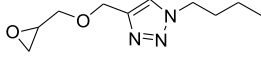
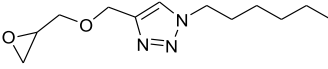
funcionalizados com epóxido (**b**) e ésteres (**c**) (Tabela 1). Os derivados triazólicos funcionalizados com hidroxila (**a**) foram precursores dos demais compostos sintetizados. Os sais, que apresentam cátion e ânion em suas estruturas, foram sintetizados a partir de seus precursores não iônicos (Figura 9).

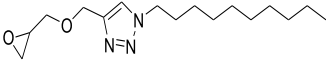
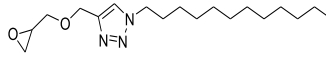
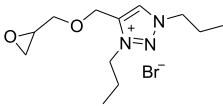
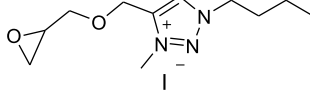
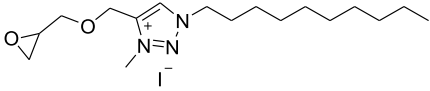
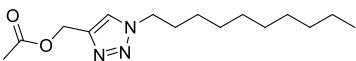
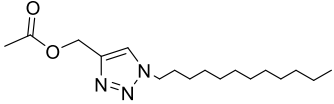
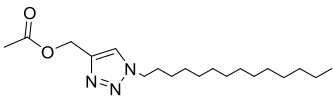
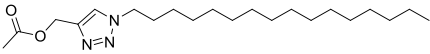
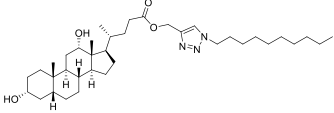
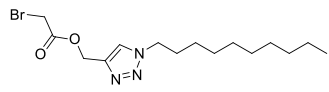
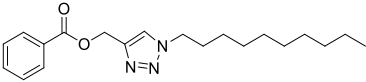


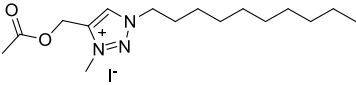
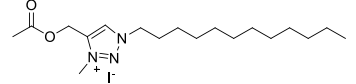
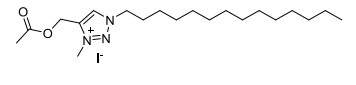
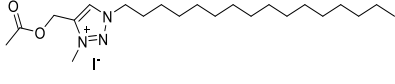
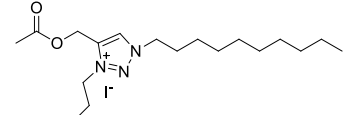
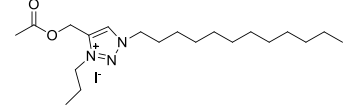
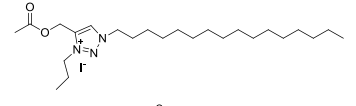
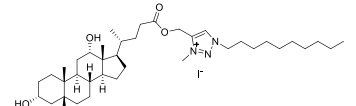
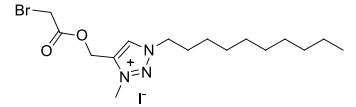
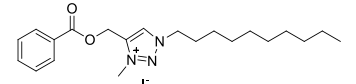
**Figura 9 - Desenho esquemático da síntese dos derivados e sais triazólicos.** Fonte: próprio autor

Os derivados triazólicos funcionalizados com hidroxila (**a**) foram obtidos através da reação “click” entre diferentes azidas alifáticas e álcool propargílico. Os compostos funcionalizados com o grupo epóxido (**b**) foram obtidos através de reações de substituição nucleofílica entre os precursores hidroxilados e epícloridrina. O grupo dos ésteres triazólicos (**c**) foram obtidos através de reações de esterificação entre os precursores hidroxilados e diferentes ácidos carboxílicos. No entanto, os ésteres que contém o grupo acetila (**18-21c**) foram obtidos através de reação de acetilação entre os precursores hidroxilados, anidrido acético e piridina. Finalmente, os sais de triazóis (**5a-9a; 15b-17b; 25c-34c**) foram obtidos através de reações de N-alquilação entre os diferentes precursores e haletos orgânicos (iodometano, iodopropano e bromopropano) (MEINEL et al., 2020).

Tabela 1. Estrutura química dos compostos 1,2,3-triazólicos e seus sais correspondentes

Compostos sintéticos	Estrutura
1a	
2a	
3a	
4a	
5a	
6a	
7a	
8a	
9a	
10b	
11b	
12b	

Compostos sintéticos	Estrutura
13b	
14b	
15b	
16b	
17b	
18c	
19c	
20c	
21c	
22c	
23c	
24c	

Compostos sintéticos	Estrutura
25c	
26c	
27c	
28c	
29c	
30c	
31c	
32c	
33c	
34c	

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

### 3.3 Cultivo do parasito

Neste trabalho, foram utilizadas as seguintes espécies de *Leishmania*: (i) *L. (L.) amazonensis* cepa IFLA/BR/1967/PH8 isolada do flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata* em Belém-PA; (ii) *L. (L.) amazonensis* cepa IFLA/BR/1967/PH8 transfectada com o gene da proteína vermelha fluorescente RFP; (iii) *L. (L.) infantum* cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 isolada de humano com LV no Marrocos; (iv) *L. (L.) infantum chagasi* cepa MCAN/BR/2008/1112 isolada de cão naturalmente infectado e

(v) *L. (L.) infantum* cepa MCAN/BR/2008/OP46 isolada de um cão naturalmente infectado e sintomático para LV proveniente da cidade de Governador Valadares- MG.

As formas promastigotas das cepas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/68/PH8), *L. (L.) infantum chagasi* (MCAN/BR/2008/1112) e *L. (L.) infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram cultivadas em meio Warren [Meio BHI-Infusão de cérebro e coração bovino (M210) (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) -acrescido com hemina (H9039) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) e ácido fólico (F7876) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA)] suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (000063) (Cultilab, SP, Brasil) e 0,1 % de solução de penicilina 10.000 U.I./mL e estreptomicina 10 mg/mL (P4333) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA). No cultivo da cepa *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2008/OP46), foi utilizado 10% de urina masculina estéril e 20 % de SFB. *Leishmania amazonensis* -RFP foi mantida em meio 199 (AT014) (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) e suplementada com 10 % de SFB, 0,5 % solução de vitaminas (11120-052) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) e de 0,1% de solução de penicilina 10.000 U.I./mL e estreptomicina 10 mg/mL. As culturas foram mantidas a 25°C e os repiques realizados 2x por semana.

### **3.4 Manutenção da infectividade do parasito**

Para a manutenção das cepas de *Leishmania* spp. foram utilizados camundongos BALB/c. Para a infecção com as cepas de *L. (L.) amazonensis* foi inoculado, na pata traseira, 50 µL de uma solução contendo  $2 \times 10^6$  promastigotas, na fase estacionária do crescimento, em PBS. Após 4-6 semanas, foram realizadas punções para retirar as formas amastigotas. Para a infecção com as cepas de *L. (L.) infantum*, 100 µL de uma solução contendo  $10 \times 10^7$  promastigotas, na fase estacionária do crescimento, em PBS, foi inoculada intraperitonealmente. Após 20 dias, foi realizada a eutanásia dos camundongos, e realizada a remoção do baço e do fígado para isolar as formas amastigotas. As formas amastigotas obtidas dos dois processos foram cultivadas, nos respectivos meios de cultura, suplementados com 20% de SFB e 1% de solução antibiótica e mantidas a 25°C para a conversão das formas amastigotas em promastigotas.

### **3.5 Ensaio *in vitro***

### 3.5.1 Ensaios de toxicidade em macrófagos peritoneais murinos

Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com 2 mL de tioglicolato de sódio 3% (108190) (Merck, Darmstadt, Alemanha), 72 horas antes da eutanásia. Em seguida, foram eutanasiados para a realização do lavado peritoneal, onde foram injetados 6 mL de solução de Hank's estéril (H6136) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) no peritônio de cada animal e repetido este processo uma vez. A solução obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 1200 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) por 10 minutos, e as células foram ressuspendidas em meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram suspensas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB e 0,5% de penicilina/estreptomicina, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL e foram transferidas para placas de 96 poços. As placas permaneceram por 24 horas em estufa com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37°C, para a adesão dos macrófagos. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações, a partir de 150 µM. As placas foram transferidas novamente para estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, onde permaneceram por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 10 µL de MTT a 5 mg/mL (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio) (M5655) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) (MOSMANN, 1983). Após 2 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/HCl (solução a 0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os testes foram realizados em duplicatas e em alguns poços não houve adição de compostos (controle). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de células viáveis comparado ao controle sem tratamento. A CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células) de cada composto foi determinada com o auxílio do programa GraFit5.

### 3.5.2 Efeito dos compostos em formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Placas de 96 poços foram preenchidas com meio de cultura Warren suplementado com 10 % de SFB e 0,5 % de penicilina/estreptomicina. Em seguida, os compostos foram adicionados e diluídos seriadamente, a partir de 100 µM. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/68/PH8), e de *L. (L.) infantum*, em



fase exponencial de crescimento, foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas a concentração de  $2 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  células/mL, respectivamente, e incubadas em BOD (Fanem, SP, Brasil) por 72 h a 25°C, juntamente com os compostos. Após esse período, foi adicionado MTT a 5 mg/mL durante 4 h a 25°C. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de isopropanol/HCl (solução a 0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do crescimento de promastigotas comparado ao controle sem adição de compostos. A  $CI_{50}$  (concentração inibitória do crescimento de 50% das células) de cada composto foi determinada com o auxílio do programa GraFit5.

### **3.5.3 Efeito dos compostos em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp.**

Para avaliar o efeito dos compostos em amastigotas intracelulares foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos conforme descrito no item 3.5.1. Macrófagos foram adicionados em placas de 24 poços, por 24 h a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após lavagem com PBS para retirar os macrófagos que não aderiram, promastigotas de *L. (L.) amazonensis*-RFP foram adicionadas (na proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago) e incubados por 4 h a 33°C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram lavadas 2x com PBS e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações em meio RPMI suplementado com 10 % de SFB e 0,5 % de penicilina/estreptomicina e incubadas por 72 h. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) no comprimento de onda excitação/ emissão de 540-600 nm e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle sem tratamento.

Os ensaios em amastigotas de *L. (L.) infantum* foram realizados em placas de 24 poços com lamínulas de vidro de 13 mm. Após adesão dos macrófagos, promastigotas de *L. (L.) infantum* foram adicionadas por 24 h a 37°C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>. A cepa *L. (L.) infantum* ITMAP 263 foi adicionada na proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago, e as demais cepas (OP46 e MCAN) na proporção 15:1. Após esse período, as placas foram lavadas 4x com PBS e os compostos foram adicionados em meio RPMI com 0,5 % de penicilina/estreptomicina e 2% de soro de cavalo (SC) (630112) (Laborclin, Paraná, Brasil) para as cepas OP46 e MCAN, e 4%

de SC para a cepa ITMAP 263 por 72 h. O soro de cavalo foi utilizado para eliminar as promastigotas que não foram fagocitadas e que, apesar das lavagens com PBS, não foram retiradas (TEGAZZINI et al., 2016). As lamínulas foram coradas com Giemsa e desidratadas em acetona/xilol, na sequência: acetona 100%, acetona 90%/xilol 10%, acetona 50% xilol 50%, acetona 10% xilol 90% e xilol 100%. Foram contadas 200 células no total, especificando as células não infectadas, infectadas e o número de amastigotas.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle sem tratamento. O  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos intracelulares) foi determinado utilizando o programa Probit.

#### **3.5.4 Determinação do índice de seletividade**

O índice de seletividade (IS) é utilizado para determinar a toxicidade do composto para o parasito quando comparado a célula hospedeira. O IS é calculado pela razão entre a  $CC_{50}$  em macrófagos peritoneais e a  $CI_{50}$  em formas promastigotas ou amastigotas do parasito (DE MUYLDER et al., 2011). Nesse trabalho, foi determinado o índice de seletividade para formas amastigotas, por ser a forma do parasito clinicamente relevante.

#### **3.5.5 Ensaios de toxicidade em hemácias de humanos**

Sangue O<sup>+</sup> de doador saudável foi coletado e colocado em tubos contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos) e o plasma foi descartado. Os eritrócitos foram lavados 4x com PBS e foi feita uma solução estoque de 50% das hemácias. O teste foi realizado em placas de 96 poços e os compostos foram adicionados a partir de 300  $\mu$ M, em hemácias a 1% por 24 h a 37°C. Como controles negativo e positivo, foram utilizados o PBS e SDS a 0,01%, (Dodecil Sulfato de Sódio) (L3771) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) respectivamente. Após esse tempo, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e 50  $\mu$ L do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 540 nm (DAGNINO et al., 2018). A porcentagem de hemólise foi calculada como = (Média da absorbância dos tratados - Média da

absorbância controle negativo/ Média da absorbância controle positivo - Média da absorbância controle negativo) x 100.

### **3.5.6 Ensaios de modo de ação do composto 25c sobre promastigotas de *L. (L.) infantum* ITMAP 263**

#### **3.5.6.1 Análise da alteração do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em promastigotas**

A alteração do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* foi analisada por meio dos reagentes JC-1 (T4069) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) e Rodamina 123 (R8004) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA).

O JC-1 é um corante catiônico, que acumula na mitocôndria, proporcionalmente ao potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Exibe a forma de monômero e fluorescência verde, mas quando acumulado na mitocôndria, forma J-agregados e apresenta fluorescência vermelha. A divisão entre a intensidade de fluorescência vermelha e verde é indicadora do potencial de membrana mitocondrial nas células (de acordo com instruções do fabricante). Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  (referente ao valor de  $CI_{50}$  *in vitro* após 72 h de tratamento) por 6, 24 e 72 h a 25°C. Após esses tempos, as células foram lavadas 2x com PBS, ressuspensas em 1 mL de solução de Hank's na concentração de  $5 \times 10^6$  promastigotas/mL e incubadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de JC-1 por 30 minutos a 37°C, sob proteção de luz. Após a incubação, promastigotas foram lavadas 3x com solução de Hank's e ressuspensas em 1 mL da mesma solução. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  do material celular foi transferido para uma placa negra de 96 poços e de fundo transparente e a leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) com os comprimentos de onda de excitação/emissão 485/528 nm (fluorescência verde) e 485/600 nm (fluorescência vermelha). Promastigotas tratadas por 20 minutos a 25°C com FCCP (1 $\mu\text{M}$ ) (C2920) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA), desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, foram utilizadas como controle positivo (ANTINARELLI et al., 2015). Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. Em paralelo, parte das células foram adicionadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (0,01%) e fixadas com paraformaldeído a 4 %. Em seguida, as células

foram lavadas 3x com PBS, e adicionadas sobre antifage em lâminas de vidro devidamente identificadas. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando os filtros FITC e TRITC, e fotografadas (câmera Olympus DP73).

A rodamina 123 é um corante catiônico que apresenta fluorescência verde e acumula em mitocôndrias ativas (de acordo com instruções do fabricante). Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  por 72 h a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS e ajustadas à concentração de  $10 \times 10^6$  promastigotas/mL. Em seguida foram incubadas com Rodamina 123 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  por 20 minutos, a temperatura ambiente, sob proteção de luz. Como controle positivo, foram utilizadas promastigotas após tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de FCCP por 20 min a 25°C. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm.

### **3.5.6.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total e mitocondrial em promastigotas**

Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  por 6, 24 e 72 h a 25°C. Após esses tempos, as células foram lavadas 2x com PBS e ajustadas à concentração de  $2 \times 10^7$  promastigotas/mL. Para determinar a produção de EROs total foi utilizada a sonda H<sub>2</sub>DCFDA (D399) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). O marcador H<sub>2</sub>DCFDA é não fluorescente, mas quando em presença de esterases intracelulares e EROs exibe um produto fluorescente (de acordo com instruções do fabricante). Dessa forma, promastigotas foram incubadas com esse reagente a 20  $\mu\text{M}$  por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Miltefosina (0445218-7) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA) a 7,81  $\mu\text{M}$  (referente ao valor de  $\text{CI}_{50}$  *in vitro* após 72 h de tratamento) foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm (ANTINARELLI et al., 2015).

Com o objetivo de quantificar o superóxido mitocondrial, foi utilizado o marcador MitoSox (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Uma vez na mitocôndria, o marcador MitoSox é oxidado pelo superóxido, produzido pela cadeia transportadora de elétrons, e exibe fluorescência vermelha (de acordo com instruções do fabricante). Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55 µM por 24 h a 25°C. Após esse período, as células foram lavadas 2x com PBS, ajustadas a concentração de  $2 \times 10^7$  promastigotas/mL e incubadas com o MitoSox a 5 µM por 20 minutos, a temperatura ambiente, sob proteção de luz. Antimicina A, um inibidor da cadeia respiratória mitocondrial, a 10 µM, incubada por 24 h com promastigotas, foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/ emissão de 540/600 nm (SAINI et al., 2017).

### **3.5.6.3 Avaliação do efeito de antioxidante sobre a produção de EROs totais e do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas**

Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram pré incubadas com o N-acetil-cisteína (NAC) (A7250) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) a 300 µM por 1h a 25°C (FONSECA-SILVA et al., 2016). Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio contendo ou não o composto **25c** a 4,55 µM por 72 h a 25°C. O restante do protocolo foi realizado da mesma maneira para determinação de EROs totais (H<sub>2</sub>CDFDA) e do potencial de membrana mitocondrial (JC-1).

### **3.5.6.4 Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos em promastigotas**

Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55 µM por 72 h a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS, e ajustadas a concentração de  $10 \times 10^6$  promastigotas/mL. As células foram incubadas com o corante Nile Red (19123) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) a 10 µg/mL, por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob proteção de luz. Nile red, corante lipofílico, é utilizado para detectar e quantificar lipídeos dentro das células, principalmente os neutros (de acordo com

instruções do fabricante). A miltefosina, a 7,81  $\mu\text{M}$ , foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm (MENDES et al., 2016).

### **3.5.6.5 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas**

Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  por 6, 24 e 72 h a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS, e ajustadas a concentração de  $10 \times 10^6$  promastigotas/mL. Em seguida, foram incubadas com o reagente iodeto de propídeo (PI) (P4864) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) a 1  $\mu\text{g/mL}$ , por 15 minutos a temperatura ambiente, sob proteção da luz. O reagente PI é um corante vermelho, que apresenta afinidade pelo DNA, se intercalando entre as bases nitrogenadas. Não é permeável pela membrana plasmática de células viáveis, por isso, quando interage com o DNA, é um indicador de perda permeabilidade da membrana plasmática (de acordo com instruções do fabricante). Como controle positivo, foram utilizadas promastigotas aquecidas a 65°C por 10 minutos. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA), nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 540/600 nm (ANTINARELLI et al., 2015).

A integridade da membrana plasmática também foi avaliada por citometria de fluxo FACSCANTO II, equipado com BD FACS DIVA software. Um total de 10000 eventos foram adquiridos utilizando o canal PE.

### **3.5.6.6 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas**

Anexina V conjugada com FITC (A13199) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) foi utilizada para detectar a externalização de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática de células em apoptose. Foi utilizada em combinação com PI para diferenciar a população de células apoptóticas e não apoptóticas (de acordo com instruções do fabricante). Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o

composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  por 72 h a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS, e ajustadas a concentração de  $2 \times 10^6$  promastigotas/mL em tampão de ligação, constituído por 10 mM HEPES, 150 mM NaCl e 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ . As células foram incubadas com 1  $\mu\text{L}$  de anexina V-FITC, por 15 minutos, a temperatura ambiente, sob proteção de luz. Em seguida, foram marcadas com PI a 1  $\mu\text{g/mL}$ , por 15 minutos, sob ausência da luz. Como controle positivo foram utilizadas promastigotas tratadas com a miltefosina a 7,81  $\mu\text{M}$ . Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. A leitura foi realizada por citometria de fluxo FACSCANTO II, equipado com BD FACS DIVA software (ANTINARELLI et al., 2018).

### 3.5.6.7 Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas

Para avaliar a fragmentação de DNA em promastigotas foi utilizado o método TUNEL por meio do kit comercial de Detecção de morte celular *in situ*, fluoresceína (Roche). Essa técnica consiste em uma reação enzimática, que catalisa a incorporação de nucleotídeos marcados na extremidade 3'-OH de fragmentos de DNA (de acordo com instruções do fabricante). Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  por 72 h a 25°C. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS e ajustadas a concentração de  $2 \times 10^7$  em 1mL de PBS. Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % por 1 h, em seguida foram lavadas 1x com PBS. No próximo passo, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 em Citrato de Sódio 0,1 % por 2 minutos no gelo, e lavadas com 1x com PBS. Assim, foi adicionada a mistura de reação TUNEL (5 $\mu\text{L}$  da enzima e 45  $\mu\text{L}$  da solução de marcação) por 60 minutos a 37 °C. As células foram novamente lavadas com PBS, e transferidas para placa negra de 96 poços e de fundo transparente. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA), nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm. Como controle positivo foram utilizadas promastigotas tratadas com DNase I a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Em paralelo, parte das células foram adicionadas em lâminulas previamente tratadas com poli-L-lisina (0,01%), fixadas com paraformaldeído 4 % e marcadas com DAPI a 1  $\mu\text{g/mL}$  por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas 5x com PBS, e adicionadas sobre antifage em lâminas de vidro devidamente identificadas. As lâminas foram

analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando os filtros DAPI e FITC, e fotografadas (câmera Olympus DP73).

### 3.5.6.8 Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos em promastigotas

Promastigotas de *L. (L.) infantum*, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  72 h a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas 2x com PBS e ajustadas a concentração de  $10 \times 10^6$  promastigotas/mL em lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina a 0,01 % por 20 minutos. Após sucessivas lavagens com PBS, foi adicionado o paraformaldeído a 4 % para a fixação das células. Posteriormente, as células foram lavadas 3x com PBS e incubadas com 100  $\mu\text{M}$  de monodansilcadaverina (MDC) por 60 minutos a 25 °C. MDC acumula preferencialmente em vacúolos autofágicos (BIEDERBICK et al., 1995). Em paralelo, foi incluído outro grupo de células que foram pré-incubadas com o inibidor de autofagia, 3-metiladenina (3-MA) (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por duas horas antes do tratamento. Em seguida, as células foram lavadas 5x com PBS, e adicionadas sobre antifage em lâminas de vidro devidamente identificadas. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando o filtro DAPI e fotografadas (câmera Olympus DP73). Como controle positivo foram utilizadas promastigotas cultivadas em PBS por 72 h (estivação).

### 3.5.6.9 Avaliação ultraestrutural de promastigotas

Promastigotas de *L. (L.) infantum* ITMAP-263, em fase exponencial de crescimento, foram não tratadas ou tratadas com o composto **25c** a 4,55  $\mu\text{M}$  72 h a 25°C. Em seguida foram fixadas em uma mistura de aldeídos recém-preparados (1% paraformaldeído e 1% glutaraldeído) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 1 h em temperatura ambiente (MELO, 1999). As células foram lavadas 2x com o mesmo tampão, e incorporadas em ágar fundido a 2 % em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3. Essa incorporação fornece preservação celular ideal pela redução de artefatos e perda de células durante a manipulação da amostra. Em seguida, pellets de ágar contendo os parasitos foram processados conforme descrito (TOLEDO et al., 2016). As amostras foram rapidamente fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão "Sym-Collidine", pH 7,4, por 2 h em temperatura ambiente. Após lavagem com tampão



maleato de sódio, pH 5,2, as amostras foram coradas *in bloc* com acetato de uranila a 2% em tampão maleato de sódio 0,05 M, pH 6,0, por 2 h à temperatura ambiente e lavados com o mesmo tampão. Em seguida, as células foram desidratadas em gradiente de etanol, infiltradas e incorporadas em óxido de propileno/Epon (resina Eponate 12; Ted Pella, Redding, CA). Após polimerização a 60 °C por 16 h, foram feitos cortes finos utilizando navalha de diamante em ultra-micrótomo (Leica, Bannockburn, IL). As seções foram montadas em telas de cobre de 200 mesh (Ted Pella, Redding, CA), contrastadas com citrato de chumbo e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Tecnai G2 Spirit, FEI / Thermo Fisher; Waltham MA, EUA) a 80 kV.

Para estudar os aspectos ultraestruturais de promastigotas de *L. (L.) infantum* ITMAP-263, micrografias eletrônicas foram tiradas aleatoriamente em ampliações de 30.000–75.000 x. Um total de 151 seções de parasitos tratados com composto **25c** (82 seções de células) e não tratados (69 seções de células) foram analisadas em micrografias eletrônicas. Todos os estudos quantitativos foram feitos usando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Primeiro, os parâmetros de tamanho e forma de promastigotas (área e circularidade) foram medidos. A circularidade celular foi obtida usando o software pelo  $4 \pi \times$  (área total da célula/perímetro da membrana celular ao quadrado), em que os valores encontrados mais próximos ou distantes de um indicam que a célula se encaixa em uma forma mais circular ou alongada, respectivamente (BROEKE, 2015). Em seguida, as áreas mitocondriais foram medidas e a proporção do citoplasma ocupado pela mitocôndria em cada célula foi adquirida. Além disso, foram investigadas possíveis alterações morfológicas qualitativas na mitocôndria, citoplasma, núcleo e membrana plasmática.

### **3.5.7 Estudo do modo de ação do composto 25c sobre macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* ITMAP 263**

#### **3.5.7.1 Determinação dos níveis de EROs em macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum***

Macrófagos peritoneais, obtidos conforme item 3.4.1, foram adicionados em placas de 96 poços e incubados em estufa a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 24 h. Os macrófagos foram não infectados ou infectados com *L. (L.) infantum* na proporção de

10 para 1 macrófago por 24 h. Após esse período, as placas foram lavadas 4x com PBS, e o composto **25c** a 7,92  $\mu\text{M}$ , foi adicionado em meio RPMI, suplementado com 4 % de soro de cavalo e 0,5 % de solução antibiótica por 72 h. As placas foram lavadas 2x com PBS e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  foi adicionada e incubada por 60 minutos a 37°C. Miltefosina, a 7,81  $\mu\text{M}$ , foi utilizada como controle positivo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm.

### **3.5.7.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* ITMAP 263**

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada no sobrenadante de macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum*. O método de Griess foi utilizado para determinar a concentração de nitrito, que é um subproduto estável de NO.

Após 72 horas de incubação, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram retiradas dos poços contendo macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum*, tratados ou não com o composto **25c** a 7,92  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo foi utilizado 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS com 1  $\text{ng}/\text{mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ , obtido de sobrenadante de células L1210. Os sobrenadantes recolhidos foram incubados com 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (25  $\mu\text{l}$  de Sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5% e 25  $\mu\text{l}$  de N-(1-naftil) etilenodiamina diidrocloreto a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%) por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (SpectraMax 190) e a produção de nitrito foi determinada através da curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

### **3.5.7.3 Determinação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-10 (IL-10) em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* ITMAP 263**

A dosagem dos níveis de TNF e IL-10 foi realizada em sobrenadante de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*, não tratados ou tratados com o composto **25c** a 7,92  $\mu\text{M}$  por 72 h. Para isso foi utilizado o método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando ABTS, por meio dos kits da Peptotech (TNF- $\alpha$  #900-k54 e IL-10 #900-k53), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, os anticorpos de captura foram adicionados e mantidos

overnight a temperatura de 25°C. Após sucessivas lavagens (tampão de lavagem: 0,05% de tween-20 em PBS), foi adicionado o tampão de bloqueio (1% de BSA em PBS) por 1 h. Novamente, as placas foram lavadas e foram adicionadas as amostras e os padrões diluídos no diluente (0,05% de tween-2 com 01% de BSA em PBS) por no mínimo 2 h. Após lavagens, foram adicionados os anticorpos de captura por 2 h. Em seguida, após lavagens, foi adicionado avidina-HRP e mantida por 30 minutos. Após esse processo, foram realizadas novas lavagens e foi adicionado o ABTS por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foi adicionado o stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan GO) a 405 nm. Como controles positivos para produção de TNF e IL-10 foram utilizados os sobrenadantes de macrófagos tratados com IFN- $\gamma$  (1 ng/mL) e com LPS (1  $\mu$ g/mL), respectivamente.

### 3.6 Análises *in silico*

A estrutura do composto **25c** foi desenhada pelo editor Chemdraw. As propriedades físico-químicas do composto **25c**, tais como peso molecular, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e coeficiente de partição, foram determinadas por meio da ferramenta Molinspiration Cheminformatics free web services (<http://www.molinspiration.com>). Os parâmetros foram avaliados pela regra dos cinco de Lipinski para prever o perfil de biodisponibilidade oral do composto. Para avaliar os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do composto **25c** foi utilizada a plataforma admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>).

### 3.7 Ensaios *in vivo*

#### 3.7.1 Efeito *in vivo* do composto 25c sobre o modelo murino de leishmaniose visceral

Camundongos fêmeas BALB/c foram infectados, intraperitonealmente, com  $2,5 \times 10^7$  promastigotas de *L. (L.) infantum* (cepa ITMAP 263), em fase estacionária de crescimento. Após 7 dias da infecção, os camundongos foram divididos em 4 grupos com 5 camundongos/grupo: (i) dois grupos experimentais tratados com o composto **25c** a 20 mg/Kg e a 10 mg/Kg solubilizados em água, (ii) grupo controle

positivo tratado com a miltefosina a 20 mg/Kg e (iii) grupo controle negativo tratado com PBS. Todos os camundongos foram tratados por via oral (200  $\mu$ L), uma vez ao dia, durante 10 dias. Após 4 dias do término do tratamento, os camundongos foram eutanasiados, o sangue foi recolhido para análises bioquímicas e hematológicas, e o baço e fígado foram retirados assepticamente. Os órgãos foram pesados e homogeneizados em meio Warren suplementado com 10 % de SBF e 1 % de solução antibiótica. A carga parasitária foi estimada pelo método de diluição limitante (LDA). Esse protocolo foi baseado pelo trabalho de Cunha-Júnior et al., 2016 com modificações.

### 3.7.2 Ensaio de toxicidade aguda em camundongos BALB/c

Para avaliar a toxicidade do composto **25c** *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, 5 animais por grupo, com 5 a 6 semanas de idade e peso entre 19 e 23 g: (i) grupo experimental tratado com o composto **25c** a 50 mg/Kg solubilizado em água, por via oral, uma vez ao dia, durante 10 dias e (ii) grupo controle tratado com água nas mesmas condições. Após 4 dias do término dos tratamentos, os camundongos foram eutanasiados e o sangue foi recolhido para análises bioquímicas e hematológicas.

A partir do sangue coletado foi realizado esfregaço para a realização da leucometria e recolhido o soro, após centrifugação (5500 rpm por 15 minutos) para as dosagens bioquímicas. A lâmina do esfregaço foi fixada com metanol e corada com Giemsa por 25 minutos. Foram contadas 100 células, especificando os tipos de leucócitos. O soro foi armazenado a -20°C até o momento da utilização. Os níveis de aspartato transaminase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia, foram dosados usando os kits comerciais (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e um aparelho auto-analisador (Thermo Plate TP analyzer®, São Paulo, Brasil) pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses-COLTEC- Universidade Federal de Minas Gerais.

### 3.8 Análises estatísticas

Os valores de  $CI_{50}$  em promastigotas (concentração inibitória de 50 % do crescimento parasitário) e de  $CC_{50}$  em macrófagos (concentração citotóxica para 50

% das células) foram determinados pelo Grafit versão 5. Os valores de  $CI_{50}$  em amastigotas foram determinados pelo programa Probit.

Os dados de modo de ação foram analisados usando o One-Way Anova, seguido pelo pós-teste de Dunnett. Nos ensaios de toxicidade e efeito *in vivo* foi utilizado o teste t de Student, comparando dois grupos, através do software GraphPad Prism versão 6. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

### **3.9 Considerações éticas**

Os ensaios que envolveram utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os protocolos são CEUA 012/2015, CEUA 013/2015, CEUA 007/2018, CEUA 008/2018, CEUA 009/2018, CEUA 006/2017). O ensaio de hemólise com o uso de sangue humano foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com protocolo: CAAE 23779719.1.0000.5147.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parte I. Avaliação dos triazóis e seus sais em *L. (L.) amazonensis*

Parte dos resultados referentes a esta primeira etapa do trabalho foi publicado na revista *Chemico-Biological Interactions* (MEINEL et al., 2020).

#### 4.1.1 Triagem dos triazóis e seus sais em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e toxicidade em macrófagos murinos

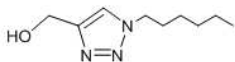
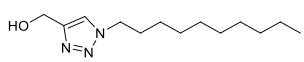
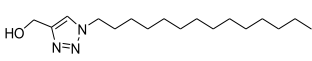
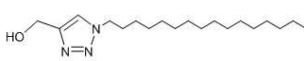
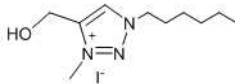
Inicialmente, os compostos foram avaliados quanto a toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos (Tabela 2). No geral, os derivados triazólicos não iônicos (**1a-4a**; **10b-14b**; **18c-24c**) não foram tóxicos até a máxima concentração testada (150  $\mu\text{M}$ ). Em relação aos sais triazólicos funcionalizados com hidroxila (**5a-9a**) observa-se que esses exibiram diferentes níveis de toxicidade nas células de mamíferos ( $\text{CC}_{50}$  variando de 82,30  $\mu\text{M}$  a 0,15  $\mu\text{M}$ ). O composto com 10 átomos de carbono na cadeia lateral (**6a**) exibiu moderado efeito tóxico (29,30  $\mu\text{M}$ ), enquanto aqueles com mais de 10 átomos de carbono na cadeia lateral (**7a**, **8a**, **9a**) exibiram elevada toxicidade ( $\text{CC}_{50}$  de 2,46; 0,15 e 5,96  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Dessa forma, observa-se que quanto maior a cadeia lateral dos sais maior a toxicidade. Os triazólicos funcionalizados com epóxido (**b**) não demonstraram importantes efeitos tóxicos até a máxima concentração testada ( $\text{CC}_{50} > 150 \mu\text{M}$ ). Em relação aos estéres, nota-se que os sais exibiram toxicidade para os macrófagos (**25-34c**), no entanto, os compostos que apresentam 10 carbonos na cadeia lateral resultaram nos menores efeitos tóxicos (**25c**, **32c**, **34c**, com  $\text{CC}_{50}$  de 47,92; 70,07; 49,95  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Os compostos **29c** e **33c** apesar de possuírem 10 átomos de carbono na cadeia lateral, possuem os grupos propila e o átomo de bromo em suas estruturas, respectivamente, que podem estar influenciando no aumento de toxicidade aos macrófagos ( $\text{CC}_{50}$  de 0,01 e 1,71  $\mu\text{M}$ , respectivamente).

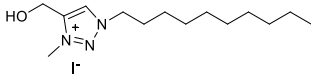
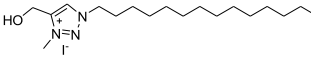
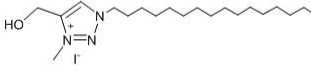
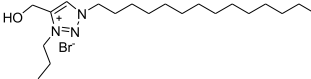
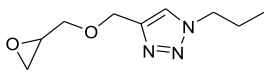
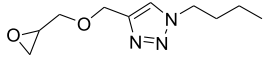
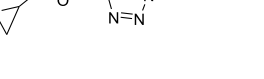
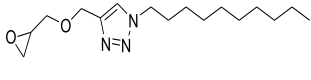
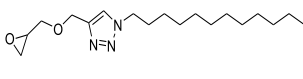
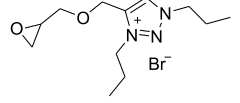
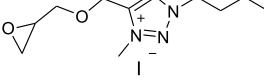
Em seguida, os compostos foram avaliados em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2). Em relação a atividade antileishmanial dos derivados triazólicos funcionalizados com hidroxila (**a**), observa-se que somente os sais com 10 ou mais átomos de carbono exibiram atividade sobre o parasito (**6-9a**), com  $\text{CI}_{50}$  variando de 0,10 a 1,55  $\mu\text{M}$  para as formas promastigotas, e de 1,07 a 57,99

$\mu\text{M}$  para as formas amastigotas. Quanto aos triazóis funcionalizados com epóxido (**b**), observa-se que os derivados triazóis **13b** e **14b** apresentaram moderada atividade sobre o parasito ( $\text{CI}_{50}$  de 33,47 e 80,23  $\mu\text{M}$  para promastigotas e 47,13 e 57,42  $\mu\text{M}$  para amastigotas, respectivamente). Nota-se que o sal triazólico **17b**, que tem como precursor o derivado **13b**, ambos com 10 átomos de carbono na cadeia lateral, exibiu atividade mais expressiva sobre as duas formas do parasito ( $\text{CI}_{50}$  de 3,61 e 7,61  $\mu\text{M}$  em promastigotas e amastigotas, respectivamente). Em relação aos ésteres de triazol (**c**), somente os sais exibiram atividade sobre o parasito (**25-33c**), com  $\text{CI}_{50}$  variando de 0,18 a 10,26  $\mu\text{M}$  para formas promastigotas e  $\text{CI}_{50}$  entre 0,24 e 39,47  $\mu\text{M}$  para amastigotas. Com exceção, o sal **34c** não exibiu atividade sobre as duas formas do parasito, até a máxima concentração testada (100  $\mu\text{M}$ ), provavelmente devido a presença do anel aromático em sua estrutura.

O índice de seletividade (IS) reflete a seletividade do composto para o parasito em relação a célula hospedeira. Neste trabalho, os compostos que exibiram os maiores índices de seletividade (IS) para a forma amastigota, que é a forma clinicamente relevante do parasito, em relação aos macrófagos, foram os sais **17b** e **25c**, com IS de 10,07 e 5,13, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2- Avaliação do efeito de derivados 1,2,3-triazólicos sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e sobre macrófagos murinos

Código	Estrutura química	Citotoxicidade $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	<i>L. (L.) amazonensis</i>		IS <sup>c</sup>
			Promastigota $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	Amastigota $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	
1a		>150	>100	>100	>1,50
2a		>150	>100	>100	>1,50
3a		>150	>100	>100	>1,50
4a		>150	>100	>100	>1,50
5a		82,30 $\pm$ 3,90	>100	>100	>1,50

Código	Estrutura química	Citotoxicidade CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	<i>L. (L.) amazonensis</i>		IS <sup>c</sup>
			Promastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Amastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
6a		29,30 ± 13,50	1,55 ± 0,12	57,99 (45,85- 73,36)	0,50
7a		2,46 ± 0,48	0,29 ± 0,00	1,07 (0,89-1,27)	2,30
8a		0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,03	3,10 (2,42-3,92)	0,05
9a		5,96 ± 0,84	0,30 ± 0,01	1,94 (1,60-2,35)	3,07
10b		>150	>100	>100	>1,50
11b		>150	>100	>100	>1,50
12b		>150	>100	>100	>1,50
13b		76,06 ± 5,72	33,47 ± 3,70	47,13 (32,74- 67,74)	1,61
14b		>150	80,23 ± 7,96	57,42 (47,89- 68,85)	1,40
15b		>150	>100	>100	>1,50
16b		>150	>100	>100	>1,50



Código	Estrutura química	Citotoxicidade CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	<i>L. (L.) amazonensis</i>		IS <sup>c</sup>
			Promastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Amastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
17b		76,65 ± 0,46	3,61 ± 1,45	7,61 (6,63-9,15)	10,07
18c		>150	>100	>100	>1,50
19c		>150	>100	>100	>1,50
20c		>150	>100	>100	>1,50
21c		>150	>100	>100	>1,50
22c		>150	>100	>100	>1,50
23c		80,67 ± 14,00	>100	>100	>1,50
24c		>150	>100	>100	>1,50
25c		47,92 ± 1,57	1,40 ± 0,75	9,34 (7,45-11,71)	5,13
26c		0,29 ± 0,05	1,36 ± 0,00	3,04 (2,38 -4,06)	0,09
27c		0,52 ± 0,02	1,27 ± 0,17	3,14 (2,55-3,87)	0,16
28c		0,37 ± 0,06	2,71 ± 0,22	1,66 (1,33-2,08)	0,22

Código	Estrutura química	Citotoxicidade CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	<i>L. (L.) amazonensis</i>		IS <sup>c</sup>
			Promastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Amastigota CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
29c		0,01 ± 0,00	0,51 ± 0,01	1,99 (1,60-2,47)	0,005
30c		0,02 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,24 (0,14-0,42)	0,08
31c		0,32 ± 0,06	4,40 ± 0,10	2,60 (1,72-3,93)	0,12
32c		70,07 ± 4,76	9,70 ± 2,70	26,22 (21,65-37,76)	2,67
33c		1,71 ± 0,31	10,26 ± 0,01	39,47 (31,98-48,71)	0,04
34c		49,95 ± 1,75	>100	>100	>0,50
Milt <sup>d</sup>		151,81 ± 0,03	15,05 ± 2,08	11,50 (9,28-14,24)	13,20

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica para 50% dos macrófagos murinos; <sup>b</sup>CI<sub>50</sub>: concentração que inibe em 50% o crescimento parasitário; <sup>c</sup>IS: CC<sub>50</sub> de macrófagos/CI<sub>50</sub> amastigotas intracelulares. <sup>d</sup>Milt: Miltefosina. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

#### 4.2 Parte II. Seleção e estudos com o composto 25c em *L. (L.) infantum*

Na triagem inicial, os compostos **17b** e **25c** apresentaram os melhores IS e, apesar do composto **17b** possuir o maior IS, esse apresenta síntese química com baixo rendimento (30%), o que dificultaria o prosseguimento da pesquisa. Dessa forma, foi escolhido o composto **25c** para a continuidade deste trabalho, uma vez que apresenta rendimento na síntese química de 90% e exibe melhor solubilidade em água, características importantes para os demais ensaios in vitro bem como o in vivo em camundongos. Além disso, no desenvolvimento de novos fármacos para doenças

negligenciadas, é importante que a nova molécula apresente síntese química simples, em poucas etapas, alto rendimento e solubilidade (KATSUNO et al., 2015), e todas essas características estão presentes na síntese do composto **25c**.

Os resultados referentes a parte II foram submetidos a revista *Parasitology Research*.

#### 4.2.1 Atividade *in vitro* do composto **25c** sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*

O composto **25c** foi avaliado quanto a atividade antileishmanial em diferentes cepas de *L. (L.) infantum*: *L. (L.) infantum chagasi* OP46 e *L. (L.) infantum chagasi* MCAN, isoladas de cão infectado e com sintomas para LV; e *L. (L.) infantum* ITMAP 263, isolada de humanos com LV.

Em relação à atividade, observa-se que o composto **25c** apresentou expressiva atividade sobre as diferentes cepas de *L. (L.) infantum*, com valores de  $CI_{50}$  abaixo de 10  $\mu M$  para as formas promastigotas e amastigotas (Tabela 3). De uma forma geral, nota-se que os valores de  $CI_{50}$  são semelhantes entre as cepas testadas e entre as duas formas biológicas do parasito. Já a miltefosina, utilizada como fármaco de referência, mostrou-se mais efetiva para a forma amastigota do parasito nas três cepas testadas.

Para darmos continuidade a este trabalho, foi escolhida a cepa *L. (L.) infantum* ITMAP 263, por ser uma cepa isolada de humanos e por questões técnicas, como sua boa infecção em camundongos no modelo *in vivo*.

Tabela 3 - Efeito do composto **25c** sobre formas promastigotas e amastigotas de diferentes cepas de *L. (L.) infantum*.

Composto	<i>L. (L.) infantum</i> OP46 $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>		<i>L. (L.) infantum</i> MCAN $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>		<i>L. (L.) infantum</i> ITMAP 263 $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	
	Pro	Ama	Pro	Ama	Pro	Ama
<b>Composto 25c</b>	5,28 ± 0,23	5,36 (4,25-6,78)	5,57 ± 0,47	6,22 (4,17-9,29)	4,55 ± 0,66	7,92 (6,73-9,33)
<b>Miltefosina</b>	2,80 ± 0,01	1,91 (1,61-2,26)	6,47 ± 0,11	1,88 (1,63-2,16)	7,81 ± 0,01	3,12 (2,61-3,72)

$^{a}Cl_{50}$ : concentração que inibe em 50% o crescimento parasitário, Pro: promastigota, Ama: amastigota. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

#### 4.2.2 Toxicidade *in vitro* sobre hemácias humanas

Como o composto **25c** exibiu moderada toxicidade em células peritoneais de camundongos BALB/c, a toxicidade desse composto também foi avaliada sobre hemácias humanas. Diante dos resultados (Figura 10), pode ser observado que o composto não exibiu toxicidade significativa até a máxima concentração testada (300  $\mu$ M), enquanto a miltefosina, fármaco de referência, exibiu efeitos tóxicos em todas as concentrações avaliadas (300; 150; 75; 37,5; 18,75  $\mu$ M) (Figura 10).

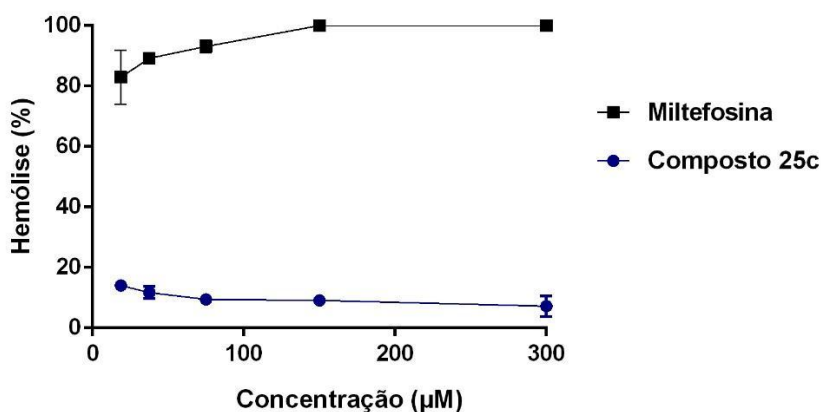


Figura 10 - Efeito do composto 25c e da miltefosina após 24 h de interação com hemácias humanas

### 4.3 Estudos do modo de ação do composto 25c sobre *Leishmania infantum* ITMAP 263

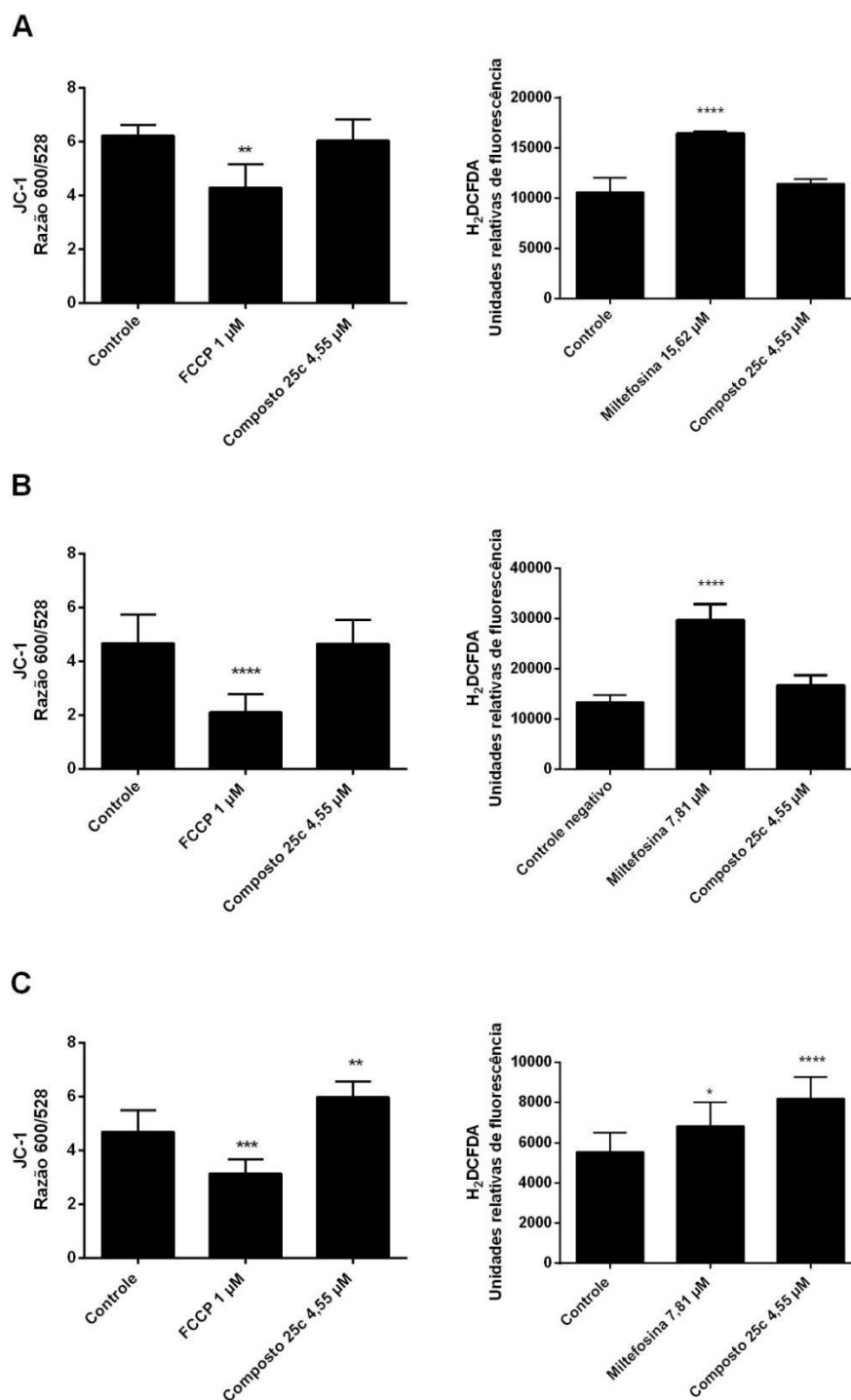
#### 4.3.1 Avaliação da função mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com composto 25c.

Inicialmente o composto **25c** foi avaliado quanto a possíveis ações sobre a mitocôndria de promastigotas, organela única e essencial para as funções metabólicas em tripanosomatídeos. O composto foi testado na concentração correspondente ao  $Cl_{50}$  em 72 h ( $Cl_{50}= 4,55 \mu$ M), incubado em diferentes tempos com o parasito (6, 24 e 72 h) e avaliado quanto a alterações do potencial de membrana

mitocondrial e EROs totais, por meio dos marcadores, JC-1 e H<sub>2</sub>DCFDA, respectivamente.

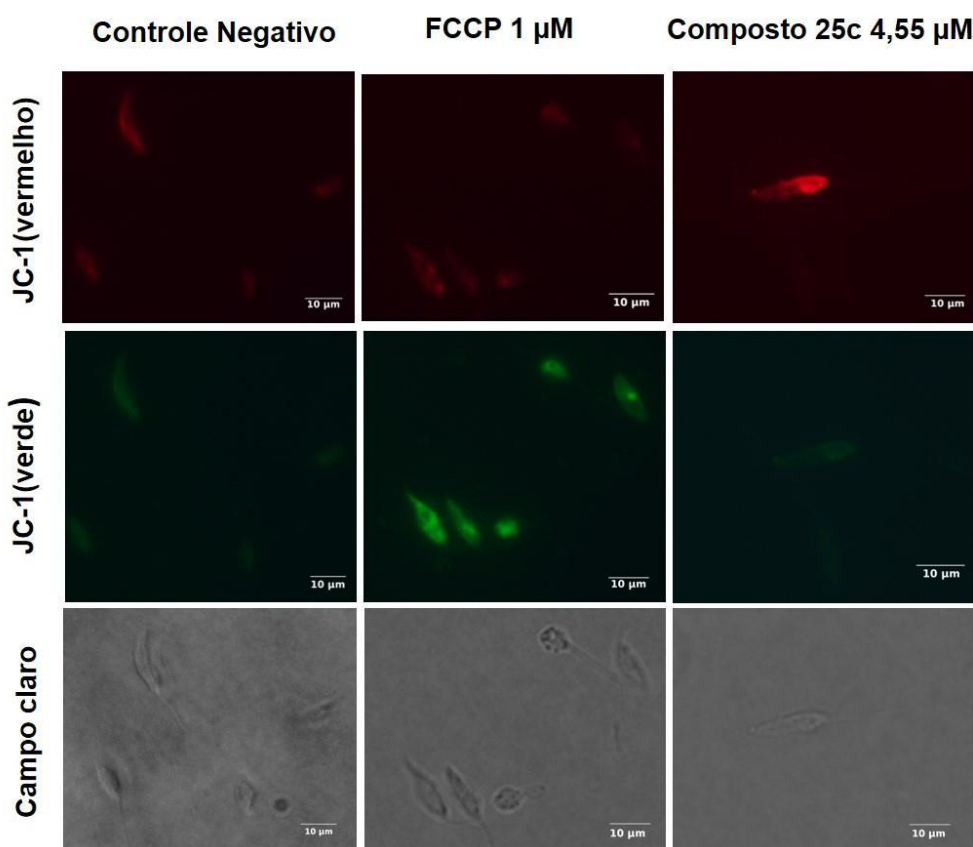
Após o tratamento em diferentes intervalos de tempo, observou-se que o composto **25c** não levou a alterações significativas no parasito em 6 e 24 h de incubação (Figura 11). Em 72 h foi notado aumento de 27,56 % no potencial de membrana mitocondrial e de 47,20% na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) totais. Os controles positivos para o potencial de membrana mitocondrial e produção de EROs, o FCCP, um desacoplador protonóforo, e a miltefosina (CI<sub>50</sub> em 72 h = 7,81 µM), respectivamente, levaram a diminuição do potencial de membrana mitocondrial em 32,93% e ao aumento de EROs em 22,67%, respectivamente (Figura 11).

Diante das alterações observadas após tratamento com o composto **25c** por 72h, esse tempo foi estabelecido para os demais estudos de modo de ação relacionados a mitocôndria do parasito.



**Figura 11 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em promastigotas de *L. (L.) infantum* em 6 (A), 24 (B) e 72 h (C) de incubação.** A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada pelo reagente JC-1 e a produção de EROs pelo reagente H<sub>2</sub>DCFDA. Os controles positivos foram promastigotas, FCCP e miltefosina, respectivamente. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

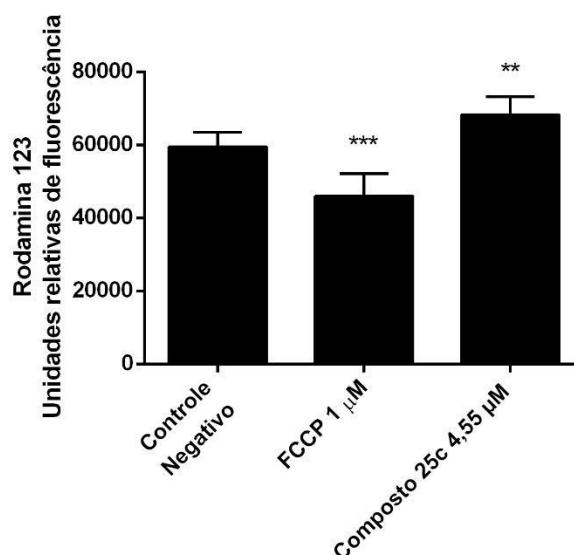
Para confirmar as alterações ocorridas em promastigotas após 72 h de interação com o composto **25c**, outras metodologias foram empregadas. Imagens de microscopia de fluorescência de promastigotas tratadas com o composto **25c** e marcadas com o JC-1, confirmaram o resultado obtido anteriormente por fluorimetria. Notavelmente, o acúmulo de JC-1 foi maior em promastigotas tratadas com o composto **25c**, com nítida fluorescência vermelha (forma oligomérica), caracterizando a hiperpolarização mitocondrial, e foi menor em promastigotas incubadas com o FCCP, indicando a perda do potencial de membrana mitocondrial, com a presença da fluorescência verde (forma monomérica) (Figura 12).



**Figura 12 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum*.** Promastigotas tratadas com o composto **25c** a 4,55 µM por 72h e não tratadas foram incubadas com o reagente JC-1, assim como o controle positivo FCCP (1µM). Imagens foram analisadas pelo microscópio Olympus BX53 com os filtros TRITC e FITC.

O potencial de membrana mitocondrial também foi avaliado utilizando o reagente Rodamina 123. Foi observado aumento do potencial de membrana mitocondrial do parasito em 14,67 % após 72 h de tratamento, corroborando com o

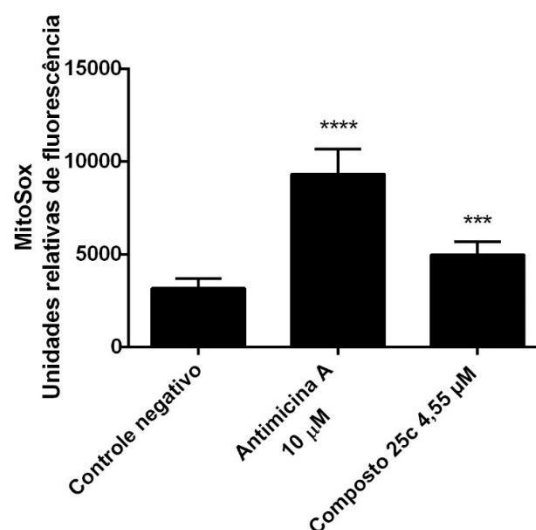
observado no experimento conduzido com JC-1. O controle positivo, FCCP a 1  $\mu\text{M}$ , levou a diminuição do potencial de membrana em 22,64% (Figura 13).



**Figura 13 - Alterações do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratadas e tratadas com o composto 25c a 4,55  $\mu\text{M}$  por 72 h.** FCCP (1  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

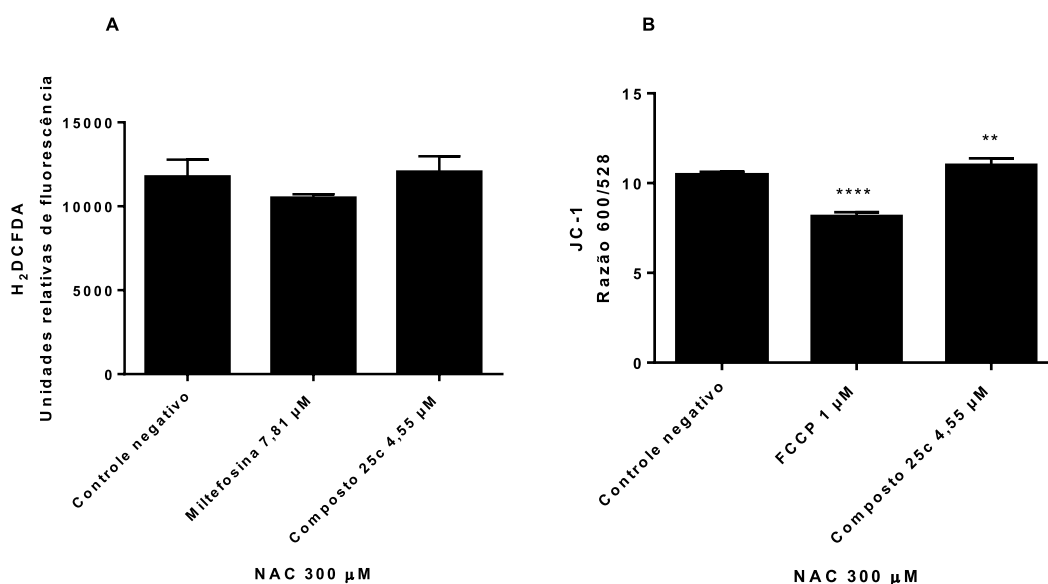
O reagente  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  indica níveis de EROs totais na célula, tais como peróxido de hidrogênio, hidroperóxido e peroxinitrito (de acordo com instruções do fabricante). Foi observado aumento de EROs em 47,20% nas formas promastigotas tratadas com o composto **25c** por 72 h, assim como no controle positivo, tratado com miltefosina (Figura 11). Para estimar a produção de EROs mitocondrial, foi utilizado o marcador MitoSox, que detecta seletivamente o superóxido oriundo da mitocôndria. No entanto, como o superóxido é muito instável e pode ser convertido em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, analisamos a produção de superóxido em promastigotas tratadas com o composto **25c** por 24 h. Foi observado um aumento significativo de 57,05% na EROs mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com o composto. O controle positivo (Antimicina A 10  $\mu\text{M}$ ) induziu aumento de 94,15 % na produção de superóxido (Figura 14). Em 72 h não houve aumento do superóxido quando comparado ao controle negativo (dados não mostrados).





**Figura 14 - Avaliação da produção de superóxido mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratadas e tratadas com o composto 25c a 4,55 µM por 24 h, utilizando o reagente MitoSox.** Antimicina A (10 mM) foi utilizado como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

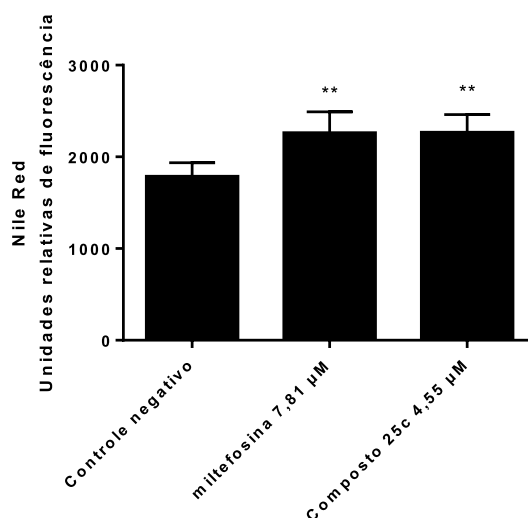
A próxima etapa foi analisar o efeito do antioxidante NAC sobre a atividade do composto **25c** em promastigotas, após 72 h de interação. De acordo com os resultados (Figura 15), observou-se que o NAC a 300 µM foi capaz de manter os níveis de EROs totais dos parasitos tratados com o composto **25c** e com a miltefosina semelhantes ao do controle não tratado. No entanto, um aumento de 5,36 % no potencial de membrana mitocondrial induzido pelo composto **25c** ocorreu mesmo na presença do antioxidante NAC. O pré tratamento com NAC, também não impediu a despolarização mitocondrial ocorrida pelo FCCP em 21,91 %. Ao comparar a hiperpolarização mitocondrial induzida pela composto **25c**, na ausência ou presença do antioxidante NAC (27,56 e 5,36 %, respectivamente), observou-se que na ausência do NAC, a hiperpolarização foi maior (27,56 %). Com isso, pode-se inferir que a presença de EROS estimula o aumento do potencial de membrana mitocondrial no parasito.



**Figura 15 - Avaliação da produção de EROs totais e do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) infantum* pré incubadas com o antioxidante NAC por 1 h e, posteriormente, não tratadas e tratadas com o composto 25c a 4,55 μM por 72 h.** Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo (A) A produção de EROs totais foi avaliada por meio do reagente H<sub>2</sub>DCFDA. A Miltefosina (7,81 μM) foi utilizada com controle positivo. (B) Alteração no potencial de membrana mitocondrial foi avaliada por meio do reagente JC-1. FCCP (1 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.3.2 Avaliação do efeito do composto 25c sobre o acúmulo de corpúsculos lipídicos

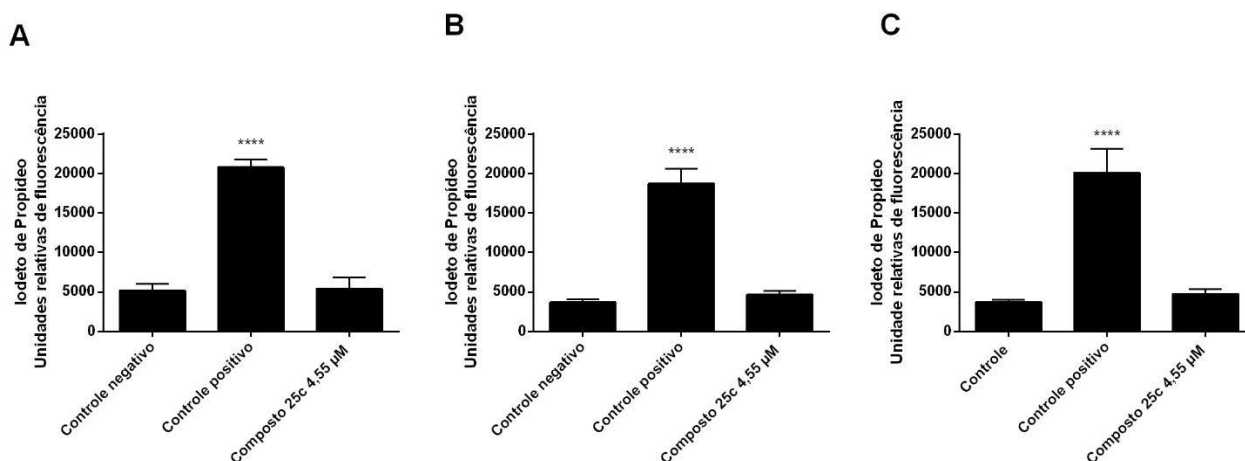
O acúmulo de corpúsculos lipídicos em promastigotas tratadas com o composto **25c** durante 72 h foi avaliada através do corante Nile Red, que detecta principalmente lipídeos neutros. Esses corpúsculos lipídicos são geralmente formados diante a disponibilidade de lipídeos exógenos e/ou estresse oxidativo (LEE et al., 2013). Notou-se que promastigotas tratadas com o composto **25c** apresentaram acúmulo de corpúsculos lipídicos de forma semelhante a miltefosina, utilizada como controle positivo, quando comparado ao controle negativo (aumento de 26,88 e 26,60 %, respectivamente) (Figura 16).



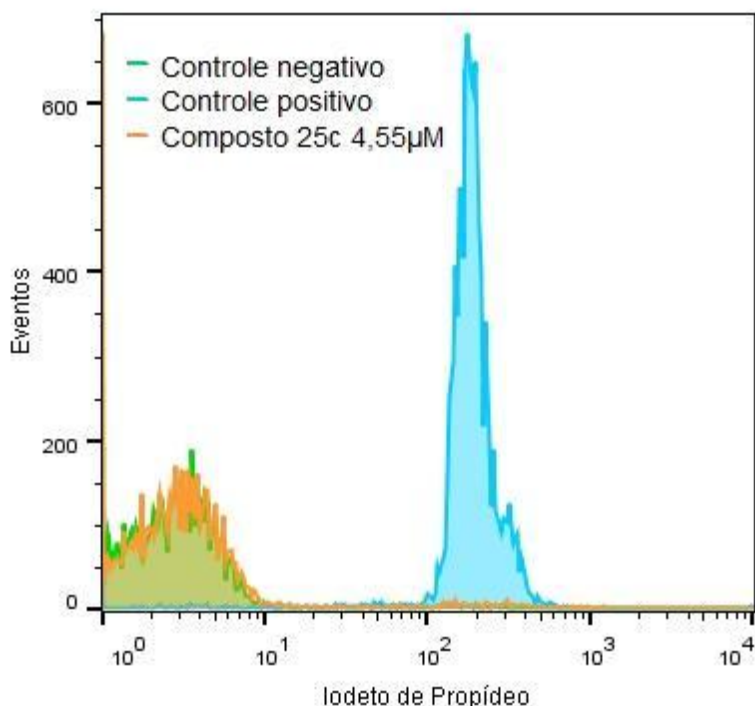
**Figura 16 - Acúmulo de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratadas e tratadas com o composto 25c a 4,55 µM por 72 h, utilizando o reagente Nile Red.** Miltefosina (7,81 µM) foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*  $P < 0,01$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.3.3 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas tratadas com o composto 25c

Com o intuito de avaliar a permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas após tratamento com o composto **25c**, em diferentes tempos de incubação (6, 24, 72h), foi empregado o reagente Iodeto de Propídeo. Observou-se que não houve alteração da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas tratadas com o composto **25c** em nenhum dos tempos avaliados (Figura 17). O controle positivo, constituído por promastigotas aquecidas a 65°C por 10 min, exibiu expressiva alteração da permeabilidade da membrana (Figura 17). A mesma análise após incubação de 72 h com o composto **25c** também foi conduzida utilizando citometria de fluxo, e corroborando com os resultados de fluorimetria, não foi detectada alteração da permeabilidade na membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* (Figura 18).



**Figura 17 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de *L. (L.) infantum* em 6 (A), 24 (B) e 72 h (C) de incubação.** A avaliação da permeabilidade da membrana foi determinada pelo reagente iodeto de propídeo. O controle positivo foi formado por promastigotas, aquecidas a 65°C por 10 minutos. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

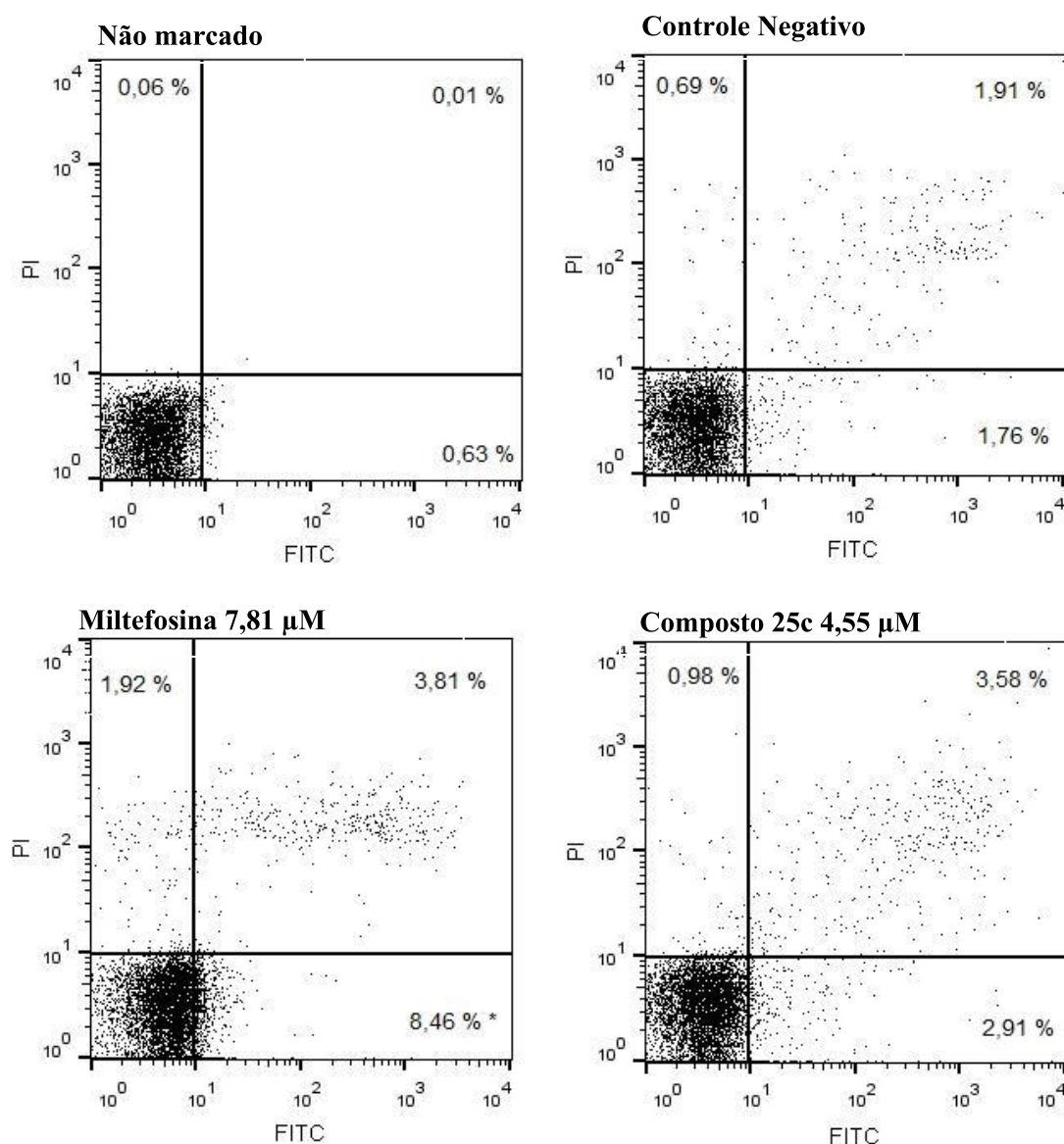


**Figura 18 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com o composto 25c a 4,55 µM por 72 h, utilizando citometria de fluxo.** Promastigotas aquecidas a 65°C foram utilizadas como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Promastigotas foram marcadas com PI.

#### 4.3.4 Avaliação da exposição de fosfatidilserina

Após a evidência que o composto **25c** ocasiona estresse oxidativo mitocondrial em promastigotas após 72 h de interação, processos como apoptose poderiam estar sendo desencadeados nessas células. Com esse intuito, foi avaliada a exposição de fosfatidilserina utilizando o marcador anexina V. Esse marcador apresenta forte afinidade de ligação a fosfatidilserina, na presença de cálcio. Em células viáveis, a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana celular, mas no processo inicial de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para o folheto externo da membrana celular. No entanto, a anexina V também pode ligar-se a fosfatidilserina localizada no interior da membrana celular, caso a membrana não esteja íntegra, como em células necróticas. Dessa forma, utiliza-se uma dupla marcação anexina V e iodeto de propídeo (PI), para distinguir essas populações.

Os resultados mostram que promastigotas tratadas com o composto **25c** por 72 horas, não apresentaram marcação positiva significativa para anexina, o que não sugeriu apoptose inicial. Já no tratamento com a miltefosina, utilizada como controle positivo, ocorreu com marcação positiva para anexina V em 8,5 % de promastigotas. Não houve alteração significativa de promastigotas em necrose ou em apoptose tardia após tratamento com o composto **25c** e com a miltefosina (Figura 19).

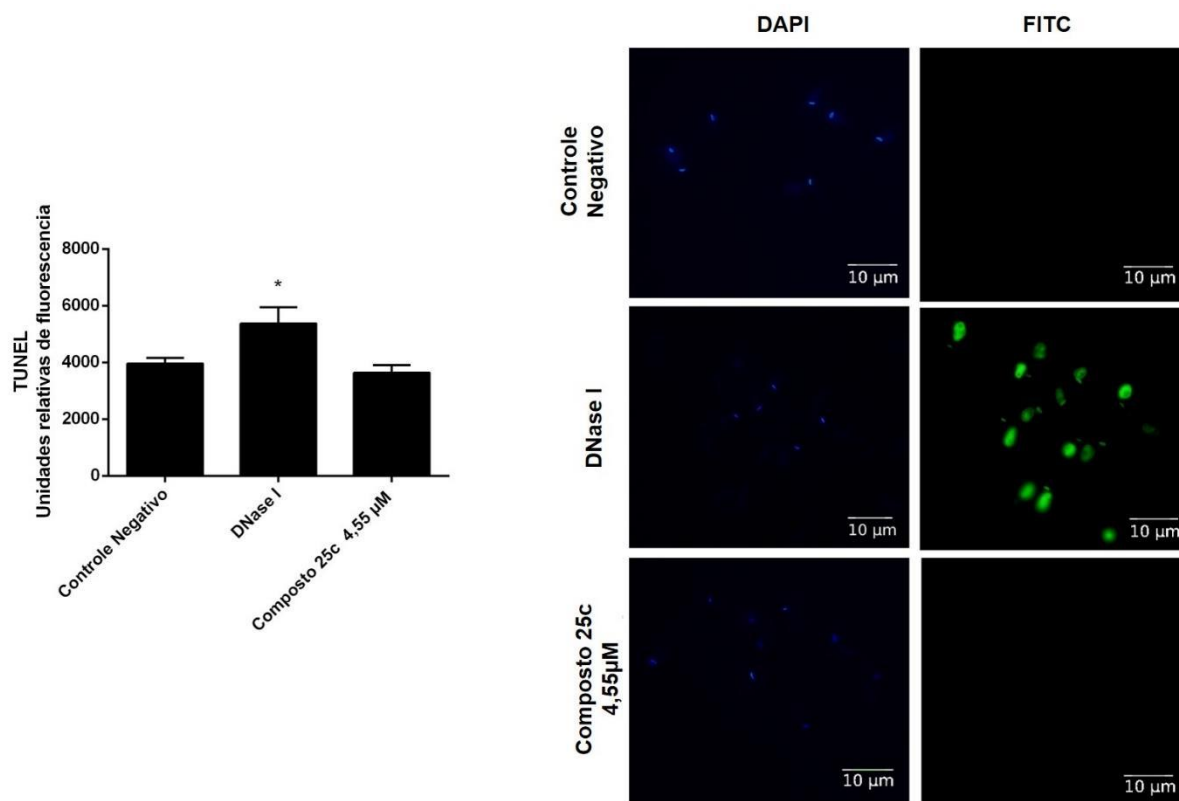


**Figura 19 - Exposição de fosfatidilserina em promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratadas e tratadas com o composto 25c a 4,55  $\mu$ M por 72 h, utilizando a dupla marcação anexina/PI e avaliação por citometria de fluxo. Miltefosina (7,81  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*  $P < 0,05$ , estatisticamente diferente do controle negativo.**

#### 4.3.5 Avaliação da fragmentação do DNA

A fragmentação de DNA é uma importante característica de apoptose nas células. Com o intuito de verificar a ocorrência de fragmentação de DNA em promastigotas após o tratamento com o composto **25c** por 72 h foi utilizado o método TUNEL. Como observado na figura 20, o composto **25c** não induziu a fragmentação

de DNA em promastigotas. A enzima DNase I a 10 µg/mL, utilizada como controle positivo, promoveu a fragmentação do DNA.

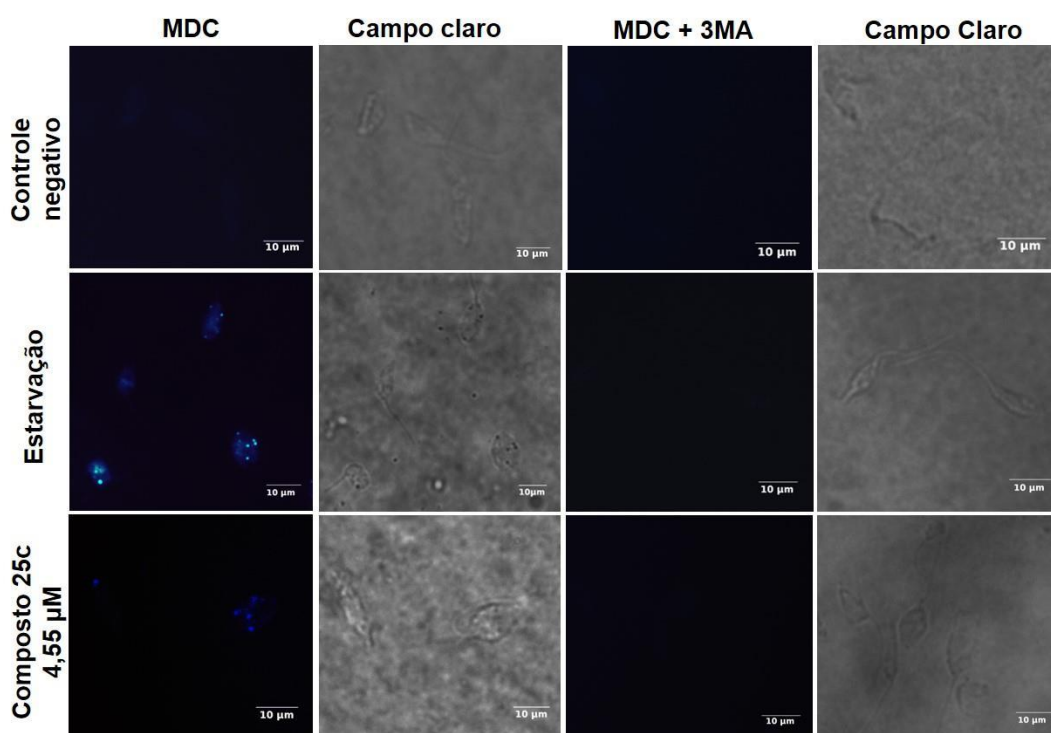


**Figura 20 - Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas após tratamento com o composto 25c a 4,55 µM por 72 h.** DNase I (10 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Os dados foram obtidos como média da fluorescência em unidades arbitrárias ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad <Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , estatisticamente diferente do controle negativo. As imagens foram analisadas pelo microscópio de fluorescência Olympus BX53 com os filtros DAPI e FITC.

#### 4.3.6 Avaliação do efeito do composto 25c sobre o acúmulo de vacúolos autofágicos

Autofagia pode ser considerado como um processo natural da célula diante situações como estresse, privação de nutrientes ou diferenciação celular. No entanto, quando este processo ocorre de maneira intensa, pode afetar e levar a danos celulares, que podem contribuir para o processo de morte celular. Dessa maneira, avaliamos se o composto **25c** poderia estar induzindo um processo autofágico em promastigotas. Para isso, foi utilizado o marcador monodansilcadaverina (MDC), que acumula preferencialmente em vacúolos autofágicos. Ao observar a figura 21,

notamos que o composto **25c** levou ao acúmulo de vacúolos autofágicos em promastigotas. O controle positivo, formado por promastigotas cultivada em PBS, como esperado, induziu fortemente autofagia em promastigotas. Paralelamente, foi utilizado o pré-tratamento com inibidor de autofagia (3-MA), e observamos que ocorreu diminuição no acúmulo de vacúolos autofágicos em todos os grupos (Figura 21).



**Figura 21 - Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos em promastigotas após tratamento com o composto 25 c a 4,55 µM por 72 h.** Promastigotas mantidas em cultura por sete dias foram utilizadas como controle positivo. Promastigotas sem adição de compostos foram utilizadas com controle negativo. Foi utilizado o marcador de vacúolos autofágicos, MDC (100 µM por 1 h). As imagens foram analisadas pelo microscópio de fluorescência Olympus BX53 com o filtro DAPI.

#### 4.3.7 Análise ultraestrutural em promastigotas tratadas com o composto 25c

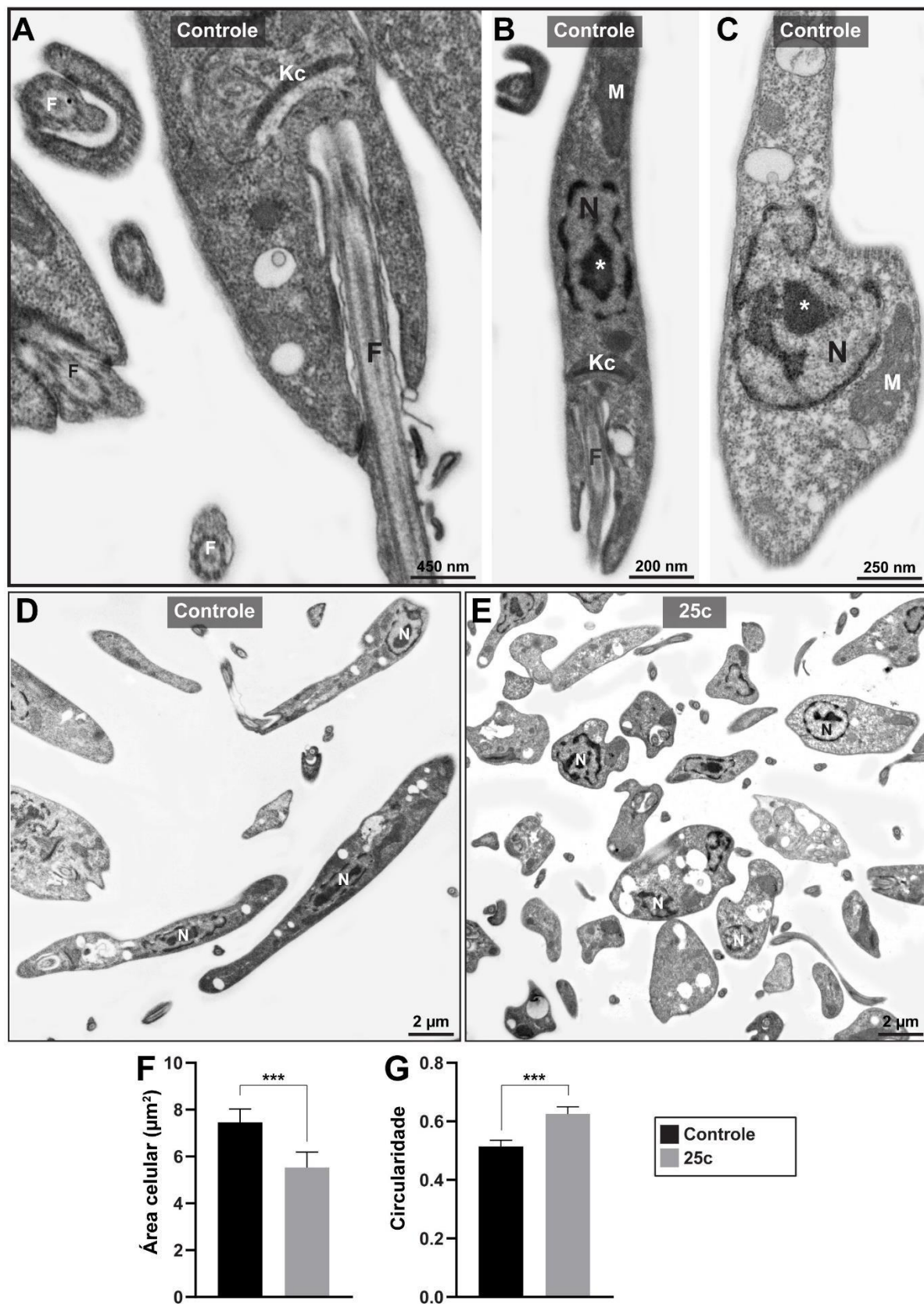
Com o intuito de obter maiores informações a respeito do modo de ação do composto **25c** foi realizada análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas e não tratadas com o composto **25c**. Observou-se que promastigotas não tratadas com o composto **25c** exibiram forma alongada com estruturas subcelulares típicas e preservadas, como



cinetoplasto (Figura 22A, B), flagelo (nas seções longitudinal e transversal; (Figura 22A, B) e mitocôndria (Figura 22B, C). Foi detectada única mitocôndria nas células, que de fato constitui uma característica padrão da Ordem Kinetoplastida. O núcleo predominantemente eucromático com nucléolo ocasionalmente visível foi observado (Figura 22B, C).

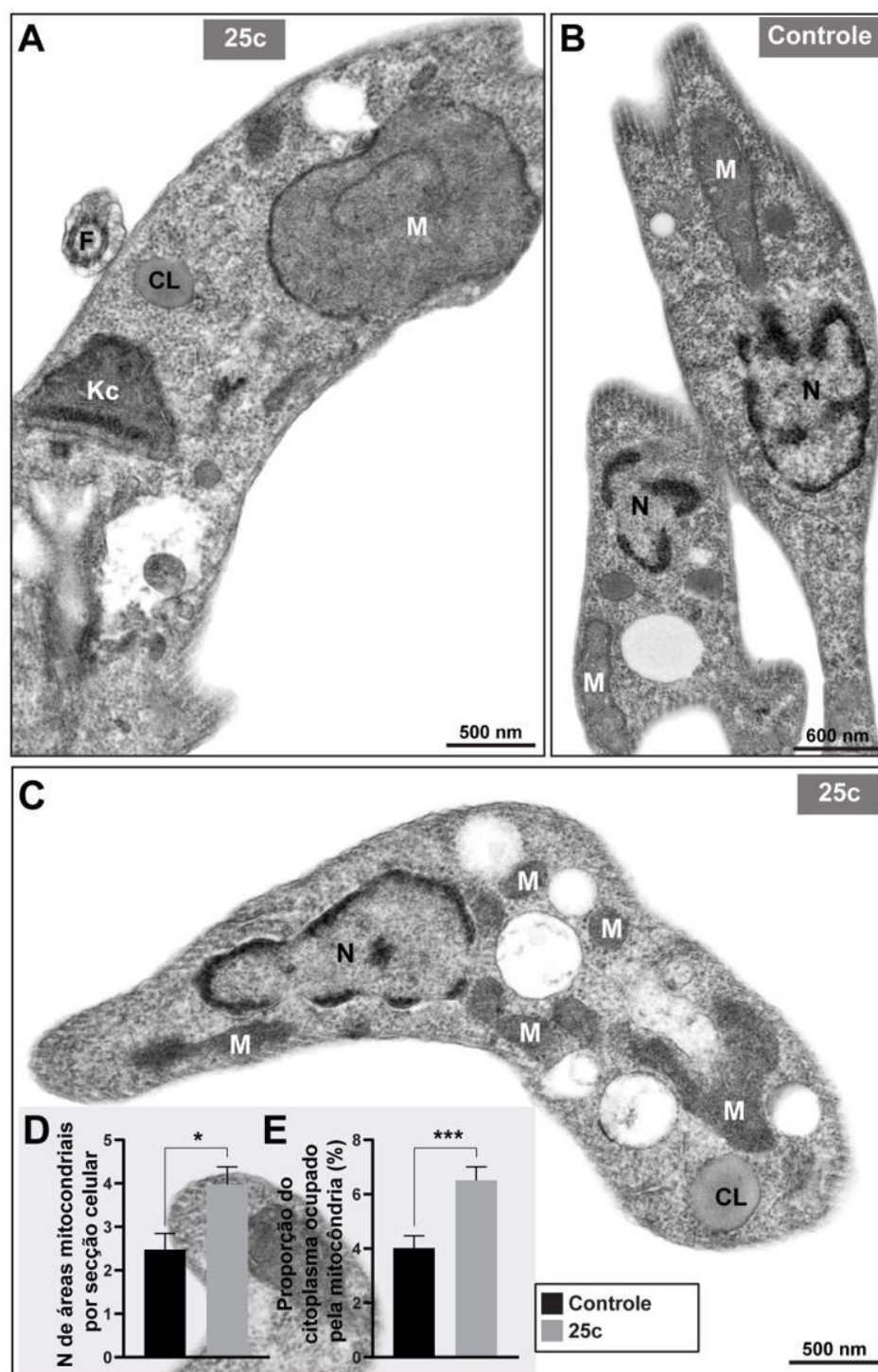
As análises qualitativas e quantitativas de MET revelaram uma alteração significativa da morfologia dos promastigotas tratadas com o composto **25c** em comparação com os controles não tratados, com redução de seus tamanhos detectados por análises morfométricas (diminuição na área celular e aumento na circularidade) (Figura 22E-G). Em geral, a ultraestrutura da membrana plasmática, cinetoplasto e núcleo de promastigotas tratadas com o composto **25c** não foram alteradas em comparação com as células controle, conforme as análises bioquímicas realizadas anteriormente, confirmando a ausência de fragmentação de DNA e danos à membrana plasmática. Por outro lado, as análises de MET confirmaram que o composto **25c** induziu alterações morfológicas na mitocôndria do parasito. Foi detectado inchaço mitocondrial, observado como áreas mitocondriais aumentadas (Figura 23A) e também um aumento no número de perfis mitocondriais por seção celular e na proporção de citoplasma ocupado por esta organela em promastigotas, conforme revelado por análises qualitativas (Figura 23B e 23C) e quantitativas (Figura 23D e 23E), que confirmaram os impactos bioquímicos do composto **25c** sobre a mitocôndria de *L. (L.) infantum*. Interessantemente, também foi observada a presença de corpúsculos lipídicos em promastigotas tratadas com o composto 25c, conforme visualizado pela marcação do corante Nile Red (Figuras 23 A, 23C e 24E).

Nitidamente, intensa vacuolização citoplasmática foi observada em promastigotas tratadas em comparação com controles não tratados (Figuras 23C, 24A e 24B). Promastigotas tratados com o composto **25c** mostraram membrana dupla envolvendo material citoplasmático (Figura 24C e Ci), presença de grandes vacúolos membranosos contendo conteúdo intraluminal heterogêneo e acúmulo de membranas multilamelares (Figura 24D-F), que são características associadas à autofagia, confirmando a detecção de vacúolos autofágicos pelo marcador MDC.



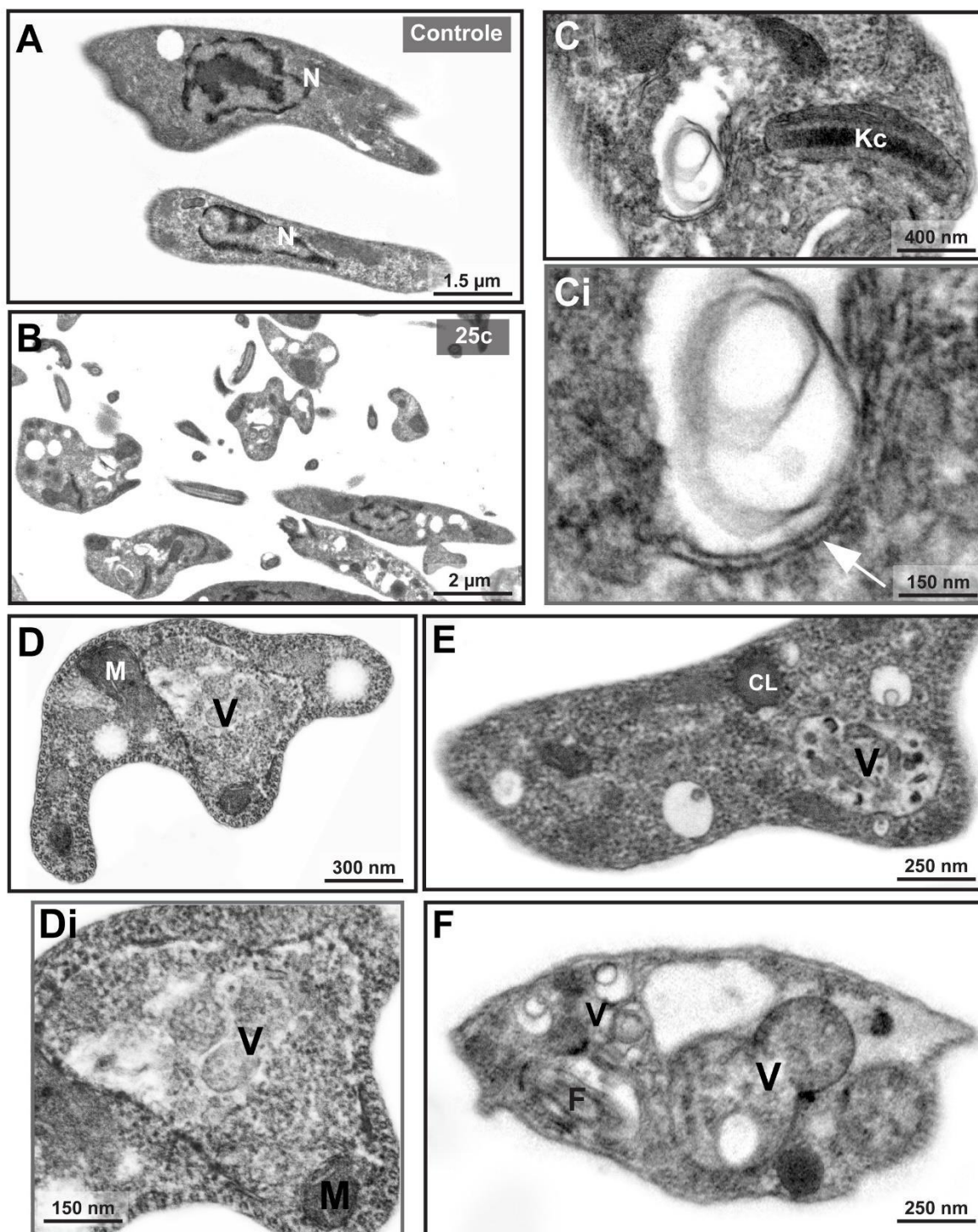
**Figura 22 - Ultraestrutura de promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratadas e tratadas com composto 25c.**(A-D) Promastigotas do controle negativo apresentam formato alongado e estruturas subcelulares típicas intactas: complexo cinetoplasto (Kc), flagelo (F), núcleo (N),

nucléolo (\*) e mitocôndria (M). (EG) Em resposta ao composto **25c**, as formas promastigotas sofreram redução significativa de seu tamanho (conforme demonstrado por análises ultraestruturais quantitativas da área celular (F; \*\*\*  $P = 0,0005$ ) e circularidade (G; \*\*\*  $P = 0,0007$ ). Promastigotas de *L. (L.) infantum* ITMAP263 foram tratadas ou não com o composto **25c** por 72 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Um total de 151 seções de células de parasitos não tratados ( $n = 69$ ) e tratados com o composto **25c** ( $n = 82$ ) foram analisados. As imagens foram analisadas pelo software Image J e a circularidade celular foi obtida pelo software 4π.



**Figura 23 - Alterações ultraestruturais da mitocôndria de *L. (L.) infantum* induzidas pelo composto 25c.** Mitocôndria aumentada é observada no grupo tratado (A) em comparação com o controle (B). Em (C e D), as análises quantitativas mostram que não apenas o número de áreas mitocondriais, mas também a proporção de citoplasma ocupada pela mitocôndria aumentou significativamente após o tratamento com o composto **25c** (\*  $P = 0,01$ , \*\*\*  $P = 0,0002$ ). N, núcleo; F, flagelo; CL, corpo lipídico, M, mitocôndria; Kc, complexo de cinetoplasto. Promastigotas de *L. (L.) infantum* ITMAP263 foram tratadas ou não com o composto **25c** por 72 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Um total de 151 seções de células de parasitos não tratados ( $n = 69$ ) e tratados com composto **25c** ( $n = 82$ ) foram

analisados e análises quantitativas foram realizadas conforme descrito na seção materiais e métodos.



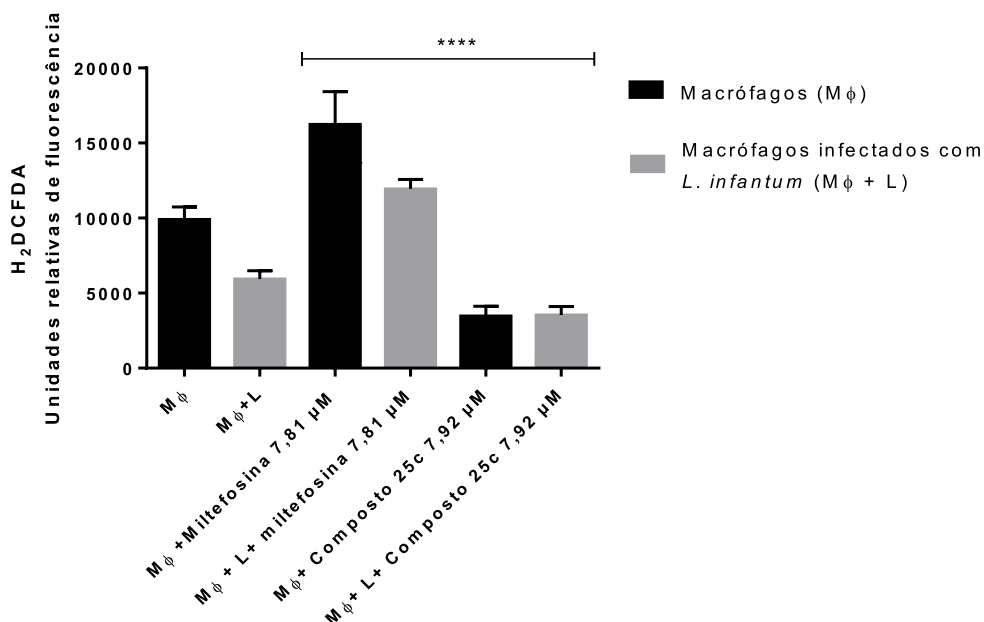
**Figura 24 - Vacúolos autofágicos dentro do citoplasma de *L. (L.) infantum* promastigotas tratadas com composto 25c.**(A-B) Vacuolização intensa é observada em promastigotas tratadas com o composto 25c em comparação com células de controle não tratadas. (C) A membrana dupla (indicada pela seta em maior ampliação em Ci) envolve o material citoplasmático. (D-F) Vacúolos citoplasmáticos (V) mostram conteúdos intraluminais heterogêneos e estruturas multilamelares. (Di) é uma ampliação maior de (D). Promastigotas

de *L. (L.) infantum* ITMAP-263 foram tratadas com o composto **25c** por 72 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Kc, complexo de cinetoplasto; F, flagelo; M, mitocôndria; CL, corpúsculo lipídico.

#### 4.4 Estudo do modo de ação do composto 25c sobre amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*

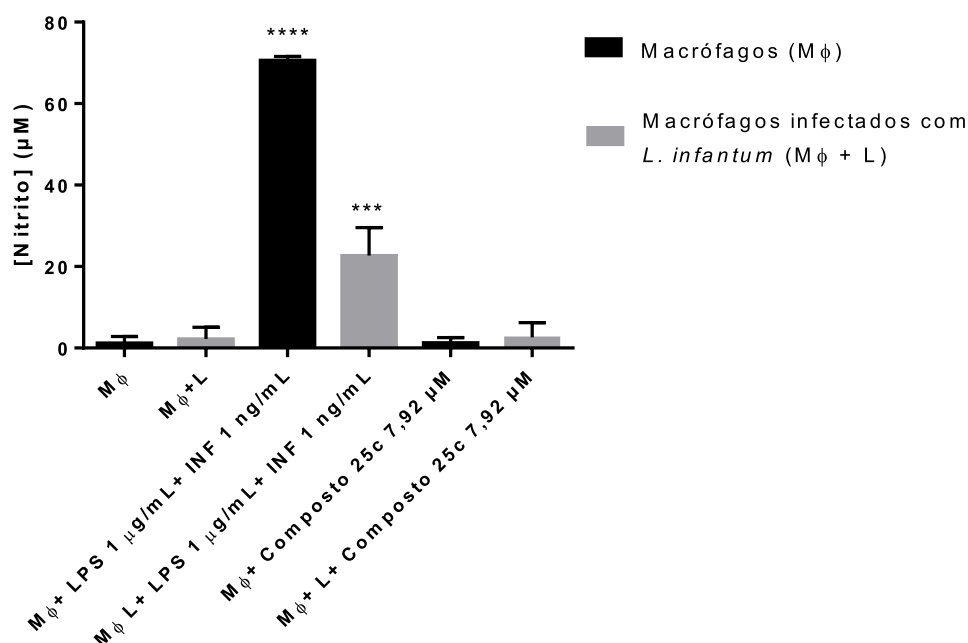
##### 4.4.1 Avaliação da produção de EROs e NO em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*

Para investigar a ação do composto **25c** sobre amastigotas intracelulares, a produção de EROs e óxido nítrico (NO) foi avaliada em macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* após 72 h de tratamento com o composto **25c** a 4,55  $\mu$ M. Observou-se uma redução na produção de EROs em macrófagos não infectados e infectados, de 64,95% e 40,33% respectivamente. A miltefosina levou ao aumento de 64,95% e 100% na produção de EROs em macrófagos não infectados e infectados, respectivamente (Figura 25).



**Figura 25 - Produção de EROs totais em macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* após 72 h de tratamento com o composto 25c, utilizando o reagente H<sub>2</sub>DCFDA.** Miltefosina (7,81  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad <Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*\*\* P < 0,0001, estatisticamente diferente do controle negativo.

De acordo com os resultados de NO (Figura 26), observou-se que não houve alteração significativa na produção de nitrito em macrófagos não infectados e infectados quando comparado aos controles. A associação de LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL ocasionou o aumento nos níveis de NO em macrófagos não infectados e infectados.

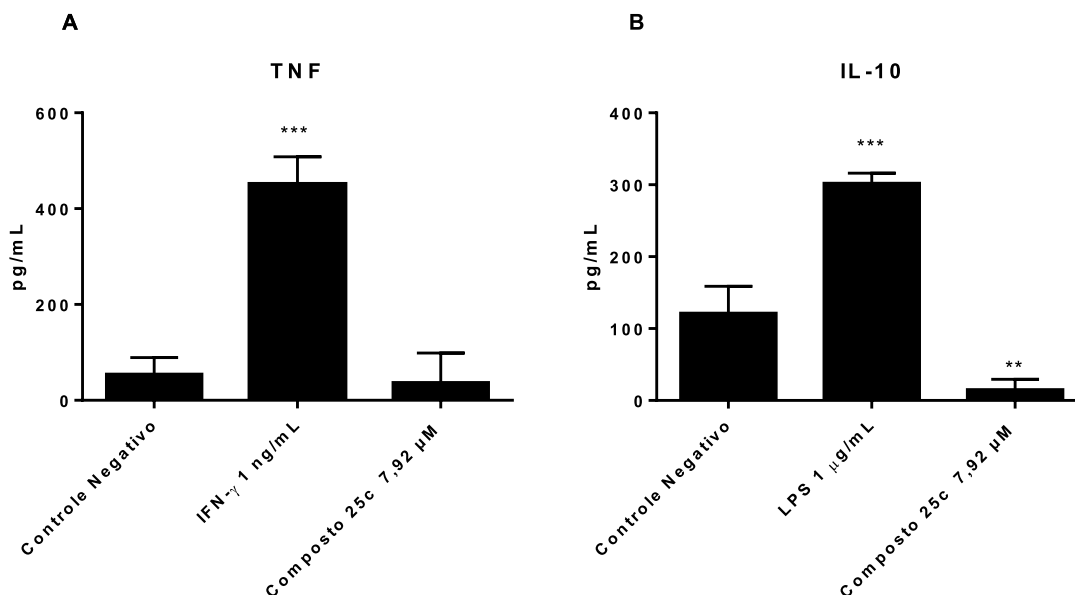


**Figura 26 - Produção de NO em macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* após 72 h de tratamento com o composto 25c, por meio do método de Griess.** LPS (1 µg/mL) juntamente com INF- γ (1 ng/mL) foram utilizados como controle positivo. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad <Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.4.2 Avaliação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-10 (IL-10) em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*

Com intuito de avaliar a atividade imunomodulatória *in vitro* do composto 25c foram realizadas as dosagens de TNF e IL-10 em sobrenadante de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* não tratados e tratados com o composto 25c a 4,55 µM. Diante dos resultados, observou-se que o composto não alterou

significativamente a produção de TNF e desencadeou a diminuição significativa dos níveis de IL-10 (Figura 27).



**Figura 27 - Dosagem de TNF e IL-10 em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* após 72 h de tratamento com o composto 25c.** INF- $\gamma$  (1 ng/mL) e LPS (1  $\mu$ g/mL) foram utilizados como controles positivos para TNF e IL-10, respectivamente. As análises estatísticas foram feitas por meio do GraphPad <Prism versão 6, utilizando análises de variância (One Way Anova) e pós-teste de Dunnett. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.5 Estudo *in silico* de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto 25c

Os estudos *in silico* foram realizados a fim determinar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto **25c** (Tablea 4). Observa-se que o composto não violou nenhuma das cinco regras de Lipinski, relacionadas ao peso molecular, coeficiente de partição, número de doadores e número de aceptores de ligação de hidrogênio. Em relação aos parâmetros de farmacocinética, referentes a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), nota-se que o composto **25c** apresenta boa absorção e permeabilidade intestinal. A principal localização do composto após o processo de distribuição indica ser na mitocôndria. De acordo com as análises, esse composto é substrato da enzima CYP450 3A4 mas não é inibidor de nenhuma das isoenzimas do citocromo P450. Os resultados de toxicidade indicam que o composto é não carcinogênico, além de apresentar



toxicidade aguda oral nível III, ou seja apresenta dose letal média maior que 500 mg/Kg ( $500 \text{ mg/Kg} < \text{DL}_{50} \leq 5000 \text{ mg/Kg}$ ).

Tabela 4- Determinação *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto **25c**.

<b>Regra dos cinco de Lipinski</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>
PM	$\leq 500$	423,14
logP	$\leq 5$	0,93
HBA	$\leq 10$	3
HBD	$\leq 5$	0
Número de violações	$< 2$	0
<b>Parâmetros ADMET</b>	<b>Resultados</b>	<b>Probabilidade (%)</b>
<b>Absorção</b>		
Barreira hematoencefálica	+	97,96
Absorção intestinal humana	+	95,04
Permeabilidade Caco-2	+	74,30
Substrato P-glicoproteína	-	74,96
Inibidor P-glicoproteína	-	68,59
<b>Distribuição</b>		
Localização subcelular	Mitocôndria	65,13
<b>Metabolismo</b>		
Substrato CYP450 2C9	NS	60,07
Substrato CYP450 2D6	NS	89,99
Substrato CYP450 3A4	S	54,00
Inibidor CYP450 1A2	NI	70,78
Inibidor CYP450 2C9	NI	74,16
Inibidor CYP450 2D6	NI	85,01
Inibidor CYP450 2C19	NI	59,26
Inibidor CYP450 3A4	NI	62,01
Promiscuidade inibitória CYP	Baixa	84,31
<b>Toxicidade</b>		
Carcinogênico	-	88,57
Hepatotoxicidade	-	57,50
Toxicidade aguda oral	III	52,10

PM: peso molecular; LogP: logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água; HBA; número de aceptores; HBD: número de doadores; NI: Não inibidor; NS: Não Substrato; S: Substrato. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

#### 4.6 Efeito *in vivo* do composto 25c sobre o modelo murino de leishmaniose visceral

Para analisar o efeito do composto **25c** sobre o modelo murino de leishmaniose visceral, os camundongos infectados com *L. (L.) infantum* receberam tratamento, por via oral, do composto **25c** a 10 e 20 mg/Kg durante 10 dias. Para estimar a ação do composto *in vivo* foi determinada a carga parasitária nos camundongos após o tratamento e comparada ao grupo de camundongos que recebeu apenas água (controle negativo). Observa-se que o composto **25c** a 20 mg/Kg levou a diminuição da carga parasitária do baço e no fígado comparada ao grupo controle (59,80 e 26,88 %, respectivamente). No entanto, o composto **25c** a 10 mg/Kg levou a uma redução de 66,50 % da carga parasitária no baço, mas não foi capaz de diminuir significativamente a carga parasitária no fígado (Figura 28). A miltefosina levou a diminuição da carga parasitaria nos dois órgãos avaliados. Os camundongos que receberam tratamento não perderam peso em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Não houve aumento significativo do tamanho do baço e do fígado de camundongos infectados (dados não mostrados), dessa forma, não foi avaliada a possível diminuição do peso relativo desses órgãos após tratamento com o composto **25c**.

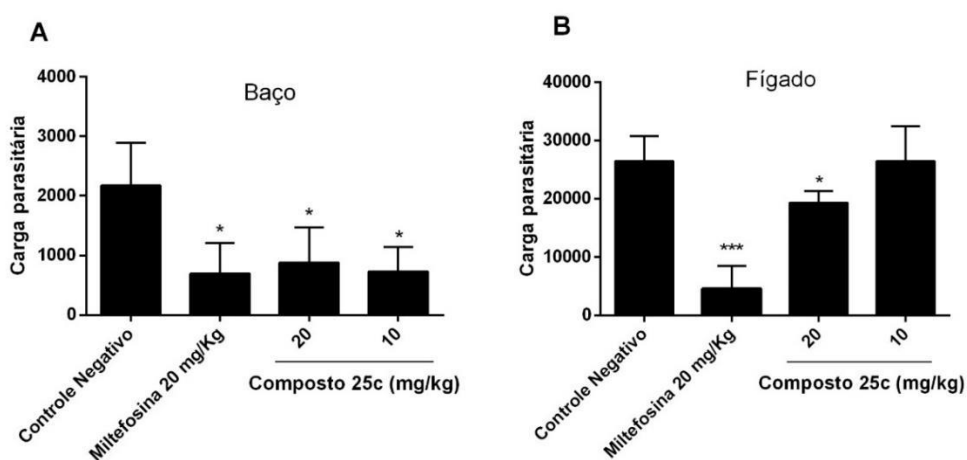


Figura 28 - Avaliação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos após 10 dias de tratamento com o composto 25c, miltefosina ou água (controle). Análises

estatísticas foram obtidas pelo *GraphPad Prism* versão 6, utilizando teste t não pareado: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.7 Ensaios de toxicidade aguda em camundongos BALB/c

A toxicidade do composto **25c** foi avaliada em camundongos BALB/c saudáveis e não infectados. Camundongos receberam 50 mg/Kg do composto **25c**, por via oral, durante 10 dias e os efeitos de toxicidade, como peso e parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados e comparados ao grupo de camundongos que recebeu apenas água. Em relação ao peso, o grupo de camundongos não infectados tratados com o composto **25c** a 50mg/Kg durante 10 dias não demonstrou diferença de peso em relação aos camundongos que receberam apenas água (dados não mostrados). Da mesma forma, não houve diferença significativa entre o peso relativo dos órgãos avaliados (baço e fígado) entre os grupos de camundongos (Tabela 5).

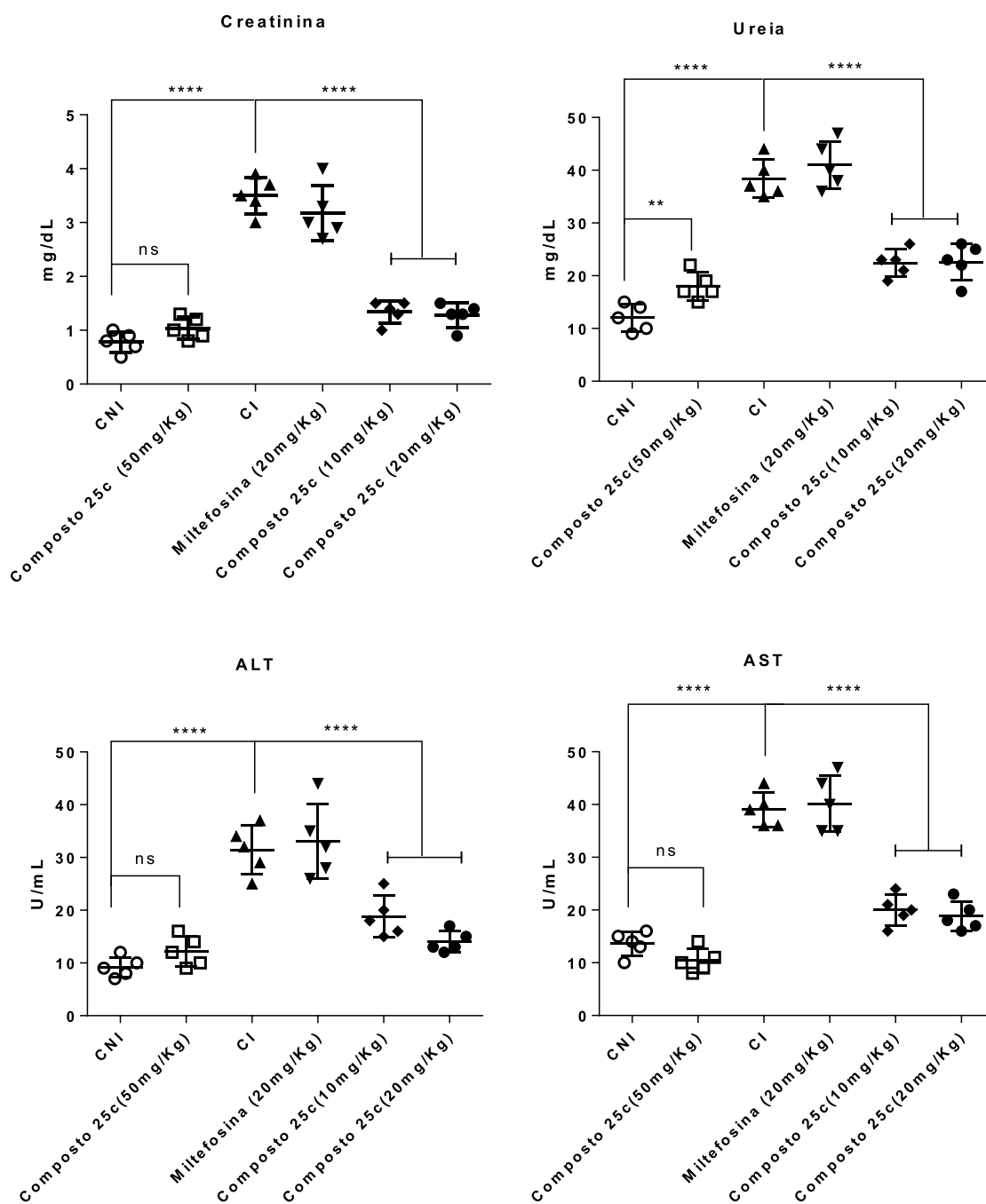
Tabela 5 - Peso relativo do baço e do fígado de camundongos não infectados tratados com o composto **25c** ou com água

Órgãos	Peso relativo dos grupos (peso do órgão (mg)/ peso do animal (g))	
	Água	Composto <b>25c</b> (50mg/Kg)
Baço	6,00 ± 0,56	5,49 ± 0,47
Fígado	52,65 ± 2,44	51,54 ± 2,88

Análises estatísticas foram obtidas pelo *GraphPad Prism* versão 6, utilizando teste t não pareado. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Ao analisar os parâmetros bioquímicos, nota-se que não houve alteração significativa dos resultados referentes à função renal e hepática dos camundongos saudáveis que receberam o tratamento com o composto **25c** a 50 mg/Kg em comparação àqueles que receberam apenas a água (CNI- controle negativo de camundongos não infectados). Foi observado apenas aumento significativo no nível de ureia dos camundongos que receberam o tratamento (Figura 29). Em relação aos parâmetros hematológicos, não foi observada diferença na contagem diferencial de leucócitos entre os camundongos não infectados que receberam água ou o composto **25c** a 50 mg/Kg (Tabela 6).

Interessantemente, ao analisar os dados bioquímicos, do grupo controle de camundongos não infectados (CNI) e infectados (CI), que receberam apenas água, observa-se que a infecção por *L. (L.) infantum* ocasionou aumento do nível de todos os parâmetros avaliados (creatinina, ureia, ALT e AST) e o composto **25c** a 10 e 20 mg/Kg, após 10 dias de tratamento, apresentou a capacidade de diminuir esses níveis, próximo a normalidade, observada em camundongos não infectados. Em camundongos infectados, a miltefosina não levou a alterações significativas nesses parâmetros avaliados (Figura 29). Em relação aos parâmetros hematológicos avaliados, não ocorreu diferença significativa na contagem diferencial de leucócitos entre o grupo de camundongos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* (Tabela 6). No entanto, foi observado um discreto aumento de linfócitos e diminuição nos neutrófilos, após tratamento dos camundongos infectados com o composto **25c** a 20 mg/Kg, ao comparar com o grupo de camundongos infectados que recebeu apenas água (Tabela 6).



**Figura 29 - Análises bioquímicas de camundongos não infectados tratados com água (CNI) e com o composto 25c a 50 mg/Kg e de camundongos infectados, tratados com água (CI), miltefosina a 20 mg/Kg e composto 25c a 10 e 20 mg/Kg. Análises estatísticas foram obtidas pelo *GraphPad Prism* versão 6, utilizando teste t não pareado: \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , estatisticamente diferente do controle negativo.**

Tabela 6. Análises hematológicas de camundongos não infectados e infectados tratados com o composto **25c** e com água

		<b>Resultados (média ± dp)</b>			
<b>Leucometria diferencial (%)</b>					
<b>Camundongos não infectados</b>	Água	Composto <b>25c</b> 50 mg/kg			
Neutrófilos	24,61 ± 5,94	24,06 ± 13,18			
Linfócitos	69,84 ± 9,16	66,27 ± 9,02			
Monócitos	5,54 ± 3,65	9,86 ± 6,12			
Eosinófilos	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			
Basófilos	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			
<b>Camundongos infectados</b>	Água	Miltefosina 20 mg/Kg	Composto <b>25c</b> 10mg/Kg	Composto <b>25c</b> 20mg/Kg	
Neutrófilos	19,82 ± 6,21	18,81 ± 7,52	19,84 ± 4,53	11,78 ± 3,11*	
Linfócitos	72,34 ± 5,54	74,04 ± 5,54	74,05 ± 2,98	81,79 ± 4,16*	
Monócitos	7,82 ± 2,25	7,14 ± 1,46	5,98 ± 2,43	6,46 ± 4,14	
Eosinófilos	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Basófilos	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	

Obs: Hemácias normocíticas e normocrômicas e presença de agregados plaquetários em todas as lâminas avaliadas.

Análises estatísticas foram obtidas pelo *GraphPad Prism* versão 6, utilizando teste t não pareado:  
\*  $P < 0,05$ , estatisticamente diferente do controle negativo

## 5 DISCUSSÃO

O tratamento atual da LV é restrito a um número limitado de fármacos associados a graves efeitos adversos, longo tempo de duração, resistência parasitária e variabilidade na eficácia, inclusive entre diferentes regiões do mundo (ALVES et al., 2018). Ainda não existem vacinas disponíveis, tornando a quimioterapia essencial para o controle da doença (RAJASEKARAN e CHEN, 2015). A descoberta de novos fármacos mais seguros, com eficácia oral, regime de tratamento de curta duração e utilização viável em áreas endêmicas é uma necessidade urgente (ALVES et al., 2018).

A diversidade quanto a atividade biológica dos derivados triazólicos já foi reportada na literatura, demonstrando efeitos antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, antileishmanial e antitumoral (ANGAJALA et al., 2016; DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017, GILANDOUST et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018; TIAN et al., 2018). Também na forma de sais, os triazóis têm exibido atividade em diferentes alvos biológicos, incluindo bactérias gram positivas e negativas (FLETCHER et al., 2018) e o protozoário *Plasmodium falciparum* (VLAHAKIS et al., 2010). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa também tem explorado estes efeitos e, recentemente, foi reportada a atividade de sais triazólicos em *Leishmania* spp. (STROPPA et al., 2017) e em células tumorais (DE SOUZA-FAGUNDES et al., 2018). Os sais apresentam maior solubilidade, podendo facilitar a o processo de absorção, biodisponibilidade (EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017) e a ligação a alvos biomoleculares (DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017). Os sais triazólicos utilizados nesse trabalho, são considerados líquidos iônicos, e comparados aos compostos orgânicos convencionais, apresentam várias características vantajosas, dentre estas, ponto de fusão abaixo de 100 °C, diferente de um sal inorgânico, que apresenta, em geral ponto de fusão ~800 °C. Além disto, possuem composição com alta dissociação iônica e grande variação de suas propriedades fisico-químicas, formando ampla classe de compostos, as quais podem ser exploradas quanto ao aumento da solubilidade, favorecendo a biodisponibilidade. Assim, os líquidos iônicos são considerados promissores na área industrial dentro de um contexto médico-farmacêutico (EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017).

A triagem inicial dos compostos foi realizada em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os ensaios em formas promastigotas de

*Leishmania* spp. são rápidos, reprodutíveis e as culturas são de fácil manipulação, no entanto é a forma do parasito presente no inseto vetor. Por outro lado, as formas amastigotas estão presentes no hospedeiro vertebrado e por serem intracelulares obrigatórios, podem sofrer influência na captação, metabolização e atividade dos compostos pela célula hospedeira (DE MUYLDER et al., 2011; ESCOBAR et al., 2002). Assim, o teste para seleção de novos compostos com ação em formas amastigotas intracelulares é o mais relevante para a análise do efeito dos compostos *in vitro*. Tradicionalmente, a avaliação da atividade em formas amastigotas intracelulares é realizada por meio da microscopia ótica, o que torna esse método laborioso e com possíveis variações entre os analistas (DE MUYLDER et al., 2011). Com a utilização do método da fluorimetria, por meio de *Leishmania* transfectada com proteínas fluorescentes, a triagem dos compostos tornou-se mais rápida além de não exigir a contagem manual dos amastigotas intracelulares (ROCHA et al., 2013). Neste presente trabalho, foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* transfectada com a proteína fluorescente vermelha (RPF), possibilitando a triagem de todos compostos na forma do parasito clinicamente relevante. Além disso, a utilização da espécie *L. (L.) amazonensis*, na triagem deste trabalho, também está associada à sua facilidade de cultivo, além da ausência de cepas de *L. (L.) infantum* transfectadas com proteínas fluorescentes em nosso laboratório.

Apesar de poucos estudos a respeito, algumas espécies de *Leishmania* classicamente associadas a manifestações cutâneas têm sido envolvidas também em formas viscerais tanto em humanos quanto em animais. Por exemplo, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, responsáveis pela forma cutânea em países do Velho Mundo foram relatadas como responsáveis pela LV em humanos (MAGILL et al., 1993; KARAMIAN et al., 2007) e em animais experimentais (SOLIMAN, 2006; YOUSSEF et al., 1996). Também no Novo Mundo, a *L. (L.) amazonensis* (BADARÓ, 1988; BARRAL et al., 1991; SANCHES et al., 2016; TOLEZANO et al., 2007, VALDÍVIA et al., 2017) tem sido incriminada como responsáveis por manifestações relatadas à LV. As razões pelas quais ocorre a disseminação e desenvolvimento de manifestações viscerais não é totalmente esclarecido, mas deve envolver a resposta imune do hospedeiro e cepa/virulência do parasito (SOLIMAN, 2006). Experimentalmente, a visceralização do parasito também pode estar associada a quantidade de promastigotas inoculadas no processo de infecção. Estudo recente demonstrou que o inóculo com maior concentração de promastigotas de *L. (L.) tropica* em camundongos BALB/c resultou



na disseminação do parasito para o baço e no aumento nos níveis de INF- $\gamma$  e interleucina-10 (ROSTAMIAN et al., 2018).

Em relação aos resultados com *L. (L.) amazonensis*, observou-se que no geral, os sais triazólicos apresentaram melhor atividade, sejam os triázóis funcionalizados com hidroxila (**a**), epóxido (**b**) ou estéres de triazol (**c**). Além disto, ocorreu um favorecimento da atividade naqueles com 10 ou mais átomos de carbono na cadeia lateral, e dentre esses, foi observado um menor efeito tóxico para as células de mamíferos naqueles com 10 átomos de carbono. É importante destacar que esses sais triazólicos apresentam naturalmente um caráter anfifílico, devido a combinação da cadeia carbônica longa e do caráter iônico, que pode estar associado a uma melhor permeabilidade pela membrana celular e atividade biológica. Assim, a síntese dos estéres de triazol (**c**) foi realizada de forma racional, sendo sintetizados e avaliados somente compostos com 10 ou mais átomos de carbono na cadeia lateral, e novamente, constatou-se a importância dessa cadeia lateral na estrutura dos sais. Esta expressiva atividade antileishmanial do sal triazólico com 10 átomos de carbono na cadeia lateral já foi reportada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (STROPPA et al., 2017). Neste presente trabalho, além dedicar a estudos sobre o tamanho da cadeia, deu-se o enfoque também em derivados e sais triazólicos com diferentes grupos funcionais e ânions.

Após triagem inicial dos compostos com a espécie *L. (L.) amazonensis*, a fim de selecionar o composto mais promissor (Parte I), o mesmo foi avaliado quanto à atividade em diferentes cepas de *L. (L.) infantum*, espécie classicamente relacionada à manifestação visceral da doença (Parte II). O composto **25c** foi selecionado por apresentar-se mais seletivo para o parasito na forma amastigota em relação à célula hospedeira e por exibir rendimento alto na síntese química, critério importante no desenvolvimento de fármacos (KATSUNO et al., 2015). Em uma análise comparativa do efeito do composto **25c** ressalta-se que: (i) a atividade antileishmanial foi muito semelhante entre as diversas cepas de *L. (L.) infantum*, o que poderá favorecer futuramente o uso deste composto tanto na LV humana quanto a LV canina; (ii) entre as espécies de *Leishmania* avaliadas neste trabalho, observou-se uma sutil melhora do perfil de atividade para a espécie *L. (L.) infantum* (CI<sub>50</sub> ~ 5,36 - 7,92  $\mu$ M para as formas amastigotas) quando comparada com *L. (L.) amazonensis* (CI<sub>50</sub> 9,34  $\mu$ M em amastigotas). Neste último caso, as diferenças de sensibilidade entre as espécies de *Leishmania* já foram relatadas, inclusive relacionadas a fármacos de

referência para tratamento das leishmanioses (ESCOBAR et al., 2002; MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011). Diferenças bioquímicas e moleculares que ocorrem entre as espécies podem interferir na atividade e sensibilidade aos compostos (ESCOBAR et al., 2002).

É interessante ressaltar que para o teste do composto **25c** em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* foi utilizado o soro de cavalo em substituição ao soro fetal bovino (SFB), classicamente utilizado em cultura de células de várias origens (VAN DER VALK, et al., 2004). O soro de cavalo foi utilizado para remover as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* que não foram fagocitadas pelos macrófagos após o processo de interação parasito-célula hospedeira e que, mesmo após sucessivas lavagens com PBS, não eram removidas. É importante retirar os promastigotas não fagocitados no intuito de impedir a replicação e o estabelecimento de uma cultura extracelular no ensaio anti-amastigota (TEGAZZINI et al., 2016). O soro de cavalo não afeta a viabilidade da célula hospedeira e dos amastigotas intracelulares, conforme reportado anteriormente (TEGAZZINI et al., 2016). O efeito do soro de cavalo em parasitos extracelulares ainda não está esclarecido, mas talvez possa estar relacionado ao fato do mesmo apresentar menos nutrientes e fatores de crescimento quando comparado ao SFB (TEGAZZINI et al., 2016).

A elucidação do modo de ação de compostos é uma etapa importante no desenvolvimento de novos fármacos. Com o objetivo de definir alvo(s) celular(es) do composto **25c**, foi inicialmente avaliada sua ação sobre a mitocôndria do parasito, uma vez que este composto é um cátion lipofílico, e que tenderia a acumular em organelas carregadas negativamente, como a mitocôndria, conforme já relatado por outros sais testados em *Leishmania* spp. e conforme previsões *in silico* realizadas para esse composto (MANZANO et al., 2019). Além disso, a mitocôndria é uma organela que desempenha funções metabólicas essenciais nas células e seu bom funcionamento torna-se um fator essencial para a sobrevivência de parasitos, como *Leishmania* spp., que possuem única mitocôndria. Diante disso, a mitocôndria tem sido considerada um promissor alvo para a ação de compostos com ação antileishmanial (MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014). Neste presente trabalho, com o intuito de detectar o potencial de membrana mitocondrial do parasito, foram utilizados os marcadores bioquímicos JC-1 e Rodamina 123, e constatou-se aumento do potencial de membrana mitocondrial, após 72 h de tratamento com o composto **25c**, caracterizando um processo de hiperpolarização. O aumento do potencial da membrana mitocondrial

(hiperpolarização mitocondrial) pode estar relacionado ao aumento da taxa respiratória e da atividade mitocondrial (ALZATE et al., 2007). Para alguns autores pode ser um evento que ocorre antes da despolarização, sendo considerado uma última tentativa da célula para evitar a morte (ANDRADE et al., 2018; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010).

Em continuidade aos estudos sobre a função mitocondrial do parasito, a produção de EROs foi também avaliada em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Para tal finalidade, foram feitas as seguintes análises: (i) produção de EROs totais, tais como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroperóxido, por meio da sonda H<sub>2</sub>DCFDA, após 72 h de tratamento com o composto **25c** e (ii) detecção de superóxido mitocondrial com o reagente MitoSox no tempo de 24 horas, em razão da instabilidade deste radical em tempos superiores. É relatado na literatura que a mitocôndria dos tripanossomatídeos é uma das principais fontes de EROs (MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014). Durante a fosforilação oxidativa, que ocorre na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, o ânion superóxido é formado pela incompleta redução do oxigênio molecular, sendo o precursor de outras EROs, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Essas EROs podem atravessar a membrana mitocondrial, atingir o citosol e outras organelas, podendo causar efeitos tóxicos nas células (MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014; TÓMAS e CASTRO, 2013;). Nossos resultados mostraram que o tratamento dos promastigotas com o composto **25c** induziu aumento em ambos ensaios e é possível observar também que primeiro ocorreu o aumento do superóxido mitocondrial (24h) e posteriormente foi detectado o aumento significativo de EROs totais (72 h).

Para avaliar a sequência da ocorrência desses dois eventos foi realizado o pré- tratamento com o antioxidante NAC. Esse antioxidante impediu o aumento de EROs totais, mas não inibiu o aumento do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas tratadas com o composto **25c**. Porém, observou-se que esse aumento foi inferior quando comparado ao ocorrido pelas células tratadas com o composto **25c** sem o pré-tratamento com o NAC, ou seja, na presença das EROS totais. Isso é um indicativo de que: inicialmente o composto **25c** induziu a hiperpolarização mitocondrial no parasito e depois ocorreu a produção significativa de EROs totais, assim como já relatado em trabalhos anteriores (ALZATE et al., 2007; MIRANDA et al., 2017). No entanto, é importante destacar, neste presente trabalho, que a produção de EROs

totais induzida pelo composto **25c**, estimulou e intensificou a hiperpolarização mitocondrial do parasito.

Corpúsculos lipídicos são compostos por lipídeos neutros, como triacilglicerol e esterol e sua formação pode estar associada a uma tentativa de proteção da célula contra os efeitos da inflamação, estresse oxidativo ou disfunção mitocondrial (LEE et al., 2013). A formação de corpúsculos lipídicos também pode estar relacionada a alteração de esterol na membrana plasmática de promastigotas, devido ao acúmulo dos lipídeos precursores (RODRIGUES et al., 2008). Nossos resultados mostram que houve formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas tratadas com o composto **25c**, podendo estar associada ao estresse oxidativo desencadeado pelo composto.

Análises de ultraestrutura qualitativa e quantitativa, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), de promastigotas tratadas com o composto **25c** confirmaram as alterações bioquímicas associadas à mitocôndria do parasito. Foi detectada alteração e inchaço mitocondrial induzido pelo composto **25c**. Considerando que as espécies de *Leishmania* têm apenas uma mitocôndria ramificada (DE SOUZA et al., 2009) e que a MET quantitativa mostrou áreas mitocondriais aumentadas em seções finas, o inchaço mitocondrial pode estar associado a um aumento no processo de ramificação ou filamentação mitocondrial.

Como o efeito sobre a mitocôndria de tripanossomatídeos pode estar relacionado a diferentes processos de morte celular, inicialmente foi avaliada a ocorrência de apoptose-like em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com o composto **25c**. Eventos de apoptose-like associados com estresse oxidativo e alterações mitocondriais em espécies de *Leishmania* tratadas com diferentes compostos, já foi anteriormente reportado como, o antiviral Amprenavir e o composto pterocarpanquinona (RIBEIRO et al., 2013; ROY et al., 2021). Os eventos de apoptose reportados em protozoários estão associados, principalmente, a fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina na superfície celular e alterações mitocondriais, tais como perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; MENNA-BARRETO, 2019). Em nossos estudos, não foi observada a exposição de fosfatidilserina e a fragmentação do DNA, por meio do marcador anexina V e método do TUNEL, respectivamente. Análises de MET não demonstraram morfologia apoptótica em promastigotas tratadas, como alterações nucleares, representadas pela condensação da cromatina (picnose) e agregação da

cromatina nuclear. Dessa maneira, nossos dados não suportam a ocorrência de apoptose-like em promastigotas tratadas com o composto **25c**.

Em continuidade aos estudos de morte celular, foi avaliada a ocorrência de necrose em promastigotas tratadas com o composto **25c**. Já foi reportado anteriormente na literatura, compostos que induziram necrose em promastigotas de *Leishmania*, com o aumento dos níveis de EROs, alteração mitocondrial e danos na membrana plasmática do parasito, como o derivado de quinoxalina e o análogo da pentamidina (CHACÓN-VARGAS et al., 2018; GOMÉZ-PÉREZ et al., 2014). Em relação a este presente trabalho, observou-se que em diferentes tempos de tratamento, não houve alteração da permeabilidade e da integridade da membrana plasmática, por meio das técnicas de fluorimetria e citometria celular, e por MET, respectivamente. Células em necrose, entre outras características, exibem a perda da integridade da membrana plasmática, com o posterior extravasamento de componentes intracelulares e indução da inflamação (MENNA-BARRETO, 2019). Pelos resultados obtidos, descartou-se também este tipo de morte celular ocasionado pelo composto **25c**.

A autofagia é considerada um processo celular normal e em *Leishmania* spp este evento pode estar associado à uma resposta adaptativa à privação de nutrientes, estresse oxidativo, desenvolvimento e diferenciação celular (BRENNAND, RICO e MICHELS, 2012; BELLOT, LIU e PERVAIZ, 2013). No entanto, quando o processo de autofagia é contínuo e exacerbado, pode desencadear danos celulares, que podem contribuir para o processo de morte celular. Autofagia induzida por diferentes compostos vem sendo reportada na literatura, como a ação do antidepressivo clomipramina e do composto PF-429242 (RODRIGUES et al., 2019; MACHADO et al., 2021). Promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com o composto **25c**, exibiram vacúolos autofágicos, visualizados por meio do marcador fluorescente MDC e por análises de MET.

Diante dos resultados apresentados, a hipótese sugerida sobre a ação do composto **25c** em promastigotas de *L. (L.) infantum* é de que esse composto atua sobre a mitocôndria do parasito, desencadeando estresse oxidativo nas células. Inicialmente, o composto desencadeou a produção do superóxido mitocondrial, e posteriormente das EROs totais. Além disso, o composto levou ao aumento da atividade metabólica e da taxa respiratória das células, ocasionando a hiperpolarização mitocondrial, que foi intensificada pela maior formação das EROs

totais induzida por esse composto (ALZATE et al., 2007). Como tentativa de proteção do estresse oxidativo ocorreu o aumento do acúmulo dos corpúsculos lipídicos (LEE et al., 2013). No entanto, esse estresse oxidativo não desencadeou eventos de apoptose-*like* ou necrose, mas pareceu estar relacionado a um processo de autofagia. As análises de ultraestrutura realizadas por MET, confirmaram essa hipótese, demonstrando a alteração mitocondrial e a presença de vacúolos autofágicos. Estudos futuros poderão ajudar a elucidar melhor este mecanismo de morte.

Resultados similares foram reportados anteriormente, em que os compostos 2,2-dipiridil e derivados de quinoxalina induziram a alteração e disfunção mitocondrial, sem estarem associados a eventos de apoptose-*like* ou necrose, mas sim, pareceram desencadear uma resposta multifatorial em *Leishmania* que resultaram em colapso e morte celular (KAPLUM et al., 2016; MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013).

Além da ação do composto nas formas extracelulares, foi também analisado o efeito em formas intracelulares. Nesta, o mesmo foi analisado indiretamente, visto os amastigotas serem parasitos intracelulares obrigatórios e, portanto, os estudos foram realizados em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*. No processo de infecção por *Leishmania* spp., os macrófagos após ativação elevam os níveis de EROs e de NO na tentativa de eliminar o patógeno. No entanto, a permanência do parasito nos macrófagos está relacionada ao equilíbrio entre a resposta imune e a habilidade do parasito em resistir ao ambiente hostil dos macrófagos ativados (ASSCHE et al., 2011). Alguns compostos induzem o aumento da produção dessas moléculas para interferir nesse balanço e levar a morte do parasito (BASU et al., 2006). Contudo, neste trabalho, observou-se que o composto **25c** não interferiu nos níveis de NO, e ao contrário, levou a uma diminuição nos níveis de EROs em macrófagos não infectados e infectados. Esses resultados sugerem que o composto **25c** pode estar associado a uma ação antioxidante, ao diminuir os níveis de EROs. Já foi reportado anteriormente, que derivados 1,2,3-triazólicos exibiram atividade antioxidante, diminuindo os níveis do radical superóxido *in vitro* (LI et al., 2018).

É reconhecida a participação de diferentes tipos de resposta imune na LV. Classicamente, ocorre a participação de uma resposta Th1 com a produção de citocinas relacionadas ao controle da infecção, como IFN- $\gamma$  e TNF (RATNAPRYA et al., 2019). TNF é uma citocina pró-inflamatória, envolvida na ativação de macrófagos

infectados por *Leishmania* (TUMANG et al., 1994; BERNARDO et al., 2021). Também ocorre o envolvimento de uma resposta Th2, associada a susceptibilidade a infecção, com a produção de citocinas regulatórias, como a IL-10, essencial para sobrevivência do parasito, progressão e severidade da doença, relacionada ao comprometimento da resposta Th1 e da ação das células fagocitárias (GAUTAM et al., 2011; MESQUITA et al., 2018; RAJA et al., 2017). De acordo com os resultados do presente trabalho, observamos que o composto **25c** levou a uma redução significativa dos níveis de IL-10, sem alterar os níveis de TNF produzidos pelos macrófagos. Como hipótese preliminar, o composto **25c** impediu a modulação do parasito sobre os macrófagos, ocasionado a diminuição da produção de IL-10 pelos macrófagos infectados, possivelmente direcionando para uma resposta pró-inflamatória para a eliminação do parasito. Diante do exposto concluímos que o composto **25c** apresenta uma atividade imunomodulatória, induzindo uma resposta protetiva à célula hospedeira, ao diminuir os níveis de uma citocina anti-inflamatória e regulatória (IL-10), que é considerada a principal citocina supressora da resposta imune contra o parasito *Leishmania* (GAUTAM et al., 2011; MESQUITA et al., 2018). Entretanto, mais estudos seriam necessários para definir melhor a atividade imunomodulatória do composto.

Ensaio *in silico* foram empregados para prever a toxicidade, absorção e permeabilidade do composto **25c** quando administrado por via oral. Diante dos resultados obtidos, o composto, via administração oral, pode ser considerado um bom candidato para os testes *in vivo*. De acordo com as predições teóricas, o composto **25c** exibiu boa solubilidade e permeabilidade intestinal, que compreendem a primeira etapa da biodisponibilidade oral (LIPINSKI, 1997; LIPINSKI, 2004). Além disso, foi considerado não carcinogênico, não indutor de hepatotoxicidade e recebeu classificação nível III para a toxicidade oral aguda, com valores de dose letal média maior que 500 mg/Kg (LI et al., 2014). As análises também indicam que o composto **25c** não apresenta efeito inibitório sobre as enzimas do citocromo p450, o que pode ser vantajoso ao diminuir a probabilidade de interações medicamentosas com outros fármacos, uma vez que essas isoenzimas estão relacionadas a biotransformação da maioria dos fármacos (WYLLIE et al., 2018). Ao comparar as propriedades físico-químicas do composto **25c** com a miltefosina, fármaco antileishmanial administrado por via oral, observamos que as duas moléculas apresentam um caráter anfifílico, possuindo uma longa cadeia carbônica e caráter iônico, característica positiva para a permeabilidade celular. No entanto, o composto **25c** é menos apolar, o que o

proporciona uma melhor solubilidade, sendo uma característica vantajosa para o processo de absorção e biodisponibilidade (EGOROVA, GORDEEV e ANANIKOV, 2017).

Assim, com base nos resultados preditivos pela via oral, a ação do composto **25c** foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*. De acordo com o DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative), um dos importantes parâmetros para o desenvolvimento de novos fármacos para a LV é o curto tempo do tratamento (até 10 dias) e a facilidade de aplicação do fármaco, seja por via oral ou intramuscular. Baseando no exposto, o composto foi administrado aos animais uma vez por dia, por via oral, durante 10 dias. Ao analisar a carga parasitária nos camundongos após o término do tratamento, observou-se que o composto levou a diminuição da carga parasitária nos órgãos avaliados (baço e fígado), mas principalmente no baço. É bem relatado na literatura que durante a fase aguda da doença em camundongos BALB/c ocorre uma carga parasitária no fígado bem maior comparada ao baço, com o ápice na segunda e terceira semana, após o dia da infecção dos camundongos (LE FICHOUX et al., 1998). Neste presente trabalho, a verificação da carga parasitária nos camundongos ocorreu na terceira semana, o que pode explicar a diferença de ação dos compostos nos dois órgãos avaliados. Outra hipótese pode estar relacionada a ação de esterases hepáticas dos camundongos BALB/c que poderiam clivar o grupo acetil, e assim ocasionar a redução da ação do composto **25c** no fígado.

Ensaio de toxicidade *in vivo* foram também realizados no intuito de avaliar os efeitos do composto **25c**. Nos ensaios *in vitro*, o composto **25c** exibiu moderada toxicidade em macrófagos peritoneais murinos e não levou a efeitos tóxicos nas hemácias após 24 horas de interação. Em relação a toxicidade *in vivo*, não foram observadas alterações significativas da função renal e hepática dos camundongos BALB/c não infectados, que receberam o composto **25c** a 50 mg/Kg, durante 10 dias, quando comparado ao grupo de camundongos não infectados que recebeu apenas água (controle). Notou-se apenas um aumento isolado dos níveis de ureia. No entanto, para avaliar a função renal devem ser analisados, concomitantemente, os níveis de ureia e de creatinina. A creatinina é considerada um parâmetro mais fidedigno para avaliar a filtração e função renal, enquanto a ureia não é específica para distúrbios renais (BARBOSA et al, 2017; SAATKAMP et al., 2016). Já em relação aos parâmetros bioquímicos dos camundongos infectados e não tratados, observou-se



que houve aumento nos níveis de ureia, creatinina, ALT, AST em comparação ao dos camundongos não infectados. No entanto, os camundongos infectados que receberam o tratamento com o composto **25c** a 10 e 20 mg/Kg, apresentaram diminuição dos níveis de creatinina e ureia, associados a função renal, e das enzimas hepáticas, ALT e AST, inclusive valores próximos aos apresentados pelos camundongos não infectados. Estes dados sugerem a tentativa do composto **25c** em reestabelecer as condições fisiológicas nos camundongos infectados. Não foi observada alteração dos parâmetros renais ou hepáticos em camundongos tratados com a miltefosina, reforçando os efeitos já descritos na literatura, em que a miltefosina tem a toxicidade gastrointestinal como o principal efeito adverso (SINDERMANN e ENGEL, 2006). Em relação aos parâmetros hematológicos analisados, não houve alteração importante do perfil de leucócitos entre o grupo de camundongos infectados, não infectados e aqueles tratados com o composto **25c**.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram o potencial de derivados de triazóis na forma de sais em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp., sendo que alguns desses sais foram mais tóxicos para o parasito do que para a célula hospedeira.

Dentre os compostos avaliados, o composto **25c**, sal de acetato com ânion iodo e dez átomos de carbono na cadeia lateral, exibiu efeito *in vitro* e *in vivo* no modelo murino de leishmaniose visceral. Notavelmente atingiu a mitocôndria do parasito, desencadeando um processo autofágico, que provavelmente contribuiu para a morte celular de promastigotas. Em adição, exibiu um efeito antioxidante e imunomodulatório em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, e apresentou a capacidade de reestabelecer as condições fisiológicas de camundongos infectados com *L. (L.) infantum*.

Esses resultados estimulam a continuidade do estudo antileishmanial dos sais triazólicos e abrem perspectivas para o aprofundamento da ação desses compostos *in vivo* e em diferentes modelos animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691-703, 2014.

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, e0004349, 2016.

AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 46, p. 132-142, 2007.

ALBORZI, A.; RASOULI, M.; SHAMSIZADEH, A. *Leishmania tropica*–isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, p. 306–307, 2006.

ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M. O.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 79-82, 2006.

ALMEIDA-SOUZA, F.; SILVA, V. D. D.; SILVA, G. X.; TANIWAKI, N. N.; HARDOIM, D. D. J.; BUARQUE, C. D.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. D. S. 1, 4-Disubstituted-1, 2, 3-Triazole compounds induce ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* promastigote: An in vitro antileishmanial and in silico pharmacokinetic study. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, p. 6839, 2020.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, F.; BILBE, G.; BLESSON, S.; GOYAL, V., MONNERAT, S.; MOWBRAY, C.; OUATTARA, G. M.; PÉCOUL, B.; RIJAL, S.; RODE, J.; SOLOMOS, A.; STRUB-WOURGAFT, N.; WASUNNA, M.; WWLLS, S.; ZIJSTRA, E.; ARAN, B.; ALVAR, J. Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, p. e00048-18, 2018.

ALZATE, J. F.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; GONZALEZ, V. M.; JIMENEZ-RUIZ, A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X L expression. **Apoptosis**, v. 11, p. 161-171, 2006.

ALZATE, J. F.; ARIAS, A. A.; MORENO-MATEOS, D.; ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A.; JIMÉNEZ-RUIZ, A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p.192-202, 2007.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.8, p. 2689-2699, 2007.

ANDRADE, C. G.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; RIBEIRO, K. R. C.; SOUZA, L. I. O.; SARMENTO-NETO, J. F.; REBOUÇAS, J. S.; SANTOS, B. S.; RIBEIRO, M.S.; CARVALHO, L. B.; FONTES, A. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.17, p. 482-490, 2018.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; PINHEIRO, M. B.; GUIMARÃES, T. M. P. D.; OLIVEIRA, N. C.; CASTRO, J. A.; SILVA, R. N.; AMORIM, A. C. ; BRANDÃO, R. M. S. S.; YOKO, M.; SILVA, A. S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M. L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S. J. H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary parasitology**, v.181, p. 83-90, 2011.

ANGAJALA, K. K.; VIANALA, S.; MACHA, R.; RAGHAVENDER, M.; THUPURANI, M. K.; PATHI, P. J. Synthesis, anti-inflammatory, bactericidal activities and docking studies of novel 1, 2, 3-triazoles derived from ibuprofen using click chemistry. **SpringerPlus**, v. 5, p. 423, 2016.

ANTINARELLI, L. M. R.; DE OLIVEIRA SOUZA, I.; CAPRILES, P. V. Z.; GAMEIRO, J.; BRITTA, E. A.; NAKAMURA, C. V.; LIMA, W. P.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: Induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 195, p. 78-86, 2018.

ANTINARELLI, L. M.; DIAS, R. M.; SOUZA, I. O.; LIMA, W. P.; GAMEIRO, J.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. 4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, p. 704-714, 2015.

ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 337-351, 2011.

BADARÓ, R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina, Bahia 1934-1989. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 159-164, 1988.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.154, p. 1003-1011, 1986.

BALAÑA-FOUCE, R.; PERTEJO, M. Y. P.; DOMÍNGUEZ-ASENJO, B.; GUTIÉRREZ-CORBO, C.; REGUERA, R. M. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. **Drug discovery today**, v. 24, p. 1209-1216, 2019.

BARBOSA, B. S; PRAXEDES, É. A.; LIMA, M. A.; PIMENTEL, M. M. L.; SANTOS, F. A.; BRITO, P. D.; LELIS, I. C. N. G.; MACEDO, M. F. ; BEZERRA, M. B. Perfil

hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. p. 45, 1-5, 2017.

BARBOSA, L. A.; FIUZA, P. P.; BORGES, L. J.; ROLIM, F. A.; ANDRADE, M. B.; LUZ, N. F.; QUINTELA-CARVALHO, G.; LIMA, J. B.; ALMEIDA, R. P.; CHAN, F. K.; BOZZA, M. T.; Borges, V. M., PRATES, D. B. RIPK1-RIPK3-MLKL-associated necroptosis drives *Leishmania infantum* killing in neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1818, 2018.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; DE JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALO, E. M.; JOHNSON JR, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 536-546, 1991.

BASMACIYAN, L.; AZAS, N.; CASANOVA, M. Calcein+/PI-as an early apoptotic feature in *Leishmania*. **PloS One**, v. 12, e0187756, 2017.

BASMACIYAN, L.; AZAS, N.; CASANOVA, M. Different apoptosis pathways in *Leishmania* parasites. **Cell Death Discovery**, v.5, p.1-3, 2018.

BASMACIYAN, L.; BERRY, L.; GROS, J.; AZAS, N.; CASANOVA, M. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. **Microbial Cell**, v. 5, p. 404-417, 2018.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. **Cell death in *Leishmania***. *Parasite*, 26, 2019.

BASU, J. M.; MOOKERJEE, A.; SEN, P.; BHAUMIK, S.; SEN, P.; BANERJEE, S.; NASKAR, K.; CHOUDHHURI, S. K.; SAHA, B.; RAHA, S.; ROY, S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p.1788-1797, 2006.

BATES, P. A. Revising *Leishmania's* life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 529-530, 2018.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v.37, 1097-1106, 2007.

BELLI, A.; GARCIA, D.; PALACIOS, X.; RODRIGUEZ, B.; VALLE, S.; VIDEA, E.; TINOCO, E.; MARIN F.; HARRIS, E. Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) Chagasi* in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 380-385, 1999.

BELLOT, G. L.; LIU, D.; PERVAIZ, S. ROS, autophagy, mitochondria and cancer: RAS, the hidden master? **Mitochondrion**, v. 13, p. 155-162, 2013.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, p. 135-147, 2014.

BERNARDO, L.; SOLANA, J. C.; ROMERO-KAUSS, A.; SÁNCHEZ, C.; CARRILLO, E.; MORENO, J. Effect of immunosuppressants on the parasite load developed in, and immune response to, visceral leishmaniasis: A comparative study in a mouse model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.15, e0009126, 2021.

BEZERRA, J. M. T.; DE ARAÚJO, V. E. M.; BARBOSA, D. S.; MARTINS-MELO, F. R.; WERNECK, G. L.; CARNEIRO, M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, e0006697, 2018.

BIEDERBICK, A.; KERN, H. F.; ELSÄSSER, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. **European journal of cell biology**, v. 66, p. 3-14, 1995.

BITTENCOURT, A.; SILVA, N.; STRAATMANN, A.; NUNES, V. L. C.; FOLLADOR, I.; BADARÓ, R. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 229-233, 2003.

BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1, 2, 3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3511-3531, 2019.

BRENNAND, A.; RICO, E.; MICHELS, P. A. Autophagy in trypanosomatids. **Cells**, v. 1, p. 346-371, 2012.

BROEKE, J.P.M.M.P. **Image Processing with ImageJ** - Second Edition, Packt, 2015.

BURZA S.; CROFT S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, 951–970, 2018.

CARLSEN, E.D.; LIANG, Y.; SHELITE, T.R.; WALKER, D.H.; MELBY, P.C.; SOONG, L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, p. 109-118, 2015.

CARNAÚBA JR, D.; KONISHI, C. T.; PETRI, V.; MARTINEZ, I. C. P.; SHIMIZU, L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: a case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, e504-e507, 2009.

CARNIELLI, J. B.; CROUCH, K.; FORRESTER, S.; SILVA, V. C.; CARVALHO, S. F.; DAMASCENO, J. D.; BROWN, E.; DICKENS, N. J.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; DIETZE, R.; JEFFARES, D. C.; MOTTRAM, J. C. A *Leishmania infantum* genetic

marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83-91, 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, p. 1251-1265, 2019.

CHALLA, S.; ZHAO, H.; GUMBS, A.; CHETTY, C. S.; BOSE, H. S. New Ionic Derivatives of Betulinic Acid as Highly Potent Anti-Cancer Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p.1734–1738, 2012.

CHACÓN-VARGAS, K. F.; ANDRADE-OCHOA, S.; NOGUEDA-TORRES, B.; JUÁREZ-RAMÍREZ, D. C.; LARA-RAMÍREZ, E. E.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; MONGE, A.; RIVERA, G.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E. Isopropyl quinoxaline-7-carboxylate 1, 4-di-N-oxide derivatives induce regulated necrosis-like cell death on *Leishmania (Leishmania) mexicana*. **Parasitology research**, v. 117, p. 45-58, 2018.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring progress in neglected disease drug development. **Clinical therapeutics**, v. 36, p. 1037-1042, 2014.

COLE, M. R.; LI, M.; EL-ZAHAB, B.; JANES, M. E.; HAYES, D.; WARNER, I. M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of BetaLactam Antibiotic-Based Imidazolium- and Pyridinium-Type Ionic Liquids. **Chemical Biology Drug Design**, v. 78, p. 33–41, 2011.

COLMENARES, M.; KAR, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MCMAHON-PRATT, D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p.S3-S7, 2002.

COSTA, C. H.; GOMES, R. B.; SILVA, M. R.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, R. J.; MAGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 997-1000, 2000.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. Hospital (Rio J), v. 11, p. 3-9, 1937.

CUNHA-JÚNIOR, E. F.; MARTINS, T. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MARQUES, P. R.; PORTARI, E. A.; COELHO, M. G. P.; NETTO, C.D.; COSTA, P. R. R.; SABINO, K. C. K.; TORRES-SANTOS, E. C. Preclinical studies evaluating subacute toxicity and therapeutic efficacy of LQB-118 in experimental visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 3794-3801, 2016.

CUNNINGHAM, M. L, FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. **European Journal of Biochemistry**, v. 4, p. 460 -468, 1995.

DAGNINO, A. P. A.; MESQUITA, C. S.; DORNELES, G. P.; TEIXEIRA, V. D. O. N.; DE BARROS, F. M. C.; CCANA-CCAPATINTA, G. V., MONTEIRO, M. C.; JÚNIOR, L. C. R.; PERES, A.; VON POSER, G. L, ROMÃO P. R.T. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v.145, p. 1199-1209, 2018.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2461-2469, 2001.

DE MENEZES, J. P. B., GUEDES, C. E. S., PETERSEN, A. L. D. O. A., FRAGA, D. B. M., VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015 p. 1-11, 2015.

DE MUYLDER, G.; ANG, K. K.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1253, 2011.

DE OLIVEIRA, J. P. C.; FERNANDES, F.; CRUZ, A. K.; TROMBELA, V.; MONTEIRO, E.; CARMARGO, A. A.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR based analyses and molecular karyotyping. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 6, p. 1-8, 2007.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, p. 1013-1025, 2002.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; & RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; DELP, J.; PRAZERES, P. D.; MARQUES, L. B.; CARMO, A. M. L.; STROPPIA, P. H. F.; GLANZMANN, N.; KISITU, J.; SZAMOSVÁRI, D.; BÖTTCHER, T.; LEIST, M.; DA SILVA, A. D. Correlation of structural features of novel 1, 2, 3-triazoles with their neurotoxic and tumoricidal properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, p. 253-263, 2018.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. **Bioorganic chemistry**, v. 71, p. 30-54, 2017.

DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. **Journal of neuroinflammation**, v.15, 2018

DORLO, T. P., BALASEGARAM, M., BEIJNEN, J. H., & DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1-12, 2012.



DRIEMEIER, M.; DE OLIVEIRA, P. A.; DRUZIAN, A. F.; LOPES BRUM, L. F.; PONTES, E. R. J. C.; DORVAL, M. E. C.; PANIAGO, A. M. M. Late diagnosis: a factor associated with death from visceral leishmaniasis in elderly patients. **Pathogens and Global Health**, v. 109, p. 283-289, 2015

EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 7132-7189, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, p. 151-157, 2002.

FISCHER, U.; JÄNICKE, R. U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, p. 76-100, 2003.

FLETCHER, J. T.; SOBCZYK, J. M.; GWAZDACZ, S. C.; BLANCK, A. J. Antimicrobial 1,3,4-trisubstituted-1,2,3-triazolium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 20, p. 3320-3323, 2018.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Oral efficacy of apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, e0004442, 2016.

FOREZI, L. S. M.; LIMA, C. G.; AMARAL, A. A.; FERREIRA, P. G.; DE SOUZA, M. C. B.; CUNHA, A. C.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F. Bioactive 1, 2, 3-Triazoles: An Account on their Synthesis, Structural Diversity and Biological Applications. **The Chemical Record**, V.21, P 1-27, 2021.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, 329-344, 2015.

L. GALLUZZI, I.; VITALE, S. A.; AARONSON, J. M.; ABRAMS, D.; ADAM, P.; AGOSTINIS, E. S.; ALNEMRI, L.; ALTUCCI, I.; AMELIO, D. W.; ANDREWS, M. ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, A. V.; ANTONOV, E.; ARAMA, E. H.; BAEHRECKE, N. A.; BARLEV, N. G.; BAZAN, F.; BERNASSOLA, M. J. M.; BERTRAND, K.; BIANCHI, M. V.; BLAGOSKLONNY, K.; BLOMGREN, C.; BORNER, P.; BOYA, C.; BRENNER, M.; CAMPANELLA, E. CANDI, D.; CARMONA-GUTIERREZ, F.; CECCONI, F. K. M.; CHAN, N. S.; CHANDEL, E. H.; CHENG, J. E.; CHIPUK, J. A.; CIDLOWSKI, A.; CIECHANOVER, G. M.; COHEN, M.; CONRAD, J. R.; CUBILLOS-RUIZ, P. E.; CZABOTAR, V.; D'ANGIOLELLA, T. M.; DAWSON, V. L.; DAWSON, V.; DE LAURENZI, R.; DE MARIA, K. M.; DEBATIN, R. J.; DEBERARDINIS, M.; DESHMUKH, N.; DI DANIELE, F.; DI VIRGILIO, V. M.; DIXIT,

S. J.; DIXON, C. S.; DUCKETT, B. D.; DYNLACHT, W. S.; EL-DEIRY, J.; W.; ELROD, G. M.; FIMIA, S.; FULDA, A. J.; GARCÍA-SÁEZ, A. D.; GARG, C.; GARRIDO, E.; GAVATHIOTIS, P.; GOLSTEIN, E.; GOTTLIEB, D. R.; GREEN, L. A.; GREENE, H.; GRONEMEYER, A.; GROSS, G.; HAJNOCZKY, J. M.; HARDWICK, I. S.; HARRIS, M. O.; HENGARTNER, C.; HETZ, H.; ICHIJO, M.; JÄÄTTELÄ, B.; JOSEPH, P. J.; JOST, P. P.; JUIN, W. J.; KAISER, M.; KARIN, T.; KAUFMANN, O.; KEPP, A.; KIMCHI, R. N.; KITSIS, D. J.; KLIONSKY, R. A.; KNIGHT, S.; KUMAR, S. W.; LEE, J. J.; LEMASTERS, B.; LEVINE, A.; LINKERMANN, S. A.; LIPTON, R. A.; LOCKSHIN, C.; LÓPEZ-OTÍN, S. W.; LOWE, T.; LUEDDE, E.; LUGLI, M.; MACFARLANE, F.; MADEO, M.; MALEWICZ, W.; MALORNI, G.; MANIC, J. C.; MARINE, S. J.; MARTIN, J. C.; MARTINOU, J. P.; MEDEMA, P.; MEHLEN, P.; MEIER, S.; MELINO, E. A. MIAO, J. D.; MOLKENTIN, U. M.; MOLL, C.; MUÑOZ-PINEDO, S.; NAGATA, G.; NUÑEZ, A.; OBERST, M.; OREN, M.; OVERHOLTZER, M.; PAGANO, T.; PANARETAKIS, M.; PASPARAKIS, J. M.; PENNINGER, D. M.; PEREIRA, S.; PERVAIZ, M. E.; PETER, M.; PIACENTINI, P.; PINTON, J. H. M.; PREHN, H.; PUTHALAKATH, G. A.; RABINOVICH, M.; REHM, R.; RIZZUTO, C. M. P.; RODRIGUES, D. C.; RUBINSZTEIN, T.; RUDEL, K. M.; RYAN, E.; SAYAN, L.; SCORRANO, F.; SHAO, Y.; SHI, J.; SILKE, H. U.; SIMON, A.; SISTIGU, B. R.; STOCKWELL, A.; STRASSER, G.; SZABADKAI, S. W. G.; TAIT, D.; TANG, N.; TAVERNARAKIS, A.; THORBURN, Y.; TSUJIMOTO, B.; TURK, T.; VANDEN BERGHE, P.; VANDENABEELE, M. G.; VANDER HEIDEN, A.; VILLUNGER, H. W.; VIRGIN, K. H.; VOUSDEN, D.; VUCIC, E. F.; WAGNER, H.; WALCZAK, D.; WALLACH, Y.; WANG, J. A.; WELLS, W.; WOOD, J.; YUAN, Z.; ZAKERI, B.; ZHIVOTOVSKY, L.; ZITVOGEL, G.; MELINO, G.; KROEMER. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, **Cell Death e Differentiation**, v.25, p. 486–541, 2018.

GALLUZZI, L.; ZAMZAMI, N.; ROUGE, T. D. L. M.; LEMAIRE, C.; BRENNER, C.; KROEMER, G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, p. 803-813, 2007.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, p. 1134-1137, 2011.

GILANDOUST, M.; HARSHA, K. B.; MOHAN, C. D.; RAQUIB, A. R.; RANGAPPA, S., PANDEY, V.; PANDEY, V.; LOBIE, P.E.; BASAPPA.; RANGAPPA, K. S. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of 1, 2, 3-triazoles and 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidines in human breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 2314-2319, 2018.

GLANZMANN, N.; CARMO, A. M.; ANTINARELLI, L. M.; COIMBRA, E. S.; COSTA, L. A. S.; DA SILVA, A. D. Synthesis, characterization, and NMR studies of 1, 2, 3-triazolium ionic liquids: a good perspective regarding cytotoxicity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, p.160, 2018.

GÓMEZ-PÉREZ, V.; MANZANO, J. I.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; CASTANYS, S.; ROSA, J. M. C.; GAMARRO, F. 4-Amino bis-pyridinium derivatives as novel

antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 4103-4112, 2014.

GOMES, R. B.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; COSTA, J.; MIRANDA, J. C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* Saliva Concurrent with the Development of Anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1530-1534, 2002.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, p. 8, p. 419-433, 2010.

GOYAL, V.; MAHAJAN, R.; PANDEY, K.; SINGH, S. N.; SINGH, R. S.; STRUB-WOURGAFT, N.; ALVES, F.; DAS, V. N. R.; TOPNO, R. K.; SHARMA, B.; BALASEGARAM, M.; BERN, C.; HIGHTOWER, A.; RIJAL, S.; ELLIS, S.; SUNYOUO, T.; BURZA, S.; LIMA, N.; DAS, P.; ALVAR, J. Field safety and effectiveness of new visceral leishmaniasis treatment regimens within public health facilities in Bihar, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, e0006830, 2018.

GUPTA, R.; KUSHAWAHA, P. K.; SAMANT, M.; JAISWAL, A. K.; BAHARIA, R. K.; DUBE, A. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 440-443, 2012.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v.61, p. 90-97, 2013.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N., HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1-15; 2010.

KAPLUM, V.; COGO, J.; SANGI, D. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A. G.; NAKAMURA, C. V. In vitro and in vivo activities of 2, 3-diarylsubstituted quinoxaline derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.60, p. 3433-3444, 2016.

KARAMIAN, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; MEHRABANI, D.; GHOLAMI, K. *Leishmania major* infection in a patient with visceral leishmaniasis: treatment with Amphotericin B. **Parasitology research**, v. 101 p.1431–1434, 2007.

KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WAMER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.14, p. 751, 2015.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p.1087-1096, 2007.

KIMA, P. E.; DUNN, W. Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania* parasitophorous vacuoles. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, p.139-145, 2005.

KHANRA, S.; DATTA, S.; MONDAL, D.; SAHA, P.; BANDOPADHYAY, S. K.; ROY, S.; MANNA, M. RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *L. tropica* with the disease. **Acta Tropica**, v.124, p. 229–234, 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W; Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine, Biology and Epidemiology, v.1, p. 1-120, 1987. Academic Press: London.

LAVÉLAN, A.; MESNIL, F. 'Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde'. **Comp. Rendum Academia de Scientia**, p. 957-62, 1903.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIÈVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. Short-and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 654-658, 1998.

LEE, S. J.; ZHANG, J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

LI, Q., SUN, X., GU, G., & GUO, Z. Novel water soluble chitosan derivatives with 1, 2, 3-triazolium and their free radical-scavenging activity. **Marine drugs**, v.16, p. 1-13, 2018.

LI, X., CHEN, L., CHENG, F., WU, Z., BIAN, H., XU, C., LI, G.; SHEN, X.;TANG, Y. In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 1061-1069, 2014.

LIMA, I. D.; LIMA, A. L.; MENDES-AGUIAR, C. D. O.; COUTINHO, J. F.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; QUEIROZ, J. W.; JERONIMO, S. M. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, e0006164, 2018.

LINDOSO, J. A. L.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T.; MOREIRA, C. H. V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v.8, p. 147-156, 2016.

LIPINSKI, C. A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v.114, p. 256-265, 2005.

LÜDER, C. G.; CAMPOS-SALINAS, J.; GONZALEZ-REY, E.; VAN ZANDBERGEN, G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, v. 3, 1-11, 2010.

LUZ, N. F., BALAJI, S., OKUDA, K., BARRETO, A. S., BERTIN, J., GOUGH, P. J., GAZZINELLI, R.; ALMEIDA, R. P.; BOZZA, M. T.; BORGES, V. M.; CHAN, F. K. M. RIPK1 and PGAM5 control *Leishmania* replication through distinct mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 196, p. 5056-5063, 2016.

LUZ, N. F.; KHOURI, R.; VAN WEYENBERGH, J.; ZANETTE, D. L.; FIUZA, P. P.; NORONHA, A.; BARRA, A.; BOAVENTURA, V. S.; PRATES, D. B.; CHAN, F. K-M.; BANDRADE, B. B.; BORGES, V. M. *Leishmania braziliensis* subverts necroptosis by modulating RIPK3 expression. **Frontiers in Microbiology**, V. 9, 2018.

MACHADO, P. D. A.; GOMES, P. S.; MIDDLEJ, V.; COIMBRA, E. S.; DE MATOS GUEDES, H. L. PF-429242, a Subtilisin Inhibitor, Is Effective in vitro Against *Leishmania infantum*. **Frontiers in Microbiology**, v.12: 583834, 2021

MAGILL, A. J.; GROGL, M.; GASSER, R. A.; WELLINGTON, S.; OSTER, C. N. Viscerotropic leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in soldiers returning from operation desert storm. **New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1383–1387, 1993.

MANZANO, J. I.; CUETO-DÍAZ, E. J.; OLÍAS-MOLERO, A. I.; PEREA, A.; HERRAIZ, T.; TORRADO, J. J.; ALUNDA, J.M.; GAMARRO, F.; DARDONVILLE, C. Discovery and pharmacological studies of 4-hydroxyphenyl-derived phosphonium salts active in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, 10664-10675, 2019.

MARIÑO, G.; NISO-SANTANO, M.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 81-94, 2014.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M.; SOTO, M.; IBORRA, S.; SANCHO, D. (2018). *Leishmania* hijacks myeloid cells for immune escape. **Frontiers in microbiology**, v.9, p. 883, 2018.

MATTE, C.; DESCOTEAUX, A. Exploitation of the Host cell membrane fusion machinery by *Leishmania* is part of the infection process. **PLoS Pathogens**, v. 12, e1005962, 2016.

MAURICIO, I. L., HOWARD, M. K., STOTHARD, J. R., MILES, M. A. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999.

MEBRAHTU, Y.; LAWYER, P.; GITHURE, J.; WERE, J. B.; MUIGAI, R.; HENDRICKS, L.; LEEUWENBURG, J.; KOECH, D.; ROBERTS, C. Visceral leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 289–294, 1989.

MEINEL, R. S.; DAS CHAGAS ALMEIDA, A.; STROPPIA, P. H. F.; GLANZMANN, N.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D. Novel functionalized 1, 2, 3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, 2020.

MELO, J. O.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1, 2, 3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MELO, R.C.N. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Ultrastructural study in rats. **Tissue and Cell**, v. 31, p. 281–290, 1999.

MENDES, E. A.; DESOTI, V. C.; DE OLIVEIRA SILVA, S., UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; YAMADA-OGATTA, S.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-biological interactions**, v. p. 256, 16-24, 2016.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill. **Cell death & disease**, v.10, p. 1-11, 2019

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

MENON, S. S.; ROSSI, R.; NSHIMYUMUKIZA, L.; ZINSZER, K. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, p. 1-9, 2016.

MESQUITA, I.; FERREIRA, C.; BARBOSA, A. M.; FERREIRA, C. M.; MOREIRA, D.; CARVALHO, A.; CUNHA, C.; RODRIGUES, F.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; ESTAQUIER, J.; CASTRO, A. G.; TORRADO, E.; SILVESTRE, R. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, 112, 16-20, 2018.

MESQUITA-RODRIGUES, C.; MENNA-BARRETO, R. F.; SABÓIA-VAHIA, L.; DA-SILVA, S. A.; DE SOUZA, E. M.; WAGHABI, M. C.; CUERVO, P.; DE JESUS, J. B. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis*

promastigotes are affected by the iron chelator 2, 2-dipyridyl. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.7, e2481, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde de A a Z. Leishmaniose Visceral, 2019. <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em 14 de setembro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. 1 edição atual, volume 3, 2017.

MINISTERIO DA SAUDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

MIRANDA, N.; VOLPATO, H.; DA SILVA RODRIGUES, J. H.; CAETANO, W.; UEDA-NAKAMURA, T.; DE OLIVEIRA SILVA, S.; NAKAMURA, C. V. The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.174, p. 342-354, 2017.

MOAL, V. LIÉVIN-LE.; LOISEAU, P. M. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. **The FEBS Journal**, v. 283, p. 598-607, 2016.

MOMEN, H.; GRIMALDI, JR G.; DEANE, L. M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 447-448, 1987.

MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 178- 182, 2009.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-7, 2012.

MORAIS-TEIXEIRA, E. D.; DAMASCENO, Q. S.; GALUPPO, M. K.; ROMANHA, A. J.; RABELLO, A. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 475-478, 2011.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.1861-1875, 2004.

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

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

NAUFAL SPIR, P. R.; PRESTES-CARNEIRO, L. E.; FONSECA, E. S.; DAYSE, A., GIUFFRIDA, R.; D'ANDREA, L. A. Z. Clinical characteristics and spatial distribution of visceral leishmaniasis in children in São Paulo state: an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 111, p. 91-97, 2017.

NICOLLE, C. J. 1908 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisia'. **Archives du Institute Pasteur de Tunisia**, p. 1-26, 1908.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p.113-123, 2016.

NOGUEIRA, F. S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-11, 2019.

OREN, R.; SCHNUR, L.; YEHUDA, D. B.; MAYNER, V.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Visceral leishmaniasis: a difficult diagnosis and unusual causative agent. **Journal of Infectious Diseases**, v.164, p. 746–749, 1991.

PAHO- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in the Americas: treatment recommendations., 2018. Disponível em :[http:// iris.paho.org](http://iris.paho.org).

PAHO—PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, WHO—World Health Organization. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, 2019. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org).

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTOS, W. R.; FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 510-517, 2001.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 852-859, 2004.

PATIL, V.; GUERRANT, W.; CHEN, P. C.; GRYDER, B.; BENICEWICZ, D. B.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B.L.; OYELERE, A. K. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 415-425, 2010.

PICADO, A.; DASH, A. P.; BHATTACHARYA, S.; BOELAERT, M. Vector control interventions for visceral leishmaniasis elimination initiative in South Asia, 2005-2010. **The Indian Journal of Medical Research**, v.136, p. 22, 2012.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, p. 111-129, 2015.



PONCE, C.; PONCE, E.; CRUZ, A.; KREUTZER, R.; PRATT, D. M.; NEVA, F. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. **The Lancet**, v. 337, p. 67-70, 1991.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 58-66, 2013.

PURKAIT, B.; KUMAR, A.; NANDI, N.; SARDAR, A. H.; DAS, S.; KUMAR, S.; PANDEY, K.; RAVIDAS, V.; KUMAR, M.; DE, T.; SINGH, D.; DAS, P. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1031-1041, 2012.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v.20, p. 959-968, 2015.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p.147–154, 2014.

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

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JÚNIOR, E.F.; PINHEIRO, R.O.; DA SILVA, S. A. G.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A.J.M.; COSTA, P. R. R.; NETTO, C. D.; MELO, R. C. N.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; TORRES-SANTOS, E. C. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 789-799, 2013.

ROCHA, M. N.; CORRÊA, C. M.; MELO, M. N.; BEVERLEY, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; MADUREIRA, A. P.; SOARES, R. P. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.75, p.282-291, 2013.

RODRIGUES, J. C. F.; CONCEPCION, J. L.; RODRIGUES, C.; CALDERA, A.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. *In vitro* activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 4098-4114, 2008.

RAJA, M. R. C.; VELAPPAN, A. B.; CHELLAPPAN, D.; DEBNATH, J.; MAHAPATRA, S. K. Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 139, 503-518, 2017.

RATNAPRIYA, S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A. Visceral leishmaniasis: an overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, v.37, p. 3505-3519, 2019.

RODRIGUES, J. H., MIRANDA, N., VOLPATO, H., UEDA-NAKAMURA, T., & NAKAMURA, C. V. The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway. **Parasitology Research**, v. 118, p. 977-989, 2019

ROSTAMIAN, M.; JAFARI, D.; ABOLGHAZI, M.; FARAHANI, H.; NIKNAM, H. M. *Leishmania tropica*: suggestive evidences for the effect of infectious dose on pathogenicity and immunogenicity in an experimental model. **Parasitology Research**, v. 117, p. 2949-2956, 2018.

ROY, A.; BEHERA, S.; MAZIRE, P. H.; KUMARI, B.; MANDAL, A.; PURKAIT, B.; GHOSH, P.; DAS, P.; DAS, P. The HIV-1 protease inhibitor Amprenavir targets *Leishmania donovani* topoisomerase I and induces oxidative stress-mediated programmed cell death. **Parasitology International**, v. 82, p. 102287, 2021.

SAATKAMP, C. J.; DE ALMEIDA, M. L.; BISPO, J. A. M.; PINHEIRO, A. L. B.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA, L. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, 037001, 2016.

SAINI, S.; BHARATI, K.; SHAHA, C.; MUKHOPADHYAY, C. K. Zinc depletion promotes apoptosis-like death in drug-sensitive and antimony-resistance *Leishmania donovani*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-14, 2017.

SALVIONI, O. D.; PEREIRA, J.; SANDER, M. G.; GÓMEZ, C. V. Molecular detection of *Leishmania infantum* in atypical cutaneous lesions from paraguayan patients. **Journal of Dermatology and Clinical Research**, v. 5, 3-5, 2017.

SAMANT, M.; SAHU, U.; PANDEY, S. C.; KHARE, P. Role of cytokines in experimental and human visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

SANCHES, L. D. C.; MARTINI, C. C. D.; NAKAMURA, A. A.; SANTIAGO, M. E. B.; DOLABELA DE LIMA, B.; LIMA, V. M. F. D. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 465-469, 2016.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. **Trends in Parasitology**, v.26, p. 466-469, 2010.

SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; OLIVEIRA, F.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 548-555, 2018.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Disease**, v. 45, p. 255-72, 2008.

SHNEINE, J. K.; ALARAJI, Y. H. Chemistry of 1, 2, 4-triazole: A review article. **Spectroscopy**, v. 9, p. 9c, 2016.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, S17-S20, 2006.

SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, p.1424-1429, 2014.

SOLIMAN, M. F. M. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. **Acta Tropica**, v. 97, p. 146-150, 2006.

SOUZA, N. A.; BRAZIL, R. P.; ARAKI, A. S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 161-174, 2017.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.10, p. 1-10, 2017.

STROPPA, P. H.; ANTINARELLI, L. M.; CARMO, A. M.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D. Effect of 1, 2, 3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3034-3045, 2017.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 25120–25132, 2003.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, v.1-10, 2018.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p.1104-1107, 2000.

SUNDAR, S.; AGARWAL, D. Visceral Leishmaniasis-Optimum Treatment Options in Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.37, p. 492-494, 2018.

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

TARAWNEH, A. H.; LEÓN, F.; JAIN, S. K.; GADETSKAYA, A. V.; ABU-ORABI, S. T.; TEKWANI, B. L.; CUTLER, S. J. Evaluation of triazole and isoxazole derivatives as potential anti-infective agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, p. 1269-1275, 2018.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, p. 497-507, 2016.

TEGAZZINI, D., DÍAZ, R., AGUILAR, F., PEÑA, I., PRESA, J. L., YARDLEY, V., MARTIN, J.J.; COTERON, J.M.; CROFT, S.L.; CANTIZANI, J. A replicative in vitro assay for drug discovery against *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 3524-3532, 2016.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1, 2, 3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274-286, 2018.

TEMRAZ, M. G.; ELZAHHAR, P. A.; BEKHIT, A. E. D. A.; BEKHIT, A. A.; LABIB, H. F.; BELAL, A. S. Anti-leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: design, synthesis, biological evaluation and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.151, p. 585-600, 2018.

THAKUR, L.; SINGH, K. K.; SHANKER, V.; NEGI, A.; JAIN, A.; MATLASHEWSKI, G.; JAIN, M. Atypical leishmaniasis: A global perspective with emphasis on the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, e0006659, 2018.

TIAN, Y.; LIU, Z.; LIU, J.; HUANG, B.; KANG, D.; ZHANG, H.; DE CLERCG, E.; DAELEMANS, D.; PANNECOUQUE, C.; LEE, K.H.; CHEN, C. H, ZHAN, P.; LIU, X. Targeting the entrance channel of NNIBP: Discovery of diarylnicotinamide 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazoles as novel HIV-1 NNRTIs with high potency against wild-type and E138K mutant virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 339-350, 2018.

TOLEDO, D.A.M.; ROQUE, N.R.; TEIXEIRA, L.; MILÁN-GARCÉS, E.A.; CARNEIRO, A.B.; ALMEIDA, M.R.; ANDRADE, G.F.S.; MARTINS, J.S.; PINHO, R.R.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; BOZZA, P.T.; D'AVILA, H.; MELO, R.C.N. Lipid body organelles within the parasite *Trypanosoma cruzi*: A role for intracellular arachidonic acid metabolism. **PLoS One** 11, e01604133, 2016.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 280-284, 2007.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, 696-707, 2013.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v, 359, p. 2188-2194, 2002.

TUMANG, M. C.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L. L.; HELFGOTT, D. C.; TEITELBAUM, R.; HARIPRASHAD, J.; MURRAY, H. W. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 768–75, 1994.

VALDIVIA, H. O.; ALMEIDA, L. V.; ROATT, B. M.; REIS-CUNHA, J. L.; PEREIRA, A. A. S.; GONTIJO, C.; FUJIWARA, R. T.; REIS, A. B.; SANDERS, M. J.; COTTON, J. A.; BARTHOLOMEU, D. C. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 7, p.40804, 2017.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; FISCHER, R.; GRUBER, F.; GSTRAUNTHALER, G.; HELLEBREKERSG, L.; HYLLNERH, J.; JONKERI, F. H.; PRIETOJ, P.; THALEN, M.; BAUMANS, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in vitro**, v. 18, p.1-12, 2004.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In *Biology of the Kinetoplastida*, p. 1-34, 1976. Edited by W. H. R. Lumsden & D. A. Evans. London: Academic Press.

VILAS, V. J. D. R.; MAIA-ELKHOURY, A. N.; YADON, Z. E.; COSIVI, O.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J. Visceral leishmaniasis: a One Health approach. **Veterinary Record**, v.175, p. 42-44, 2014.

VLAHAKIS, J. Z.; LAZAR, C.; CRANDALL, IE.; E SZAREK, W. A. Atividade anti-Plasmodium dos sais imidazolium e triazolium. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 6184-6196, 2010.

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *The Journal of Immunology*, v.176, p.1834-1839, 2006.  
WILLIAMS, R. A.; SMITH, T. K.; CULL, B.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. **PLoS pathogens**, v. 8, e1002695, 2012.

WHO. Health topics- leishmaniasis. 2018. [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em 07 de julho de 2021.

WHO. Leishmaniasis, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 07 de julho de 2021.

WYLLIE, S.; THOMAS, M.; PATTERSON, S.; CROUCH, S.; DE RYCKER, M.; LOWE, R.; GRESHAM, S.; URBANIAK, M.; OTTO, T. D.; STOJANOVSKI, L.; SIMEONS, F. R MANTHRI, S.; MACLEAN, L. M.; ZUCCOTTO, F.; HOMEYER, N.; PFLAUMER, H.; BOESCHE, M.; SASTRY, L.; CONNOLLY, P.; ALBRECHT, S.; BERRIMAN, M.; DREWES, G.; GRAY, D. W.; GHIDELLI-DISSE, S.; DIXON, S.; FIANDOR, J. M.; WYATT, P.G.; FERGUSON, M. A. J.; FAIRLAMB, A.H.; MILES, T.; READ, K. D.; GILBERT, I. H. Cyclin-dependent kinase 12 is a drug target for visceral leishmaniasis. **Nature**, v. 560, p. 192-197, 2018.

YOUSSEF, M. Y.; EISSA, M. M.; EL-NAGA, I. F.; EL-GOWHARY, S. H. Dissemination of *Leishmania* to organs of mice experimentally infected with *Leishmania tropica*. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v.26, p. 719–731, 1996.

ZHANG, Y.; SU, S. S.; ZHAO, S.; YANG, Z.; ZHONG, C. Q.; CHEN, X.; CAI, O.; YANG, Z-H.; HUANG, D.; WU, R.; HAN, J. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. **Nature communications**, v. 8, p.1-14, 2017.

ZHAO, H.; HOLMES, S. S.; BAKER, G. A.; CHALLA, S.; BOSE, H. S.; SONG, Z. Ionic Derivatives of Betulinic Acid as Novel HIV-1 Protease Inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition Medical**, v.27, 715-721, 2012.

ZUBEN, A. P. B. V.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, p. e00087415, 2016.

**ANEXO A- Certificados CEUA**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 006/2017 – CEUA sobre “Estudo in vivo da ação leishmanicida de bioisómeros da milftosina em Leshmania chagasi”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de AYLA DAS CHAGAS ALMEIDA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/04/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 100 camundongos isogênico Balb/c (100 fêmeas) de 4-6 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/08/2017 a 30/04/2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 006/2017 – CEUA about “Estudo in vivo da ação leishmanicida de bioisómeros da milftosina em Leshmania chagasi”, under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA and collaboration of AYLA DAS CHAGAS ALMEIDA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/04/2017. For the development of this research 100 Balb / c isogenic mice (100 females) from 4-6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 01/08/2017 to 30/04/2018.

**Juiz de Fora, 29 de junho de 2017**

P.

Vice-coordenadora  
CEUA

Coordenadora  
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 007/2018 – CEUA sobre “Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, referentes aos lotes 2019,2020 e 2021”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 108 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

**CERTIFICATE**

We certify that protocol no. 007/2018 - CEUA on "Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of synthetic or natural compounds in peritoneal macrophages of BALB / c mice, for lots 2019,2020 and 2021", research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra Ayla collaboration of Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) of PRÓ- REITORIA DE PESQUISA / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research, 108 females will be used, being a BALB / c isogenic mouse of 4-6 weeks, a project to be carried out in the laboratory located at the Institute of Biological Sciences Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, according to and will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year, provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

P: 

Vice-coordenadora  
CEUA



 Coordenadora  
CEUA





**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 008/2018 – CEUA sobre “Avaliação da atividade antileishmanial *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania sp.*, referentes aos lotes 2019, 2020 e 2021”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 432 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

**CERTIFICATE**

We certify that protocol no. 008/2018 - CEUA on "Evaluation of the *in vitro* antileishmanial activity of synthetic or natural compounds in *Leishmania sp* infected macrophages referring to lots 2019, 2020 and 2021", research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra, the collaboration of Ayla Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the PRE-REITORIAL ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) OF RESEARCH / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research will be used 432 females being isogenic mouse BALB / c of 4-6 weeks, a project to be carried out in the bioterrorist located at the Reproductive Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora, as requested and that will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year, provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

P:

Vice-coordenadora  
CEUA

Coordenadora  
CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 08/05/2018, analisou o protocolo nº.009/2018 intitulado "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra e colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato a ser realizado no período de 01/01/2019 a 31/12/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 24 fêmeas de Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério Localizado no Centro de Biologia da Reprodução(CBR) no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 009/2018 - CEUA about "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c" under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of Ayla das Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF - ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 08/05/2018. For the development of this research 24 mice of lineage BALB/C (24 females) of 4-6 week old, will be delivered as requested in the period period of 01/01/2019 to 12/31/2021. The Project will be performed at Biology Reproduction Center located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of vality.

Juiz de Fora, 09 de Maio de 2018.

Vice-coordenadora  
CEUA

Coordenadora  
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 012/2015 – CEUA sobre “Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com Leishmania sp, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO e LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Salientamos, porém, ser necessário o Parecer da Comissão de Biossegurança para experimentos com patógenos in vitro. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 336 camundongos da linhagem BALB/c (336 fêmeas) de 4 a 6 semanas de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/09/2016 a 31/12/2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol no. 012/2015 - CEUA about “Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com Leishmania sp, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO and LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. We stress, however, may require the Opinion of the biosecurity Commission for experiments with pathogens in vitro. For the development of this research 336 mice of lineage BALB/c (336 females) of 4 to 6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 01/09/2016 to 31/12/2018.

**Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016**

\_\_\_\_\_  
Coordenadora  
CEUA

\_\_\_\_\_  
Vice-coordenadora  
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 013/2015 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS SINTÉTICOS OU NATURAIS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C, REFERENTES AOS LOTES 2016, 2017 E 2018” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO e LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 84 camundongos da linhagem BALB/c (84 fêmeas) de 4 a 6 semanas de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/09/2016 a 31/12/2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol no. 013/2015 - CEUA about “Avaliação da citotoxicidade in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO and LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. For the development of this research 84 mice of lineage BALB/c (84 females) of 4 to 6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 01/09/2016 to 31/12/2018.

**Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016**

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA

## ANEXO B- Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito de compostos sintéticos e naturais com potencial atividade antileishmanial em eritrócitos humanos.

**Pesquisador:** ELAINE SOARES COIMBRA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 23779719.1.0000.5147

**Instituição Proponente:** Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.697.188

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa. Será realizado um estudo experimental *in vitro* buscando determinar o efeito citotóxico de compostos sintéticos e naturais em eritrócitos humanos. Este trabalho está inserido dentro do projeto que visa a descoberta de novos compostos sintéticos e naturais com ação antileishmanial, o qual objetiva a busca não apenas de compostos que matem o parasito causador das leishmanioses, mas que também não sejam tóxicos para o homem.

Assim, apenas os compostos que mostrarem atividade antileishmanial promissora é que serão avaliados quanto à toxicidade em eritrócitos humanos. Os eritrócitos serão submetidos ao teste de hemólise buscando selecionar compostos com baixa toxicidade hemolítica permitindo, desta maneira, a continuidade dos estudos para posteriores ensaios em animais de laboratório. O sangue do doador será utilizado exclusivamente para avaliar a toxicidade dos compostos testadas e não será avaliado, ou colhido, ou medido, nenhum tipo de dado do sangue coletado, nem haverá nenhum tipo de seguimento dos indivíduos doadores, pois

não é objetivo do projeto. Os indivíduos serão apenas doadores do sangue. Apresentação do projeto está clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, estando de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Continuação do Parecer: 3.697.188

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a toxicidade de novos compostos in vitro tendo como alvo os eritrócitos humanos.

Objetivo Secundário:

A partir dos resultados obtidos no objetivo primário, ampliar os estudos de toxicidade para modelo experimental. Os Objetivos da pesquisa estão claros bem delineados, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto é considerado de risco mínimo. Na coleta, o participante poderá sentir um pequeno desconforto local durante o acesso venoso. Para minimizar este incômodo, serão utilizados agulhas e seringas estéreis e descartáveis de calibre adequado, bem como antissépticos e curativos. Além disso, a coleta será realizada por profissional

habilitado, neste projeto por um farmacêutico-bioquímico. A equipe de pesquisa irá assegurar o sigilo dos dados a que terão acesso, incluindo o anonimato do doador assegurado pelo TCLE. Sendo assim, as informações serão organizadas em planilhas protegidas por senha, onde os nomes dos participantes serão codificados, e apenas o coordenador da pesquisa terá acesso a estes documentos, preservando integralmente o anonimato de cada participante. Como benefício a pesquisa visa a descoberta de novos compostos com ação antileishmanial que sejam eficazes sobre o parasito e seguros homem. É interessante utilizar os eritrócitos humanos em ensaios de triagem para complementar os estudos in vitro e estimular os ensaios in vivo. Além disso, ensaios sobre células humanas refletem um melhor perfil de toxicidade dos compostos em humanos. Riscos e benefícios descritos em conformidade com a natureza e propósitos da pesquisa. O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo e benefícios esperados estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios está de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**



ufjf

UFJF - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE JUIZ DE FORA -  
MG

Continuação do Parecer: 3.697.188

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a, b, d, e, f, g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: dezembro de 2025.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Continuação do Parecer: 3.697.188

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1454510.pdf	06/11/2019 09:23:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_apos_pendencias2.doc	06/11/2019 09:17:48	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito
Outros	Anexo_1_Tabela_de_controle_doadores_sangue.doc	04/11/2019 18:46:12	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito
Folha de Rosto	Folho_de_rosto.pdf	18/10/2019 12:02:27	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio.pdf	17/10/2019 08:19:02	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBiorrepositorio.doc	16/10/2019 14:40:28	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	16/10/2019 14:36:30	ELAINE SOARES COIMBRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JUIZ DE FORA, 11 de Novembro de 2019

Assinado por:

Jubel Barreto



## APÊNDICE A- Produções científicas diretas

### Artigo publicado

Meinel, R. S., das Chagas Almeida, A., Stroppa, P. H. F., Glanzmann, N., Coimbra, E. S., da Silva, A. D. Novel functionalized 1, 2, 3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. *Chemico-biological interactions*, 315, 108850, 2020.

### Artigo submetido

das Chagas Almeida, A., Meinel, R. S., Leal, Y. L., Silva, T. P., Glanzmann, N., Mendonça, D. V. C., Perin, L., Cunha-Júnior, E. F., Coelho, E. A. F., MELO, R. C. N., da Silva, A. D., Coimbra, E. S. Antileishmanial activity and mode of action of functionalized 1,2,3-triazolium salts against *Leishmania infantum*. *Revista Parasitology Research*, 2021.

### Depósito de patente

Adilson David da Silva, Elaine Soares Coimbra, Ayla das Chagas Almeida, Raíssa Meinel Soares. Sal de triazol e uso como antioxidante e citoprotetor- Número do registro: BR10202000644.

## APÊNDICE B- Produções científicas indiretas

Pereira, Vinícius R. D.; Junior, Ismael J. Alves; Da'silveira, Lígia S.; Geraldo, Reinaldo B.; De'f.'Pinto, Priscila; Teixeira, Fernanda S.; Salvadori, Maria C.; Silva, Marcos P.; Alves, Lara A.; Capriles, Priscila V. S. Z.; Das'c.'Almeida, Ayla; Coimbra, Elaine S.; Pinto, Pedro L. S.; Couri, Mara R. C.; De'moraes, Josué; Da'silva'filho, Ademar A. In Vitro and in Vivo Antischistosomal Activities of Chalcones. *Chemistry & Biodiversity.*, 15, 1 - 11, 2018.

Da Silva, Emerson Teixeira; De Andrade, Gabriel Fernandes; Araújo, Adriele Da Silva; Almeida, Ayla Das Chagas; Coimbra, Elaine S.; De Souza, Marcus Vinícius Nora. In vitro Assessment of Camphor Hydrazone Derivatives as an Agent Against *Leishmania amazonensis*. *Acta Parasitologica.* 1, 2019.

Carvalho, Lara Soares Aleixo De; Queiroz, Lucas Sales; Alves Junior, Ismael José; Almeida, Ayla Das Chagas; Coimbra, Elaine Soares; De Faria Pinto, Priscila; Silva, Marcos Paulo Nascimento Da; De Moraes, Josué; Da Silva Filho, Ademar A. In Vitro Schistosomicidal Activity of the Alkaloid-Rich Fraction from *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) and Its Characterization by UPLC-QTOF-MS. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2019, 1 - 8, 2019.

Pereira, V. R., da Silveira, L. S., Mengarda, A. C., Júnior, I. J. A., da Silva, O. O. Z., Miguel, F. B., Silva, M. P., das C. Almeida, A., Torres, D. S., Pinto, P. F., Coimbra, E.S., Moraes, J., Couri, M. R. C., da Silva Filho, A. A. Antischistosomal properties of aurone derivatives against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 213, 105741, 2021

Queiroz, L. S., Ferreira, E. A., Mengarda, A. C., Almeida, A. D. C., Pinto, P. D. F., Coimbra, E. S., Moraes, J., Denadai, A. M. L., Da Silva Filho, A. A. In vitro and in vivo evaluation of cnicin from blessed thistle (*Centaurea benedicta*) and its inclusion complexes with cyclodextrins against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 4, 1321-1333, 2021.