

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “Professor José de Souza Herdy”  
UNIGRANRIO  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa – PROPEP  
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

ALINE RODRIGUES DE MESQUITA LORETE TERRA

ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO DO METALOCOMPLEXO  
**Co7HCHBPA** EM MACRÓFAGOS J774.A1 E PROMASTIGOSTA DE *Leishmania*  
*amazonensis*

DUQUE DE CAXIAS

2021

ALINE RODRIGUES DE MESQUITA LORETE TERRA

ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO DO METALOCOMPLEXO  
**Co7HCHBPA** EM MACRÓFAGOS J774.A1 E PROMASTIGOSTA DE *Leishmania*  
*amazonensis*

Tese apresentada ao programa de  
Biomedicina Translacional - BIOTRANS,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutora em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Sergio Henrique  
Seabra e Prof. Dr. Fabio da Silva de  
Azevedo Fortes.

DUQUE DE CAXIAS

2021

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

**T323a** Terra, Aline Rodrigues de Mesquita Lorete.

Análise *in silico* e *in vitro* do efeito do metalocomplexo Co7HCHBPA em macrófagos J774.A1 e promastigosta de *Leishmania amazonensis* / Aline Rodrigues de Mesquita Lorete Terra. – Duque de Caxias, 2021.  
145 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2021.

“Orientadores: Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra  
Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes”.

Referências: f. 94-107.

1. Biomedicina. 2. Epidemiologia. 3. *Leishmania amazonensis*. 4. Macrófagos. 5. Promastigotas. 6. Leishmaniose. I. Seabra, Sergio Henrique. II. Fortes, Fabio da Silva de Azevedo. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

ALINE RODRIGUES DE MESQUITA LORETE TERRA

ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO DO METALOCOMPLEXO  
**Co7HCHBPA** EM MACRÓFAGOS J774.A1 E PROMASTIGOSTA DE  
*Leishmania amazonensis*

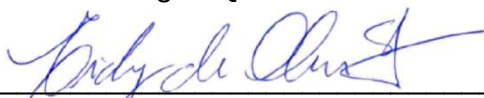
Tese apresentada ao programa de  
Biomedicina Translacional -  
BIOTRANS, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutora  
em Ciências Biomédicas.

Aprovada em: 12/04/2021

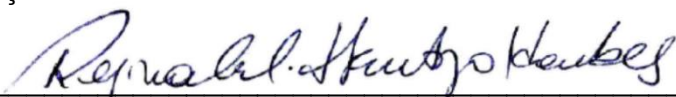
**BANCA EXAMINADORA**



Professor (a) Dr. Celso Barbosa Sant'anna Filho (Presidente)  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO



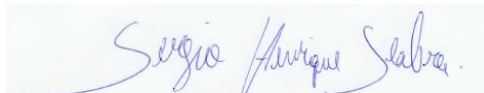
Professor (a) Dra. Eidy de Oliveira Santos  
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO



Professor (a) Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Professor (a) Dr. Renato Augusto DaMatta  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF



Professor (a) Dr. Sérgio Henrique Seabra  
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO



Professor (a) Dr. Fabio da S. de A. Fortes  
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

*Dedico este trabalho à minha amada filha  
Isabela.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e a oportunidade de me levantar todos os dias saudável e com disposição para encarar mais um dia. Nos momentos mais difíceis, Ele foi meu sustento e socorro.

Aos meus guias espirituais, pelo direcionamento, força e proteção. Agradeço terem mantido meu ânimo, minha alegria para que eu pudesse encarar os eventos inesperados, pela luz em meus caminhos e pela serenidade para agir de forma consciente e equilibrada. Que nunca me falte fé!

Aos meus padrinhos Antônia (*in memorian*) e José (*in memorian*). Perdê-los é algo que jamais irei superar. Minha madrinha me deixou em 2005, quando eu ainda tinha 14 anos. Meu padrinho me deixou durante o doutorado. Este foi um momento extremamente difícil, principalmente pela forma como foi. Este foi o primeiro momento em que quis desistir do mesmo. Cuidei dele da melhor forma que pude, desde 2008, sem quase ninguém saber o que se passava. Durante incontáveis noites socorri você, e na manhã seguinte seguia para faculdade, e eu faria tudo novamente. Apesar de hoje não estarem presentes fisicamente, sinto vosso amor em mim. Agradeço por tudo que fizeram, e fazem, por mim. Gratidão eterna.

Aos meus pais, Ana e Luiz Carlos. Não existem palavras que possam quantificar minha gratidão. Agradeço pela vida, por todo trabalho e sacrifícios para que eu pudesse ter chegado até aqui. Quando novamente pensei em desistir do doutorado, se colocaram à disposição para cuidar da minha pequena. Esse título, e tudo mais que eu conquistei até aqui, foi graças ao amor e o esforço de vocês. Amo vocês, gratidão eterna!

Ao meu irmão Allisson. Agradeço por sua amizade, apoio e incentivo em todos os momentos, principalmente naqueles em tudo parecia estar perdido. Amo você!

A minha filha amada Isabela. Quando ingressei no doutorado não esperava escrever este agradecimento em minha tese, mas durante o curso Deus me presenteou com você. Você chegou em um momento de dor e devastação. Você foi, é e sempre será a luz que me guia. Por você eu quase larguei tudo, mas foi você, acima de qualquer um, que me deu ânimo pra chegar até aqui. Foram muitas noites longe de você, desde os seus oito meses de vida, e muito choro de saudade. Mas essa foi apenas uma fase em nossas vidas, e que em breve chegará ao fim. Ainda

temos toda uma vida pela frente. Obrigada com seu amor sincero e puro, você é tudo o que há de melhor em mim.

Ao meu esposo Orlando. Agradeço por todo amor e paciência, desde o início da graduação. Obrigada por não me deixar desistir, e por ser meu grande incentivador. Você é um companheiro e pai maravilhoso, e por isso foi possível chegar até aqui. Amo você!

Aos meus grandes amigos, Júlio César, Jéssica Manya, Carlos Falcão, Raphael, Marco Antônio (Kinho), Débora, Murilo, Andrea Stella, Camila, Raquel, Thiago, Pedro e Iamara. Cada um de vocês teve sua importância ao longo dessa longa trajetória. Desde a graduação até esta conclusão do doutorado. Agradeço de coração por todo apoio, incentivo, dedicação e amor. Sem vocês nada seria igual. Amo cada um de vocês, obrigada!

Aos meus orientadores, Sérgio e Fabio, pela oportunidade de cursar o doutorado e por seus ensinamentos. Guardarei para sempre os bons momentos, principalmente aqueles em que contei para ambos que estava grávida. Gratidão!

Aos meus companheiros dos laboratórios LTBM, LTCC e LTFCM, em especial Nayara, Felipe, Juliana, Tatiana, Gabriela, Tiago e Elinéia. Agradeço pelo companheirismo e parceria. Por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos (e bota ruins nisso, rsrs!). Levarei vocês eternamente em meu coração.

A Joseane Godinho e a Sara Teixeira. Agradeço pelo treinamento e ensinamentos ao longo do meu doutorado, pelo carinho e pela paciência. Tenho muita admiração e gratidão por vocês.

Aos meus queridos integrantes do DIMAV/INMETRO, em especial Celso, Emile, Renata, Thayanne, Jean, Lucas, Flávio, Michele, Thais, Renato e Mateus. Agradeço de coração a acolhida e apoio na reta final do doutorado. Vocês foram fundamentais na minha decisão de continuar e lutar até o fim. Eterna gratidão!

A banca de examinadores, que me acompanha desde o primeiro workshop. Gratidão por suas palavras de incentivo e ensinamentos. Professores maravilhosos que fazem jus a ao título de educadores. Obrigada!

Ao programa de pós-graduação BIOTRANS, em especial aos professores Marlene, Carina e Leonardo. Agradeço pela dedicação e todo conhecimento compartilhado.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença complexa que é considerada um grave problema de saúde pública. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida por vetores da subfamília flebotomíneos. A espécie *Leishmania amazonensis* causa leishmaniose cutânea difusa (LCD). A terapia corrente para a leishmaniose provoca vários efeitos colaterais e gera cepas resistentes aos medicamentos. Essa situação estimulou a busca de tratamentos alternativos, como o uso de metalocomplexos. Metalocomplexos são compostos metálicos coordenados, com um núcleo metálico. A ação destes compostos tem sido estudada em várias espécies de parasitas da família *Trypanosomatidae*, incluindo a espécie *L. amazonensis*. Neste estudo, verificamos o efeito do composto Co7HCHBPA, que possui núcleo de cobalto coordenado a um ligante orgânico HBPA (2-hidrobencil) (2-piridilmetil) amina, em promastigotas de *L. amazonensis* da cepa WHOM / BR / 75 / Josefa e macrófagos J774A.1. Análises *in silico* dos parâmetros preditivos farmacocinéticos e farmacodinâmicos foram realizadas no SiwissADME e no pkCSM. Ensaios antiproliferativo *in vitro*, análise de viabilidade e microscopia óptica e eletrônica foram realizados. Os resultados *in silico* indicam que o composto Co7HCHBPA apresenta características promissoras para o desenvolvimento de um novo fármaco, contudo, uma possível atividade cancerígena e outra inibitória de hERGII foram identificadas. Os ensaios *in vitro* demonstraram que o composto Co7HCHBPA inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose-tempo dependente em concentrações que não se mostraram citotóxicas para macrófagos J774A.1. O composto também foi capaz de induzir alterações morfológicas, tais como alterações no formato do corpo celular, encurtamento do flagelo, formação de duplo flagelo, invaginações no corpo celular do parasita, e ultraestruturais no parasita, como formação de vacúolos autofágicos próximos a região da bolsa flagelar e formações de figura de mielina. Por fim, ensaios com marcação anti-LC3B indicaram a possível morte do parasita por autofagia. Os resultados são promissores, mas o desenvolvimento de futuros experimentos na forma amastigota intracelular de *L. amazonensis* podem complementar esta análise.

**Palavras-chaves:** *Leishmania amazonensis*. Co7HCHBPA. Metalocomplexos. Análise *in silico*. Quimioterapia.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex disease that is considered a serious public health problem. The disease is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by vectors of the phlebotomine subfamily. The species *Leishmania amazonensis* causes diffuse cutaneous leishmaniasis (LCD). Current therapy for leishmaniasis causes several side effects and generates drug-resistant strains. This situation stimulated the search for alternative treatments, such as the use of metallocomplexes. Metallocomplexes are coordinated metallic compounds, with a metallic core. The action of these compounds has been studied in several species of parasites of the Trypanosomatidae family, including species of *L. amazonensis*. In this study, we verified the effect of the compound Co7HCHBPA, which has a cobalt nucleus coordinated to an organic ligand HBPA (2-hydrobenzyl) (2-pyridylmethyl) amine, in *L. amazonensis* promastigotes of the strain WHOM / BR / 75 / Josefa and macrophages J774A.1. *In silico* analyzes of the pharmacokinetic and pharmacodynamic predictive parameters were performed in SiwissADME and pkCSM. *In vitro* antiproliferative tests, feasibility analysis and electronic optical microscopy were performed. The *in silico* results indicate that the compound Co7HCHBPA has promising characteristics for the development of a new drug, however, a possible carcinogenic and other inhibitory activity of hERGII has been identified. *In vitro* tests demonstrated that the compound Co7HCHBPA inhibits the growth of the promastigote forms of *L. amazonensis* in a dose-time dependent manner at concentrations that were not cytotoxic to J774A.1 macrophages. The compound was also able to induce morphological changes, such as changes in the shape of the cell body, shortening of the flagellum, formation of double flagellum, invaginations in the cell body of the parasite, and ultrastructural in the parasite, such as the formation of autophagic vacuoles near the region of the pouch flagellar and myelin figure formations. Finally, tests with anti-LC3B labeling indicated the possible death of the parasite by autophagy. The results are promising, but the development of future experiments in the intracellular amastigote form of *L. amazonensis* may complement this analysis.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*. Co7HCHBPA. Metallocomplexes. *In silico* analysis. Chemotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Flebotomíneo.....                                                                                          | 22 |
| Figura 2 – Esquema ilustrativo da morfologia de <i>L. amazonensis</i> nos diferentes estágios de desenvolvimento..... | 24 |
| Figura 3 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida da <i>L. amazonensis</i> .....                                        | 27 |
| Figura 4 – Manifestações clínicas em Leishmaniose.....                                                                | 31 |
| Figura 5 – Manifestação clínica de um nódulo com crosta central na LC.....                                            | 33 |
| Figura 6 – Leishmaniose mucocutânea oronasal grave em um homem de 73 anos com história de viagem ao Panamá.....       | 33 |
| Figura 7 – Status de endemicidade de leishmaniose cutânea (2018).....                                                 | 37 |
| Figura 8 – Status de endemicidade de leishmaniose visceral (2018).....                                                | 37 |
| Figura 9 – Página de envio SwissADME.....                                                                             | 45 |
| Figura 10 – Painel da molécula contendo diferentes parâmetros analisados.....                                         | 46 |
| Figura 11 – Radar de biodisponibilidade.....                                                                          | 47 |
| Figura 12 – Gráfico BOILED-Egg.....                                                                                   | 50 |
| Figura 13 – Estrutura química do metalocomplexo.....                                                                  | 53 |
| Figura 14 – Classificação dos compostos analisados, segundo a regra de Lipinski.....                                  | 66 |
| Figura 15 – Radar de biodisponibilidade.....                                                                          | 67 |
| Figura 16 – Ensaio antiproliferativo na forma promastigota do parasita <i>L. amazonensis</i> .....                    | 69 |

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 17 – Ensaio antiproliferativo na forma promastigota do parasita <i>L. amazonensis</i> .....                                                    | 70  |
| Figura 18 – Ensaio antiproliferativo em macrófagos J774A.1 Macrófagos tratados pelo metalocomplexo Co7HCHBPA por 24, 48 e 72 h.....                   | 72  |
| Figura 19 – Ensaio antiproliferativo em macrófagos J774A.1.....                                                                                       | 73  |
| Figura 20 – Viabilidade das células J774A.1, após tratamento com o metalocomplexo Co7HCHBPA.....                                                      | 74  |
| Figura 21 – Taxa de crescimento celular da forma promastigota de <i>L. amazonensis</i> tratadas por 24, 48 e 72 h com o metalocomplexo Co7HCHBPA..... | 76  |
| Figura 22 – Taxa de crescimento celular de macrófagos J774A.1 tratados por 24, 48 e 72 h com o metalocomplexo Co7HCHBPA.....                          | 77  |
| Figura 23 – Micrografia eletrônica de varredura de <i>L. amazonensis</i> após 36 horas de tratamento com 5 µM do composto Co7HCHBPA.....              | 81  |
| Figura 24 – Micrografia eletrônica de varredura de <i>L. amazonensis</i> após 36 horas de tratamento com 10 µM do composto Co7HCHBPA.....             | 82  |
| Figura 25 – Micrografia eletrônica de transmissão de <i>L. amazonensis</i> após 24 horas de tratamento com 10 µM do composto Co7HCHBPA.....           | 84  |
| Figura 26 – Micrografia eletrônica de transmissão de <i>L. amazonensis</i> após 48 horas de tratamento com 10 µM do composto Co7HCHBPA.....           | 85  |
| Figura 27 – Microscopia confocal a laser mostrando morte celular por autofagia de <i>L. amazonensis</i> apos tratamento com o composto Co7HCHBPA..... | 87  |
| Figura 28 – Gráfico BOILED-Egg.....                                                                                                                   | 109 |

## LISTA QUADROS E TABELAS

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1 – Manifestações da doença e transmissão das espécies predominantes de <i>Leishmania</i> encontradas no Novo e no Velho Mundo..... | 23  |
| Quadro 2 – Sistema de classificação para leishmaniose dérmica pós-calazar na África Oriental.....                                          | 32  |
| Tabela 1 – Faixa ideal das propriedades físico-químicas analisadas no radar de biodisponibilidade.....                                     | 47  |
| Quadro 3 – Características do metalocomplexo.....                                                                                          | 59  |
| Tabela 2 – Descritores moleculares e propriedades físico-químicas do metalocomplexo Co7HCHBPA, Glucantime e AnfotericinaB.....             | 65  |
| Tabela 3 – Valores de IC <sub>50</sub> em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> no período de 24-96 h.....                                | 71  |
| Tabela 4 – Valores de DL <sub>50</sub> em macrófagos J774A.1 no período de 24-72 h.....                                                    | 75  |
| Tabela 5 – Tempo de duplicação da população de <i>L. amazonensis</i> nos períodos de 24, 48 e 72 h.....                                    | 78  |
| Tabela 6 – Tempo de duplicação da população de Macrófagos os períodos de 24, 48 e 72 h.....                                                | 79  |
| Tabela 7 – Quantificação das alterações morfológicas provocadas por Co7HCHBPA em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....              | 80  |
| Tabela 8 – Quantificação da autofagia provocada por Co7HCHBPA em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....                              | 86  |
| Tabela 9 – Parâmetros de farmacocinética.....                                                                                              | 108 |
| Tabela 10 – Análise de absorção.....                                                                                                       | 110 |
| Tabela 11 – Análise de toxicidade.....                                                                                                     | 111 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

µg/L - micrograma por litro

µg/mL - micrograma por mililitro

µL - microlitro

µM - micromolar

BHI – do inglês *Brain Heart Infusion*

BSA – albumina bovina sérica

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

CTL - controle

DMEM – do inglês *Dulbelco's modified Eagle's medium*

DMSO - dimetil sulfóxido

EDTA – do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FnRs - receptores de fibronectina

Kg - quilo

LCD - leishmaniose cutânea disseminada

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LPGs - lipofosfoglicanos

LV - Leishmaniose visceral

M - molar

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

Min - minutos

mL - mililitro

MP - Matriz peritrófica

OsO<sub>4</sub> - tetróxido de ósmio

PBS – do inglês *phosphate buffered saline*

pH - potencial de hidrogênio

PKDL - leishmaniose cutânea pós-calazar

PSG – do inglês *promastigote secretory gel*

RM - receptores de manose

SFB - soro fetal bovino

TA – temperatura ambiente

v/v – volume/volume

VP - vacúolo parasitóforo

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

|        |                                                                                                                                                |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO .....                                                                                                                               | 17 |
| 2.     | REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                                     | 21 |
| 2.1.   | Etiologia .....                                                                                                                                | 21 |
| 2.2.   | Vetor .....                                                                                                                                    | 22 |
| 2.3.   | Morfologia, ciclo e infecção .....                                                                                                             | 24 |
| 2.4.   | Características clínicas .....                                                                                                                 | 29 |
| 2.5.   | Métodos de Diagnóstico.....                                                                                                                    | 35 |
| 2.6.   | Aspectos epidemiológicos .....                                                                                                                 | 36 |
| 2.7.   | Quimioterapia.....                                                                                                                             | 37 |
| 2.8.   | Metalocomplexos .....                                                                                                                          | 39 |
| 3.     | JUSTIFICATIVA .....                                                                                                                            | 53 |
| 4.     | OBJETIVOS .....                                                                                                                                | 55 |
| 4.1.   | Objetivo Geral .....                                                                                                                           | 55 |
| 4.2.   | Objetivos específicos .....                                                                                                                    | 55 |
| 5.     | MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                       | 56 |
| 5.1.   | Parâmetros de análise <i>in silico</i> .....                                                                                                   | 56 |
| 5.2.   | Cultivo de células e manutenção dos parasitas .....                                                                                            | 56 |
| 5.2.1. | Obtenção de formas promastigotas a partir de formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> a partir de lesões em camundongos Balb/C..... | 56 |
| 5.2.2. | Formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....                                                                                    | 57 |
| 5.2.3. | Cultivo e manutenção das células-hospedeiras                                                                                                   | 58 |
| 5.3.   | Metalocomplexo .....                                                                                                                           | 58 |
| 5.3.1. | Descrição do metalocomplexo.....                                                                                                               | 58 |
| 5.4.   | Estudo <i>in vitro</i> do efeito antiproliferativo da forma promastigota de <i>L. amazonensis</i> .....                                        | 59 |
| 5.5.   | Determinação da IC <sub>50</sub> .....                                                                                                         | 60 |
| 5.6.   | Análise da citotoxicidade em macrófagos J774A.1 <i>in vitro</i> .....                                                                          | 60 |

|        |                                                                                                                                                                                            |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.7.   | Determinação da taxa de crescimento e tempo de duplicação da população de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos.....                                                                          | 61  |
| 5.8.   | Avaliação Morfológica e Ultraestrutural.....                                                                                                                                               | 62  |
| 5.8.1. | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                                                                                                                                             | 62  |
| 5.8.2. | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....                                                                                                                                          | 63  |
| 5.8.3. | Microscopia confocal a laser.....                                                                                                                                                          | 63  |
| 5.9.   | Análise estatística .....                                                                                                                                                                  | 64  |
| 6.     | RESULTADOS .....                                                                                                                                                                           | 65  |
| 6.1.   | Parâmetros de análise <i>in silico</i> do composto Co7HCHBPA, Glucantime e Anfotericina B.....                                                                                             | 65  |
| 6.2.   | Estudo <i>in vitro</i> do efeito antiproliferativo.....                                                                                                                                    | 68  |
| 6.2.1. | Formas promastigotas .....                                                                                                                                                                 | 68  |
| 6.2.2. | Determinação da IC <sub>50</sub> .....                                                                                                                                                     | 71  |
| 6.3.   | Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> de macrófagos J774A.1.....                                                                                                                       | 71  |
| 6.4.   | Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população da forma promastigota de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos J774A.1 tratados com o metalocomplexo Co7HCHBPA..... | 75  |
| 6.5.   | Avaliação Morfológica e Ultraestrutural.....                                                                                                                                               | 80  |
| 6.5.1. | Microscopia Eletrônica de Varredura .....                                                                                                                                                  | 80  |
| 6.5.2. | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....                                                                                                                                          | 83  |
| 6.5.3. | Microscopia confocal a laser.....                                                                                                                                                          | 86  |
| 7.     | DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                             | 88  |
| 8.     | CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                             | 93  |
|        | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                           | 94  |
|        | APÊNDICE A - Análise <i>in silico</i> .....                                                                                                                                                | 108 |
|        | APÊNDICE B - Artigo.....                                                                                                                                                                   | 116 |
|        | APÊNDICE C - Artigo.....                                                                                                                                                                   | 132 |

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses consistem em um amplo espectro de doenças causadas por mais de 20 espécies diferentes dos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (MARSDEN, 1986; ASHFORD, 2000; WHO 2021) e são consideradas pela Organização Mundial de Saúde como um importante problema de saúde pública, assim como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2021).

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida complexo que envolve tanto hospedeiros vertebrados quanto invertebrados. Dois estágios de desenvolvimento são encontrados: (i) promastigota, forma proliferativa encontrada no lúmen do intestino do inseto fêmea e (ii) amastigota, forma proliferativa encontrada em vários tipos de células hospedeiras de mamíferos (TEIXEIRA, 2013), que podem ser hematopoéticas ou não, tais como queratinócitos, células de Langerhans, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, sendo o macrófago considerado a principal célula hospedeira na qual o parasita consegue sobreviver e se multiplicar ao utilizar mecanismos de evasão do sistema imune (MOUGNEAU, BIHL e GLAICHENHAUS, 2011; KAYE e SCOTT, 2011; ASHOK e ARCHA-ORBEA, 2014, SOUSA et al., 2014). Aproximadamente, 30 espécies diferentes de flebotomíneos podem transmitir esse parasita antropológicamente ou zoonoticamente por suas picadas (DE FREITAS et al., 2016).

A leishmaniose é classificada, basicamente, nas formas cutânea (LC) e visceral (LV), de acordo com a Organização Mundial de Saúde, dos 200 países e territórios que se reportam à OMS, 97 países e territórios eram endêmicos para leishmaniose em 2018. Isso inclui 68 países endêmicos para LV e LC, 8 países endêmicos apenas para LV e 21 países endêmicos somente para LC (WHO, 2021).

Segundo o Observatório Global de Saúde da OMS, em dezembro de 2019, 52 países endêmicos para LV (68%) e 59 países endêmicos para LC (66%) reportaram dados ao programa. Mais de 90% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (GLOBAL HEALTH OBSERVATORY, 2019).

Em 2018, 11 países relataram mais de 5000 casos de LC: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Paquistão, Peru,

República Árabe Síria e Tunísia, que juntos representam 88% da incidência de LC. Em 2018, houve 1039 casos importados de leishmaniose cutânea relatados globalmente. Comparativamente, o número de casos importados de leishmaniose visceral foi menor, com um total de 140 casos importados relatados globalmente em 2018 (GLOBAL HEALTH OBSERVATORY, 2019).

A LC é causada por *L. major* e *L. tropica* no Oriente Médio e Ásia Central, e complexo *L. braziliensis* e *L. mexicana* nas Américas. A LV é causada pelos complexos *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*. A leishmaniose mucocutânea (LMC) é uma infecção grave e crônica (SAVOIA, 2015).

No Brasil, *L. amazonensis* é uma das espécies responsáveis pela forma cutânea da doença; entretanto, em alguns indivíduos o sistema imunológico não consegue combater o parasita, levando a manifestações clínicas de leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARSDEN e JONES, 1985). A LCD foi primeiramente descrita pela na Amazônia brasileira, no estado do Pará por Silva (1958), que descreveu os primeiros achados clínicos sobre uma forma rara da leishmaniose tegumentar, ressaltando a natureza das lesões queloidianas na pele e lesões no tecido ósseo das extremidades (mãos e pés) (SILVEIRA, 2009).

O diagnóstico é realizado com base em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. No diagnóstico clínico são coletados dados sobre as características das lesões e informações epidemiológicas, contudo, apenas esses elementos não são o suficiente para fechar o diagnóstico final, sendo necessária a confirmação através de exames laboratoriais. Os exames realizados são os exames parasitológicos (direto ou indireto), exames imunológicos (intradermoreação de Montenegro, sorologia) ou ainda exames moleculares (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Também é recomendada a realização de exames para o diagnóstico diferencial para piodermites, paracoccidioidomicose, neoplasias cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea e hanseníase virchowiana (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Atualmente, são utilizados no tratamento da leishmaniose o composto antimonial pentavalente, Glucantime® (antimoniato de meglumina), e a Anfotericina B como fármacos de primeira e segunda linha, respectivamente, sendo aplicados por via intramuscular ou endovenosa. Entretanto, ambos são pouco eficientes, pois, ocasionam frequentemente efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, náuseas, taquicardia, febre e vômitos, além de serem medicamentos de alto custo. Os diferentes modos de prevenção contra os vetores também apresentam pouca

eficiência (NEVES, 2007; BRASIL, 2009; TEIXEIRA et al., 2013). A miltefosina é o único medicamento oral disponível para o tratamento da leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), embora o fármaco seja eficaz e bem tolerado no tratamento da LV, a eficácia e a segurança da miltefosina por períodos mais longos de tratamento (> 28 dias) na PKDL ainda não estão claras (PIJPERS et al., 2019). Dessa forma, existe uma necessidade urgente de desenvolver novos compostos ou combinações de compostos que sejam mais seguros, eficazes e acessíveis.

Os metalocomplexos são compostos por metais de transição, coordenados com fármacos, e apresentam possibilidades de coordenação e geometrias com o ligante (fármaco) (VAN RIJT e SADLER, 2009). Esta coordenação permite interagir com o alvo molecular específico, principalmente com moléculas biológicas (FRICKER, 2007) permitindo o aumento da lipofilicidade (AHMAD, 2006; BRUIJNINCX e SADLER, 2008).

Alguns estudos já demonstraram que a coordenação de compostos pode ser uma alternativa na terapia antiparasitária, além de também demonstrar efeito em células tumorais. Compostos contendo íons cobre ou cobalto ligados ao ligante (5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7 (4H) -um) (HmtpO) demonstraram um efeito no metabolismo energético dos parasitas de *L. infantum* e *L. brasiliensis* no nível do equilíbrio NAD<sup>+</sup>/NADH e nas membranas das organelas, causando sua degradação e morte celular (RAMIREZ-MACIAS et al., 2011).

Compostos coordenados a lantanídeos demonstraram potencial antiparasitário contra *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Sua atividade *in vitro* foi semelhante ou excedeu significativamente os demonstrados por dois dos medicamentos mais utilizados atualmente para o tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas, Glucantime e benznidazol, respectivamente (CABALLERO et al., 2014).

Estudos demonstraram que compostos coordenados a complexo de ferro podem controlar o crescimento de *Toxoplasma gondii*, o agente causador da toxoplasmose. Os complexos reduziram o crescimento de *T. gondii* e, ao mesmo tempo, causaram baixa citotoxicidade nas células hospedeiras. Além disso, um dos complexos utilizados induziu alterações morfológicas e ultraestruturais distintas nos parasitas incluindo bolhas e fendas de membrana no citoplasma, com inclusões semelhantes aos grânulos de amilopectina, que normalmente são encontradas nos

bradizóitose desencadeou a formação de formas semelhantes a cistos (PORTES et al., 2017; 2018).

Complexos coordenados à base de rutênio [cisCRu (III) e cisDRu (III)] já demonstraram efeito em células de leucemia mielóide crônica humana (VILANOVA-COSTA et al, 2015). Um sistema binário ácido ascórbico-metalocomplexo de cobalto promoveu a fragmentação em larga escala do DNA e morte celular em células de leucemia K-562 *in vitro* (MEDVEDEV e LESCHENKO, 2008; 2012).

Para auxiliar no desenvolvimento desses novos medicamentos, ferramentas preditivas *in silico* podem orientar na seleção dos compostos a serem testados, visto que os processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos consomem tempo e recursos. A análise *in silico* de diversos parâmetros otimiza a seleção de moléculas com potencial de se tornar um medicamento eficaz para os pacientes. A ferramenta **Web SwissADME** oferece acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança a medicamentos e facilidade de uso de medicamentos, entre os quais métodos proficientes internos, como o **BOILED-Egg**, **iLOGP** e **radar de biodisponibilidade** (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Visto que já foi demonstrado que compostos coordenados a metais podem ser utilizados como uma boa estratégia antiparasitária, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito leishmanicida do composto **CO7HCHBPA**, um metalocomplexo com um núcleo de Cobalto (Co) coordenado a um ligante orgânico de HBPA ((2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina), contra as formas extracelular (promastigota) de *L. amazonensis*, além da avaliação do seu efeito citotóxico em macrófagos (J774A.1), bem a análise de seus parâmetros preditivos *in silico*, comparando-o com os medicamentos já utilizados no tratamento da leishmaniose.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Etiologia

O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários tripanossomatídeos pertencentes à Filo Sarcomastigophora, a super classe Mastigophora, à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e abrange mais de 20 espécies diferentes. Variações geográficas de espécies existem entre os países endêmicos caracteristicamente tendo um clima subtropical ou tropical (PACE, 2014).

A *Leishmania* é classificada em dois subgêneros baseados em diferenças anatômicas nos locais de desenvolvimento do parasita dentro do intestino do mosquito-pólvora: *Leishmania*, que é encontrada no Novo (nas Américas) e Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Viannia*, endêmica apenas no Velho Mundo. A eletroforese de enzima multilocus é um método bioquímico padronizado clássico que é amplamente usado para distinguir entre as diferentes espécies. Técnicas moleculares que foram recentemente introduzidas para diagnóstico clínico são especialmente úteis em áreas onde diferentes espécies coexistem (FOULET, 2007; WHO, 2010).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, como Nested-PCR (nPCR), Semnested-PCR (snPCR) e Quantitative Real Time PCR (qPCR), têm sido amplamente empregadas para a otimização de novos ensaios de diagnóstico, usando diferentes regiões-alvo e amostras (DE PAIVA-CAVALCANTI, 2009; DA SILVA et al., 2013; REIS et al., 2013; GALLUZZI et al., 2018). O acompanhamento do tratamento visando a avaliação da eficácia de um medicamento é uma abordagem comum (POURABBAS et al., 2013) proporcionada pelo qPCR, com sua capacidade de estimar a carga parasitológica em vários tipos de amostra (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; DOS SANTOS-MARQUES et al., 2013). A caracterização de espécies de *Leishmania* também é uma aplicação importante da PCR, e tem sido fortemente explorada (MOHAMMADIHA et al., 2013). Juntamente com diferentes metodologias, incluindo análise de sequenciamento de genes e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), os estudos trouxeram esse tipo de análise com objetivos distintos: confirmação de espécies em pesquisas

epidemiológicas (MAIA et al., 2010; WANG et al., 2011) avaliação de especificidade de novos ensaios otimizados (FRAGA et al., 2011) e estudos comparativos (CRUZ et al., 2013).

## 2.2. Vetor

O flebotomíneo fêmea, pertencente ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, são os únicos vetores responsáveis pela transmissão da leishmaniose (Quadro 1). Trinta de cerca de 500 espécies conhecidas de flebótomos espalham a leishmaniose (WHO, 2021). O flebotomíneo hematófago é um artrópode silencioso, com 2 - 3 mm de comprimento, cuja cor varia de preto a branco e, ao contrário de outras espécies de Diptera, posiciona suas asas em um ângulo com relação ao abdome (Figura 1) (KILLICK-KENDRICK, 1999; WHO, 2021).

**Figura 1 – Flebotomíneo.**



Fonte: WHO, 2020.< <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/>> Acesso em 20 de Março de 2020.

Os flebotomíneos estão ativos nos meses quentes de verão na região do Mediterrâneo (GÁLVEZ, 2010). A maioria das espécies de flebótomos pica ao ar livre, do anoitecer até a madrugada, embora haja algumas espécies que picam dentro de casa e à luz do dia, comportamento que afeta os métodos de pulverização de

inseticidas utilizados (KILLICK-KENDRICK, 1999). Os parasitas se desenvolvem no flebotomíneo durante um período entre 4 e 25 dias (WHO, 2021).

**Quadro 1 – Manifestações da doença e transmissão das espécies predominantes de *Leishmania* encontradas no Novo e no Velho Mundo.**

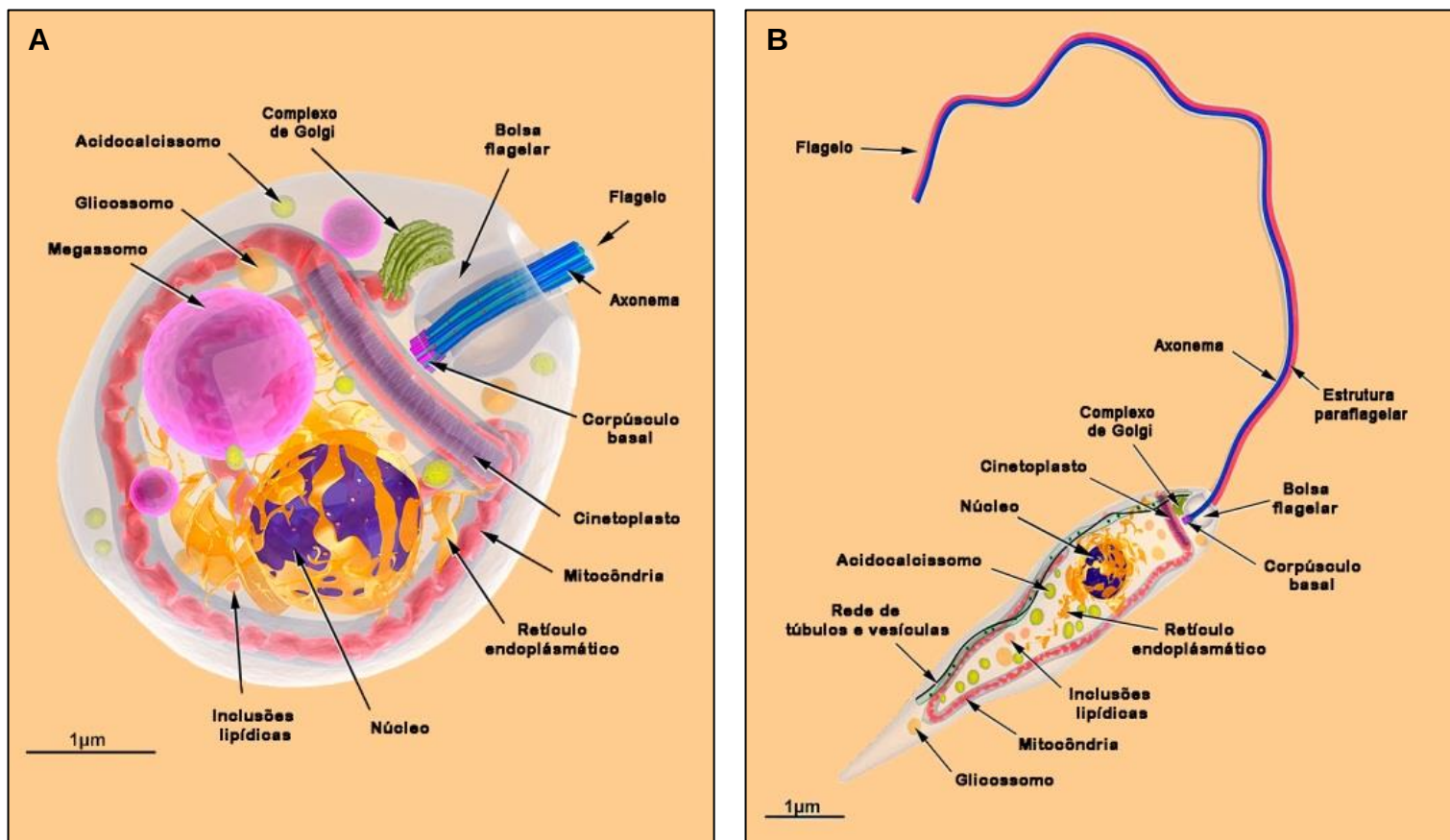
| Espécies de <i>Leishmania</i> (L)                                | Espécies de flebotomíneos (Phlebotomus [P] ou Lutzomyia [L])                     |           | Principais áreas afetadas                             | Reservatório                   | Manifestações da doença |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>L. aethiopica</i>                                             | <i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>                                           | <i>P.</i> | Etiópia, Quênia                                       | Hyraxes                        | Cutâneo, difuso, mucoso |
| <i>L. amazonensis</i>                                            | <i>L. flaviscutellata</i>                                                        |           | Leste dos Andes                                       | Roedores                       | Cutânea, disseminada    |
| <i>L. braziliensis</i>                                           | <i>L. ovallesi</i> , <i>L. wellcomei</i> , <i>L. neivai</i> , <i>L. whitmani</i> | <i>L.</i> | Leste e oeste dos Andes                               | Roedores, marsupiais           | Cutâneo, mucoso         |
| <i>L. donovani</i>                                               | <i>P. argentipes</i>                                                             |           | Índia, Bangladesh, Nepal                              | Humano                         | Visceral                |
|                                                                  | <i>P. martini</i> , <i>P. orientalis</i>                                         | <i>P.</i> | Butão, Sudão, Etiópia                                 |                                |                         |
| <i>L. guyanensis</i>                                             | <i>L. umbratilis</i>                                                             |           | Leste dos Andes                                       | Edentado arborícola, mamíferos | Cutâneo, mucoso         |
| <i>L. infantum</i> (o mesmo que <i>L. chagasi</i> no Novo Mundo) | <i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>                                         | <i>P.</i> | Região mediterrânea                                   | Cachorro                       | Visceral, cutâneo       |
| <i>L. major</i>                                                  | <i>L. longipalpis</i> , <i>P. duboscqi</i>                                       |           | América latina, África Subsaariana                    | Roedores, gerbos, roedores     | Cutâneo                 |
|                                                                  | <i>P. papatasi</i>                                                               |           | Norte da África, Oriente Médio, Irã, Paquistão, Índia |                                |                         |
| <i>L. mexicana</i>                                               | <i>L. olmeca olmeca</i>                                                          |           | oeste dos Andes                                       | Roedores, marsupiais           | Cutâneo, difuso, mucoso |
| <i>L. panamensis</i>                                             | Nenhum provado                                                                   |           | Oeste dos Andes                                       | Endentado arbóreo, mamíferos   | Cutâneo, mucoso         |
| <i>L. peruviana</i>                                              | Nenhum provado                                                                   |           | Peru                                                  | Roedores, marsupiais, cachorro | Cutâneo, mucoso         |
| <i>L. tropica</i>                                                | <i>P. sergenti</i>                                                               |           | Norte da África, Oriente Médio, Irã, Afeganistão      | Humano                         | Cutâneo                 |
|                                                                  | <i>P. arabicus</i> , <i>P. guggisbergi</i>                                       | <i>P.</i> | África do Norte e Subsaariana                         | Hyraxes                        |                         |

Fonte: Adaptado de Pace, 2014.

### 2.3. Morfologia, ciclo e infecção

*Leishmania* spp. são parasitas heteroxenos que se desenvolvem como promastigotas (Figura 2A) no intestino de flebotomíneos e como amastigotas (Figura 2B) intracelulares nos macrófagos de hospedeiros vertebrados (REAL, 2013).

**Figura 2 – Esquema ilustrativo da morfologia de *L. amazonensis* nos diferentes estágios de desenvolvimento.** Neste modelo estão representadas as organelas das diferentes formas do parasita. A: Amastigota; B: Promastigota.



Fonte: Adaptado de: Teixeira, 2013.

A infecção inicia quando um flebotomíneo portador do protozoário *Leishmania* pica um hospedeiro humano, ou outro mamífero, para realizar a hematofagia (Figura 3) (TEIXEIRA, 2013). Os flebotomíneos, assim como os tabanídeos, simulídeos e moscas picadoras, possuem peças bucais para rasgar, dilacerar ou cortar a pele, e em seguida sugar o sangue do poço hemorrágico formado. Este processo é chamado de telmatofagia ou *pool-feeder*. Após penetração das peças bucais na pele do hospedeiro e a localização do sangue, ocorre a fase de ingurgitamento, na qual o

alimento entra no canal alimentar. Os insetos apresentam bombas de sucção localizadas na sua cabeça que transferem o sangue do hospedeiro para o intestino médio. Junto às bombas alimentares é possível observar a liberação de saliva durante a alimentação pelos insetos hematófagos (MASUDA, RAMOS e WINTER, 2012).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor regurgita as formas promastigotas metacíclicas juntamente com vários componentes salivares chamados sialogeninas, que possuem propriedades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que ajudam a contornar esse ambiente hostil do hospedeiro e a finalizar com sucesso a hematofagia. Estes componentes induzem uma rápida infiltração de neutrófilos e o recrutamento de macrófagos para a pele (LESTINOVA et al., 2017).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção, onde são capazes de fagocitar promastigotas de *Leishmania* por mecanismos dependentes ou independentes de opsoninas e complemento (GUEIRARD et al., 2008). No entanto, outros tipos de células como células de Langerhans e fibroblastos também podem ser infectados. Este primeiro passo de interação com células hospedeiras é exemplificado na Figura 3, utilizando neutrófilos e macrófagos. Ambos envolvem reconhecimento e adesão, seguidos de sinalização e invasão. Acredita-se que os neutrófilos desempenhem um papel importante agindo como um “cavalo de Tróia”, enquanto os macrófagos são importantes para o estabelecimento final e amplificação da infecção (TEIXEIRA, 2013).

Laskay et al. (2003) e Peters et al. (2008) observaram que o fagossomo do neutrófilo não possui atividade anti-leishmania, permitindo a sobrevivência do parasita no interior do vacúolo. Dentro do vacúolo, a *Leishmania* realiza o bloqueio da indução do estresse oxidativo, propicia o aumento do tempo de vida e a produção de interleucina 8 (IL-8) por parte dos neutrófilos, com o intuito de atrair outras células (LAUFS et al., 2002; AGA et al., 2002; LASKAY et al, 2003). Dessa forma, os neutrófilos infectados entram em processo de apoptose, e em seguida são fagocitados por macrófagos não ativados, possibilitando a entrada do parasita e o estabelecimento da infecção (LASKAY et al, 2003).

O parasita se liga à superfície da célula hospedeira através do flagelo ou do corpo celular. Essa adesão envolve o reconhecimento de moléculas expostas na superfície do parasita, como lipofosfoglicanos (LPGs) e a glicoproteína gp63. Estas moléculas se ligam a diferentes receptores presentes na superfície dos macrófagos,

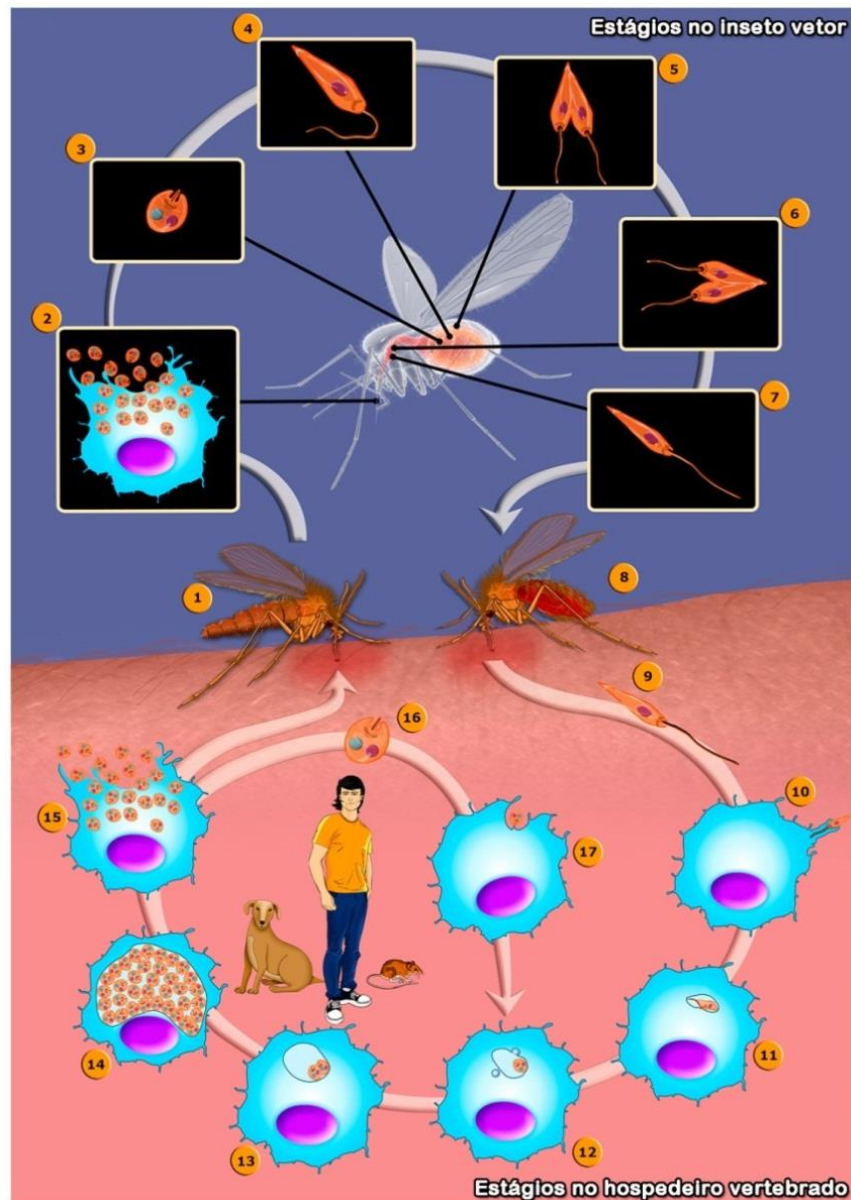
incluindo receptores do complemento (CR1 e CR3), receptores de manose (RM), receptores de fibronectina (FnRs). O processo de internalização via fagocitose começa com a formação de pseudópodes. Assim, o parasita se liga à superfície do macrófago e é então internalizado em um vacúolo conhecido como vacúolo parasitóforo (VP) (TEIXEIRA, 2013).

Os macrófagos estão diretamente incluídos no processo de resposta a infecção por *Leishmania*, visto que esta necessita do tipo de resposta imune estabelecida pelo hospedeiro (Th1 ou Th2), e da habilidade das células para eliminar os parasitas. A resposta de Th1 é representada pela imunidade celular que consente a ativação dos macrófagos pela produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ) e a expressão de NOS2, em contrapartida na resposta por Th2 predomina a resposta humoral não efetiva contra *Leishmania* levando à produção de IL-4 e IL-10 (CORRALIZA et al., 1995; INIESTA et al., 2002).

No VP, o promastigota metacíclico se transforma em um amastigota. Alguns dos amastigotas ficam presos à membrana do vacúolo, enquanto outros permanecem livres no vacúolo e começam a proliferar, dividindo-se várias vezes. Após uma multiplicação intensa, a membrana do macrófago se rompe, liberando assim os amastigotas no tecido; esses amastigotas podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridos por um novo flebotomíneo fêmea. É importante ressaltar que, durante a infecção por *L. amazonensis*, os amastigotas se multiplicam dentro de um VP muito grande, que contém muitos parasitas ligados à membrana do vacúolo. Em outras espécies, incluindo todas as cepas do Velho Mundo, bem como todas as espécies de *Viannia*, os amastigotas permanecem segregados dentro de seu próprio VP pequeno e estrito após cada divisão (TEIXEIRA, 2013).

Apesar de os neutrófilos (CHARMOY et al., 2010) e os macrófagos (FARAH et al. 1975; UENO e WILSON, 2012) serem os principais alvos de infecção da *Leishmania* quando esta é inoculada no hospedeiro mamífero, já foi reportada a infecção deste parasita em outros tipos celulares, como os fibroblastos (BOGDAN et al., 2000). Os fibroblastos fazem parte do conjunto de células que compõem o tecido conjuntivo, e têm sido atribuído a esta célula a capacidade de internalizar promastigotas de várias espécies de *Leishmania*, além de possibilitar a transformação do parasita para a forma amastigota no interior da célula (CHANG et al., 1978; DEDET et al., 1983; SCHWARTZMAN e PEARSON 1985).

**Figura 3 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida da *L. amazonenses*.** (1) O inseto fêmea do mosquito pica um mamífero infectado durante sua alimentação. (2) Macrófagos infectados com formas amastigotas. (3) Forma amastigota. (4) Os amastigotas se transformam em promastigotas pró-cíclicos. (5) Os promastigotas procíclicos se multiplicam no intestino médio. (6) Promastigotas migram em direção à válvula estomodeal no intestino anterior e reiniciam a divisão celular. (7) Promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas infecciosas. (8) O flebótomo fêmea libera os promastigotas metacíclicos em um novo hospedeiro mamífero via regurgitação durante a refeição de sangue. (9) Promastigotas Metacíclicos. (10) Promastigotas metacíclicos infectam macrófagos. (11) Promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas. (12) Os amastigotas se ligam à membrana do vacúolo parasitóforo. (13) Amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Intensa multiplicação amastigota. (15) Amastigotas irrompem a célula. (16) Forma amastigota. (17) Um amastigota infecta um macrófago. Na porção central da figura, adicionamos os reservatórios mais importantes envolvidos na manutenção do parasita.



Fonte: Adaptado de: Teixeira, 2013.

A infecção de células não-fagocitárias que não produzem uma resposta imune pode ser um mecanismo de evasão do parasita para sobreviver a resposta realizada por células do sistema imune. No estudo de Bogdan et al. (2000) foram identificados

fibroblastos de nódulos linfáticos como uma das principais células hospedeiras durante a fase latente da leishmaniose, devido ao fato de ser um ambiente menos hostil à resposta imune, permitindo a persistência dos parasitas. Hespanhol et al. (2005) sugeriram a participação do RM na internalização dos promastigotas nos fibroblastos, assim como ocorre nos macrófagos.

A infecção do hospedeiro invertebrado começa quando um inseto fêmea pica um mamífero infectado durante sua refeição. A fêmea usa suas estruturas orais para perfurar a pele, lacerar os capilares e formar uma poça hemorrágica; a partir disso, ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. O sangue ingerido é imediatamente envolvido pela matriz peritrófica (MP), secretada pelo epitélio intestinal e composta de quitina, proteínas e glicoproteínas (SECUNDINO et al., 2005), e digerido no intestino abdominal do inseto. Neste novo ambiente, amastigotas agrupam-se formando aglomerados ou “ninhos de amastigota”, onde permanecem protegidos pela MP de enzimas digestivas. Neste ambiente, os amastigotas então se diferenciam em uma forma replicativa chamada promastigotas procíclicos. Durante a diferenciação, formas intermediárias entre as formas amastigotas e promastigotas são mais suscetíveis à morte por enzimas digestivas encontradas no ambiente intestinal. Posteriormente, a porção anterior do MP decompõe-se e os parasitas são liberados no epitélio do intestino médio do inseto (TEIXEIRA, 2013).

Os promastigotas se dividem por fissão binária e se ligam às microvilosidades do epitélio do intestino médio. Essa adesão ocorre predominantemente em toda a região do flagelo e envolve a participação de um LPG exposto na superfície da promastigota. Quando os parasitas se desprendem do epitélio, os promastigotas migram em direção à válvula estomodeal localizada no intestino anterior onde se concentram e reiniciam a divisão celular. Estes são responsáveis pela produção e secreção de um gel, chamado *promastigote secretory gel* (PSG) que age como um tampão obstruindo o intestino médio e a faringe. Durante a produção do PSG os parasitas começam a se diferenciar em formas promastigotas metacíclicas infecciosas. Esse processo de diferenciação é chamado de metaciclogênese. Parasitas causam danos à válvula estomodeal, interferindo assim em sua função e facilitando o refluxo dos parasitas do intestino médio torácico. Consequentemente, durante as subseqüentes picadas de insetos, as formas promastigotas metacíclicas infecciosas são liberadas e podem assim infectar um novo hospedeiro mamífero (TEIXEIRA, 2013).

## 2.4. Características clínicas

As manifestações da infecção por *Leishmania* podem variar de doença assintomática a clinicamente manifestada que pode permanecer localizada na pele ou disseminar-se para as membranas mucosas orais e respiratórias superiores ou por todo o sistema retículo-endotelial (PACE, 2014).

A LV é endêmica em mais de 60 países ao redor do mundo. Em 2015, mais de 90% de todos os casos documentados vieram dos sete países a seguir: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018; WILHELM et al., 2019). A incidência mundial está atualmente em declínio. Cerca de 200.000 a 400.000 novos casos ocorreram em todo o mundo em 2012 e apenas 50.000 a 90.000 em 2017. No entanto, a incidência varia de forma cíclica, com picos de incidência a cada 8 a 15 anos. Portanto, um aumento cíclico na incidência parece provável, especialmente porque os fatores de risco para doenças (por exemplo, HIV/AIDS e migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas) persistem (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018; WILHELM et al., 2019).

Caracterizam a LV os sintomas de febre irregular persistente e esplenomegalia. A pancitopenia a hepatomegalia, a hipergamaglobulinemia e a perda de peso são comuns, principalmente em pacientes que apresentam atraso em seu desenvolvimento. A desnutrição aguda está associada a uma alta carga parasitária, principalmente em crianças pequenas (HARHAY et al., 2011), embora não esteja claro se esse efeito é causa ou consequência de um estado nutricional ruim (ZACARIAS et al., 2017). O início da LV pode ser agudo ou insidioso, e o período de incubação é de 2 semanas a 8 meses. Sem tratamento, a doença é tipicamente fatal dentro de 2 anos como resultado de infecção bacteriana secundária ou anemia grave. No entanto, as pessoas infectadas podem desenvolver sintomas somente anos após a infecção, quando se tornam imunossuprimidas (READY, 2014; BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018).

A coinfeção pelo HIV é um dos principais desafios para o controle da leishmaniose visceral. O HIV foi responsável pelo ressurgimento da leishmaniose visceral no sul da Europa no final dos anos 90. No Brasil e na Índia, agora são relatadas coinfeções de até 6% dos pacientes (BRASIL, 2011; BURZA et al., 2014), enquanto na Etiópia até 18% dos pacientes que apresentam LV em áreas

endêmicas são coinfeções (YIMER et al., 2014; BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018).

O HIV e a *Leishmania* compartilham um mecanismo imunopatológico comum que envolve macrófagos e células dendríticas, resultando em progressão acelerada de ambas as doenças devido ao aumento da replicação de patógenos (MOCK et al., 2012). Qualquer forma de leishmaniose visceral em uma pessoa infectada pelo HIV deve ser considerada uma doença definidora de AIDS em estágio 4, embora as diretrizes atuais da OMS para o estadiamento do HIV mencionem apenas leishmaniose disseminada atípica (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). A testagem para HIV deve ser obrigatória em todos os pacientes que apresentam leishmaniose visceral, embora seja recomendado o rastreamento de leishmaniose visceral em pacientes com HIV vivendo em áreas endêmicas. Esses pacientes apresentam manifestações mais graves e atípicas da leishmaniose visceral, exigindo diferentes abordagens diagnósticas e de manejo; por exemplo, na África Oriental, os testes de diagnóstico rápido demonstraram ser menos sensíveis em pacientes HIV positivos do que em pacientes HIV negativos (TER HORST et al., 2009), enquanto a precisão dos pacientes coinfeções no subcontinente indiano ainda não foi estabelecida (BOELAERT et al., 2014; BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018).

A leishmaniose disseminada atípica pode se apresentar com parasitas isolados da mucosa gastrointestinal, do trato respiratório e do fígado (EJARA et al., 2010). Na Índia, metade dos pacientes diagnosticados com coinfeção não estavam cientes de seu status de HIV (BURZA et al., 2014), enquanto a leishmaniose pode ser facilmente confundida com a maioria de infecções oportunistas relacionadas ao HIV (LINDOSO et al., 2016).

A leishmaniose cutânea pós-calazar (PKDL) é uma dermatose que complica entre 10% e 60% das LV causadas por *L. donovani* na Ásia (Índia, Nepal e Bangladesh) e na África Oriental (Sudão e Etiópia), respectivamente, com seu espectro clínico variando entre as duas regiões (DESJEUX, 2004). Raramente é observado em pessoas infectadas com *L. infantum*, mas, quando visto, é típico naqueles imunocomprometidos (STARK et al., 2006). No Sudão PKDL é vista principalmente em crianças, enquanto na Índia, adultos jovens são mais comumente afetados. A doença ocorre meses a anos após o tratamento da LV (ambas as regiões), durante o tratamento (Sudão) ou às vezes na ausência de qualquer evidência de visceralização. Se manifesta como uma erupção cutânea na face, tronco e membros

que além de variar de macular a papular, a nodular e a placas, também varia em gravidade (Figura 4) (ZIJLSTRA, 2001). PKDL é resultado de uma reação imunológica aos parasitas de *Leishmania* que estão persistindo dentro da pele e fornece um reservatório para a transmissão. Casos leves de PKDL no Sudão podem se resolver espontaneamente dentro de um ano, mas na Ásia o tratamento é indicado para todos os casos (DESJEUX, 2004).

A preservação da sensação distingue essas lesões da hanseníase. Para a PKDL na África, um sistema de classificação foi desenvolvido (Tabela 2) (ZIJLSTRA et al., 2003; ZIJLSTRA, 2014); mas esse sistema de classificação não existe na Ásia.

**Figura 4 – Manifestações clínicas em Leishmaniose.** Paciente do sexo feminino (A) e criança (B) com exantema maculopapular eritematoso e paciente com mácula hipopigmentada (C) devido a PKDL.



Fonte: Burza, Croft e Boelaert, 2018.

**Quadro 2 – Sistema de classificação para leishmaniose dérmica pós-cala-azar na África Oriental.**

|        |                                                                                                                                                                            |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grau 1 | Erupção maculopapular ou nodular dispersa na face, com ou sem lesões na parte superior do peito ou nos braços                                                              |
| Grau 2 | Erupção maculopapular ou nodular densa que cobre a maior parte da face e se estende ao tórax, costas, braços e pernas, com apenas lesões dispersas nos antebraços e pernas |
| Grau 3 | Erupção maculopapular ou nodular densa que cobre a maior parte do corpo, incluindo mãos e pés; a mucosa dos lábios e palato pode estar envolvida                           |

Fonte: ZIJLSTRA et al., 2003; ZIJLSTRA, 2014.

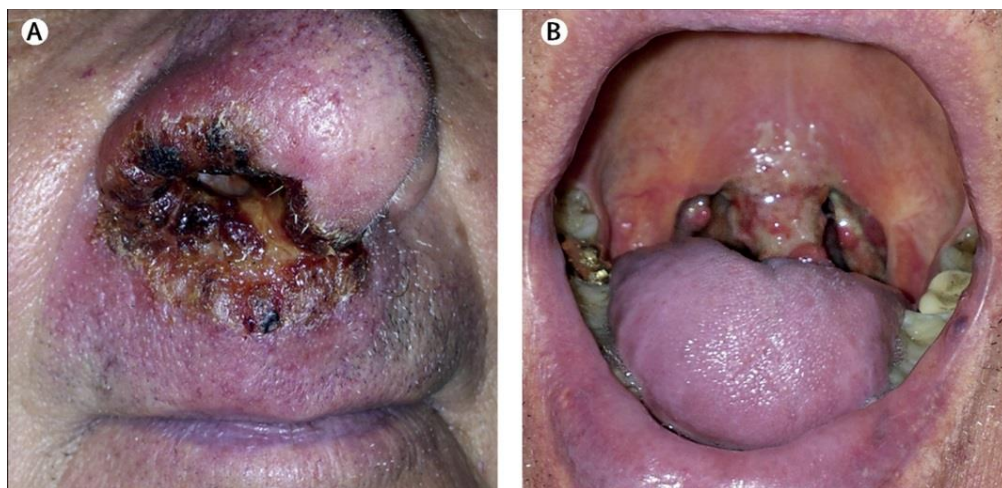
A leishmaniose cutânea não apresenta risco de vida, mas pode levar a morbidade estética substancial, estigmatização social (BENNIS et al., 2017) e efeitos psicológicos (YANIK et al., 2004). Quando sintomática a aparência e a extensão das lesões cutâneas após a infecção por *Leishmania* variam dependendo das espécies, bem como dos fatores genéticos do hospedeiro e da extensão da ativação imunológica. A LC geralmente ocorre em áreas expostas acessíveis aos flebótomos, como o rosto, pescoço e membros. No Velho Mundo, o LC manifesta-se inicialmente como uma pápula indolor que progride ao longo de semanas ou meses até um nódulo com uma crosta central, que é uma úlcera seca endurecida (Figura 5) (AARA, 2013). Em geral, os pacientes permanecem sistemicamente bem, e as lesões, embora às vezes com coceira, não geram a dor que pode ser esperada pelo aparecimento (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018). As lesões causadas por *L. tropica* e *L. major* geralmente regredem em um ano, mas tendem a deixar cicatrizes permanentes. As lesões de *L. aethiopica* (FIKRE et al., 2017) levam anos para cicatrizar e podem evoluir para leishmaniose mucocutânea oronasal grave (Figura 6) e formas difusas de leishmaniose cutânea.

**Figura 5 – Manifestação clínica de um nódulo com crosta central na LC.**



Fonte: Burza, Croft e Boelaert, 2018.

**Figura 6 – Leishmaniose mucocutânea oronasal grave em um homem de 73 anos com história de viagem ao Panamá.** (A) Uma lesão que afeta a narina direita e lábio superior. (B) Lesões que afetam a úvula e o palato mole adjacente.



Fonte: Burza, Croft e Boelaert, 2018.

As lesões de leishmaniose cutânea são frequentemente confundidas com furúnculos. Dependendo do contexto, os médicos também devem considerar a paracoccidioidomicose, histioplasmose cutânea, esporotricose, infecção por *Balamuthia mandrilaris*, infecções por micobactérias, cromoblastomicose, neoplasias cutâneas e infecções cutâneas bacterianas parcialmente cicatrizadas como diagnóstico diferencial (DAVID e CRAFT, 2009).

A LC no Novo Mundo tem vários padrões e é menos provável que se resolva sem tratamento. A progressão após uma picada de flebótomo é semelhante à do Velho Mundo, exceto que o nódulo pode se manifestar como úlcera úmida que pode

estar associada a linfadenite localizada ou linfadenopatia (BLANCO et al., 2013). Na América Latina, as lesões cutâneas podem se disseminar e se manifestar como múltiplas lesões cutâneas não ulceradas elevadas ou infiltrados que podem ser muito extensos (com até centenas de lesões) e de gravidade variável (LCD) (BLANCO et al., 2013; PANIZ MONDOLFI, 2013) dependendo do grau de ativação da resposta imune celular subjacente.

As variantes mais raras da leishmaniose cutânea - leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose *recidivans* - se correlacionam com um espectro subjacente de respostas imunes contrastantes (SCOTT e NOVAIS, 2016). A leishmaniose cutânea difusa é causada por *L. amazonensis*, *L. aethiopica* ou *L. mexicana* e desenvolve-se como múltiplas pápulas e nódulos não ulcerados e não dolorosos, que se assemelham à hanseníase lepromatosa. A condição reflete a ausência de uma resposta imune celular, e a derme é tipicamente infiltrada por uma grande quantidade de parasitas. A leishmaniose cutânea disseminada é vista na América Latina, e é definida por dez ou mais lesões localizadas em duas ou mais partes do corpo. O envolvimento da mucosa é frequente. Histologicamente, existem poucos parasitas nas lesões, e a leishmaniose cutânea disseminada está associada a um teste cutâneo para *Leishmania* positivo e a anticorpos antileishmaniais (HASHIGUCHI et al., 2016). A leishmaniose *recidivans* apresenta-se como novas lesões ao redor da cicatriz antiga, originada de uma LC causada por *L. tropica*, que podem se expandir progressivamente. As lesões são intensamente infiltradas com linfócitos. Essa manifestação pode ser confundida com tuberculose cutânea. A imunossupressão é um fator de risco para leishmaniose cutânea difusa e disseminada (VAN GRIENSVEN et al., 2014).

A disseminação linfática ou hematogênica do parasita *Leishmania* de uma lesão cutânea, concomitantemente ou meses a anos mais tarde, pode resultar em infecção da mucosa oral e do trato respiratório superior. As lesões da mucosa causadas por espécies do Velho Mundo são raras, mas podem ter sido relatadas como envolvendo mucosas bucais ou laríngeas em idosos e imunocomprometidos (FSADNI, 2007). No Novo Mundo, a leishmaniose muco-cutânea se manifesta como nódulos e infiltrados da cartilagem nasal levando ao bloqueio da mucosa, narinas, destruição do septo nasal e colapso nasal (GUERRA, 2015) A faringe, o palato, o lábio superior e a laringe também podem ser afetados o que pode resultar em grave destruição tecidual e grande desfiguração (AMATO, 2010).

## 2.5. Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico clínico-epidemiológico baseia-se na coleta de informações primárias, como uma breve conversa com o paciente afim de avaliar a gravidade dos sinais e sintomas, além da análise das características das lesões. A reunião desses dados é um indicativo de qual tipo de leishmaniose se trata e seus possíveis agentes, porém para a confirmação se faz necessário a realização do diagnóstico laboratorial (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

O diagnóstico laboratorial engloba dois grupos principais de exames: os exames parasitológicos e os exames imunológicos. Dentro dos exames parasitológicos são feitas as buscas pelo parasita através de técnicas diretas ou indiretas (BRASIL, 2017).

A demonstração direta do parasita é a primeira escolha por se tratar de um exame rápido, fácil e barato. Faz-se a pesquisa direta de formas amastigotas, o material da lesão é obtido através de escarificação, aspiração ou biópsia da borda, corado pelo Giemsa ou Leishman. Quanto mais recente a lesão maior as chances de encontrar o parasita (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

No isolamento em meio de cultivo o material obtido da biópsia da borda é inoculado em meios de cultura (Neal, Novy e Nicolle (NNN) e *Liver Infusion Triptose* (LIT), entre 24°C e 26°C). A partir do quinto dia já é possível encontrar formas promastigotas. (BRASIL, 2017).

O isolamento *in vivo* é um método pouco utilizado por ser complexo, caro e demorado, apesar de altamente sensível. Nele o material é obtido por biópsia ou raspado da lesão é inoculado em hamster (*Mesocricetus auratus*), as lesões se desenvolvem a partir de 1 mês e o animal deve ser acompanhado de três a seis meses (BRASIL, 2017).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente sensível e específica, mas pouco utilizado pelo seu alto custo e necessidade de uma infraestrutura especial, além da alta chance de contaminação durante o processo. É uma técnica de amplificação do DNA, e permite que o material genético do parasita seja detectado mesmo em baixas cargas (BRASIL, 2017).

No grupo de exames Imunológicos são realizados a Intradermoreação de Montenegro (IDRM), onde um antígeno padronizado é injetado na face flexora do

antebraço do paciente. Para LC, após um ou dois dias, o resultado é positivo quando há endurecimento da área de tamanho igual ou superior a 5mm. Reações sorológicas também são utilizadas e dentre elas a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é a mais comum, é relativamente sensível, mas pode haver reação cruzada entre a LC e a doença de Chagas ou a LV (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

## **2.6. Aspectos epidemiológicos**

As epidemias recorrentes de LV na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) causaram alta morbidade e mortalidade nas comunidades afetadas. Da mesma forma, grandes epidemias de leishmaniose cutânea afetaram diferentes partes do Afeganistão e da República Árabe da Síria. Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à WHO ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, países pobres e subdesenvolvidos nos quais prevalecem as doenças negligenciadas (WHO, 2018).

Na região da Ásia do Sudeste de acordo com a WHO (2018), o programa de eliminação de LV está progredindo satisfatoriamente, e países como Bangladesh, que reportaram mais de 9.000 casos em 2006, registraram uma média de cerca de 600 novos casos em 2014–2015. A maioria dos casos de LC ocorre no Afeganistão, na Argélia, no Brasil, na Colômbia, na República Islâmica do Irã, no Paquistão, no Peru, na Arábia Saudita e na República Árabe da Síria. A epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Região das Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores de flebotomíneos, manifestações clínicas e resposta à terapia, e múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018).

Segundo o *Global Health Observatory* (2019) o Brasil é um país endêmico para LC e LV, assim como outros países (Figura 7 e 8), sendo em 2018 o número de casos reportados de LC 16651 e de LV 3460.

**Figura 7 – Status de endemidade de leishmaniose cutânea (2018).**



Fonte: *Global Health Observatory*, 2019.

**Figura 8 – Status de endemidade de leishmaniose visceral (2018)**



Fonte: *Global Health Observatory*, 2019.

## 2.7. Quimioterapia

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial. Entretanto, tais fármacos apresentam uma série de problemas, como resistência do parasita e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia deles (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de Leishmanioses têm sido até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb5+). Foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente – Sb3+), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio),

obtendo algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento (LAINSON, 1997). No entanto, esta formulação apresentava toxicidade, ocasionando tosse, dor no peito e depressão. Além disso, era de difícil administração. Em 1937, Smith introduziu a utilização do estibogluconato de sódio (Pentostan®, um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio está na forma pentavalente, Sb<sup>5+</sup>). Desta forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade em relação tártaro emético. Este medicamento constituiu o tratamento padrão para LV a partir de 1940, no entanto, seu potencial de toxicidade, bem como as crescentes taxas de resistência observada na Europa, Ásia e América do Sul nas últimas duas décadas levou ao uso de medicamentos alternativos, como anfotericina B e seus derivados lipossômicos (CROFT, 2003).

A anfotericina B (deoxicolato) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas ao invés do colesterol das membranas de células animais. Este lipídeo é um esteróide de 28 carbonos (C-28), dupla ligação em C22 e uma metila em C-24. O mecanismo de ação da anfotericina B decorre de sua ligação ao ergosterol, com consequente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita (SAHA, 1986; OLLIARO, BRYCESON, 1993). O uso clínico de anfotericina B é recomendado para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional, com ameaça de morte. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (BERMAN, 1998).

Hexadecilfosfocolina ou miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (UNGER, 1989). O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores (SINDERMAN, 2003) e atualmente desponta como a melhor alternativa para o tratamento da LV, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros (SUNDAR, JHA, 1999). Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* (CROFT, 1996; LE FICHOUX, 1998). O desenvolvimento da miltefosina foi um grande avanço no tratamento da LV (PALUMBO, 2008). Seguindo os preços diferenciados das formulações lipídicas da anfotericina B, esses são agora preferidos não apenas

na Europa, mas também em países em desenvolvimento, devido à drástica redução resultante na permanência hospitalar e perfil de segurança mais favorável (SUNDAR et al., 2013).

A LC do Velho Mundo pode ser observada com expectativa, embora o tratamento seja geralmente considerado para lesões múltiplas ou grandes ou potencialmente desfigurantes. O tratamento é geralmente oferecido para lesões do Novo Mundo, que provavelmente não cicatrizam espontaneamente. Termoterapia, crioterapia, injeções intralesionais de antimoniais ou aplicação tópica de creme de paromomicina são opções terapêuticas alternativas cuja eficácia varia entre diferentes espécies de *Leishmania*. A terapia sistêmica é considerada para lesões grandes/difusas ou para doença mucocutânea/PKDL (SUNDAR et al., 2013).

## 2.8. Metalocomplexos

Os metalocomplexos são compostos por metais de transição, coordenados com fármacos. Os mesmos apresentam possibilidades de coordenação e geometrias com o ligante (fármaco), variedade de estados de oxidação e grande diversidade estrutural (VAN RIJT e SADLER, 2009).

Esta coordenação permite a interação com o alvo molecular específico, principalmente com moléculas biológicas (FRICKER, 2007), possibilitando o aumento da lipofilicidade do fármaco após sua coordenação a um metal, facilitando a passagem do composto através das membranas biológicas (AHMAD, 2006; BRUIJNINCX e SADLER, 2008).

Devido a essas características de aumento de lipofilicidade, degradação das organelas e morte celular, diferentes aplicações biológicas de complexos metálicos têm sido atualmente estudadas (TAN, 2000; WRIGHT e SUTHERLAND, 2007), como a coordenação de metais a antibióticos, considerando principalmente a possibilidade de melhoria nas atividades biológicas das drogas, e ponderando sobre os níveis baixos de toxicidade dos complexos. Assim, estes complexos podem ser considerados novos e potenciais compostos a serem testados contra diferentes patogenias (ROCHA, 2011).

A atividade de compostos metálicos contra protozoários, bactérias e fungos têm sido amplamente abordados na literatura. Fricker et al. (2008) investigaram a atividade dos complexos ciclometalados de ouro (III) e paládio (II) e os complexos oxorênio (V)

contra cisteíno-proteases de mamíferos e parasitas, incluindo *Leishmania*. As cisteíno-proteases desempenham um papel essencial nos ciclos de vida dos parasitas, incluindo *Schistosoma*, *Plasmodium*, *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* (SAJID e MCKERROW, 2002). As cisteíno-proteases em *Leishmania* ocorrem em grandes quantidades nos megassomas, que são particularmente abundantes em amastigotas, mas podem ser encontradas em outros compartimentos intracelulares (UEDA-NAKAMURA, ATTIAS e DE SOUZA, 2001). Estas enzimas desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasita, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e na modulação de sua resposta imune (SILVA-LÓPEZ, 2010; MOTTRAM, COOMBS e ALEXANDER, 2004).

Seis complexos foram testados contra as cisteíno-proteases dos parasitas, a cruzaina de *T. cruzi* e a catepsina B de *L. major*. Os dois complexos inibidores mais potentes foram o de rênio (2 (1 *H*) -pyridinethionato-κ *S*<sup>2</sup>) [2,6-bis [(mercapto-κ *S*) metil] piridina-κ *N*<sup>1</sup>] oxorhenium (V) e cloro [2,2' - (tio-κ *S*) bis [ethanethiolato-κ *S*]] oxorhenium (V). Os compostos também foram avaliados em ensaios antiproliferativos de parasitas. Dois compostos de oxorênio e um composto de composto de paládio inibiram o crescimento de *T. Cruzi* e o composto de paládio inibiu o crescimento de promastigotas em três espécies de *Leishmania*: *L. major*, *L. mexicana* e *L. donovani* (FRICKER et al., 2008)

O HmtpO {5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*] pyrimidin-7(4*H*)-one} é um derivado de triazolo-pirimidina, considerado um análogo da hipoxantina, que ocorre naturalmente. Estes complexos apresentaram efeito sobre o metabolismo energético dos parasitas, causando também degradação nas membranas das organelas e morte celular (RAMÍRES-MACÍAS, 2011). Complexos de lantanídeos 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*] pyrimidin-7(4*H*)-one (HmtpO), denominados [Ln(mtpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>] · 9H<sub>2</sub>O (Ln=La (III), Nd (III), Eu (III), Gd (III), Tb (III), Dy (III) e Er (III)) foram utilizados em testes antiproliferativos *in vitro* contra atividade de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Sua atividade *in vitro* foi semelhante ou excedeu significativamente os demonstrados por dois dos medicamentos mais utilizados atualmente para o tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas, Glucantime e benznidazol, respectivamente (CABALLERO et al., 2014).

Em 2015, Portes et al. descreveu os efeitos citotóxicos do composto de ferro dinuclear [Fe (HPCINOL) (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> -μ-oxo, no qual HPCINOL é o ligante 1- (bis-piridin-

2-ilmetil-amino) -3- cloropropan-2-ol, em *T. gondii* infectando células hospedeiras LLC-MK2. Este composto não foi tóxico para as células LLC-MK2 em concentrações de até 200  $\mu\text{M}$ , mas foi efetivo contra o parasita, com uma concentração inibitória de 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) de 3,6 após 48 horas de tratamento. A formação de cisto foi observada após o tratamento. Alterações ultraestruturais também foram observadas em *T. gondii*, incluindo bolhas e fendas de membrana no citoplasma, com inclusões semelhantes aos grânulos de amilopectina, que normalmente são encontradas nos bradizoítos. Uma análise das vias de morte celular no parasita revelou que o composto causou uma combinação de apoptose e autofagia. Os ensaios de fluorescência demonstraram que o ambiente redox nas células LLC-MK2 se torna oxidante na presença do composto de ferro. Além disso, foi observada uma redução nas atividades de superóxido dismutase e catalase nos parasitas tratados e a presença de espécies reativas de oxigênio nos vacúolos parasitóforos, indicando uma resposta protozoária prejudicada contra esses radicais (PORTES et al., 2015).

Em 2017, dois novos complexos de cobre (II):  $[(\text{H}_2\text{L}_1) \text{Cu} (\mu\text{-Cl})_2 \text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_1)] \text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1) e  $[(\text{H}_2\text{L}_2) \text{Cu} (\mu\text{-Cl})_2 \text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)] \text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2) foram testados contra *T. gondii*. Os complexos (1) e (2) controlaram irreversivelmente o crescimento de parasitas *in vitro*, com valores de  $\text{IC}_{50}$  0,78  $\mu\text{M}$  e 3,57  $\mu\text{M}$ , respectivamente, após 48h. Esses complexos induziram parte da população de taquizoítas a se converter em bradizoítas, que morrem eventualmente. Foram observados sinais de apoptose, como bolhas na membrana e fragmentação nuclear, e necrose, como ruptura da membrana plasmática, intensa vesiculação do citoplasma e liberação de conteúdo celular. Além disso, o complexo (2) interferiu na disposição correta do complexo da membrana interna do parasita, afetando a divisão celular (PORTES et al., 2017).

Costa et al. (2017) avaliaram o potencial anti-Leishmania de novos complexos de rutênio (II),  $\text{cis-} [\text{Ru}^{\text{II}} (\eta^2\text{-O}_2\text{CR}) (\text{dppm})_2] \text{PF}_6$ , com  $\text{dppm}$  = bis (difenílfosfina) metano e  $\text{R}$  = 4-butilbenzoato (bbato) 1, 4- (metiltio) benzoato (mtbato) 2 e 3-hidroxi-4-metoxibenzoato (hmxato) 3. Foi avaliada a citotoxicidade em promastigota e seus efeitos sobre interação parasita-hospedeiro. A citotoxicidade dos complexos foi analisada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e macrófagos de camundongos (RAW 264.7). O efeito de complexos sobre a interação hospedeiro-parasita foi avaliado por ensaio de infecciosidade *in vitro* realizada na presença de duas concentrações diferentes de cada complexo: o valor de  $\text{IC}_{50}$  para os

promastigotas e a concentração não tóxica para 90% de macrófagos RAW 264.7. Três complexos exibiram potente atividade citotóxica contra todas as espécies de *Leishmania* testadas. Os valores de IC<sub>50</sub> variaram de 7,52-12,59µM (complexo 1); 0,70-3,28µM (complexo 2) e 0,52-1,75µM (complexo 3). Todos os complexos inibiram significativamente o índice de infecciosidade nas duas concentrações testadas. As inibições de infecciosidade variaram de 37 a 85%. As inibições de infecciosidade resultaram de reduções na porcentagem de macrófagos infectados e no número de parasitas por macrófago. Os resultados sugerem notável atividade leishmanicida *in vitro* por esses novos complexos de rutênio (II).

Em 2018, foi avaliada a influência da coordenação da sulfadiazina (SDZ), uma droga usada no tratamento da toxoplasmose, na atividade biológica do complexo de ferro (III) [Fe (HBPCINOL)Cl<sub>2</sub>] · H<sub>2</sub>O, 1, (H<sub>2</sub>BPCINOL=N-(2-hydroxybenzyl) -N-(2-pyridylmethyl) (3-chloro) (2-hydroxy) -propylamine). O novo complexo[(Cl)(SDZ)Fe (III) (µ-BPCINOL)<sub>2</sub>Fe (III)(SDZ)(Cl)] · 2H<sub>2</sub>O, 2, que foi obtido pela reação entre o complexo 1 e SDZ, foi caracterizado usando uma variedade de técnicas físico-químicas. O efeito citotóxico dos complexos e a capacidade do *T. gondii* de infectar células LLC-MK2 foram avaliados, e verificou-se que ambos os complexos reduziram o crescimento de *T. gondii* e, ao mesmo tempo, causaram baixa citotoxicidade nas células hospedeiras. Após 48 h de tratamento, o complexo 2 reduziu a capacidade do parasita de proliferar em cerca de 50% com um IC<sub>50</sub> de 1,66 µmol / L. Enquanto isso, o complexo 1 ou SDZ sozinho causou uma redução de 40% na proliferação e o SDZ exibiu um IC<sub>50</sub> de 5,3 µmol / L. Além disso, o tratamento do complexo 2 induziu alterações morfológicas e ultraestruturais distintas nos parasitas e desencadeou a formação de formas semelhantes a cistos (PORTES et al., 2018).

Hubin et al. (2019) avaliaram o efeito de diversos complexos com diferentes núcleos metálicos (Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) contra amastigotas axênicos de *L. donovani* e amastigotas intracelulares em células THP-1. Os valores de IC<sub>50</sub> e / ou IC<sub>90</sub> mostrou que 10 compostos foram igualmente ativos a cerca de 2 vezes menos potente do que a pentamidina. O composto mais potente tinha um IC<sub>50</sub> de 2,82 µM (em comparação com 2,93 µM para pentamidina). Nove compostos eram 1,1 a 13,6 vezes mais potentes que a pentamidina contra os amastigotas axênicos, sendo o mais potente cerca de 2 vezes menos potente que a anfotericina B. Quatorze compostos eram cerca de 2 a 10 vezes mais potentes que a pentamidina, o mais potente é cerca de 2 vezes menos potente que a anfotericina B contra

amastigotas intracelulares em células THP-1. Os dois compostos mais promissores ( $\text{Fe L7 Cl}_2$  e  $\text{Mn L7 Cl}_2$ ), com uma forte atividade contra ambos os promastigotas e amastigotas e nenhuma toxicidade observável contra as células THP-1 são o  $\text{Fe}^{2+}$  - e  $\text{Mn}^{2+}$ -complexos de um derivado de dibenzil cicleno. Apenas 2 dos 44 compostos apresentaram citotoxicidade observável contra células THP1.

Santos et al. (2014) avaliaram o efeito antibacteriano de complexos metálicos de quercetina flavonóide e íons Ga (III) e ligantes sintéticos H2bbppd e íons Cu (II) em *Pseudomonas fluorescense*. A bactéria demonstrou alta sensibilidade aos compostos testados, sendo eficiente na avaliação da atividade antibacteriana. Os bioensaios com complexos metálicos apresentaram maior efeito inibitório que seus ligantes individuais, portanto, indicando aumento da atividade antimicrobiana após a coordenação. Ambos os complexos metálicos exibem bons desempenhos antimicrobianos, como baixa concentração inibitória mínima ( $\text{CIM} \leq 250 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), efeito bactericida e um amplo espectro de atividade.

Castillo et al. (2016) sintetizaram compostos metálicos com diferentes núcleos ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e seus ligantes e testaram seu efeito nas bactérias *S. aureus*, MRSA, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium* e *S. flexneri*; nas leveduras: *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* e nos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. Os ensaios mostraram que os complexos exibiram moderada atividade antibacteriana e/ou antifúngica. A atividade antimicrobiana foi considerada mais ativa para os complexos metálicos do que para os ligantes. Os complexos metálicos que continham cobre e cobalto, respectivamente, exibiram efeitos antibacterianos e antifúngicos notáveis contra todas as cepas bacterianas testadas. Os valores da concentração inibitória mínima 50 ( $\text{MIC}_{50}$ ) estavam na faixa de  $2454\text{--}0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Complexos metálicos foram mais eficazes na inibição de bactérias do que fungos.

Turecka et al. (2018) avaliaram a atividade antifúngica de complexos de Co (III) com ligantes de diamina quelato contra um amplo espectro de espécies de *Candida*. Os compostos analisados revelaram atividade antifúngica significativa para cepas selecionadas de espécies de *Candida*;  $[\text{CoCl}_2 (\text{dap})_2] \text{Cl}$  (1) e  $[\text{CoCl}_2 (\text{en})_2] \text{Cl}$  (2) foram mais eficazes do que o cetoconazol. Seu provável mecanismo de ação não envolveu a parede celular ou a ligação ao ergosterol. A atividade antifúngica do cetoconazol aumentou em combinação com os complexos testados de Co (III). Foram

observados danos à membrana mitocondrial e à membrana do retículo endoplasmático, sendo este efeito observado por microscopia eletrônica de transmissão. Os complexos de Co (III) com ligantes de diamina quelato não são tóxicos em concentrações ativas contra espécies de *Candida*.

## **2.9. Análise *in silico* dos parâmetros preditivos**

Para ser eficaz como uma droga, uma molécula potente deve atingir seu alvo no corpo em concentração suficiente e permanecer em uma forma bioativa por tempo suficiente para que os eventos biológicos esperados ocorram. Durante os processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, que consomem tempo e recursos, um grande número de estruturas moleculares é avaliado de acordo com parâmetros muito diversos, a fim de orientar a seleção de quais produtos químicos sintetizar, testar e promover, com o objetivo final de identificar aqueles com a melhor chance de se tornar um medicamento eficaz para os pacientes (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

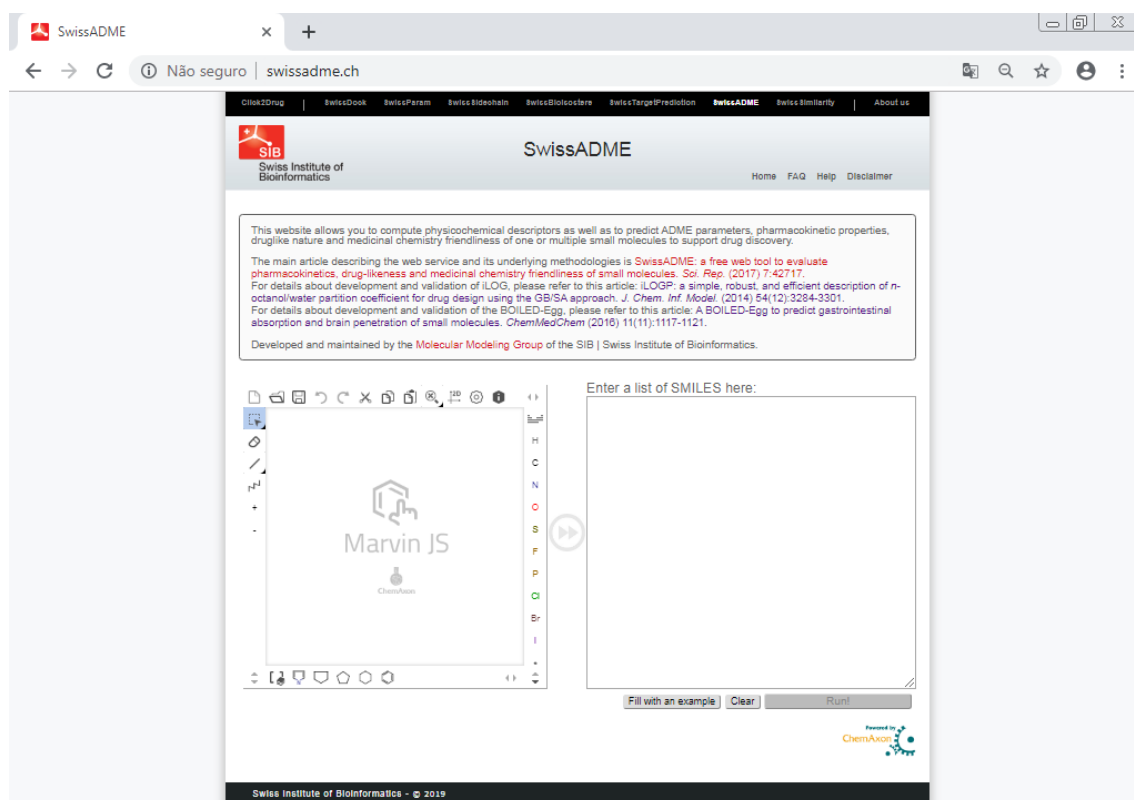
As moléculas devem mostrar alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade. Igualmente importante é o acesso e a concentração no alvo terapêutico no organismo. A maneira tradicional de considerar a farmacocinética, isto é, o destino de um composto terapêutico no organismo, é decompor os vários efeitos que afetam o acesso ao alvo em parâmetros individuais. Por sua vez, esses parâmetros ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) podem ser avaliados separadamente por métodos dedicados (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017). Foi demonstrado que a estimativa precoce de ADME na fase de descoberta reduz drasticamente a fração de falha relacionada à farmacocinética nas fases clínicas (HAY, THOMAS e CRAIGHEAD, 2014).

Na atualidade, modelos de computador foram adotados como uma alternativa válida aos procedimentos experimentais para predição de ADME, especialmente nas etapas iniciais, quando as estruturas químicas investigadas são numerosas (DAHLIN, INGLESE e WALTERS, 2015). Uma grande variedade de métodos *in silico* compartilha o objetivo de prever parâmetros ADME a partir da estrutura molecular<sup>3</sup>. A ferramenta da Web SwissADME é gratuita, e está disponível para acesso no endereço <http://www.swissadme.ch>. Esta ferramenta oferece acesso a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-

químicas, farmacocinética, semelhança a medicamentos e facilidade de uso de medicamentos, entre os quais métodos proficientes internos, como o BOILED-Egg, iLOGP e radar de biodisponibilidade. A ferramenta permite que Especialistas, mas também não especialistas em quiminformática ou química computacional, possam prever rapidamente parâmetros-chave para uma coleção de moléculas para apoiar seus esforços de descoberta de medicamentos (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

O acesso ao SwissADME em um navegador da Web exibe diretamente a página de envio do SwissADME, onde podem ser inseridas moléculas a serem estimadas para propriedades de ADME, físico-química, semelhança a medicamentos, farmacocinética e de compatibilidade com produtos químicos. A interface desta ferramenta está ilustrada abaixo na figura 9.

**Figura 9 – Página de envio SwissADME.**



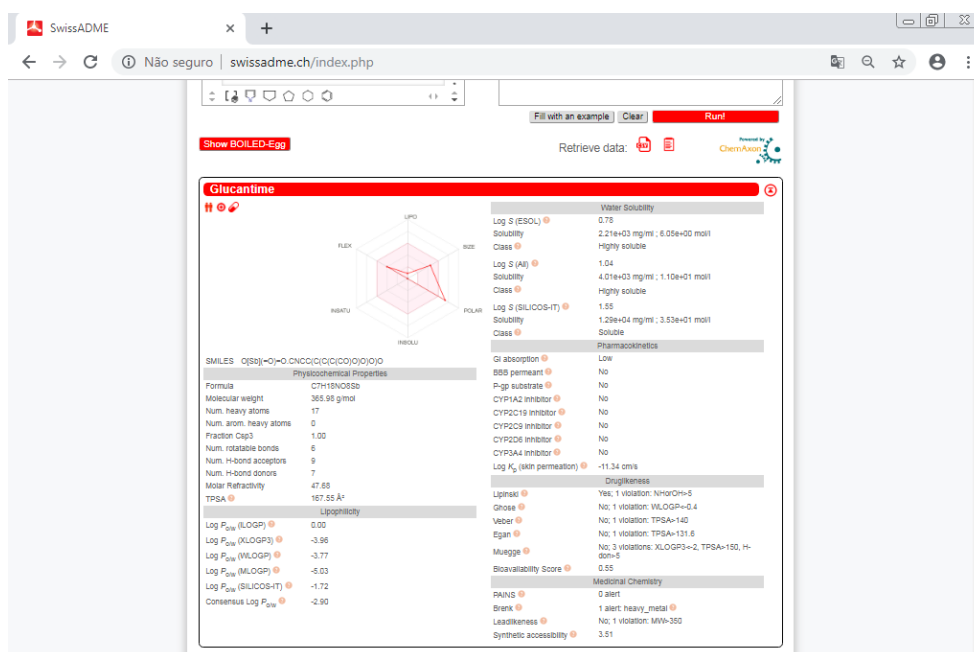
Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

É possível desenhar a estrutura molecular utilizando o Marvin JS da ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), que também permite ao usuário importar (de um arquivo ou banco de dados externo) e editar uma estrutura química 2D e transferi-lo para uma lista de moléculas. Esta lista fica localizada ao lado direito da página de

envio, e é a entrada real para o cálculo. Nesta lista pode conter mais de uma molécula a ser analisada. Ele pode ser editado como um texto padrão, permitindo digitar ou colar SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), que é uma forma de representar estruturas químicas usando caracteres ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*), um código binário (cadeias de bits: 0s e 1s) que codifica um conjunto de 128 sinais: 95 sinais gráficos (letras do alfabeto latino, sinais de pontuação e sinais matemáticos) e 33 sinais de controle, utilizando portanto apenas 7 bits para representar todos os seus símbolos (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Os resultados são gerados na mesma página da Web, sendo um painel compilando todos os valores para cada molécula. Este painel por molécula (Figura 10) é encabeçado pelo nome da molécula e dividido em seções diferentes, que contém os dados de radar de biodisponibilidade, propriedades físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade em água, farmacocinética, similaridade às drogas e química medicinal (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

**Figura 10 – Painel da molécula contendo diferentes parâmetros analisados.**

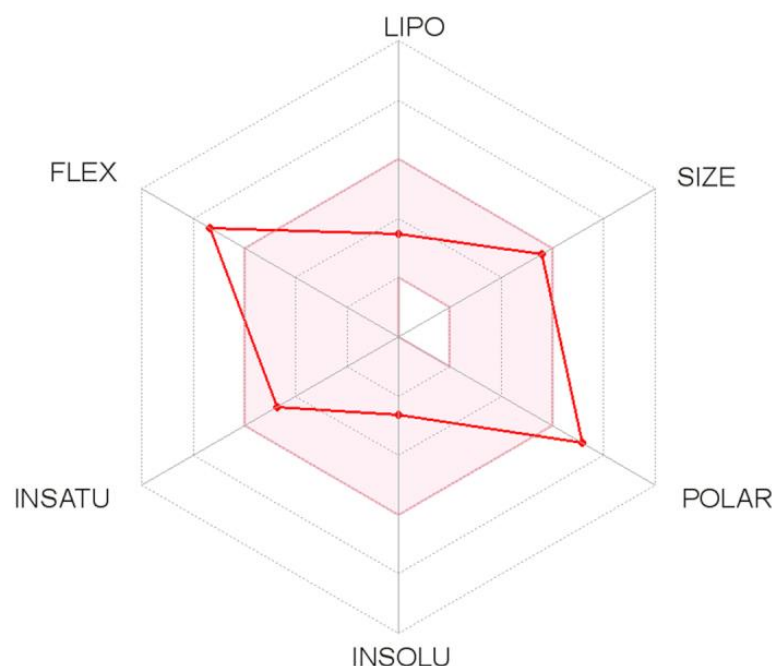


Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

O radar de biodisponibilidade (Figura 11) considera seis propriedades físico-químicas: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Uma faixa físico-química em cada eixo foi definida por descritores adaptados de Ritchie et al. (2011) e Lovering et al. (2009). Esta faixa é representada como uma área rosa na qual o gráfico de radar da molécula deve cair inteiramente

para ser considerado semelhante a uma droga. Na tabela abaixo (Tabela 1) está descrita a faixa ideal para cada propriedade. Para fins de ilustração, o composto analisado na figura 11 é previsto como não biodisponível oralmente, porque muito flexível e muito polar.

**Figura 11 – Radar de biodisponibilidade.**



Fonte: Daina, Michielin e Zoete, 2017

**Tabela 1 – Faixa ideal das propriedades físico-químicas analisadas no radar de biodisponibilidade.**

| Propriedade físico-química | Faixa ideal                                              |
|----------------------------|----------------------------------------------------------|
| Lipofilicidade             | XLOGP3 entre -0,7 e +5,0                                 |
| Tamanho                    | Entre 150 e 500 g / mol                                  |
| Polaridade                 | Entre 20 e 130 Å                                         |
| Solubilidade:              | log S não superior a 6                                   |
| Saturação                  | Fração de carbonos na hibridação sp3 não inferior a 0,25 |
| Flexibilidade              | Não mais que 9                                           |

Fonte: Daina, Michielin e Zoete, 2017

Na seção das propriedades físico-químicas são disponibilizadas diversas informações, como peso molecular (PM), refratividade molecular (RM), contagem de tipos específicos de átomos e área de superfície polar (PSA). Os valores são calculados com o OpenBabel versão 2.3.0, um conjunto de ferramentas químicas de código aberto que fala as muitas linguagens dos dados químicos (O'BOYLE et al.,

2011). O PSA é calculado pela técnica fragmentária denominada área de superfície polar topológica (TPSA), considerando o enxofre e o fósforo como átomos polares (ERTL et al., 2000). Este descritor se mostrou muito útil em muitos modelos e regras para estimar rapidamente algumas propriedades da ADME, especialmente no que diz respeito ao cruzamento de barreiras biológicas, como absorção e acesso cerebral (DAINA e ZOETE, 2016).

O papel da lipofilicidade na descoberta e design de medicamentos é crítico. A lipofilicidade é uma propriedade físico-química essencial que desempenha um papel crucial na determinação das propriedades ADME e na adequação geral dos candidatos a medicamentos. No Web SwissADME há uma seção dedicada a esta propriedade físico-química, dada sua importância crítica. O coeficiente de partição entre o *n*-octanol e a água ( $\log P_{o/w}$ ) é o descritor clássico de lipofilicidade. O SwissADME dá acesso a cinco modelos preditivos disponíveis (XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT e iLOGP). O log de consenso  $P_{o/w}$  é a média aritmética dos valores previstos pelos cinco métodos propostos, e também está disponível medicinal (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Ter uma molécula solúvel facilita as atividades de desenvolvimento de drogas, principalmente no que diz respeito ao manuseio e formulação (RITCHIE et al., 2013). Além disso, para projetos de descoberta direcionados à administração oral, a solubilidade é uma das principais propriedades que influenciam a absorção (OTTAVIANI et al., 2010). Além disso, um medicamento destinado ao uso parenteral deve ser altamente solúvel em água para fornecer uma quantidade suficiente de princípio ativo no pequeno volume dessa dose farmacêutica (SAVJANI et al., 2012). A análise de solubilidade é um dos recursos oferecidos pelo SwissADME, no qual são utilizados dois métodos topológicos para prever a solubilidade em água, ESOL (DELANEY, 2004) e outro adaptado de Ali et al. (2012). Ambos diferem da equação de solubilidade geral seminal (YALKOWSKY e VALVANI, 1980) pois evitam o parâmetro do ponto de fusão; sendo este último difícil de prever. O terceiro preditor de solubilidade do SwissADME foi desenvolvido pela SILICOS-IT. Todos os valores previstos são o logaritmo decimal da solubilidade molar na água ( $\log S$ ). (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Na seção de farmacocinética é possível realizar a predição da absorção intestinal humana (AIH) e da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), através da leitura do modelo BOILED-Egg (Figura 12) (DAINA e ZOETE, 2016), um

modelo intuitivo de classificação gráfica, que pode ser obtido na página de resultados SwissADME. Embora conceitualmente muito simples, pois conta apenas com dois descritores físico-químicos (WLOGP e TPSA, para lipofilicidade e polaridade aparente), esse modelo possui significância e robustez estatística. O gráfico de classificação em forma de ovo inclui a gema (ou seja, o espaço físico-químico altamente provável para permeação BHE) e o branco (ou seja, o espaço físico-químico altamente provável para AIH).

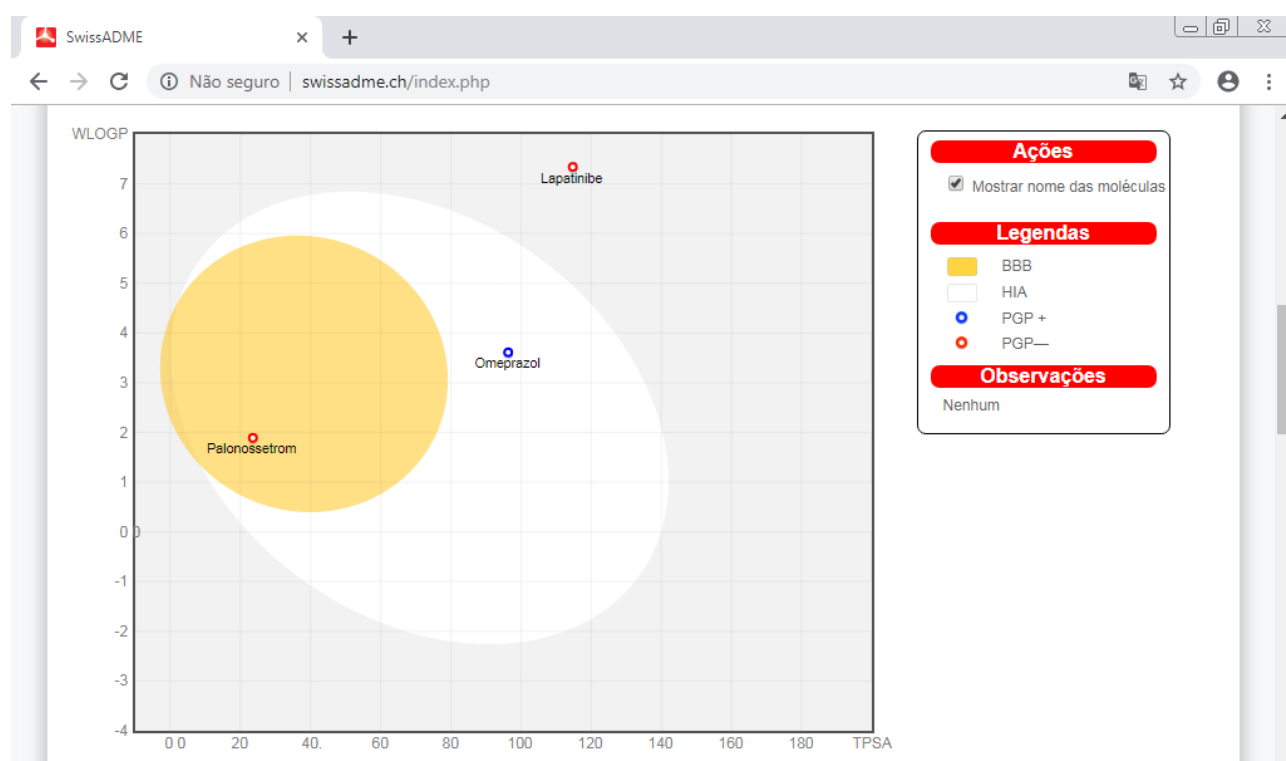
Outro conceito importante é o conhecimento sobre os compostos serem ou não substrato da Glicoproteína P (P-gP). A P-gp é um produto do gene de multirresistência à fármacos (MDR1) que age como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para a parte externa das células do fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal, das células tumorais e das células das barreiras hemato-teciduals. Ela está envolvida no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos, como os agentes quimioterápicos, glicosídeos cardíacos, inibidor da protease HIV-1 e ciclosporina (AZEREDO, UCHÔA e COSTA, 2009).

Para fins de ilustração, o resultado demonstrado na figura 12 prevê que o lapatinib não seja absorvido e não penetre no cérebro (fora do ovo), o omeprazol é bem absorvido, mas não acessa o cérebro (em branco) e PGP + (ponto azul) e o palonossetrom é predito como penetrante no cérebro (na gema) e não está sujeito a efluxo ativo (ponto vermelho).

Outro conhecimento essencial que é fornecido pelo SwissADME é sobre a interação de moléculas com os citocromos P450 (CYP). Essa superfamília de isoenzimas é um participante fundamental na eliminação de medicamentos por biotransformação metabólica (WOLF, SMITH e SMITH, 2000). Van Waterschoot e Schinkel (2011) sugeriram que o CYP e a P-gp podem processar pequenas moléculas sinergicamente para melhorar a proteção de tecidos e organismos. Pode-se estimar que 50 a 90% das moléculas terapêuticas são substrato das cinco principais isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) (WOLF, SMITH e SMITH, 2000; DI, 2014). A inibição dessas isoenzimas é certamente uma das principais causas de interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética (HOLLENBERG, 2002; HUANG et al., 2008) levando a efeitos adversos tóxicos ou outros efeitos indesejados devido à menor depuração e acúmulo do medicamento ou de seus metabólitos (KIRCHMAIR et al., 2015). Numerosos inibidores das isoformas do CYP foram

identificados. Alguns estão afetando diferentes isoformas do CYP, enquanto outros compostos mostram seletividade para isoenzimas específicas (VEITH et al., 2009). Portanto, é de grande importância para a descoberta de medicamentos prever a propensão com a qual a molécula causará interações medicamentosas significativas por meio da inibição dos CYPs e determinar quais isoformas são afetadas (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

**Figura 12 – Gráfico BOILED-Egg.**



Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

Outro parâmetro avaliado é a permeabilidade a pele. Um modelo é uma regressão linear múltipla, que visa prever o coeficiente de permeabilidade da pele ( $K_p$ ). Ele é adaptado de Potts e Guy (1992), que encontraram  $K_p$  linearmente correlacionada com o tamanho molecular e da lipofilicidade ( $R^2 = 0,67$ ). Quanto mais negativo o  $\log K_p$  (com  $K_p$  em cm/s), menos permeável a pele é a molécula (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Na seção de "semelhança ao medicamento" avalia-se qualitativamente a chance de uma molécula se tornar um medicamento oral em relação à biodisponibilidade. A semelhança de drogas foi estabelecida a partir de inspeções estruturais ou físico-químicas de compostos de desenvolvimento avançados o suficiente para serem considerados candidatos a drogas orais. Essa noção é

rotineiramente empregada para realizar a filtragem de bibliotecas químicas para excluir moléculas com propriedades provavelmente incompatíveis com um perfil farmacocinético aceitável. Esta seção SwissADME fornece acesso a cinco filtros baseados em regras diferentes, com diversas faixas de propriedades dentro das quais a molécula é definida como semelhante a uma droga. Esses filtros geralmente são originários de análises de grandes empresas farmacêuticas com o objetivo de melhorar a qualidade de suas coleções de produtos químicos proprietários (LIPINSKI et al., 2001). Estão disponíveis os métodos de Lipinski (Pfizer), Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia) e Muegge (Bayer). Várias estimativas permitem visualizações de consenso ou seleção de métodos que melhor atendem às necessidades específicas do usuário final em termos de espaço químico ou demandas relacionadas ao projeto. Qualquer violação de qualquer regra descrita aqui aparece explicitamente no painel de saída (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Na última seção são avaliados os parâmetros de química medicinal. Dois métodos complementares de reconhecimento de padrões permitem a identificação de fragmentos potencialmente problemáticos. PAINS (para compostos de interferência de ensaio de pan, também conhecidos como rebatedores frequentes ou compostos promíscuos) são moléculas contendo subestruturas que mostram resposta potente em ensaios, independentemente do alvo da proteína. O SwissADME retorna avisos se tais porções forem encontradas na molécula em avaliação. O *Structural Alert* consiste em uma lista de 105 fragmentos identificados por Brenk et al (2008) por serem potencialmente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou possuírem propriedades responsáveis por fraca farmacocinética. No SwissADME, é possível ter uma descrição química dos fragmentos problemáticos encontrados em uma dada molécula voando sobre o ícone "ponto de interrogação" que aparece após a lista de fragmentos. Isso é implementado para os filtros PAINS e Brenk (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Também é possível avaliar se a molécula é "sem chumbo". Esse conceito é semelhante à semelhança ao medicamento, mas com foco nos limites físico-químicos que definem uma boa liderança, ou seja, uma entidade molecular adequada para otimização. Por definição, os eletrodos são submetidos a modificações químicas que provavelmente aumentarão o tamanho e a lipofilicidade (HANN e KESERŰ, 2012). Como consequência, é necessário que os eletrodos sejam menores e menos hidrofóbicos que as moléculas semelhantes a medicamentos. Como é crucial para um

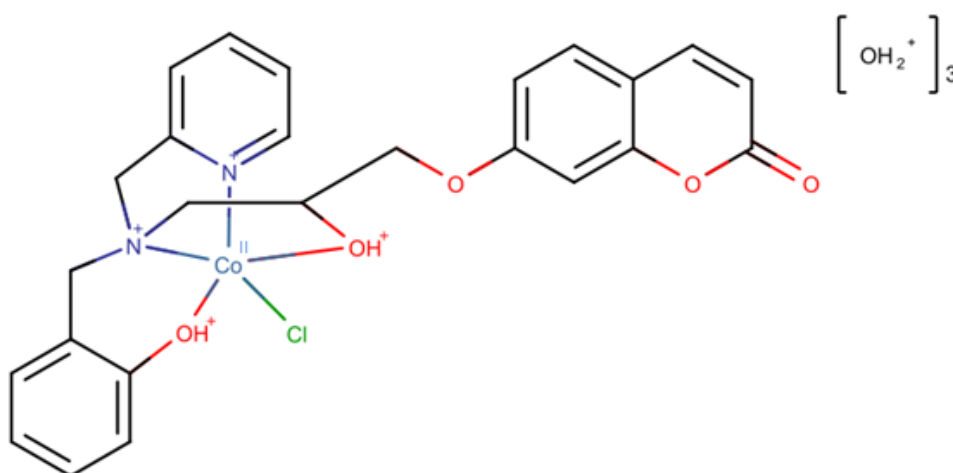
químico julgar se uma dada molécula é adequada para iniciar a otimização do chumbo, além dos filtros estruturais, implementamos um método baseado em regras para a ausência de chumbo, que foi adaptado de (TEAGUE et al., 1999). A acessibilidade sintética (SA) é um fator importante a ser considerado nesse processo de seleção. Obviamente, para um número razoável de moléculas, os químicos medicinais são os mais capazes de determinar a SA. No entanto, quando muitas estruturas moleculares impedem uma avaliação especializada, a estimativa *in silico* pode ser usada para pré-filtragem (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Outra ferramenta que também realiza a análise de ADME é o pkCSM. Esta ferramenta é baseada no conceito de *Cutoff Scanning* para representar a estrutura e a química de moléculas pequenas (expressas como farmacóforos atômicos - marcadores de nós) para representar e prever suas propriedades farmacocinéticas e de toxicidade, construindo 30 preditores divididos em cinco classes principais: absorção (sete preditores), distribuição (quatro preditores), metabolismo (sete preditores), excreção (dois preditores) e toxicidade (10 preditores) (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Neste trabalho abordaremos apenas os preditores de absorção e toxicidade.

### 3. JUSTIFICATIVA

Diante da severidade da leishmaniose, doença cuja terapia atual apresenta diversos efeitos colaterais adversos e pode induzir resistência, este trabalho justifica-se pela busca de uma nova alternativa para quimioterapia para leishmaniose, com o intuito de trazer algo mais eficaz, menos tóxico e que não gere resistência. Nesta abordagem, apresentamos a avaliação de um metalocomplexo, composto por um núcleo metálico de  $\text{Co}^{2+}$ , ligado a um ligante orgânico denominado HBPA. Sua estrutura química está ilustrada abaixo (Figura 13). Diversos autores previamente citados neste projeto já demonstraram que compostos coordenados a metais de transição apresentam efeito antiparasitário, inclusive contra *Leishmania*.

Figura 13 – Estrutura química do metalocomplexo.



Fonte: Autor

Vale destacar que esta pesquisa apresenta uma abordagem translacional, onde o intuito é a transferência da pesquisa científica à um conhecimento aplicado e útil a sociedade. Utilizamos uma ferramenta preditiva *in silico*, para avaliação dos parâmetros físico-químicos do composto, além da análise de toxicidade, com o intuito de otimizar o processo de translação, já que o processo de desenvolvimento de um medicamento é um procedimento longo e dispendioso.

Além da análise preditiva, este trabalho também se justifica pela pesquisa de básica dos efeitos citotóxicos do composto em células de mamíferos, macrófagos e

fibroblastos, e no parasita *L. amazonensis*. A escolha das células utilizadas acompanhou o processo de curso da doença, visto que a *Leishmania* possui mecanismos que permitem que esta sobreviva e se multiplique no interior de macrófagos e fibroblastos. Além disso, *L. amazonensis* é o agente etiológico responsável por uma das variantes mais raras da LC, a LCD, que representa uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar, face à imunossupressão celular específica induzida pelo parasita, a qual dificulta o controle da infecção e resulta no caráter evolutivo crônico da LCD, de difícil tratamento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo realizar uma análise dos parâmetros físico-químicos *in silico* do composto Co7HCHBPA, um metalocomplexo com um núcleo de Cobalto (Co) coordenado a um ligante orgânico de HBPA ((2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina) comparando-o com os medicamentos já utilizados no tratamento da leishmaniose, bem como avaliar o efeito leishmanicida, contra a forma extracelular (promastigota) de *L. amazonensis* e seu efeito citotóxico em macrófagos (J774A.1) *in vitro*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Analisar os parâmetros de farmacocinéticos ADME, toxicidade e absorção do metalocomplexo em comparação aos medicamentos de primeira e segunda linha utilizados na quimioterapia de leishmaniose utilizando ferramentas *in silico*;
- Avaliar o efeito antiproliferativo do metalocomplexo sobre forma promastigota de *L. amazonensis*;
- Investigar o efeito citotóxico do metalocomplexo em macrófagos (J774A.1) *in vitro*;
- Verificar as alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo metalocomplexo em promastigotas de *L. amazonensis*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Parâmetros de análise *in silico*

Neste estudo avaliamos um metalocomplexo com núcleo de Cobalto e um ligante orgânico HBPA em comparação aos medicamentos de primeira (Glucantime) e segunda (Anfotericina-B) linha utilizados na atual quimioterapia de leishmaniose. Inicialmente, gerou-se o código SMILES para o metalocomplexo utilizando o editor químico gratuito Marvin Sketch (ChemAxion), uma especificação necessária para obter propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) em servidores web (redes). O código SMILES do Glucantime e da Anfotericina-B foram obtidos do PubChem, um banco de dados de química aberto do *National Institutes of Health* (NIH). As propriedades ADMET foram calculadas utilizando dois serviços de diferentes redes: o servidor SwissADME (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017), para avaliação preditiva das propriedades físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade em água, farmacocinética, similaridade a drogas e química medicinal e o servidor pkCSM (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015), para toxicidade e absorção.

### 5.2. Cultivo de células e manutenção dos parasitas

#### 5.2.1. Obtenção de formas promastigotas a partir de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* a partir de lesões em camundongos Balb/C

A cepa WHOM/BR/75/Josefa de *L. amazonensis* proveniente do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF/ Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ) foi cultivada e mantida como descrito em Godinho *et al.* (2012). As formas promastigotas infectivas foram cultivadas em meio Warren, (BHI - *Brain Heart Infusion* - Sigma®) acrescido de 20 µg/L hemina - Sigma® e 10 µg/mL ácido fólico - Sigma®, no período de 5 a 7 dias, foram lavadas com PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline* - 0,01M / pH 7.2) estéril, centrifugadas

e ressuspensas em 500 µL do mesmo tampão. Foram feitas contagens das células em câmara de Neubauer para determinação do inóculo inicial ( $10^7$  células/mL) para infecção dos animais. Camundongos BALB/c foram inoculados com 100 µL da suspensão contendo promastigotas metacíclicos infectivos, utilizando seringa descartável de 1 mL e agulha para injeção subcutânea estéril, com bixel voltado para cima, na base da cauda do animal para a produção das lesões. As lesões começaram a aparecer a partir do 15º dia. Para isolar as lesões, os animais foram primeiramente sacrificados (câmara de CO<sub>2</sub>) de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética para o uso de animais em pesquisa (PAIXÃO, 2008), com protocolos de números IBCCF 096 e 097, 30 dias após a infecção. As lesões foram retiradas com auxílio de um bisturi estéril e maceradas em Potter estéril (pelo menos 50 “*strokes*”) com PBS, resultando no rompimento dos macrófagos e consequente liberação das formas amastigotas, que foi monitorada através de microscopia óptica de contraste de fase. Após o rompimento, o homogeneizado total foi centrifugado a 211g por 10 min com as amastigotas permanecendo no sobrenadante. O *pellet* foi ressuspenso em PBS suplementado com glicose (Sigma®) e EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - Sigma®) e centrifugado novamente a 211g por 10 min. O segundo sobrenadante foi misturado ao primeiro e centrifugado a 1900g por 15 minutos, onde no *pellet* ficaram concentradas as amastigotas parcialmente purificadas. As formas amastigotas foram então colocadas para diferenciação em promastigotas em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab®) inativado por calor, a 25°C ± 1°C.

#### 5.2.2. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram obtidas a partir da diferenciação de amastigotas isoladas de lesão de camundongos Balb/C e cultivadas em meio Warren em inóculo de 5% de volume acrescido de 10% de SFB em garrafas para culturas estéreis e mantidas a uma temperatura de 25°C ± 1°C. As amostras foram mantidas através de passagens semanais até um total de seis passagens, garantindo que os parasitas utilizados nos experimentos permanecessem infectivos.

### 5.2.3. Cultivo e manutenção das células-hospedeiras

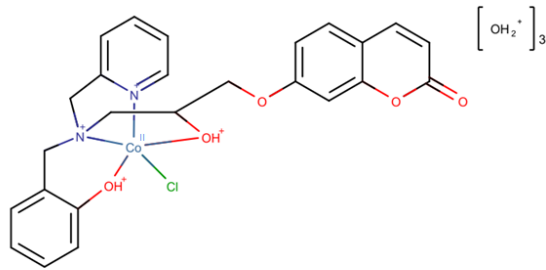
Macrófagos de camundongos (*Mus musculus*), J774A.1 (ATCC<sup>®</sup> TIB-67<sup>™</sup>), com inóculo inicial de  $5 \times 10^3$ , foram mantidas em garrafas plásticas de 75cm<sup>3</sup>, contendo RPMI-1640 Medium (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) suplementado com 10% de SFB (Gibco-Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) e antimicrobianos, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (130U/mL). A cada 48 h ou após a formação de monocamadas confluentes, as culturas foram tratadas com solução tripsina/EDTA por 2 minutos para obtenção de subculturas dessas células. No dia anterior aos experimentos de IC<sub>50</sub> e citotoxicidade,  $1 \times 10^4$  eram plaqueadas em placas de 96 poços (Costar 3606).

## 5.3. Metalocomplexo

### 5.3.1. Descrição do metalocomplexo

O composto testado foi um metalocomplexo denominado Co7HCHBPA, que apresenta um núcleo de cobalto e um ligante orgânico HBPA. Este composto foi sintetizado e gentilmente cedido pelo professor Dr. Adolfo Horn Jr. e colaboradores do Laboratório de Ciências Químicas, localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. As informações sobre o composto estão resumidas no quadro (Quadro 3) abaixo.

**Quadro 3 – Características do metalocomplexo**

| Nome do composto | Estrutura                                                                          | Ligante orgânico | Metal   |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|
| Co7HCHBPA        |  | HBPA             | Cobalto |

Fonte: Autor

### 5.3.2. Solução estoque

Para estudos *in vitro*, o composto foi diluído em DMSO (Dimetil sulfoxido - Merck®) na concentração estoque de 50 mM e adicionado diretamente ao meio de cultura. A concentração final de DMSO no meio nunca excedeu 0.01% (v/v). O composto foi estocado a -22°C.

### 5.4. Estudo *in vitro* do efeito antiproliferativo da forma promastigota de *L. amazonensis*

As culturas das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram iniciadas a partir de um inóculo de  $1,0 \times 10^6$  células/ml, sendo cultivadas em meio Warren suplementado com 10% de SFB (VitroCell®). Após 24 h de crescimento, para que os parasitas se adaptassem ao meio de cultura (fase lag), o metalocomplexo foi adicionado nas concentrações (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0  $\mu$ M). Foi mantido um grupo controle, onde a droga não foi adicionada. Os parasitas foram cultivados na presença do metalocomplexo por até 72 h de tratamento, onde alíquotas foram retiradas a cada 24 h para contagem em câmara de Neubauer, após diluições (1:10 e 1:100) em solução de formalina a 3,4-3,6% formaldeído em PBS usando um microscópio óptico de contraste de fase.

### 5.5. Determinação da IC<sub>50</sub>

A determinação da IC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento) foi obtida a partir dos valores resultantes das curvas de crescimento, onde foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 µM em *L. amazonensis*. O valor de IC<sub>50</sub> foi determinado a partir da seguinte fórmula (MARTIN *et al.*, 2001):

$$I = I_{\max} C / IC_{50} + C, \text{ onde:}$$

I = percentual de inibição (%);

I<sub>max</sub> = 100% de inibição;

C = concentração do inibidor;

IC<sub>50</sub> = concentração para inibir 50% do crescimento.

### 5.6. Análise da citotoxicidade em macrófagos J774A.1 *in vitro*

O limiar de citotoxicidade do metalocomplexo foi avaliado sobre culturas de células de J774A.1 com concentrações crescentes do metalocomplexo, seguido pela análise da viabilidade por Hoescht 33342 (*Trihydrochloride, Trihydrate*, 100 mg – ThermoFisher). Além de ensaios por MTT (Teste de citotoxicidade pelo método direto). Os controles foram realizados pela adição do veículo de cada droga, no caso DMSO. Para avaliar o efeito dos compostos na viabilidade das células J774A.1, as mesmas foram plaqueadas em placas de 96 poços (Costar 3606) incubadas a 37°C ± 1°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, na concentração de 5x10<sup>3</sup> células por poço, com concentrações crescentes de cada composto (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 µM). As culturas, então, foram cultivadas na presença do marcador nuclear Hoeschst33342, na concentração de 1µL por 5mL em meio RPMI 1640 Media (Sigma-Aldrich) e 5% de SFB.

Para determinar o IC<sub>50</sub>, as células foram cultivadas na presença do metalocomplexo por 24h, 48h e 72h. Imagens foram adquiridas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h de cultivo nas condições controle e tratados utilizando o sistema de imagens IN Cell Analyzer 2000. Foram escolhidos nove diferentes campos dentro de cada poço para aquisição das imagens de fluorescência, usando o filtro DAPI (região espectral entre 410 - 480 nm), com objetiva de 10x. A contagem do número de núcleos

marcados foi realizado através do software *In Cell Invastigation* (GE HealthCare Life Sciences). Para o acompanhamento da curva de crescimento, a quantidade de núcleos contados no tempo 0 h (controles não tratados) foi normalizado para 100% e os núcleos contados nos tempos posteriores foram convertidos em percentual de proliferação com relação ao ponto 0 h.

No ensaio de MTT (ensaio de redução do sal tetrazólio em Formazan) as células viáveis realizam a redução do sal em formazan. Neste caso, os poços onde essa reação ocorreu a coloração do poço se torna azul/púrpura (formazan), logo a quantidade de formazan nesse meio é proporcional ao número de células viáveis. Para que a mesma avaliação fosse feita através do método colorimétrico MTT, células hospedeiras J774A.1, na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço, foram plaqueadas em placas de 96 poços transparentes (Costar 3606) incubadas a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , e após 24 h foram tratadas nas concentrações crescentes do composto (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0, 40,0, 80,0, 100,00 e 120,00  $\mu\text{M}$ ). Após 48h, foi adicionada a solução MTT (5mg/mL em PBS) em todos os poços, mesmo aqueles que não possuíam células. Durante 4 h as células foram incubadas a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, foi adicionado 150 $\mu\text{L}$  por poço de solvente MTT (1:1 de DMSO em isopropanol), a placa coberta com papel alumínio foi levada para o agitador orbital por 15 minutos. A leitura foi realizada na absorbância de 590nm com filtro de referência de  $\lambda = 620 \text{ nm}$ , espectrofotômetro TECAM (Infinite® 200 PRO series).

### **5.7. Determinação da taxa de crescimento e tempo de duplicação da população de *L. amazonensis* e macrófagos**

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação da população de *L. amazonensis* e macrófagos J774A.1 foram estimados de acordo com SHERLEY et al., 1995. Em resumo, foi utilizada a fórmula a seguir para o cálculo da taxa de crescimento:

$$N_t = N_0 2^{ft}, \text{ onde:}$$

$N_t$  = número total de células;

$N_0$  = número inicial de células;

f = taxa de crescimento;

t = tempo de cultivo.

A partir dos valores da taxa de crescimento, o tempo de duplicação da população foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$TDDP = \frac{\ln(2)}{f}, \text{ onde:}$$

TDDP = tempo de duplicação da população;

f = taxa de crescimento.

## 5.8. Avaliação Morfológica e Ultraestrutural

### 5.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os parasitas tratados com o metalocomplexo (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) e não tratados com o composto, por 36h, foram lavados com meio Warren sem soro. Posteriormente foram coletados por centrifugação e fixados em solução contendo 2.5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, por cerca de por 1h a TA. Após serem fixadas, as células foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, e então, colocadas para aderir por 20 min a TA em lamínulas previamente revestidas com 0,1% de poli-L-lisina. Após este período, as lamínulas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, para retirada das células não aderentes. Em seguida, os parasitas foram pós-fixados por 40 minutos ao abrigo de luz com uma solução contendo tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, por 1h a TA. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, e em seguida as células foram desidratadas em uma bateria de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), por 10 min cada. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (Balzers), e posteriormente montadas em suportes metálicos apropriados para MEV (*stubs*). Em seguida foram revestidas com ouro (20–30 nm), utilizando o equipamento metalizador (Balzers). As amostras então foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol 6490 LV, utilizando 30 kv de aceleração da voltagem.

### 5.8.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliação da ultraestrutura dos promastigotas de *L. amazonensis* na presença do metalocomplexo, os parasitas foram mantidos na presença (10  $\mu$ M) e ausência do composto por 24 e 48h, e em seguida foram lavados com meio sem soro. Para o processamento das amostras, foi realizada a fixação em solução de 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, por cerca de 1h a TA. Em seguida os parasitas foram lavados com PBS duas vezes e centrifugados a 895 x g por 10 min. Em seguida, os parasitas foram pós-fixados por 40 minutos ao abrigo de luz com uma solução contendo OsO<sub>4</sub> 1% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, por 1h a TA, desidratadas em série gradual de acetona (30, 50, 70, 90, 100%), por 10 min cada, e embebidas em resina PolyBed 812. Com o auxílio do ultramicrotomo (Leica), foram obtidos cortes ultrafinos de 70 nm, que posteriormente foram corados com solução aquosa de acetato de uranila 5%, por 45 minutos (WATSON, 1958), e citrato de chumbo, por 5 minutos (REYNOLDS, 1963). As grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss®900, utilizando aceleração da voltagem de 30 kv.

### 5.8.3. Microscopia confocal a laser

Para avaliação a indução da morte do parasita por autofagia, as culturas das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas nas concentrações de 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. O controle utilizado foi a cultura sem tratamento. Estes valores de concentração foram estipulados de acordo com os resultados dos ensaios de curva de crescimento e avaliação dos efeitos antiproliferativo. Para tais experimentos, os parasitas foram primeiramente fixados em tampão PHEM (60mM de Pipes, 20mM de Hepes, 10mM EGTA, e 5mM de cloreto de magnésio – Sigma® pH 7.2) contendo 4% (v/v) de paraformaldeído (Merck®), por 30 min a temperatura ambiente (TA  $\cong$  23-25°C). Em seguida, os parasitas foram aderidos por 20 min a TA em lamínulas previamente revestidas com 0,1% de poli-L-lisina. Após as lamínulas foram lavadas em PBS, permeabilizadas em PHEM contendo 0,3% de Triton X-100 (Sigma®) por 5 min, e incubadas com 50 mM de Cloreto de Amônio (NH<sub>4</sub>Cl) por 30 minutos, em seguida com Soro Albumina Bovina (BSA) 3% em tampão PHEM por 30 minutos a TA. Após a incubação com os bloqueios (PHEM-BSA), as lamínulas foram incubadas

com anticorpo policlonal de coelho LC3B (diluição 1:1000) por 1h a TA. Posteriormente, foi realizada incubação com anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com Alexa-546 (diluição 1:100) (Molecular Probes) por 1 h a TA. Após marcação, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas com o reagente “ProLong® Gold antifade” (Invitrogen) com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) e observadas ao Microscópio de varredura confocal a laser (LSM-710, Zeiss).

### **5.9. Análise estatística**

Os dados dos ensaios foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA, seguido do teste Tukey, usando o software Graphpad Prism 5. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Parâmetros de análise *in silico* do composto Co7HCHBPA, Glucantime e Anfotericina B

Nesta seção são compilados descritores moleculares e físico-químicos (Tabela 2). Os valores são calculados com o OpenBabel, versão 2.3.0 (O'BOYLE et al., 2011). O PSA é calculado pela técnica fragmentária denominada área de superfície polar topológica (TPSA), considerando o enxofre e o fósforo como átomos polares (ERTL et al., 2000).

**Tabela 2 – Descritores moleculares e propriedades físico-químicas do metalocomplexo Co7HCHBPA, Glucantime e AnfotericinaB.**

| Propriedades físico-químicas                      | Co7HCHBPA             | Glucantime            | Anfotericina B        |
|---------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Fórmula</b>                                    | C25H30ClCoN2O8        | C7H18NO8Sb            | C47H73NO17            |
| <b>Peso molecular</b>                             | 580,90 g / mol        | 365,98 g / mol        | 924,08 g / mol        |
| <b>Número de átomos pesados</b>                   | 37                    | 17                    | 65                    |
| <b>Número de aromáticos átomos pesados</b>        | 22                    | 0 0                   | 0 0                   |
| <b>Fração Csp3</b>                                | 0,20                  | 1,00                  | 0,66                  |
| <b>Número de ligações rotacionáveis</b>           | 3                     | 6                     | 3                     |
| <b>Número de aceptores de ligação H</b>           | 8                     | 9                     | 18                    |
| <b>Número de doadores de ligação H</b>            | 5                     | 7                     | 12                    |
| <b>Refração Molar</b>                             | 139,90                | 47,68                 | 239,06                |
| <b>Área da superfície polar topológica (TPSA)</b> | 111,47 Å <sup>2</sup> | 167,55 Å <sup>2</sup> | 319,61 Å <sup>2</sup> |

Fonte: Autor

Lipinski et al. (2001), após análise do *World Drug Index*, propuseram a chamada Regra dos Cinco, um conjunto de regras que traduziam características estruturais comuns dos fármacos oralmente ativos deste banco de dados. Segundo a regra, um fármaco deve apresentar: peso molecular  $< 500$  Da; presença de número  $\leq 5$  grupos doadores de ligação de hidrogênio; presença de número  $\leq 10$  grupos aceptores de ligação de hidrogênio; Log P calculado  $\leq 5$ . Os resultados das moléculas analisadas em nosso estudo estão dispostos nos diagramas abaixo (Figura 14), sendo dispostos os valores segundo a regra de Lipinski.

**Figura 14 – Classificação dos compostos analisados, segundo a regra de Lipinski.**



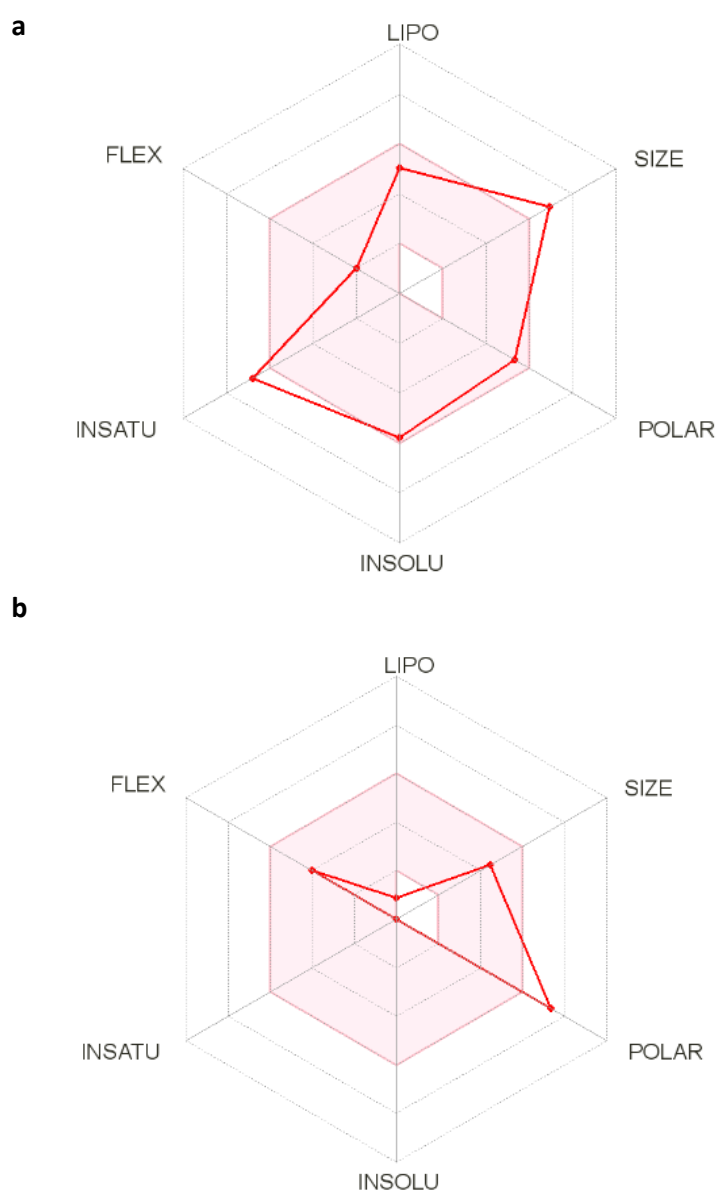
Fonte: Autor

A lipofilicidade é uma propriedade físico-química essencial que desempenha um papel crucial na determinação das propriedades ADME e na adequação geral dos candidatos a medicamentos. Os valores do log de consenso  $P_{ow}$  de Co7HCHBPA, Glucantime e Anfotericina B, que é a média aritmética dos valores previstos pelos cinco métodos propostos, foram, respectivamente: 0,29; -2,90; -0,39.

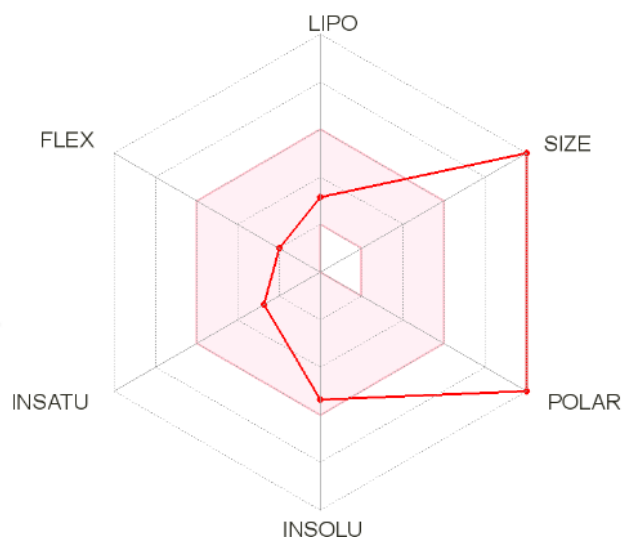
A solubilidade de uma molécula é fundamental no desenvolvimento de drogas, principalmente no que diz respeito ao manuseio e formulação. Nesta análise, os compostos avaliados foram ranqueados de acordo com o seu grau de solubilidade, considerando a escala ESOL (DELANEY, 2004), onde considerando o valor de LogS, uma molécula é insolúvel  $< -10$  insatisfatório  $< -6$  moderadamente  $-4$  solúvel  $-2$  muito  $< 0$  altamente. Sendo assim, os valores de LogS de Co7HCHBPA, Glucantime e AnfotericinaB, respectivamente, são -5,78, 0,78, -5,37. Podemos observar que dentre os três, o Glucantime é um composto considerado altamente solúvel, enquanto que a Anfotericina B e o Co7HCHBPA, são moderadamente solúveis.

Ao compararmos o radar de biodisponibilidade dos três compostos analisados, o metalocômplexo Co7HCHBPA mostrou-se como uma molécula com boa disponibilidade, pois apesar dos pontos do tamanho e instauração estarem fora da área rosa, estes estão próximos desta área do radar; o Glucantime também apresentou um bom resultado, ficando fora do radar apenas em polaridade; e a Anfotericina B apresentou dois parâmetros, tamanho e polaridade, bem distantes da área rosada do radar (Figura 15).

**Figura 15 – Radar de biodisponibilidade.** (a) Metalocômplexo Co7HCHBPA; (b) Glucantime e (c) Anfotericina B.



c



Dados complementares desta seção referentes aos dados de farmacocinética, toxicidade e absorção estão dispostos no anexo I. Tais resultados foram obtidos para corroborar com futuras análises *in vivo*.

## 6.2. Estudo *in vitro* do efeito antiproliferativo

### 6.2.1. Formas promastigotas

O metalocomplexo Co7HCHBPA foi analisado quanto à sua atividade antiproliferativa contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Este teste foi realizado a partir do tratamento dos parasitas com 5 diferentes concentrações de Co7HCHBPA (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0  $\mu$ M), por 24, 48 e 72 h. Além disso, foi mantido um controle que não recebeu nenhum tratamento nos mesmos tempos de incubação, para comparação.

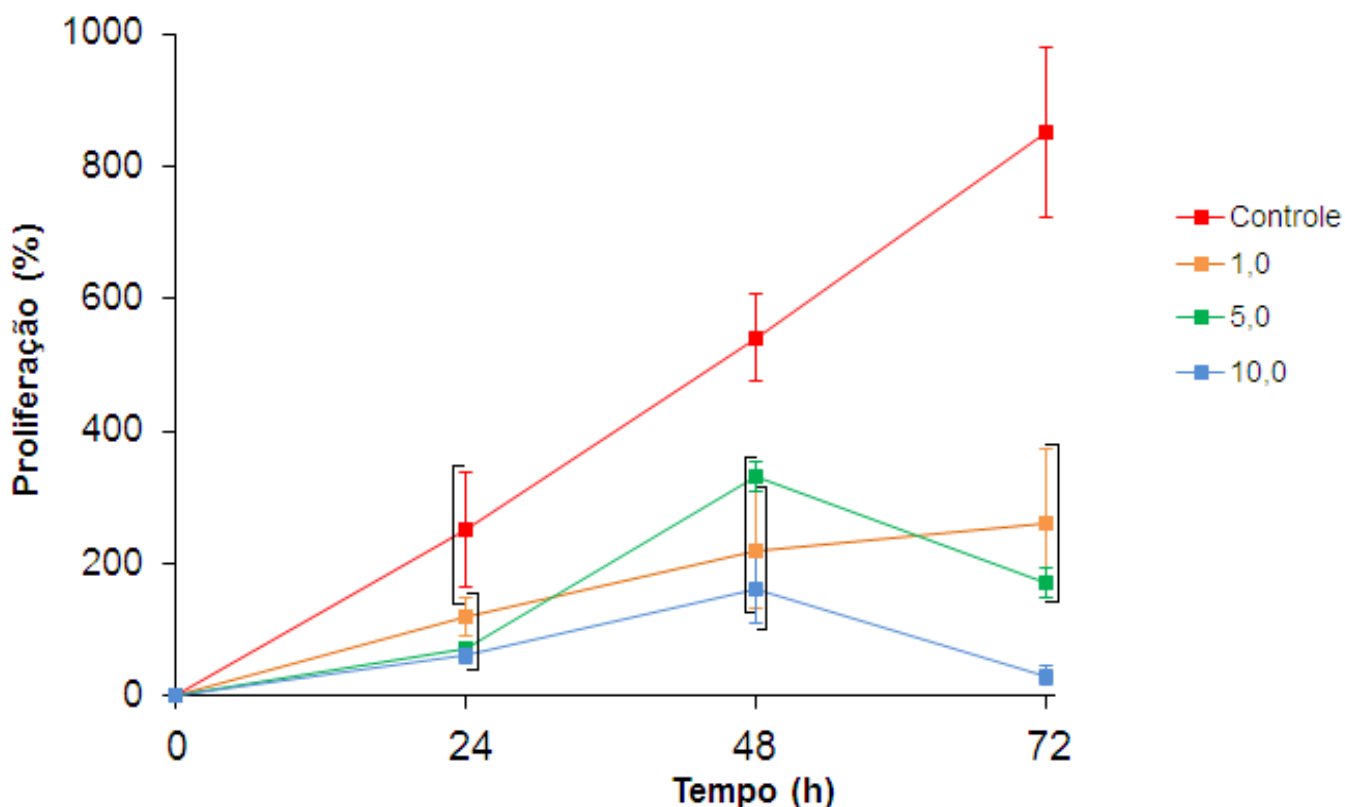
Em 24 h, ocorreu uma diminuição de mais 50% da proliferação nas culturas de *L. amazonensis* após tratamento com Co7HCHBPA em todas as concentrações, em comparação ao controle não tratado. Nenhuma das concentrações apresentou valores similares ao controle (Figura 16, Figura 17a).

O efeito antiproliferativo diminui após 48 h em quase todas as concentrações em relação ao controle, que permaneceu proliferando. Houve uma exceção na concentração de 0,5  $\mu$ M (Figura 17b), onde cultura apresentou crescimento semelhante ao controle. As culturas tratadas com a concentração de 5,0  $\mu$ M

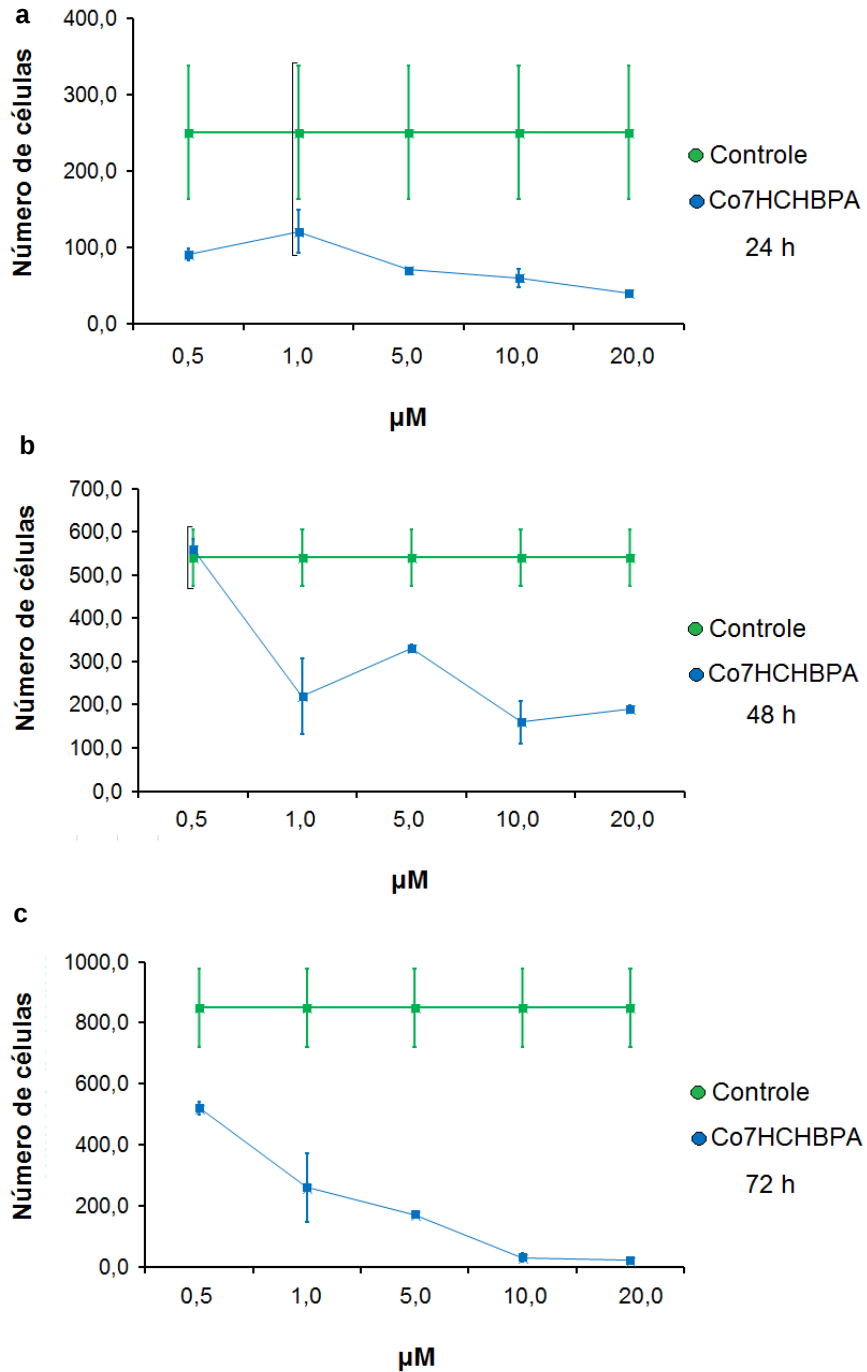
apresentaram menor inibição em relação as demais concentrações (1,0; 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$ ) (Figura 17b). Apesar do efeito antiproliferativo ter diminuído, as culturas tratadas a partir da concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  não apresentaram crescimento próximo ao controle não tratado (Figura 16, Figura 17b).

Em 72 h de tratamento, o controle permaneceu proliferando, e nas culturas tratadas com as concentrações de 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  a densidade celular chegou em níveis perto de zero. A diminuição da densidade celular ocorreu gradativamente de acordo com a concentração do composto (Figura 16, Figura 17c). Estes resultados indicam que o a droga apresenta um efeito tempo-dose dependente, visto que em 24 h ocorreu o início da diminuição da densidade celular, houve uma diminuição da inibição em 48 h, e novamente observou-se diminuição da densidade celular em 72 h. Este efeito não foi observado apenas na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , que apesar da diminuição da proliferação em relação ao controle, apresentou um crescimento linear semelhante ao controle.

**Figura 16 – Ensaio antiproliferativo na forma promastigota do parasita *L. amazonensis*.** *L. amazonensis* tratada pelo metalocomplexo Co7HCHBPA por 24, 48 e 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17 – Ensaio antiproliferativo na forma promastigota do parasita *L. amazonensis*.** (a) *L. amazonensis* tratada com Co7HCHBPA por 24 h. (b) *L. amazonensis* tratada com Co7HCHBPA por 48 h. (c) *L. amazonensis* tratada com Co7HCHBPA por 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



### 6.2.2. Determinação da IC<sub>50</sub>

Os dados IC<sub>50</sub> são mostrados na Tabelas 6. Como o IC<sub>50</sub> representa a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular, quanto menor for o valor do IC<sub>50</sub>, mais sensível é o microrganismo para este tratamento. Após o tratamento das formas promastigotas em diferentes concentrações por 96 h, o valor de IC<sub>50</sub> foi calculado. No tratamento da forma promastigota, o IC<sub>50</sub> mais tóxico foi observado em 48 h (2,6 µM), e o menos tóxico em 72 h (3,6 µM) (Tabela 3).

**Tabela 3 – Valores de IC<sub>50</sub> em promastigotas de *L. amazonensis* no período de 24-96 h.**

| Tempo | IC <sub>50</sub> |
|-------|------------------|
| 24 h  | 3,1 µM           |
| 48 h  | 2,6 µM           |
| 72 h  | 3,6 µM           |
| 96 h  | 3,4 µM           |

### 6.3. Análise da citotoxicidade *in vitro* de macrófagos J774A.1

O metalocomplexo Co7HCHBPA foi analisado quanto à sua atividade antiproliferativa macrófagos J774A.1. Este teste foi realizado a partir do tratamento das células com 8 diferentes concentrações de Co7HCHBPA (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0 µM), por 24, 48 e 72 h. Além disso, foi mantido um controle negativo que não recebeu nenhum tratamento nos mesmos tempos de incubação, para comparação e um controle positivo com DMSO.

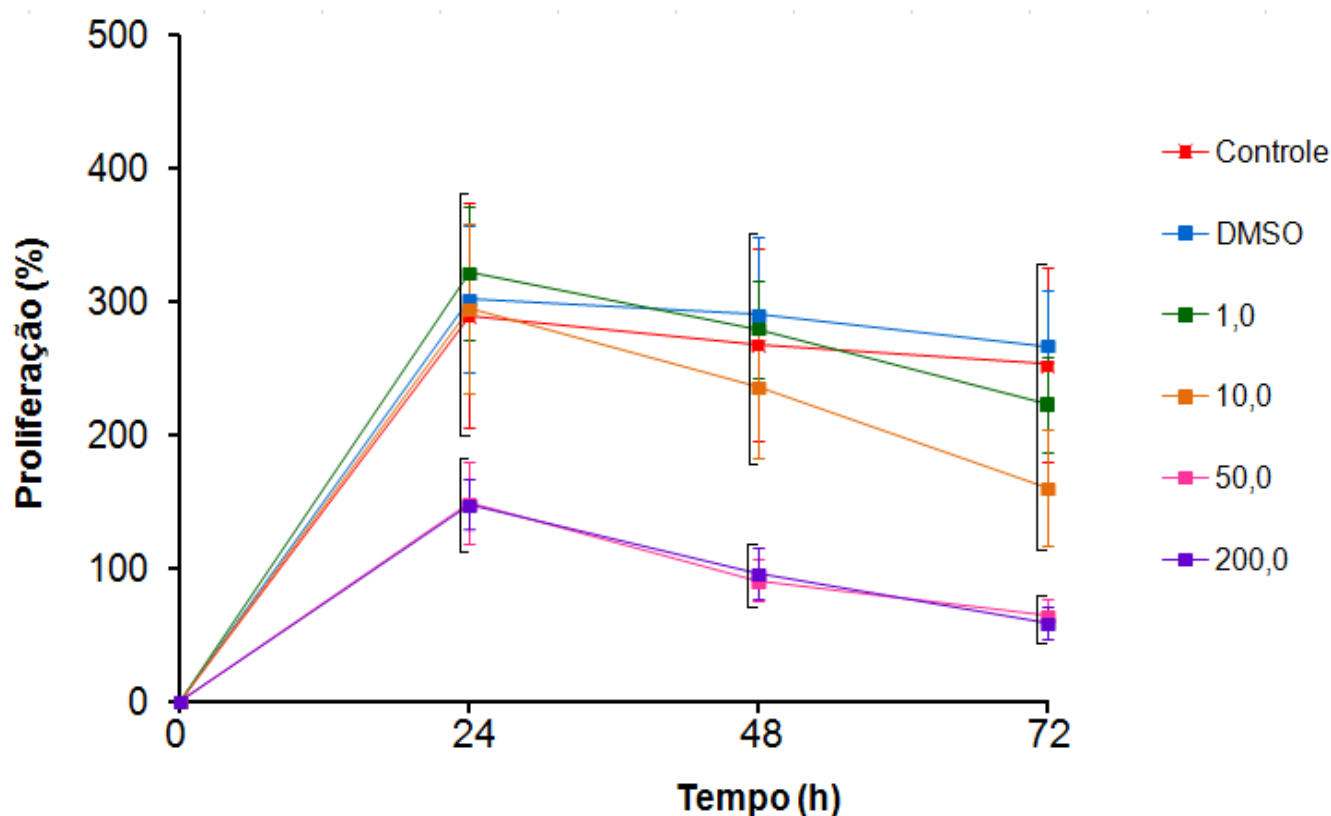
Em 24 h, uma diminuição superior a 50 % da proliferação nas culturas de macrófagos a partir da concentração de 50,0 µM foi observada em comparação aos controles. As concentrações de 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 µM apresentaram valores similares ao controle (Figura 18, Figura 19a).

O efeito antiproliferativo permaneceu semelhante aos controles após 48 h nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 µM. As culturas tratadas com concentrações acima de 20,0 µM apresentaram uma redução de cerca de 65 % em seu crescimento em relação ao controle (Figura 18, Figura 19b).

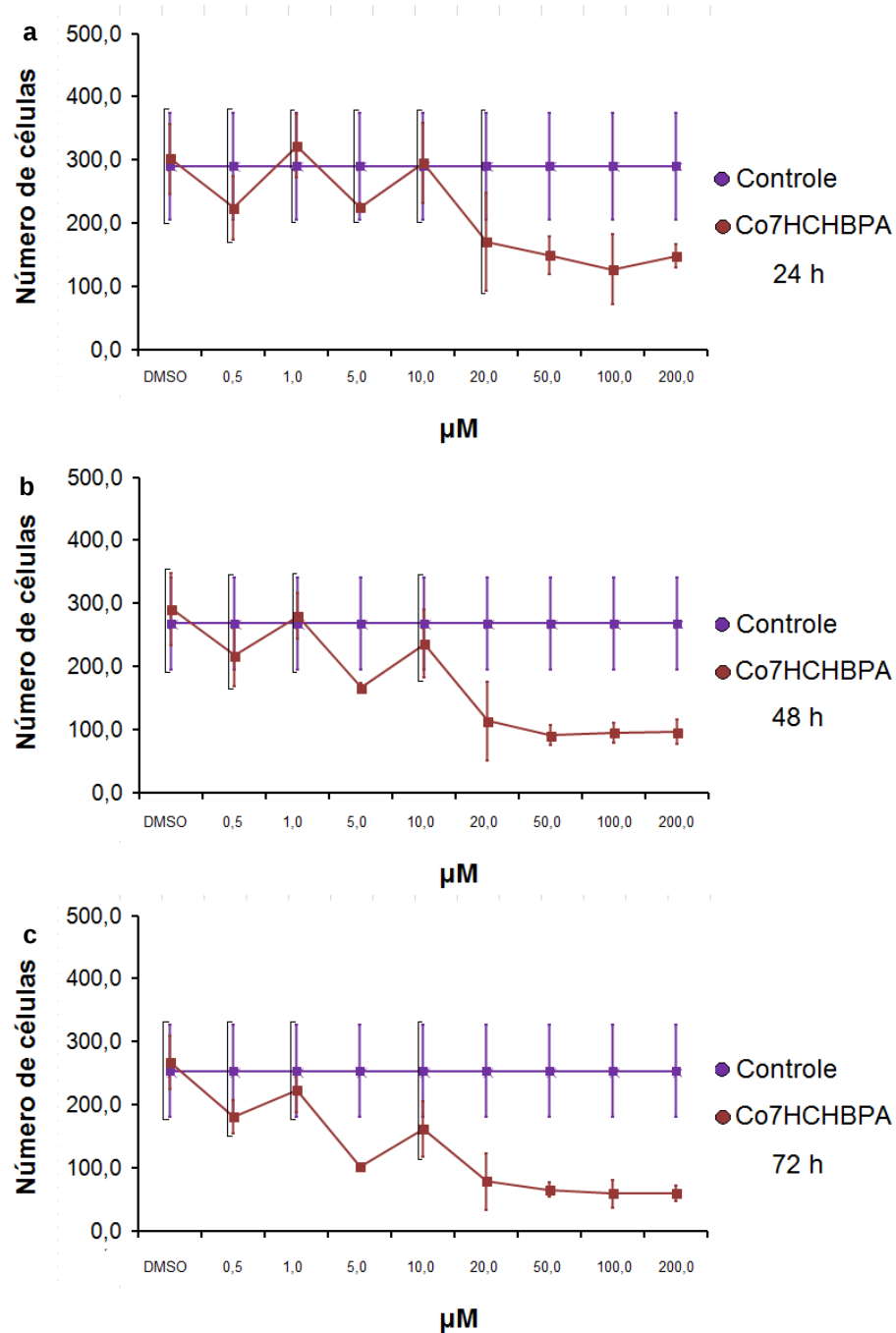
Em 72 h de tratamento, os controles permaneceram proliferando, e as culturas tratadas com 0,5, 1,0 e 10,0 µM apresentaram crescimento semelhantes aos controles. As culturas tratadas com 5,0 µM apresentaram um decaimento. As culturas

tratadas com concentrações acima de 20,0  $\mu\text{M}$  apresentaram uma redução ainda mais acentuada em seu crescimento, cerca de 85 % em relação ao controle (Figura 18, Figura 19c). Estes resultados indicam que o a droga não apresenta citotoxicidade aos macrófagos nas concentrações que se mostraram tóxicas a forma promastigota de *L. amazonensis*.

**Figura 18 – Ensaio antiproliferativo em macrófagos J774A.1 Macrófagos tratados pelo metalocomplexo Co7HCHBPA por 24, 48 e 72 h.** Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

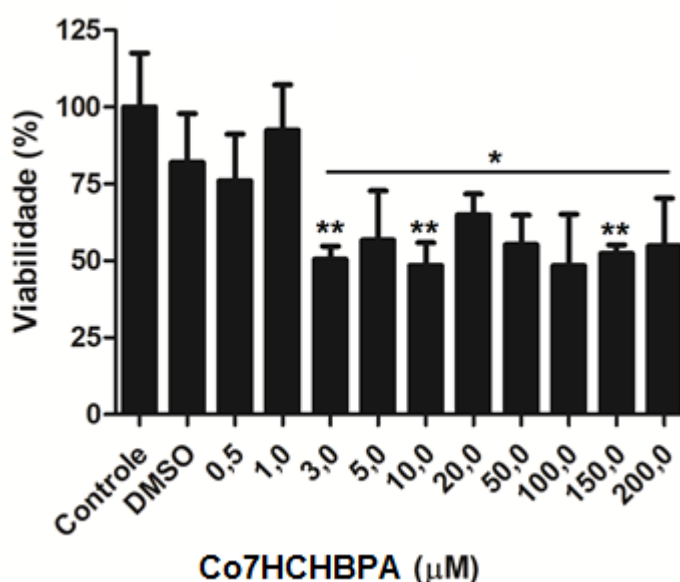


**Figura 19 – Ensaio antiproliferativo em macrófagos J774A.1** (a) Macrófagos tratados com Co7HCHBPA por 24 h. (b) Macrófagos tratados com Co7HCHBPA por 48 h. (c) Macrófagos tratados com Co7HCHBPA por 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



A toxicidade do composto Co7HCHBPA para a linhagem J774A.1 foi avaliada após o tratamento com diferentes concentrações. Para esta avaliação foi utilizado o ensaio de MTT. Os resultados estão dispostos no gráfico abaixo (Figura 20). Na figura 20 observamos que embora há uma redução da viabilidade dos macrófagos ela é muito pequena. Isso demonstra que em nosso estudo é possível matar ou inibir o crescimento do parasita sem nenhum ou pouco efeito no hospedeiro.

**Figura 20 – Viabilidade das células J774A.1, após tratamento com o metalocomplexo Co7HCHBPA.** A linhagem celular J774A.1 foi tratada com concentrações crescentes do inibir metalocomplexo até 200  $\mu\text{M}$ , por 48h. Os grupos marcados com um asterisco se diferenciam do controle e os grupos marcados com dois asteriscos se diferenciam do DMSO, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Ao avaliar a citotoxicidade na célula hospedeira é possível determinar a concentração  $\text{DL}_{50}$  que é tóxica para o parasita e não para o hospedeiro. Nossos dados  $\text{DL}_{50}$  indicam que o tratamento com Co7HCHBPA mostra-se seguro em relação a linhagem de macrófagos J774A.1 para os tempos analisados (Tabela 4). O  $\text{DL}_{50}$  de macrófagos J774A.1 tratados com Co7HCHBPA foi calculado, respectivamente, como 205,66  $\mu\text{M}$ , em 24 h; 157,19  $\mu\text{M}$ , em 48 h e 115,43  $\mu\text{M}$ , em 72 h. No tratamento dos macrófagos J774A.1, o  $\text{DL}_{50}$  mais tóxico foi observado em 72 h (115,43  $\mu\text{M}$ ), e o menos tóxico em 24 h (205,66  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de DL<sub>50</sub> em macrófagos J774A.1 no período de 24-72 h.

| Tempo | DL <sub>50</sub> |
|-------|------------------|
| 24 h  | 205,66 µM        |
| 48 h  | 157,19 µM        |
| 72 h  | 115,43 µM        |

#### 6.4. Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população da forma promastigota de *L. amazonensis* e macrófagos J774A.1 tratados com o metalocomplexo Co7HCHBPA

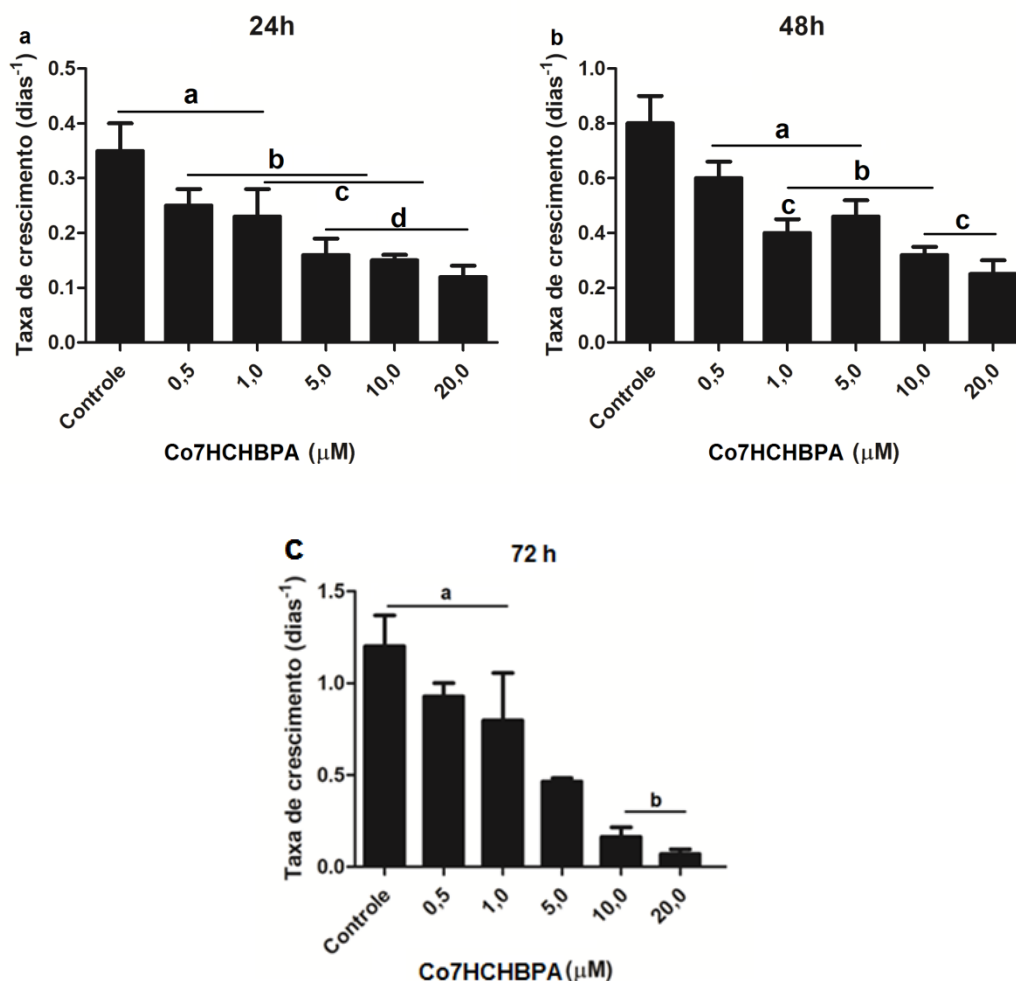
Com o intuito de analisar mais detalhadamente o efeito do metalocomplexo Co7HCHBPA na proliferação celular de *L. amazonensis* e macrófagos foi realizada a quantificação da capacidade proliferativa das células tratadas e não tratadas. Para isso, foram estimadas a taxa de crescimento (Figuras 21 e 22) e o tempo de duplicação da população (Tabela 5 e 6) nos períodos de 24, 48 e 72 h (ASSANGA et al., 2013; GAVISH et al., 2016).

No tempo de 24 h observamos uma diminuição crescente da taxa de crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis* em relação ao aumento das concentrações. Nas concentrações mais baixas (0,5 e 1,0 µM) temos uma taxa de diminuição de ~ 30 %, e com o aumento das concentrações (5, 0; 10,0 e 20,0 µM) a taxa diminui ainda mais (~ 50 %) (Fig. 21a).

Em 48 h observamos uma diminuição maior na concentração de 1,0 µM (~50%) semelhante as taxas de crescimento observadas nas concentrações de 10,0 e 20,0 µM (Fig. 21b).

A exposição a concentrações mais baixas (0,5 e 1,0 µM) do metalocomplexo Co7HCHBPA por 72 h levou a uma diminuição limitada (~25%) na taxa de crescimento de *L. amazonensis* (em comparação com células não tratadas), enquanto a taxa de crescimento destas células diminuiria acentuadamente, após o tratamento com 5,0 (~50 %); 10,0 e 20,0 µM (~80%) (Fig. 21c).

**Figura 21 – Taxa de crescimento celular da forma promastigota de *L. amazonensis* tratadas por 24, 48 e 72 h com o metalocômplexo Co7HCHBPA.** (a) *L. amazonensis* tratadas com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 24 h; (b) *L. amazonensis* tratadas com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 48 h e (c) *L. amazonensis* tratadas com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 72 h. Os grupos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

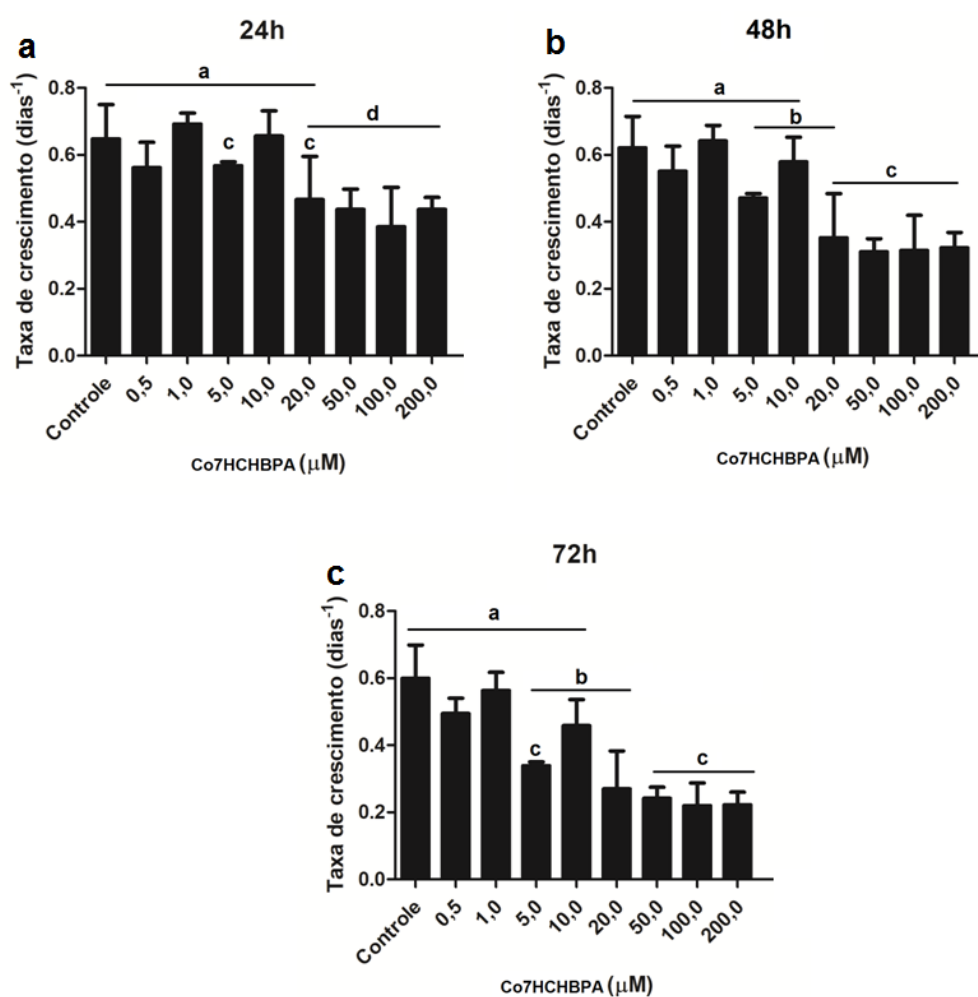


A exposição dos macrófagos às concentrações 0,5, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  do metalocômplexo Co7HCHBPA no período de 24h levou a uma diminuição limitada na taxa de crescimento (em comparação com células não tratadas). Houve uma diminuição da taxa de crescimento nas concentrações 5,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  (~10 e ~20 %). A taxa de crescimento destas células diminuíram acentuadamente, para ~30 %, após no tratamento com 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{M}$  (Fig. 22a).

Em 48 h, as taxas de crescimento dos macrófagos tratados com 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  diminuíram em relação ao controle. As culturas tratadas com as concentrações de 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{M}$  mostraram-se semelhantes, e demonstraram uma diminuição maior da taxa de crescimento (~50%) (Fig. 22b).

No tempo de 72 h apenas as culturas tratadas com as concentrações 0,5 e 1,0 demonstraram taxa de crescimento semelhante ao controle. A taxa de crescimento diminuiu acentuadamente nas concentrações de 5,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{M}$  (~40%) (Fig. 22c).

**Figura 22 – Taxa de crescimento celular de macrófagos J774A.1 tratados por 24, 48 e 72 h com o metalocômplexo Co7HCHBPA.** (a) Macrófagos tratados com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 24 h; (b) Macrófagos tratados com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 48 h; (c) Macrófagos tratados com o metalocômplexo Co7HCHBPA por 72 h.



No tempo de 24 h, o tempo de duplicação da população de *L. amazonensis* tratado com até 0,5  $\mu\text{M}$  de Co7HCHBPA foi cerca de quatro décimos maior ( $\cong 40\%$ ) o que a das células não tratadas, enquanto o tratamento com 1,0  $\mu\text{M}$  aumentou consideravelmente ( $\cong 66\%$ ). O tratamento com 5,0; 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  aumentou consideravelmente (para ~1, ~4 e ~5 vezes, respectivamente) o tempo de duplicação dos parasitas *L. amazonensis* (Tabela 5).

Em 48 h o tempo de duplicação da população tratada com 0,5  $\mu\text{M}$  de Co7HCHBPA foi cerca de três décimos maior ( $\cong 33\%$ ), enquanto o tratamento com

1,0  $\mu\text{M}$  praticamente dobrou ( $\sim 1$  vez). O tratamento com 5,0  $\mu\text{M}$  resultou em um aumento de sete décimos em relação ao tempo do controle não tratado ( $\cong 73\%$ ), um pouco menor que a concentração anterior. Em 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  aumentou consideravelmente (para  $\sim 1,5$  e  $\sim 2$ , respectivamente) o tempo de duplicação dos parasitas *L. amazonensis* (Tabela 5).

Em 72 h, o tempo de duplicação da população de *L. amazonensis* tratado com até 0,5  $\mu\text{M}$  de Co7HCHBPA foi cerca de um quarto maior ( $\cong 23\%$ ) do que a das células não tratadas, enquanto o tratamento com 1,0  $\mu\text{M}$  aumentou consideravelmente ( $\cong 75\%$ ). O tratamento com 5,0; 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  aumentou abruptamente (para  $\sim 2$ ,  $\sim 8$  e  $\sim 12$  vezes, respectivamente) o tempo de duplicação dos parasitas *L. amazonensis* (Tabela 5), indicando claramente que o tratamento com o metalocomplexo Co7HCHBPA nestas concentrações afeta drasticamente a proliferação celular de *L. amazonensis*. É importante ressaltar que em todos os experimentos para ter efeito nos macrófagos J774A.1 foi necessário aumentar as concentrações de tratamento em até 10 vezes.

**Tabela 5 – Tempo de duplicação da população de *L. amazonensis* nos períodos de 24, 48 e 72 h.**

| Tratamento                                | Concentração<br>( $\mu\text{M}$ ) | 24 h   | 48 h  | 72 h   |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|--------|-------|--------|
| Controle<br><br><br><br><br><br>Co7HCHBPA | 0                                 | 47,53  | 20,79 | 15,37  |
|                                           | 0,5                               | 66,54  | 27,73 | 18,96  |
|                                           | 1,0                               | 79,22  | 41,59 | 27,01  |
|                                           | 5,0                               | 110,90 | 36,16 | 34,82  |
|                                           | 10,0                              | 237,65 | 51,99 | 131,82 |
|                                           | 20,0                              | 277,26 | 66,54 | 189,69 |

No tempo de 24 h, o tempo de duplicação dos macrófagos J774A.1 tratados com as concentrações 0,5; 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de Co7HCHBPA foi cerca de um décimo maior ( $\cong 12\%$ ) em relação as células não tratadas. A população tratada com 5,0  $\mu\text{M}$  de Co7HCHBPA aumento cerca de três décimos do tempo da população controle ( $\cong 31\%$ ). O tratamento com 20,0  $\mu\text{M}$  aumentou para mais de três quartos o tempo de duplicação ( $\cong 77\%$ ). Os maiores de tempo foram observados nas concentrações de

50,0; 100,0 e 200,0, onde o tempo praticamente dobrou ( $\cong 97\%$ ;  $\cong 100\%$ ;  $\cong 93\%$ , respectivamente) (Tabela 6).

Em 48 h, nas concentrações de 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  os tempos de duplicação foram semelhantes entre si e ao controle, aumentando o tempo de duplicação no máximo em  $\cong 16\%$ . A partir da concentração de 20,0  $\mu\text{M}$  ocorreu um maior aumento de tempo  $\cong 38\%$ . Os maiores aumentos foram observados em 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{M}$  ( $\cong 47\%$ ,  $\cong 66\%$ ,  $\cong 47\%$ , respectivamente) (Tabela 6).

Após 72 h, somente nas concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  foram observados tempos semelhantes ao controle ( $\cong 22\%$  e  $\cong 7\%$ ). Houve um aumento considerável do tempo em 5,0 e 10,00  $\mu\text{M}$  ( $\cong 76\%$  e  $\cong 30\%$ ), e a partir 20,00  $\mu\text{M}$  o tempo de duplicação mais que dobra e quase triplica ( $\sim 2,2$ ;  $\sim 2,4$ ;  $\sim 2,7$  e  $\sim 2,7$  vezes) (Tabela 6).

Aparentemente o metalocomplexo Co7HCHBPA não influencia muito no tempo de duplicação dos macrófagos em concentrações mais baixas, concentrações estas que demonstram um efeito maior em promastigotas de *L. amazonensis*.

**Tabela 6 – Tempo de duplicação da população de Macrófagos os períodos de 24, 48 e 72 h.**

| Tratamento | Concentração ( $\mu\text{M}$ ) | 24h   | 48h   | 72h   |
|------------|--------------------------------|-------|-------|-------|
| Co7HCHBPA  | Controle                       | 26,83 | 25,59 | 27,73 |
|            | 0                              | 26,83 | 25,59 | 27,73 |
|            | 0,5                            | 30,25 | 29,71 | 33,95 |
|            | 1,0                            | 25,99 | 24,11 | 29,71 |
|            | 5,0                            | 35,39 | 29,19 | 48,93 |
|            | 10,0                           | 28,68 | 25,21 | 36,16 |
|            | 20,0                           | 47,53 | 35,39 | 61,61 |
|            | 50,0                           | 53,06 | 37,81 | 69,31 |
|            | 100,0                          | 53,66 | 42,66 | 75,02 |
|            | 200,0                          | 51,99 | 37,81 | 75,62 |

## 6.5. Avaliação Morfológica e Ultraestrutural

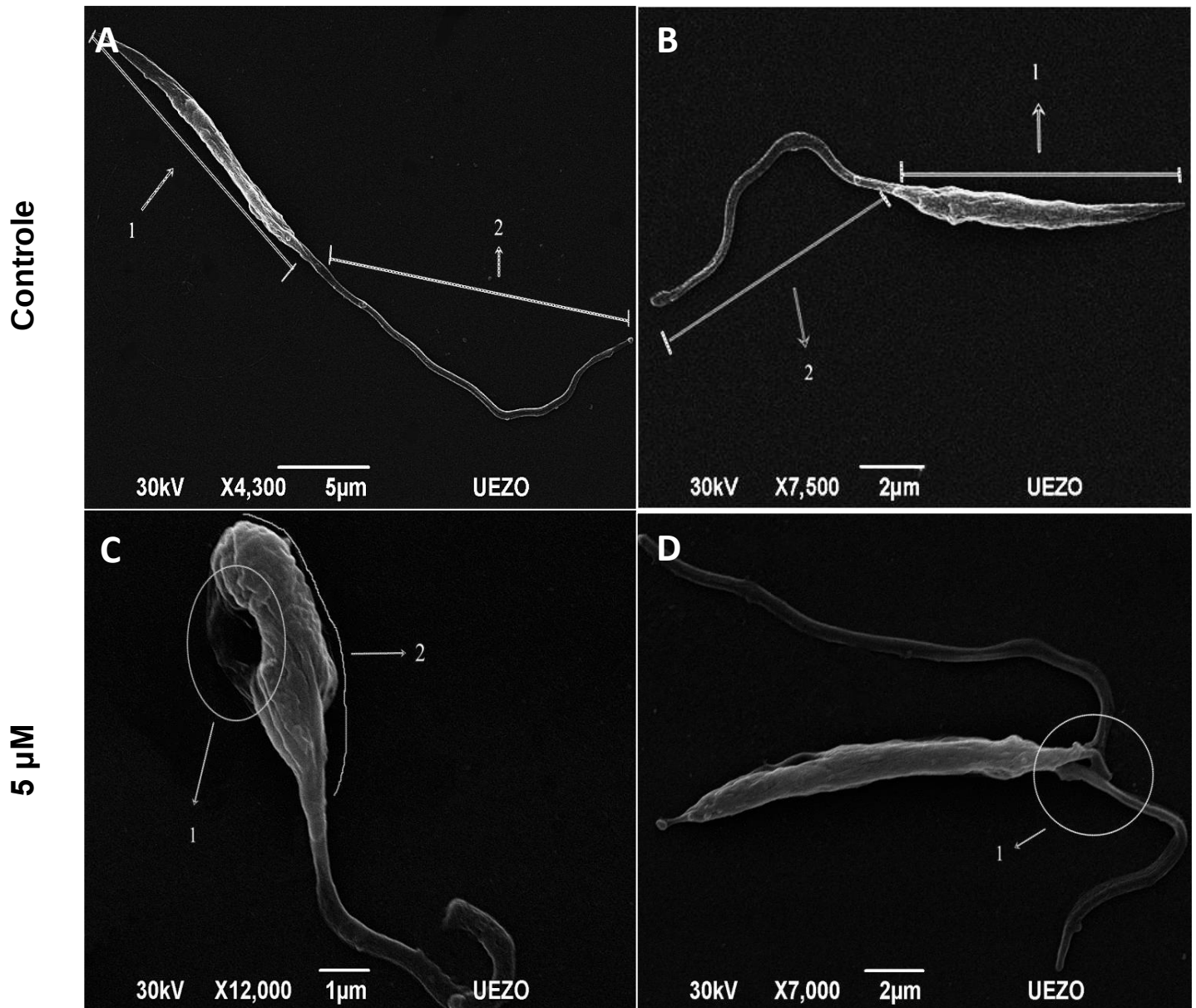
### 6.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar a ocorrência de mudanças na morfologia dos parasitas tratados com o metalocomplexo Co7HCHBPA, as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram processadas para observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 23 e 24). As imagens mostram que as concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$  do metalocomplexo, após 36 h de tratamento, foram capazes de causar alterações nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figuras 23 C e D, 24 C e D), que perdeu seu aspecto normal alongado (Figuras 23 A e B, 24 A e B). As alterações encontradas foram tabelas e sua frequência está descrita na tabela 7. As imagens revelaram a presença de células com mais de um flagelo (23 D e 24 D) encurtamento do flagelo (23C e D), além de alterações no corpo celular, tal como invaginações da membrana (23C, 24C E D), redução (24 C e D) e arredondamento (Figuras 23 C, 24 C).

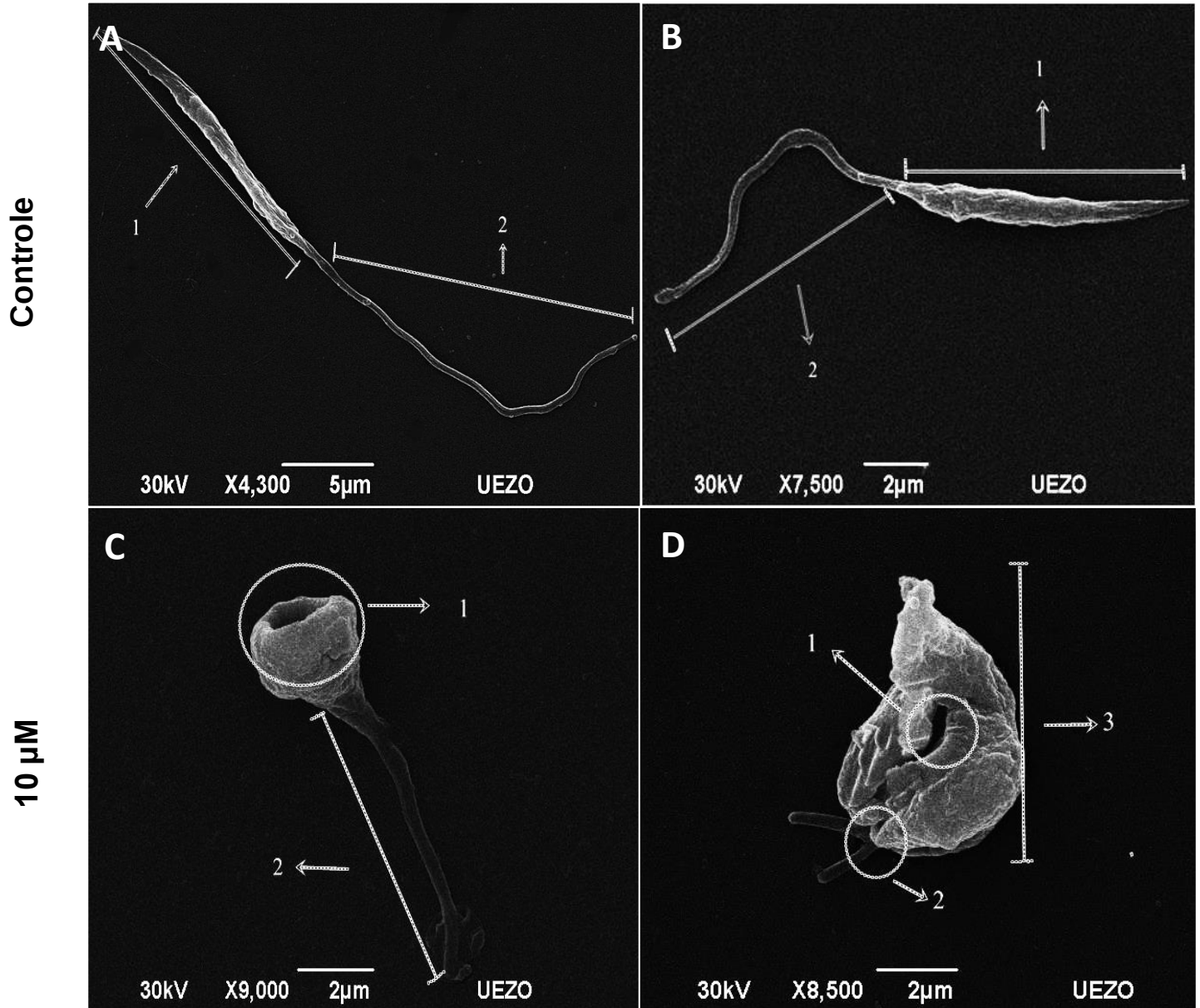
**Tabela 7 – Quantificação das alterações morfológicas provocadas por Co7HCHBPA em promastigotas de *L. amazonensis*.**

| <b>Alterações morfológicas</b> | <b>(%)</b> |
|--------------------------------|------------|
| Mais de um flagelo             | 70%        |
| Encurtamento do flagelo        | 42%        |
| Invaginações da membrana       | 73%        |
| Redução do corpo celular       | 60%        |
| Arredondamento da célula       | 67%        |

**Figura 23 – Micrografia eletrônica de varredura de *L. amazonensis* após 36 horas de tratamento com 5  $\mu$ M do composto Co7HCHBPA. (A e B) Células não tratadas com corpo celular alongado e fusiforme (1) e flagelo logo (2), característicos do parasita. (C) Surgimento de invaginações na membrana do parasita (1); alterações na forma e tamanho do corpo celular do parasita (2). (D) Ocorrência de duplo flagelo (1).**



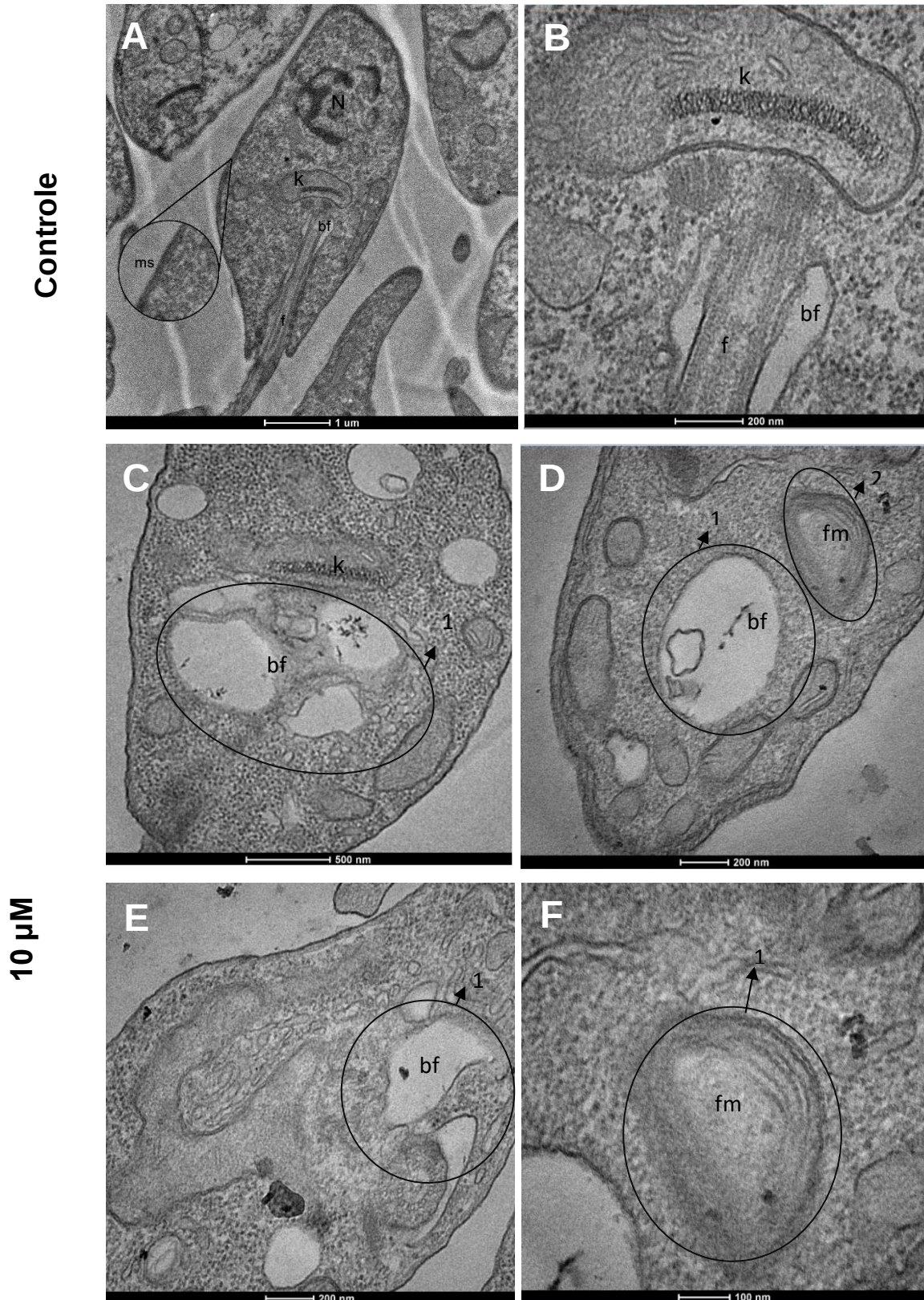
**Figura 24 – Micrografia eletrônica de varredura de *L. amazonensis* após 36 horas de tratamento com 10  $\mu$ M do composto Co7HCHBPA.** (A e B) Células não tratadas com corpo celular alongado e fusiforme (1) e flagelo logo (2), característicos do parasita. (C) Surgimento de invaginação no corpo celular (1) e alterações no tamanho do flagelo do parasita (2). (D) Surgimento de invaginação (1) redução e formação de duplo flagelo (2), e a alteração e redução no corpo celular (3).



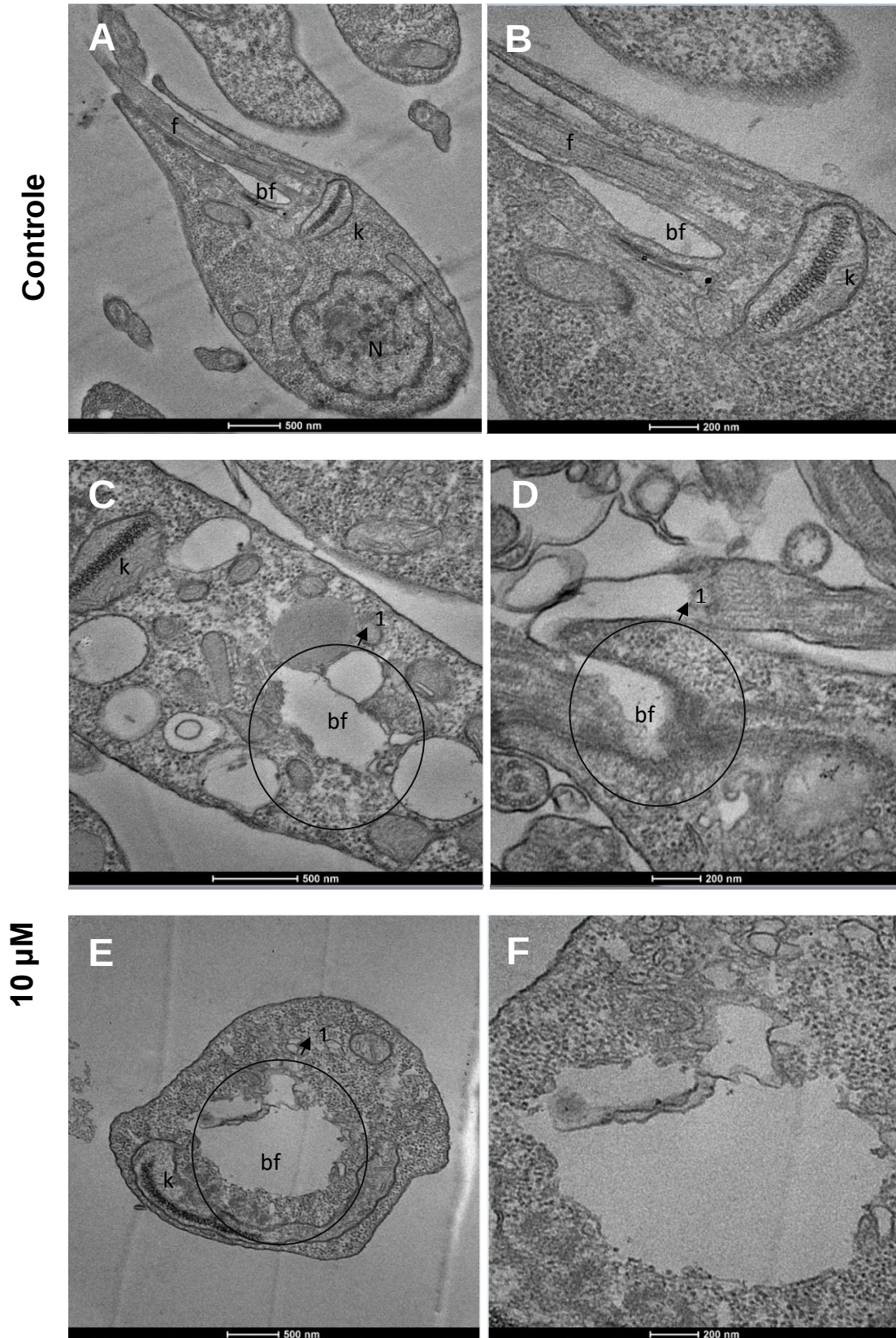
### 6.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Possíveis alterações na ultraestrutura da forma promastigota, causadas pelo metalocomplexo, foram avaliadas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Formas promastigotas foram tratadas com o metalocomplexo na concentração de 10  $\mu$ M nos períodos de 24 e 48 h. Parasitos controle, não tratados, também foram observados por MET e apresentaram uma ultraestrutura normal, onde o núcleo (N) estava com sua estrutura íntegra e cromatina descompactada, cinetoplasto (k) em sua compactação característica, flagelo (f) emergindo da bolsa flagelar (bf) e microtúbulos subpeliculares na membrana (ms) (Figuras 25 A e B, 26 A e B). Após o tratamento, foram observadas várias alterações, dentre elas: formação de vacúolos autofágicos próximos a região da bolsa flagelar (Figuras 25 C e F, 26 C, D e E), formações de figura de mielina (Figuras 25 D e F),

**Figura 25 – Micrografia eletrônica de transmissão de *L. amazonensis* após 24 horas de tratamento com 10  $\mu$ M do composto Co7HCHBPA.** (A e B) Células não tratadas com estruturas características do parasita. (C) Bolsa flagelar alterada, indicando morte por autofagia (1). (D) Bolsa flagelar alterada (1) e formação de figuras de mielina (2). (E) Alteração da bolsa flagelar (1). (F) Figura de mielina – Ampliação imagem D (2). (N) núcleo, (k) cinetoplasto, (f) flagelo, (bf) bolsa flagelar e (MS) microtúbulos subpeliculares.



**Figura 16 – Micrografia eletrônica de transmissão de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento com 10  $\mu$ M do composto Co7HCHBPA.** (A e B) Células não tratadas com estruturas características do parasita. (C) Bolsa flagelar alterada, indicando morte por autofagia (1). (D) Bolsa flagelar alterada (1). (E) Alteração da bolsa flagelar (1). (F) Alteração da bolsa flagelar – Ampliação imagem D. (N) núcleo, (k) cinetoplasto, (f) flagelo, (bf) bolsa flagelar e (MS) microtúbulos subpelículars.



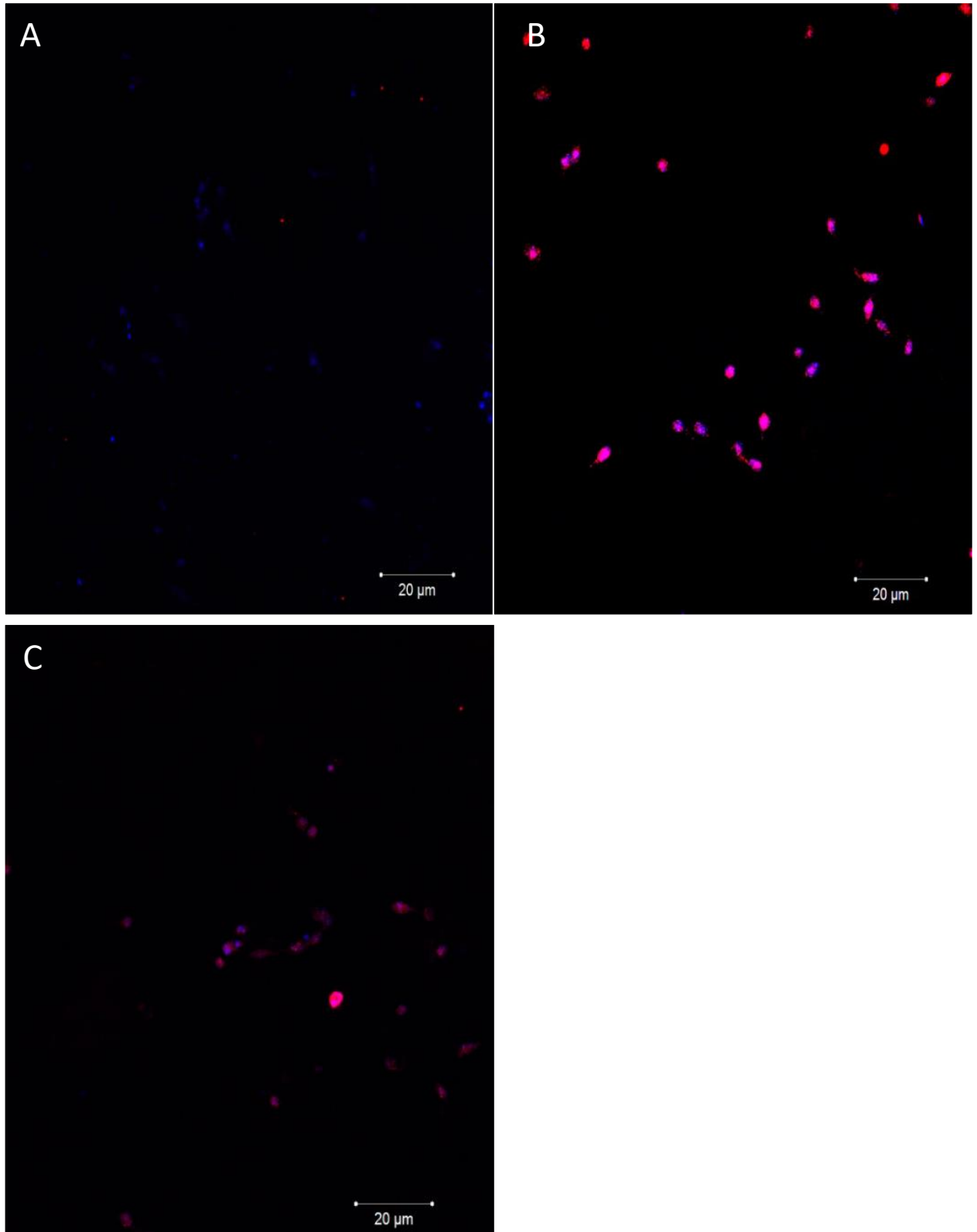
### 6.5.3. Microscopia confocal a laser

Visto que a análise da ultraestrutura dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o metalocomplexo Co7HCHBPA apresentaram a formação de vacúolos autofágicos (na região da bolsa flagelar), foi investigado se estes promastigotas poderiam ter a morte celular por autofagia disparada pelo tratamento. Para isto, os parasitas tratados nas concentrações 5  $\mu$ M e 10 $\mu$ M foram incubadas com um anticorpo contra a proteína LC3B e observadas em microscópio de imunofluorescência. O percentual de autofagia foi tabelado e está descrito na tabela 8. Nas células do controle não houve marcações para autofagia, como esperado (Figura 27 A). As células tratadas com 5  $\mu$ M apresentaram marcação positiva para a proteína LC3B (Figura 27 B), o que indica que o composto Co7HCHBPA induziu o parasita a autofagia. Na sequência, as células tratadas com 10  $\mu$ M, foram submetidas a mesma avaliação (Figura 27 C) apresentando também marcação positiva para anti-LC3B indicando autofagia.

**Tabela 8 – Quantificação da autofagia provocada por Co7HCHBPA em promastigotas de *L. amazonensis*.**

| <b>Autofagia</b> | <b>(%)</b> |
|------------------|------------|
| Controle         | 0%         |
| 5 $\mu$ M        | 96,6%      |
| 10 $\mu$ M       | 88,4%      |

**Figura 27 – Microscopia confocal a laser mostrando morte celular por autofagia de *L. amazonensis* apos tratamento com o composto Co7HCHBPA.** (A) Células controle em azul, com marcação para autofagia nas células tratadas com 5  $\mu$ M (B) e 10 $\mu$ M (C) do composto Co7HCHBPA. A marcação com anti-LC3B corresponde aos pontos vermelhos rosados na figura.



## 7. DISCUSSÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*, que se apresentam nas formas cutânea, visceral ou calazar e mucocutânea. A maioria dos casos cutâneos de leishmaniose ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria (WHO, 2021) Esta patologia de distribuição mundial faz parte do grupo das doenças negligenciadas, que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (MS, 2011).

Os medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses incluem o antimonial pentavalente e a anfotericina B. Estes medicamentos apresentam vários problemas, como: efeitos colaterais graves, como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios; vias (intramuscular e intravenosa) e tempo de administração, que influenciam diretamente na adesão do tratamento; custo, visto que são relativamente caros; normalmente estes medicamentos não estão incluídos na lista de medicamentos essenciais; e o fornecimento do medicamento não é contínuo considerando que a maioria dos medicamentos antileishmania são produzidos por apenas um único fabricante. Problemas com qualidade, baixa capacidade de produção e falta de uma previsão adequada das necessidades (resultando em longos prazos de entrega de pedidos) regularmente causam rupturas de estoque em países endêmicos (WHO, 2021). A busca por novos medicamentos é fundamental, contudo, novos compostos quimioterápicos para o tratamento de leishmaniose acabam não sendo interessantes para investimento da indústria farmacêutica. Em nosso estudo realizamos uma análise *in silico* e *in vitro* a resposta de um metalocomplexo denominado Co7HCHBPA frente a forma promastigota de *L. amazonensis*.

A estrutura de um composto determina suas propriedades físicas e químicas, bem como o ADMET. Aqui, os parâmetros ADMET do Co7HCHBPA foram estudados por dois softwares preditivos, SwissADME e pkCSM, comparando-o aos medicamentos utilizados atualmente empregados no tratamento de primeira e

segunda linha em casos de leishmaniose cutânea provocada por *L. amazonensis*. Com base nas análises das propriedades físico-químicas, utilizando-se a Regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), regra esta que dita que um fármaco deve apresentar peso molecular < 500 Da; presença de número  $\leq 5$  grupos doadores de ligação de hidrogênio; presença de número  $\leq 10$  grupos aceptores de ligação de hidrogênio; Log P calculado  $\leq 5$ , observamos em nosso estudo que o metalocomplexo em questão obedece a três regras, infringindo apenas a regra do peso molecular (580,90 g/mol). Esta classificação ainda permite que este fármaco seja idealizado como um bom candidato para o desenvolvimento de um fármaco oralmente ativo.

Uma característica importante dos compostos coordenados é a melhor permeabilidade as membranas biológicas (AHMAD, 2006; BRUIJNINCX e SADLER, 2008). Esta característica se dá pela lipoficidade, que se refere à habilidade de um composto químico ser dissolvido em lipídeos em geral, fundamental para um fármaco, visto que nossas membranas são compostas e sua maioria por fosfolipídios. Os valores do log de consenso  $P_{o/w}$  de Co7HCHBPA, Glucantime e Anfotericina B, que é a média aritmética dos valores previstos pelos cinco métodos propostos no programa utilizado, foram, respectivamente: 0,29; -2,90; -0,39, demonstrando assim que nosso composto demonstra um valor de maior em relação aos outros medicamentos comparados.

No quesito solubilidade, característica fundamental no desenvolvimento de drogas, os compostos avaliados foram ranqueados de acordo com o seu grau de solubilidade, considerando a escala ESOL (DELANEY, 2004). Os valores de LogS de Co7HCHBPA, Glucantime e Anfotericina B, foram, respectivamente, -5,78, 0,78, -5,37. Nesta análise, o composto aqui estudado mostrou-se moderadamente solúvel.

O radar de biodisponibilidade considera seis propriedades físico-químicas fundamentais para previsões sobre a eficiência farmacocinética de fármacos em desenvolvimento (RITCHIE et al., 2011; LOVERING et al., 2009). Por meio dos gráficos plotados no programa SwissADME (Figura 15), podemos verificar que o metalocomplexo Co7HCHBPA apresenta razoáveis condições para uma boa biodisponibilidade se administrado por via oral, pois quase todos os pontos plotados no gráfico, correlacionando os seis parâmetros, estão na área rosa que representa os padrões ideais (Figura 15). Apenas os pontos de tamanho e saturação ficaram fora da área do radar, mas ainda assim próximos a área rosa, pois o Co7HCHBPA possui peso molecular 580,90 g/mol, e é preconizado para que fique dentro do radar um valor

entre 150 e 500 g / mol; e um valor de 0,20 para a fração de carbonos na hibridação sp<sup>3</sup>, e o que é determinado para entrar no radar é que seja não inferior a 0,25 (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

Nos ensaios *in vitro* avaliamos os efeitos do metalocomplexo Co7HCHBPA nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos J774A.1. Observamos que o metalocomplexo em questão apresentou um efeito antiproliferativo dose-tempo dependente (Figuras 16 e 17) nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Apesar de observarmos um crescimento maior em 5,0 do que em 10,00 no período de 48h, não há diferença estatística, visto que os compostos metalocomplexos são antioxidativos, e por este motivo, nem sempre é possível observar diferença significativa no tratamento da cultura. Resultados semelhantes já foram observados em outros estudos. Compostos coordenados a paládio inibiram o crescimento de promastigotas em três espécies de *Leishmania*: *L. major*, *L. mexicana* e *L. donovani* (FRICKER et al., 2008); Complexos de lantanídeos foram utilizados em testes antiproliferativos *in vitro* contra atividade de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* e demonstraram efeitos superiores aos medicamentos já utilizados (CABALLERO et al., 2014); Complexos de rutênio exibiram potente atividade citotóxica contra todas as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* (COSTA et al., 2017); Diversos complexos com diferentes núcleos metálicos, incluindo cobalto, demonstraram atividade contra *L. donovani* (HUBIN et al., 2019).

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774A.1 revelaram que o composto aqui estudado na apresentou efeito antiproliferativo em macrófagos nas concentrações que se mostraram tóxicas aos promastigotas de *L. amazonensis* (Figuras 18, 19 e 20). Outros estudos com complexos coordenados a metais já demonstraram que os mesmos não possuem efeito citotóxico em diferentes linhagens de macrófagos. Complexos coordenados ao metal rutênio não se mostraram tóxicos a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (COSTA et al., 2017); Metalocomplexos com diferentes núcleos metálicos, incluindo cobalto, não apresentaram efeito antiproliferativo em células THP-1 (HUBIN et al., 2019). Em nossos estudos observamos ainda que o metalocomplexo Co7HCHBPA afetou de forma agressiva as taxas de crescimento e tempo de duplicação das formas promastigota de *L. amazonensis*, contudo, não demonstrou muita interferência nas culturas de macrófagos J774A.1.

Ao longo deste estudo, observamos, por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, que há alterações morfológicas e ultraestruturais drásticas, na forma promastigota de *L. amazonensis* provocadas pelo metalocomplexo Co7HCHBPA. Os efeitos morfológicos foram observados no período de 36 h (Figuras 23 e 24). Observamos que o parasita perdeu seu aspecto normal alongado, apresentavam mais de um flagelo, flagelos mais curtos, além de alterações no corpo celular, tal como invaginações da membrana, redução e arredondamento. Estas alterações foram atribuídas à ação do composto, pois a divisão do parasita se inicia do corpo celular para o flagelo, assim, a formação do duplo flagelo caracteriza uma divisão irregular que se inicia pelo flagelo, sendo as invaginações da membrana a alteração mais observada. Em condições normais o parasita apresenta características específicas como corpo celular fusiforme e alongado e longo flagelo. Em relação a ultraestrutura, alterações foram observadas nos períodos de 24 e 48 h, onde foram vistas várias alterações, dentre elas: formação de vacúolos autofágicos próximos a região da bolsa flagelar, formações de figura de mielina (Figuras 25 e 26), indicando morte celular. Outros complexos apresentaram efeito sobre o metabolismo energético dos parasitas, causando também degradação nas membranas das organelas e morte celular (RAMÍRES-MACÍAS, 2011). Ensaio com complexos coordenados a Fe já demonstraram alterações morfológicas e ultraestruturais em *T. gondii* (PORTES et al., 2015 e 2017). Por fim, considerando que a análise da ultraestrutura dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o metalocomplexo Co7HCHBPA apresentaram a formação de vacúolos autofágicos (na região da bolsa flagelar), foi investigado se estes promastigotas poderiam ter a morte celular por autofagia disparada pelo tratamento. As células tratadas com 5  $\mu$ M apresentaram marcação positiva para a proteína LC3B (Figura 27), indicando que o composto Co7HCHBPA induziu o parasita a autofagia. É importante ressaltar que o principal mecanismo de nutrição de *L. amazonensis* é a bolsa flagelar, e por esse motivo, a possibilidade de indução de autofagia. Na sequência, as células tratadas com 10  $\mu$ M, foram submetidas a mesma avaliação (Figura 27) apresentando também marcação positiva para anti-LC3B indicando autofagia.

Todos os resultados obtidos deste trabalho, seja análise *in silico* ou *in vitro*, sugerem fortemente que o metalocomplexo testado possui ação leishmanicida, apresentando efeitos significativos sobre a forma promastigota com uma concentração (em  $\mu$ M) que não afeta os macrófagos. Contudo, ensaios em

amastigotas intracelulares devem ser desenvolvidos para que possamos evidenciar seu efeito, e desta forma, indicá-lo como um bom candidato para testes futuros, seja sendo utilizado de forma isolada ou coordenado a outros compostos.

## 8. CONCLUSÃO

Por fim, foi possível concluir que:

- As análises *in silico* revelaram que o metalocomplexo Co7HCHBPA se mostrou promissor para um possível desenvolvimento de um medicamento para o tratamento de leishmaniose, contudo, vale ressaltar que alguns parâmetros se mostraram negativos, como o fato da possibilidade de apresentar um potencial cancerígeno e ser inibidor de hERG II.
- As análises *in vitro* demonstraram que o metalocomplexo apresenta efeito antiproliferativo nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- A análise de citotoxicidade em macrófagos demonstrou que o metalocomplexo não apresentou efeito anfiroliferativo em macrófagos nas concentrações que se mostraram tóxicas aos promastigotas de *L. amazonensis*.
- Ensaios de microscopia óptica e eletrônica revelaram que o metalocoplexo Co7HCHBPA induz diversas alterações morfológicas e ultraestruturais que podem estar associadas a indução de morte celular por autofagia nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.

## REFERÊNCIAS

- AARA, Naushin et al. Clinco-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 1, p. 111-115, 2013. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0558.
- AGA, Eresso et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898-905, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.169.2.898.
- AHMAD, Saeed et al. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, n. 7, p. 1633-1645, 2006. DOI: 10.1016/j.poly.2005.11.004.
- ALI, Jogoth et al. Revisiting the general solubility equation: in silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 2, p. 420-428, 2012. DOI: 10.1021/ci200387c.
- AMATO, Valdir Sabbaga; TONACIO, Adriana Coracini; ALVES MDO, M. An atypical presentation of cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 481, 2010. DOI: 10.1590/S0037-86822010000400035.
- ASHFORD, Richard W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00136-3.
- ASHOK, Devika; ACHA-ORBEA, Hans. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 10, p. 499-507, 2014. DOI: 10.1016/j.pt.2014.08.001.
- AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Rev Bras Farm**, v. 90, p. 321-326, 2009.
- BALIMANE, Praveen V.; CHONG, Saeho; MORRISON, Richard A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 1, p. 301-312, 2000. DOI: 10.1016/S1056-8719(00)00113-1.
- BENNIS, Issam et al. Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 46, 2017. DOI: 10.1186/s40249-017-0267-5.
- BERMAN, Jonathan. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 11, n. 6, p. 707-710, 1998. PMID: 17035746.
- BLANCO, Victor M. et al. Clinical and epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis in Colombian children: considerations for local treatment. **The**

**American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 2, p. 359-364, 2013. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0784.

BOGDAN, Christian; RÖLLINGHOFF, Martin; DIEFENBACH, Andreas. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2000.917307.x.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRENK, Ruth et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435, 2008. DOI: 10.1002/cmdc.200700139.

BRUIJNINCX, Pieter CA; SADLER, Peter J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008. DOI: [10.1016/j.cbpa.2007.11.013](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.11.013).

BURZA, Sakib et al. Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2603, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002603.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

CABALLERO, Ana B. et al. Lanthanide complexes containing 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4H)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 138, p. 39-46, 2014. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.04.016.

CASTILLO, Keshia F. et al. Metal complex derivatives of azole: A study on their synthesis, characterization, and antibacterial and antifungal activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2334-2347, 2016. DOI: 10.5935/0103-5053.20160130.

CHANG, K.-P. Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their

intracellular transformation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 6, p. 1084-1096, 1978. DOI: 10.4269/ajtmh.1978.27.1084.

CHARMOY, Mélanie et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, p. e1000755, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000755.

CORNELIO, Rafael; MAYORGA, Paulo. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 883, 2007.

CORRALIZA, Ines Maria et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1094.

COSTA, Mônica S. et al. Anti-*Leishmania* activity of new ruthenium (II) complexes: Effect on parasite-host interaction. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 175, p. 225-231, 2017. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.023.

CROFT, Simon L.; COOMBS, Graham H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003. DOI: 10.1016/j.pt.2003.09.008.

CROFT, Simon L.; SNOWDON, Diane; YARDLEY, Vanessa. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1041-1047, 1996. DOI: 10.1093/jac/38.6.1041.

CRUZ, Israel et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 281-289, 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.03.026.

DA SILVA, Maria Almerice Lopes et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 2, p. 206-210, 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.03.003.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, p. 42717, 2017. DOI: 10.1038/srep42717.

DAINA, Antoine; ZOETE, Vincent. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117, 2016. DOI: 10.1002/cmdc.201600182.

DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x.

DE ALMEIDA FERREIRA, Sidney et al. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania*

infantum DNA. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2150, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002150.

DE FREITAS, Elisangela Oliveira et al. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 153, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00153.

DE PAIVA CAVALCANTI, Milena et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356-358, 2009. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.05.018.

DEDET, J. P. et al. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 35-44, 1983. DOI: 10.1080/00034983.1983.11811670.

DELANEY, John S. ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000-1005, 2004. DOI: 10.1021/ci034243x.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004. DOI: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.

DI, Li. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 10, n. 3, p. 379-393, 2014. DOI: 10.1517/17425255.2014.876006.

DOS SANTOS MARQUES, Letícia Helena et al. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living in urban area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1955, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001955.

EJARA, Ermias Diro et al. Challenges in HIV and visceral *Leishmania* co-infection: future research directions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 10, p. 1266–1267, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2010.02612.x.

FARAH, F. S.; SAMRA, S. A.; NUWAYRI-SALTI, N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 29, n. 4, p. 755, 1975. PMID: 1184120

FERNANDES, Mariane B. et al. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 535-540, 2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.01.018.

FIKRE, Helina et al. Clinical features and treatment response of cutaneous leishmaniasis in North-West Ethiopia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 10, p. 1293-1301, 2017. DOI: 10.1111/tmi.12928.

FOULET, Françoise et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2110-2115, 2007. DOI: 10.1128/JCM.02555-06.

FRAGA, Thiago Leite et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 310-313, 2010. DOI: 10.1590/S0074-02762010000300011.

FRICKER, Simon Paul. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton transactions**, n. 43, p. 4903-4917, 2007. DOI: 10.1039/b705551j.

FSADNI, C. et al. Laryngeal leishmaniasis in Malta. **Journal of Infection**, v. 54, n. 2, p. e61-e63, 2007. DOI: 10.1016/j.jinf.2006.04.003.

GALLUZZI, Luca et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2859-8.

GÁLVEZ, R. et al. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 95-102, 2010. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.02.009.

GLOBAL HEALTH OBSERVATORY. Leishmaniasis; 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>>.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. **Storpirtis, S.; Gonçalves, JE; Chiann, C.; Gai, MN–Biofarmacotécnica–Coleção Ciências Farmacêuticas. Ed. Guanabara Koogan, cap**, v. 19, p. 204-211, 2009.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, p. 71-80, 2003. DOI: 10.1590/S0037-86822003000100011.

GUEIRARD, Pascale et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x.

GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12-19, 2015. DOI: 10.1590/0037-8682-0268-2013.

HANN, Michael M.; KESERÜ, György M. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 5, p. 355-365, 2012. DOI: 10.1038/nrd3701.

HARHAY, Michael O. et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 4, p. 543-550, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0321.

HASHIGUCHI, Yoshihisa et al. Leishmaniasis in Ecuador: comprehensive review and current status. **Acta tropica**, v. 166, p. 299-315, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.11.039.

HAY, Michael et al. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40-51, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2786.

HESPANHOL, Renata C. et al. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 35-44, 2005. DOI: 10.1177/002215540505300105.

HIDALGO, Ismael J.; RAUB, Thomas J.; BORCHARDT, Ronald T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 736-749, 1989. DOI: 10.1016/S0016-5085(89)80072-1.

HOLLENBERG, Paul F. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. **Drug metabolism reviews**, v. 34, n. 1-2, p. 17-35, 2002. DOI: 10.1081/DMR-120001387.

HOU, Tingjun et al. ADME evaluation in drug discovery. 7. Prediction of oral absorption by correlation and classification. **Journal of chemical information and modeling**, v. 47, n. 1, p. 208-218, 2007. DOI: 10.1021/ci600343x.

HUANG, Shiew-Mei et al. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. **The Journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 662-670, 2008. DOI: 10.1177/0091270007312153.

HUBIN, Timothy J. et al. Tetraazamacrocyclic derivatives and their metal complexes as antileishmanial leads. **Polyhedron**, v. 163, p. 42-53, 2019. DOI: 10.1016/j.poly.2019.02.027.

HUUSKONEN, Jarmo; SALO, Marja; TASKINEN, Jyrki. Aqueous solubility prediction of drugs based on molecular topology and neural network modeling. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 38, n. 3, p. 450-456, 1998. DOI: doi.org/10.1021/ci970100x.

INIESTA, Virginia et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite immunology**, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x.

JORGENSEN, Paul et al. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 395-400, 2002. DOI: 10.1126/science.1070850.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2608.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999. DOI: 10.1016/S0738-081X(99)00046-2.

KIRCHMAIR, Johannes et al. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 6, p. 387-404, 2015. DOI: 10.1038/nrd4581.

LAINSON, R. Leishmania e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 11, n. 1, p. 29-40, 1997.

LAMOTHE, Shawn M. et al. The human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel represents an unusual target for protease-mediated damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 39, p. 20387-20401, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.743138.

LASKAY, Tamás; VAN ZANDBERGEN, Ger; SOLBACH, Werner. Neutrophil granulocytes–Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00075-1.

LAU, Yau Yi et al. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 9, p. 937-942, 2004. PMID: 15319334

LAUFS, Helmut et al. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 826-835, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.2.826-835.2002.

LE FICHOUX, Yves et al. Short-and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established Leishmania infantum infection in BALB/c mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 654-658, 1998. DOI: 10.1128/AAC.42.3.654

LESTINOVA, Tereza et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005600, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005600.

LINDOSO, José Angelo Lauletta et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **Hiv/aids (Auckland, NZ)**, v. 8, p. 147, 2016. DOI: 10.2147/HIV.S93789.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 2001. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

LOVERING, Frank; BIKKER, Jack; HUMBLET, Christine. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6752-6756, 2009. DOI: 10.1021/jm901241e.

LUNARDELLI, M. J. M.; BECKER, M. W.; BLATT, C. R. Lesão hepática induzida por medicamentos: Qual o papel do farmacêutico clínico. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços Saúde**, v. 7, n. 4, p. 31-35, 2016.

MAIA, C. et al. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 336-340, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.08.030.

MARSDEN, Philip Davis. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986. DOI: 10.1016/0035-9203(86)90243-9.

MARSDEN, Philip D.; JONES, Tracey C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. **Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands**, p. 183-198, 1985.

MARTIN, Michael B. et al. Bisphosphonates Inhibit the Growth of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, and Plasmodium falciparum: A Potential Route to Chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 909-916, 2001. DOI: 10.1021/jm0002578.

MASUDA, H.; RAMOS, I. B.; WINTER, C. E. Vitelogênese nos Ecdisozoa: Nematoides e Insetos como Exemplos . Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, p. 1–45, 2012.

MEDVEDEV, A. I.; LESCHENKO, V. V. Generators of reactive oxygen forms  $\gamma$ -irradiation and ascorbic acid-cobalt metallocomplexes induced large-scale fragmentation and reparation of DNA in tumor cells. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 145, n. 5, p. 600-603, 2008. DOI: 10.1007/s10517-008-0150-2.

MEDVEDEV, A. I.; LESHCHENKO, V. V. Large-scale fragmentation of DNA and the death of tumor cells by the action of the binary system ascorbic acid-metallocomplexes of cobalt in vitro. **Cytologia**, v. 54, n. 5, p. 417-420, 2012. PMID: 22827039.

MOCK, David J. et al. Leishmania induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002635, 2012. DOI: doi.org/10.1371/journal.ppat.1002635.

MOHAMMADIHA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of Leishmania infantum infection. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 83-90, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.10.013.

MORTELMANS, Kristien; ZEIGER, Errol. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00064-6.

MOTTRAM, Jeremy C.; COOMBS, Graham H.; ALEXANDER, James. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375-381, 2004. DOI: 10.1016/j.mib.2004.06.010.

MOUGNEAU, Evelyne; BIHL, Franck; GLAICHENHAUS, Nicolas. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x.

NEVES, David Pereira; MELO Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marco; VITOR, Ricardo W. Almeida. **Parasitologia humana**. 11 a. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 2007.

O'BOYLE, Noel M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 2011. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitology today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993. DOI: 10.1016/0169-4758(93)90231-4.

OTTAVIANI, Giorgio et al. What is modulating solubility in simulated intestinal fluids?. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 41, n. 3-4, p. 452-457, 2010. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.07.012.

PACE, D. Leishmaniasis. 2014. **Journal of infection**, v. 69, p. 510-518.

PAIXÃO, Rita Leal. Os desafios das comissões de ética no uso de animais. **Ciênc vet tróp**, v. 11, n. 1, p. 84-7, 2008.

PALUMBO, Emilio. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 2-4, 2008. DOI: 10.1590/S1413-86702008000100002.

PANIZ MONDOLFI, Alberto E. et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 52, n. 4, p. 446-455, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2012.05709.x.

PETERS, Nathan C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008. DOI: 10.1126/science.1159194.

PIJPERS, Joyce et al. The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia—A review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007173, 2019. DOI: [10.1371/journal.pntd.0007173](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007173).

PIRES, Douglas EV; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.

PORTES, J. A. et al. In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 141-152, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.04.002.

PORTES, J. A. et al. Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron (III) compound. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7374-7386, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00057-15.

PORTES, Juliana de A. et al. A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 117, n. 9, p. 2795-2805, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5967-7.

POTTS, Russell O.; GUY, Richard H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical research**, v. 9, n. 5, p. 663-669, 1992. DOI: 10.1023/a:1015810312465.

POURABBAS, Bahman et al. Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 88, n. 5, p. 868-871, 2013. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0440.

RAMÍREZ-MACÍAS, Inmaculada et al. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4 H)-one against *Leishmania* spp. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 813-819, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkq537.

READY, Paul D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 147, 2014. DOI: 10.2147/CLEP.S44267.

REAL, FERNANDO et al. The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA research**, v. 20, n. 6, p. 567-581, 2013. DOI: 10.1093/dnares/dst031.

REIS, Levi Eduardo Soares et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 498-503, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.07.006.

RITCHIE, Timothy J. et al. Increasing small molecule drug developability in sub-optimal chemical space. **MedChemComm**, v. 4, n. 4, p. 673-680, 2013. DOI: 10.1039/C3MD00003F.

RITCHIE, Timothy J.; ERTL, Peter; LEWIS, Richard. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 1-2, p. 65-72, 2011. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.11.002.

ROCHA, Aline Alves Ferreira et al. Diet composition and food overlap of *Acestrorhynchus britskii* and *A. lacustris* (Characiformes: Acestrorhynchidae) from Sobradinho reservoir, São Francisco river, Bahia State. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 407-415, 2011. DOI:

SAHA, Ahindra Kumar; MUKHERJEE, Tanmoy; BHADURI, Amar. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 19, n. 3, p. 195-200, 1986. DOI: 10.1016/0166-6851(86)90001-0.

SAJID, Mohammed; MCKERROW, James H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00438-8.

SANTOS, Antonio F. et al. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 309-315, 2014. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.07.008.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 06, p. 588-596, 2015. DOI: 10.3855/jidc.6833.

SCHWARTZMAN, Joseph D.; PEARSON, Richard D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 5, p. 850-855, 1985. DOI: 10.4269/ajtmh.1985.34.850.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.72.

SECUNDINO, N. F. C. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005. DOI: doi.org/10.1093/jmedent/42.6.928.

SHERLEY, J. L.; STADLER, P. B.; STADLER, J. Scott. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. **Cell proliferation**, v. 28, n. 3, p. 137-144, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1995.tb00062.x.

SILVA-LÓPEZ, Raquel Elisa da. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700022.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x.

SINDERMANN, H. et al. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, v. 193, n. 4, p. 173-180, 2004. DOI: 10.1007/s00430-003-0201-2.

SOARES-BEZERRA, Rômulo José; LEON, Leonor; GENESTRA, Marcelo. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004. DOI: 10.1590/S1516-93322004000200003.

STARK, D. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1178-1180, 2006. DOI: 10.1128/JCM.44.3.1178-1180.2006.

SUNDAR, Shyam et al. Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 1, p. 96-100, 2013. DOI: 10.1111/tmi.12015.

SUNDAR, Shyam et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 352, n. 9143, p. 1821-1823, 1998. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)04367-0.

TAJIRI, Kazuto; SHIMIZU, Yukihiro. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 44, p. 6774, 2008. DOI: 10.3748/wjg.14.6774.

TAN, Yu-Ting; TILLET, Darren J.; MCKAY, Ian A. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. **Molecular medicine today**, v. 6, n. 8, p. 309-314, 2000. DOI: 10.1016/S1357-4310(00)01739-1.

TEAGUE, Simon J. et al. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003594.

TER HORST, Rachel et al. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 11, p. 1702-1709, 2008. DOI: 10.1086/587899.

TURECKA, Katarzyna et al. Antifungal activity and mechanism of action of the Co (III) coordination complexes with diamine chelate ligands against reference and clinical strains of *Candida* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1594, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01594.

UEDA-NAKAMURA, Tânia; ATTÍAS, Márcia; DE SOUZA, Wanderley. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology research**, v. 87, n. 2, p. 89-97, 2001. DOI: 10.1007/s004360000319.

UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012. DOI: 10.1016/j.pt.2012.05.002.

UNGER, C. et al. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. **Acta oncologica**, v. 28, n. 2, p. 213-217, 1989. DOI: 10.3109/02841868909111249.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 286-299, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12556.

VAN RIJT, Sabine H.; SADLER, Peter J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.09.003.

VAN RIJT, Sabine H.; SADLER, Peter J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.09.003.

VAN WATERSCHOOT, Robert AB; SCHINKEL, Alfred H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 390-410, 2011. DOI: 10.1124/pr.110.002584.

VEITH, Henrike et al. Comprehensive characterization of cytochrome P450 isozyme selectivity across chemical libraries. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 1050-1055, 2009. DOI: 10.1038/nbt.1581.

VILANOVA-COSTA, Cesar Augusto Sam Tiago et al. MDR1 and cytochrome P450 gene-expression profiles as markers of chemosensitivity in human chronic myelogenous leukemia cells treated with cisplatin and Ru (III) metallocomplexes. **Biological trace element research**, v. 163, n. 1-2, p. 39-47, 2015. DOI: 10.1007/s12011-014-0133-2.

WANG, Jun-Yun et al. The prevalence of canine Leishmania infantum infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-69.

WHO – World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>>.

WHO – World Health Organization. **Epidemiological situation**; 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>

WHO – World Health Organization. Leishmaniasis; 2021. Disponível em: < [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>.

WILHELM, T. J. Visceral leishmaniasis. **Chirurg**, v. 90, n. 10, p. 833-837, 2019. DOI: 10.1007/s00104-019-0994-1.

WOLF, C. Roland; SMITH, Gillian; SMITH, Robert L. Pharmacogenetics. **Bmj**, v. 320, n. 7240, p. 987-990, 2000. DOI: 10.1136/bmj.320.7240.987.

WRIGHT, Gerard D.; SUTHERLAND, Arlene D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.04.004.

YALKOWSKY, Samuel H.; VALVANI, Shri C. Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 69, n. 8, p. 912-922, 1980. DOI: 10.1002/jps.2600690814.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology: Clinical Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 464-467, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2004.01605.x.

YIMER, Mulat et al. Proportion of Visceral leishmaniasis and human immune deficiency virus co-infection among clinically confirmed visceral leishmaniasis patients at the endemic foci of the Amhara National Regional State, north-west Ethiopia. **Am J Biomed Life Sci**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014. DOI: 10.11648/j.ajbls.20140201.11.

ZACARIAS, Danielle A. et al. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 6, p. 679-687, 2017. DOI: 10.1111/tmi.12877.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003. DOI: 10.1016/S1473-3099(03)00517-6.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. 3. Visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. Supplement\_1, p. S27-S58, 2001. DOI: 10.1016/S0035-9203(01)90218-4.

ZIJLSTRA, Eduard E. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3258, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003258.

### APÊNDICE A - Análise *in silico*

A análise de farmacocinética dos compostos permite realizar a predição da absorção intestinal humana, da permeabilidade da barreira hematoencefálica, além de avaliar se são ou não substrato da P-gP, se interagem com citocromos P450 e se são permeáveis a pele. Os resultados das análises estão dispostos na tabela 9. Em relação a absorção no TGI, o metalocomplexo se mostrou melhor que os medicamentos já utilizados, visto que é o único dos três passível de ser absorvido. A anfotericina-B mostrou ser substrato para da P-gP, o que é ruim, considerando que esta age como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para a parte externa das células do fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal, das células tumorais e das células das barreiras hemato-teciduals. Nenhum dos três compostos se mostraram permeáveis a BHE, assim como também não são inibidores de citocromos P450.

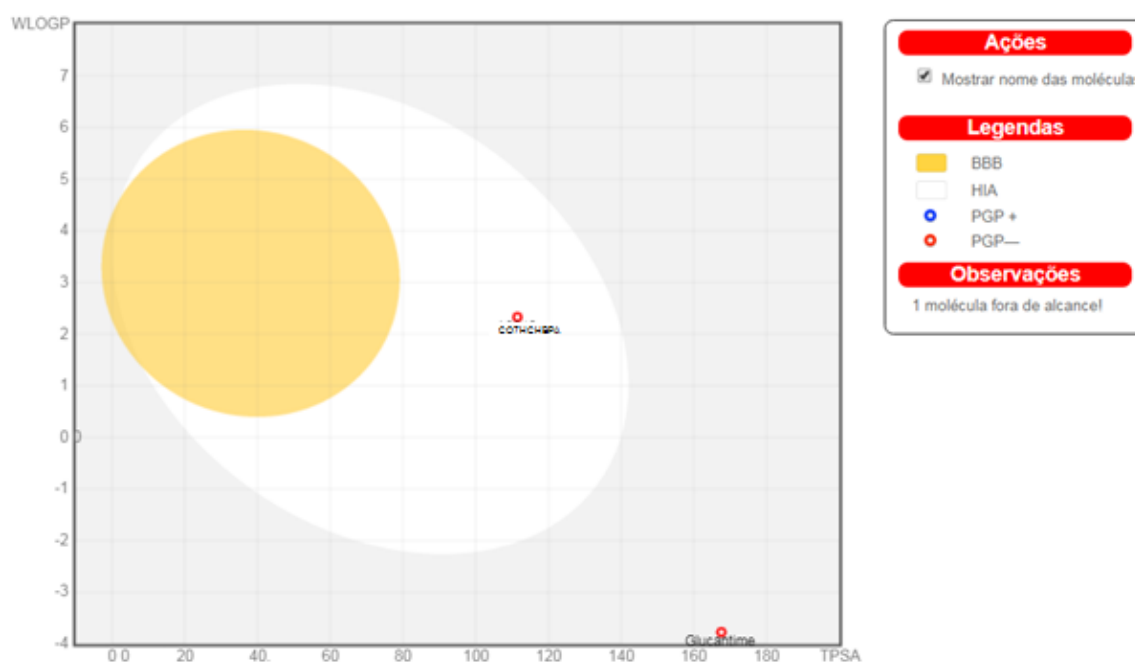
**Tabela 9 – Parâmetros de farmacocinética.**

| Parâmetros de farmacocinética      | Co7HCHBPA    | Glucantime    | Anfotericina B |
|------------------------------------|--------------|---------------|----------------|
| <b>Absorção TGI</b>                | Alto         | Baixo         | Baixo          |
| <b>Permeante a BHE</b>             | Não          | Não           | Não            |
| <b>Substrato P-gp</b>              | Não          | Não           | Sim            |
| <b>Inibidor da CYP1A2</b>          | Não          | Não           | Não            |
| <b>Inibidor da CYP2C19</b>         | Não          | Não           | Não            |
| <b>Inibidor da CYP2C9</b>          | Não          | Não           | Não            |
| <b>Inibidor da CYP2D6</b>          | Não          | Não           | Não            |
| <b>Inibidor da CYP3A4</b>          | Não          | Não           | Não            |
| <b>Log K p (permeação cutânea)</b> | -7,49 cm / s | -11,34 cm / s | -11,94 cm / s  |

Fonte: Autor

O gráfico BOILED-Egg dos compostos analisados está ilustrado abaixo (Figura 28). O resultado ilustrado prevê que o metalocomplexo Co7HCHBPA é bem absorvido, mas não acessa o cérebro (em branco), é PGP negativo; o Glucantime não é absorvido e não penetra no cérebro (fora do ovo), além de ser PGP negativo; e a Anfotericina B não está ilustrada, pois segundo a ferramenta, a molécula está fora de alcance.

Figura 28 – Gráfico BOILED-Egg.



No quesito similaridade às drogas, neste trabalho levamos em consideração a regra de Lipinski, que dispõe uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: log P maior ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. Como resultado a molécula pode apresentar uma violação a um destes parâmetros apenas para ser candidato a fármaco. Portanto, estas regras permitem uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas. O metalocomplexo Co7HCHBPA viola apenas uma regra, massa molecular menor ou igual a 500, e pode ser considerado como um candidato fármaco. O Glucantime também viola apenas uma, doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. A anfotericina B viola três regras, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5.

Os resultados das análises de absorção e toxicidade (Tabelas 10 e 11) realizados no pkCSM estão dispostos na tabela abaixo. O metalocomplexo CO7HCBPA apresentou uma taxa de absorção intestinal de 99.193%, além de não ser hepatotóxico, mostrando-se promissor para um futuro desenvolvimento de um fármaco oral.

**Tabela 10 – Análise de absorção.**

| Absorção                     | Co7HCHBPA                         | Glucantime                          | Anfotericina B                      |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Solubilidade em água         | -2,783 log mol / L                | -1.539 log mol / L                  | -2.937 log mol / L                  |
| Permeabilidade Caco2         | 0,49 log Papp em $10^{-6}$ cm / s | -0.231 log Papp em $10^{-6}$ cm / s | -0.597 log Papp em $10^{-6}$ cm / s |
| Absorção intestinal (humana) | 99.193%                           | 8.893%                              | 0%                                  |
| Permeabilidade da pele       | -2,734 log Kp                     | -2.836 log Kp                       | -2.735 log Kp                       |
| Substrato da glicoproteína P | Não                               | Não                                 | Sim                                 |
| Inibidor da glicoproteína P  | Sim                               | Não                                 | Não                                 |
| Inibidor da glicoproteína II | Sim                               | Não                                 | Não                                 |

Fonte: Autor.

Tabela 11 – Análise de toxicidade

| Toxicidade                                       | Co7HCHBPA                  | Glucantime                 | Anfotericina B             |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Toxicidade por AMES                              | Sim                        | Não                        | Não                        |
| Máx. dose tolerada (humana)                      | -0,085 log mg / kg / dia   | 1.788 log mg / kg / dia    | 0.292 log mg / kg / dia    |
| Inibidor de hERG I                               | Não                        | Não                        | Não                        |
| Inibidor de hERG II                              | Sim                        | Não                        | Não                        |
| Toxicidade aguda por via oral em ratos (LD50)    | 2,757 mol / kg             | 1.88 mol / kg              | 2.518 mol / kg             |
| Toxicidade crônica em ratos por via oral (LOAEL) | 0,679 log mg / kg_bw / dia | 4.505 log mg / kg_bw / dia | 2.049 log mg / kg_bw / dia |
| Hepatotoxicidade                                 | Não                        | Não                        | Não                        |
| Sensibilização da pele                           | Não                        | Não                        | Não                        |
| Toxicidade por <i>T. pyriformis</i>              | 0,285 log ug / L           | 0.285 log ug / L           | 0.285 log ug / L           |
| Toxicidade Minnow                                | 0,059 log mM               | 5.758 log mM               | 11.261 log mM              |

Fonte: Autor

Na análise farmacocinética realizamos uma predição da absorção intestinal humana e da permeabilidade da barreira hematoencefálica através da leitura do modelo BOILED-Egg (Figura 28). O resultado ilustrado prevê que o metalocomplexo Co7HCHBPA é bem absorvido, mas não acessa o cérebro, é PGP negativo; o Glucantime não é absorvido e não penetra no cérebro, além de ser PGP negativo; e a Anfotericina B não está ilustrada, pois segundo a ferramenta, a molécula ficou fora de alcance. Outro conceito fundamental é o conhecimento sobre os compostos serem

ou não substrato da Glicoproteína P (P-gP), dada sua associação a multirresistência à fármacos e seu envolvimento no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos (AZEREDO, UCHÔA e COSTA, 2009). Outro conhecimento essencial aqui analisado é a interação de moléculas com os citocromos P450 (CYP). Essas isoenzimas participam da eliminação de medicamentos por biotransformação metabólica (WOLF, SMITH e SMITH, 2000). A inibição dessas isoenzimas é certamente uma das principais causas de interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética (HOLLENBERG, 2002; HUANG et al., 2008) levando a efeitos adversos tóxicos ou outros efeitos indesejados devido à menor depuração e acúmulo do medicamento ou de seus metabólitos (KIRCHMAIR et al., 2015). Van Waterschoot e Schinkel (2011) sugeriram que o CYP e a P-gp podem processar pequenas moléculas sinergicamente para melhorar a proteção de tecidos e organismos. Pode-se estimar que 50 a 90% das moléculas terapêuticas são substrato das cinco principais isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) (WOLF, SMITH e SMITH, 2000; DI, 2014). Nosso composto não é substrato da P-gP e não se mostrou inibidor de citocromos P450. Outro importante parâmetro avaliado está associado a permeação cutânea. Dizemos que uma substância possui permeação cutânea quando esta é capaz de atingir a derme, porém não atinge os vasos sanguíneos. O metalocomplexo aqui analisado apresenta um valor de  $\log K_p$  ( $K_p$  é o coeficiente de partição octanol/água) de -7,49 cm/s, o qual está abaixo da faixa considerada ótima, ou seja,  $\log K_p$  entre 2 e 3 (CORNELIO e MAYORGA, 2007), demonstrando que este metalocomplexo em questão não se mostrou promissor para o desenvolvimento de um medicamento tópico para o tratamento de leishmaniose.

Os parâmetros de absorção e toxicidade foram analisados no software pkCSM. A solubilidade de compostos orgânicos é normalmente representada por  $\log S$ , onde  $S$  é a concentração do composto em mol/L. Na prática, cerca de 85% dos fármacos tem valores de  $\log S$  entre -1 e -5 e virtualmente não tem valores abaixo de -6, (JORGENSEN et al., 2002; HUUSKONEN et al., 1998). Empiricamente, é aparente que o alvo de  $\log S$  entre -1 a -5 para a maioria dos fármacos reflita a relação entre a polaridade necessária para razoável solubilidade aquosa e a hidrofobicidade necessária para a passagem aceitável de membrana (JORGENSEN et al., 2002). O metalocomplexo Co7HCBPA aqui analisado apresentou um valor de -2,783  $\log \text{mol/L}$ , mostrando-se virtualmente ótimo.

Modelos baseados em células humanas, como o sistema Caco-2, tem sido larga e eficientemente usado nos estudos de permeabilidade intestinal. (HOU et al., 2004; LAU et al., 2004; HIDALGO, RAUB e BORCHARDT et al., 1989). Muitos estudos têm demonstrado que a absorção oral de compostos em humanos tem uma boa correlação com sua permeabilidade em células Caco-2, fornecendo uma medida importante para estimar a captação de fármacos administrados por via oral (FERNANDES et al., 2012; GONÇALVES, SOUZA e STORPIRTIS, 2009; BALIMANE, CHONG e MORRISON, 2001). A literatura tem sugerido que compostos com coeficientes de permeabilidade menores do que  $1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , entre  $1$  e  $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  e maiores do que  $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  podem ser classificados, respectivamente, como fármacos pouco absorvidos (0–20%), moderadamente absorvidos (20–70%) e bem absorvidos (70–100%). 63,85-86. O composto aqui analisado demonstrou um valor de 0,49 log Papp em  $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , sendo classificado como pouco absorvido. Sob a absorção dos medicamentos, o intestino delgado possui uma área de superfície ampla para a absorção de fármacos no trato GI, sendo suas membranas mais permeáveis que as do estômago. A maioria dos fármacos é absorvida, principalmente no intestino delgado. Após a análise o composto aqui estudado demonstrou uma ótima taxa de absorção (99.193%).

Na análise de toxicidade o primeiro parâmetro analisado foi toxicidade para AMES. O ensaio de reversão de mutação em *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames, Teste de *Salmonella* ou Ensaio do Microsoma, é um ensaio de metagênese de curto termo que visa a identificação de substâncias com potencial para induzir mutações gênicas de tipo *frameshift* ou por substituição de pares de bases (MORTELMANS e ZEIGER, 2000). Um teste positivo indica que o composto é mutagênico e, portanto, pode atuar como um agente cancerígeno (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Segundo a análise, nosso composto mostrou-se positivo, ou seja, possui um potencial cancerígeno.

A dose tolerada máxima (DTM) recomendada fornece um limiar de dose tóxica de produtos químicos em humanos. O modelo é treinado usando 1222 pontos de dados experimentais de ensaios clínicos em humanos e prevê o logaritmo do DTM (log mg/kg/dia). Isso auxilia na orientação da dose inicial máxima recomendada para medicamentos nos ensaios clínicos de fase I, que atualmente se baseiam em extrapolações de dados com animais (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Para um determinado composto, um DTM menor ou igual a 0,477 log (mg/kg/dia) é

considerado baixo, e a análise do nosso composto demonstrou um valor de -0,085 log mg/kg/dia.

hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) é um gene humano que codifica a subunidade formadora de poros do canal retificador  $K^+$ , importante para a repolarização cardíaca (LAMOTHE et al., 2016). A inibição dos canais de potássio codificados pelo hERG é a principal causa para o desenvolvimento da síndrome do QT longo, levando a arritmia ventricular fatal. A inibição dos canais hERG resultou na retirada de muitas substâncias do mercado farmacêutico (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). A análise de nosso composto mostrou que o mesmo não inibe hERG I, contudo, mostrou-se inibidor de hERG II.

Outro fator importante que deve ser considerado é a potência tóxica de composto em penitencial. Os valores de dosagem letais (LD50) são uma medida padrão da toxicidade aguda usada para avaliar a toxicidade relativa de diferentes moléculas (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). O LD50 é a quantidade de um composto administrado de uma só vez que causa a morte de 50% de um grupo de animais de teste, sendo o valor resultante da nossa análise 2,757 mol/kg. A exposição a doses baixas e moderadas de produtos químicos por longos períodos de tempo é motivo de grande preocupação em muitas estratégias de tratamento. Os estudos crônicos visam identificar a dose mais baixa de um composto que resulta em um efeito adverso observado (LOAEL) e a dose mais alta na qual nenhum efeito adverso é observado (NOAEL) (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). O composto aqui analisado demonstrou um valor baixo de LOAEL 0,679 log mg/kg<sub>bw</sub> /dia.

A lesão hepática induzida por medicamentos, também conhecida como hepatite medicamentosa, ou chamada pelo termo DILI (*Drug Induced Liver Injury*) caracteriza-se como uma doença comum do fígado que se manifesta geralmente entre um e 90 dias após a administração do medicamento em doses usuais (TAJIRI e SHIMIZU, 2008). O quadro clínico da doença é variável, e pode ocorrer desde a ligeira alteração das enzimas hepáticas até a insuficiência hepática fulminante, levando ao óbito (LUNARDELLI et al., 2016). A lesão hepática induzida por drogas é uma grande preocupação de segurança para o desenvolvimento de drogas e uma causa significativa de atrito com drogas (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Em nossa análise o metalocomplexo não se mostrou hepatotóxico. A sensibilização da pele é um efeito adverso potencial para produtos aplicados por via dérmica. A avaliação de se um composto que pode encontrar a pele pode induzir dermatite alérgica de contato

é uma importante preocupação de segurança (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Em nossa análise o composto não se mostrou capaz de induzir reações alérgicas na pele.

Encerrando a análise *in silico* foram avaliados os testes de toxicidade para *T. Pyriformis* e Minnow. *T. Pyriformis* é uma bactéria protozoária, cuja toxicidade é frequentemente usada como um ponto final tóxico. Este método construiu a concentração de 1.571 compostos necessários para inibir 50% do crescimento (IGC50) (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Para um dado composto, o pIGC50 (logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% é previsto um crescimento em log ug/L), com um valor  $> -0,5 \log \text{ ug / L}$  é considerado tóxico. Nossa análise mostrou que o composto aqui testado apresentou um valor de  $0,285 \log \text{ ug / L}$ , não se mostrando tóxico. O *Flathead Minnows* (*Pimephales promelas*) é uma espécie de peixe de água doce. No teste Minnow, os valores da concentração letal (CL50) representam a concentração de uma molécula necessária para causar a morte de 50% dos *Flathead Minnows*. Para um dado composto, será previsto um log LC50. Valores de CL50 abaixo de 0,5 mM ( $\log \text{ LC50} < -0,3$ ) são considerados como alta toxicidade aguda (PIRES, BLUNDELL e ASCHER, 2015). Em nossa análise obtivemos um valor de  $0,059 \log \text{ mM}$ , apresentando assim toxicidade aguda.

***In vitro* activity on *Leishmania amazonensis* promastigote forms of a new CO(II) coordination complex**

***Atividade in vitro em formas promastigotas de Leishmania amazonenses de um novo complexo de coordenação CO(II)***

DOI:10.34117/bjdv7n2-202

Recebimento dos originais: 09/01/2021

Aceitação para publicação: 09/02/2021

**Aline Rodrigues de Mesquita Lorete-Terra**

PhD Student on the Program in Translational Biomedicine (BioTrans)  
University of Grande Rio Prof. José de Souza Herdy - UNIGRANRIO  
Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203 - Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, 23070-200,  
Brazil  
E-mail: alinelorete@gmail.com

**Jéssica Marques da Costa Tostes**

Biologist  
State University of the West Zone of Rio de Janeiro - UEZO  
Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203 - Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, 23070-  
200, Brazil  
E-mail: jessicamtostes@hotmail.com

**Renato Augusto Da Matta**

Professor of Cell Biology  
State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro - UENF  
Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque California, Campos dos Goytacazes - RJ, CEP:  
28013-602, Brazil  
E-mail: renato@uenf.br

**Celso Barbosa de Santanna Filho**

Professor of Cell Biology  
INMETRO  
Av. Nossa Sra. das Graças -50 - Xerém, Duque de Caxias - RJ, 25250-020, Brazil  
E-mail: celso.santanna@gmail.com

**Christiane Fernandes**

Professor of Chemical synthesis  
Federal University of Santa Catarina - UFSC  
Departamento de Química- Universidade Federal de Santa Catarina- Campus Trindade.  
Florianópolis-SC, 88040-900, Brazil  
E-mail: christiane.horn@ufsc.br

**Adolfo Horn Junior**

Professor of Chemical synthesis  
Federal University of Santa Catarina - UFSC  
Departamento de Química- Universidade Federal de Santa Catarina- Campus Trindade.  
Florianópolis-SC, 88040-900, Brazil  
E-mail: adolfo@uenf.br

**Fabio da Silva de Azevedo Fortes**

Professor of Physiology, Pathology and Biophysics  
State University of the West Zone of Rio de Janeiro - UEZO  
Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203 - Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, 23070-200, Brazil  
E-mail: fabiofortes@hotmail.com

**Sérgio Henrique Seabra**

Professor of Parasitology  
State University of the West Zone of Rio de Janeiro - UEZO  
Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203 - Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, 23070-200, Brazil  
E-mail: seabrash@gmail.com

**ABSTRACT**

Leishmaniasis is a complex disease that is considered a serious public health problem. The disease is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by vectors of the phlebotomine subfamily. The species *Leishmania amazonensis* causes diffuse cutaneous leishmaniasis (LCD). Current therapy for leishmaniasis causes several side effects and generates drug-resistant strains. This situation stimulated the search for alternative treatments, such as the use of metallocomplexes. The action of metallocomplexes has been studied in several species of parasites of *Trypanosomatidae* family, including species of *L. amazonensis*. In this study, we verified the effect of a new Co(II) complex, against promastigotes of *L. amazonensis* of strain WHOM / BR / 75 / Josefa. *In vitro* antiproliferative tests, feasibility analysis and electronic microscopy were performed. The *in vitro* tests showed that this complex inhibits the growth of the promastigote forms of *L. amazonensis* in a dose-time dependent manner. The complex was also able to induce morphological changes, such as changes in the shape of the cell body, shortening of flagellum, formation of double flagellum, invaginations in the cell body of parasite.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, Co (II) complex.

**RESUMO**

A leishmaniose é uma doença complexa considerada um grave problema de saúde pública. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida por vetores da subfamília dos flebotomíneos. A espécie *Leishmania amazonensis* causa leishmaniose tegumentar difusa (LCD). A terapia atual para leishmaniose causa vários efeitos colaterais e gera cepas resistentes a medicamentos. Essa situação estimulou a busca por tratamentos alternativos, como o uso de metalocomplexos. A ação dos metalocomplexos tem sido estudada em várias espécies de parasitas da família *Trypanosomatidae*, incluindo espécies de *L. amazonensis*. Neste estudo, verificamos o efeito de um novo complexo de Co (II), contra promastigotas de *L. amazonensis* da cepa WHOM / BR / 75 / Josefa. Foram realizados testes antiproliferativos *in vitro*, análise de viabilidade e microscopia eletrônica. Os testes *in vitro* mostraram que este complexo inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose-tempo dependente. O complexo também foi capaz de induzir alterações morfológicas, como alterações na forma do corpo celular, encurtamento do flagelo, formação de flagelo duplo, invaginações no corpo celular do parasita.

**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*, complexo Co (II), MEV.

## 1 INTRODUCTION

Leishmaniasis consist of a wide spectrum of diseases caused by more than 20 different species of protozoa belonging to the genus *Leishmania* (MARSDEN, 1986; ASHFORD, 2000; WHO 2020) and are considered by the World Health Organization as an important public health problem, as well as a neglected tropical disease (WHO, 2020). Parasites belonging to the *Leishmania* genus have a complex life cycle that involves both vertebrate and invertebrate hosts. Two stages of development are found: (i) promastigote, proliferative form found in the lumen of the intestine of the female insect and (ii) amastigote, proliferative form found in various types of mammalian host cells (TEIXEIRA, 2013), which can be hematopoietic or no, such as keratinocytes, Langerhans cells, neutrophils, macrophages and fibroblasts, the macrophage being considered the main host cell in which the parasite can survive and multiply using immune system evasion mechanisms (MOUGNEAU, BIHL and GLAICHENHAUS, 2011; KEYE and SCOTT, 2011; ASHOK and ARCHANA-ORBEA, 2014, SOUSA et al., 2014).

Leishmaniasis is basically classified as cutaneous (LC) and visceral (LV). According to the WHO, of the 200 countries and territories that report to WHO, 97 countries and territories were endemic for leishmaniasis in 2018. This includes 68 countries endemic to LV and LC, 8 countries endemic only to LV and 21 countries endemic only for LC (WHO, 2020). LC is caused by *L. major* and *Leishmania tropica* in the Middle East and Central Asia, and *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* complex in the Americas. Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) is a serious and chronic infection (SAVOIA, 2015). In Brazil, *L. amazonensis* is one of the species responsible for the cutaneous form of the disease; however, in some individuals the immune system cannot fight the parasite, leading to clinical manifestations of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (MARSDEN and JONES, 1985). DCL was first described by in the Brazilian Amazon, in the state of Para by Silva (1958), who described the first clinical findings on a rare form of cutaneous leishmaniasis, highlighting the nature of keloid lesions on the skin and lesions in the bone tissue of the extremities (hands and feet) (SILVEIRA, 2009).

Currently, the pentavalent antimonial compound, Glucantime® (meglumine antimoniate), and Amphotericin B are used in the treatment of leishmaniasis as first and second line drugs, respectively, being applied intramuscularly or intravenously. However, both are not very efficient because they often cause side effects, such as arthralgia, myalgia, nausea, tachycardia, fever and vomiting, in addition to being expensive drugs

(NEVES, 2007; MS, 2009; DE SOUZA et al., 2013). Given the scenario, there is an imminent need to develop new drugs.

Metallocomplexes are composed of transition metals, coordinated with drugs, and present possibilities of coordination and geometries with the ligand (drug) (VAN RIJT and SADLER, 2009). This coordination allows to interact with the specific molecular target, mainly with biological molecules (FRICKER, 2007) allowing the increase of lipophilicity (AHMAD, 2006; BRUIJNINCX and SADLER, 2008). Some studies have already shown that the coordination of compounds can be an alternative in antiparasitic therapy, in addition to also demonstrating an effect on tumor cells. Compounds containing copper or cobalt ions bound to the ligand (5-methyl-1,2,4-triazole [1,5-a] pyrimidine – 7 (4H) -one) (HmtpO) demonstrated an effect on the energy metabolism of parasites *Leishmania infantum* and *L. brasiliensis* at the level of NAD<sup>+</sup> / NADH balance and in the membranes of organelles, causing their degradation and cell death (RAMIREZ-MACIAS et al., 2011).

Studies by our group have shown that coordination compounds with iron (III), Zn (II) and Cu (II) can control the growth of *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis, and even promote the death of the parasite (PORTES et al., 2018). The complexes reduced the growth of *T. gondii* and, at the same time, caused low cytotoxicity in the host cells. In addition, one of the complexes used induced distinct morphological and ultrastructural changes in the parasites including bubbles and membrane cracks in the cytoplasm, with inclusions similar to amylopectin granules, which are normally found in bradyzoites and triggered the formation of cysts-like forms (PORTES et al., 2017; 2018). Considering that it has already been demonstrated that coordination compounds can be used as a good antiparasitic strategy, the objective of this work was to evaluate the leishmanicidal effect of the new Co(II) complex, against the extracellular form (promastigote) of *L. amazonensis*, in addition to the analysis of cytotoxicity in macrophages (J774A.1).

## 2 METHODS AND METHODS

### 2.1 CELL CULTURE OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

The promastigote forms of *L. amazonensis* were obtained from the differentiation of amastigotes isolated from lesions in Balb/C mice and grown in Warren's medium, (BHI - Brain Heart Infusion - Sigma®) plus 20 µg / L hemin - Sigma® and 10 µg / mL folic acid - Sigma®, in inoculum of 5% of volume plus 10% of fetal bovine serum (FBS)

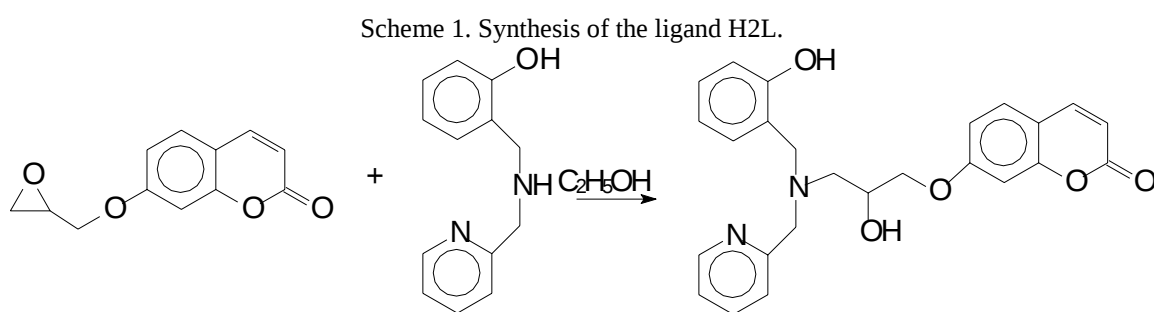
(Gibco-Thermo Fisher Scientific®) in bottles for sterile cultures and kept at temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The samples were maintained through weekly passages up to a total of six passages, ensuring that the parasites used in the experiments remained infectious.

## 2.2 CULL CULTURE OF MACROPHAGES LINEAGE J774A.1

Macrophages of mice (*Mus musculus*), J774A.1 (ATCC® TIB-67™), with initial inoculum of  $5 \times 10^3$ , were kept in  $75\text{cm}^3$  plastic bottles, containing RPMI-1640 Medium (Thermo Fisher Scientific®) supplemented with 10% FBS (Gibco-Thermo Fisher Scientific®) and antimicrobials, penicillin (100U/mL) and streptomycin (130U/mL). Every 48 h or after the formation of confluent monolayers, cultures were treated with trypsin/EDTA solution to obtain subcultures of these cells. In the day before the experiments,  $10^4$  were plated in 96-well plates (Costar 3606).

## 2.3 SYNTHESIS OF THE LIGAND H2L

The ligand was obtained as described in Scheme 1, by the reaction between equimolar amount of the epoxide (4g, 18 mmol) and HBPA (3g), in 100 mL of ethanol, under reflux, for 5 days. The reaction was follow by TLC, using ethanol as eluent. Subsequently, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was to  $50\text{ cm}^3$  of water. The compound was extracted with five  $50\text{ cm}^3$  portion of  $\text{CHCl}_3$  and the extracts were combined, washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. A orange oil was obtained.

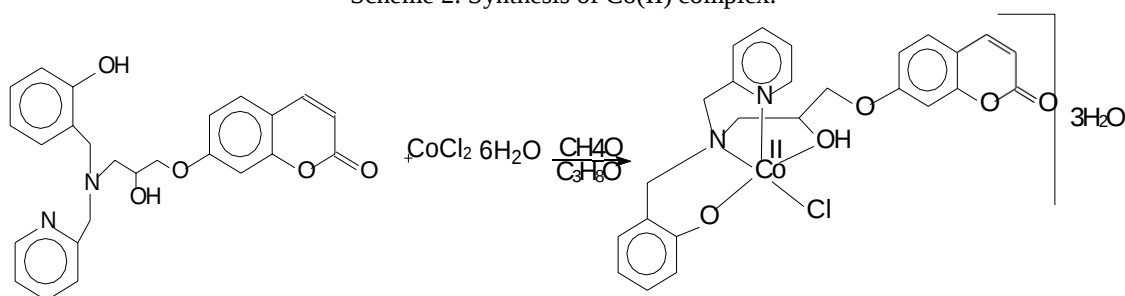


## 2.4 SYNTHESIS OF $[\text{Co}(\text{HL})\text{Cl}](\text{H}_2\text{O})_3$

The cited complex (Scheme 2) was prepared by the reaction between the ligand H2L (1 mmol, 432 mg) and  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 mmol, 237 mg), in methanol/propan-2-ol (1:1), at room temperature. After allowing the purple solution to stand for a few days, purple crystals were filtered off, washed with cold propan-2-ol and dried in a desiccator.

Yield: 70 mg (7%). m.p.: 245°C. Anal. Calcd. for  $C_{25}H_{29}ClCoN_2O_8$ ; MW= 579.90 g mol<sup>-1</sup>: C, 51.78; H, 5.04; N, 4.83. Found: C, 52.84; H, 5.15; N, 4.79. The IR spectrum exhibits bands at 3412 (ν OH), 3068 (aromatic CH), 2970-2864 (aliphatic CH), 1506, 1477, 1444, 1400 (ν C=N and C=C), and at 779 cm<sup>-1</sup> (δ C-H), ESI(+)-MS spectrum shows a peak with *m/z* of 490, attributed to the Co(III) complex: [Co(III)(HL)]<sup>+</sup>, as a result of desprotonation of the ligand H2L with the releasing of a HCL molecule from the starting complex. Electronic spectrum of Co(II) complex, in DMSO, presents two d-d transitions at 596 nm (122 dm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) e outra em 689 nm (46 dm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

Scheme 2. Synthesis of Co(II) complex.



## 2.5 ANALYSIS OF THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT IN THE PROMASTIGOTE FORM OF *L. AMAZONENSIS*

For *in vitro* studies, the complex was diluted in DMSO (Dimethyl sulfoxide - Merck®) at a stock concentration of 50 mM and added directly to the culture medium. The final concentration of DMSO in the medium never exceeded 0.01% (v/v). The compost was stored at -22°C.

After 24 h of culture growth, the complex was added in concentrations (0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 20.0 μM). A control group was maintained, where the drug was not added. The parasites were cultured in the presence of the metalcomplex for up to 72 h of treatment, where aliquots were removed every 24 h for counting in a Neubauer chamber, after dilutions (1:10 and 1: 100) in formalin solution at 3,4- 3.6% formaldehyde in PBS (Phosphate buffered saline - 0.01M / pH 7.2) using a phase contrast optical microscope.

## 2. 6 ANALYSIS OF CYTOTOXICITY IN J774A.1 MACROPHAGES *IN VITRO*

The cytotoxicity threshold of the complex was evaluated on cell cultures of J774A.1 with increasing concentrations of the metalcomplex, followed by the viability analysis by Hoescht 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate, 100 mg - ThermoFisher), in addition to

MTT tests (Cytotoxicity test by the direct method). Controls were performed by adding the vehicle of each drug, in the DMSO case.

To evaluate the effect of the complex on the viability of J774A.1 cells, they were plated on 96-well plates (Costar 3606) incubated at  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ , at a concentration of  $5 \times 10^3$  cells per well, with increasing concentrations of each compound (0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 20.0; 50.0; 100.0  $\mu\text{M}$ ). The cultures were then grown in the presence of the nuclear marker Hoeschst 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate, 100 mg - ThermoFisher), at a concentration of 1  $\mu\text{L}$  by 5 mL in RPMI 1640 Media (Sigma-Aldrich) and 5% FBS. Every 24h, the reading was performed and images were obtained using the automated fluorescence optical microscope (In Cell - GE Healthcare Life Sciences), in the objective of 20, 9 quadrants, to be later analyzed in the specific software (InCell Analyzer 2000).

For the same evaluation to be made using the MTT colorimetric method, J774A.1 host cells, at a concentration of  $5 \times 10^3$  cells per well, were plated in 96-well plates (Costar 3606) incubated at  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5 %  $\text{CO}_2$ , with increasing concentrations of the complex (0.5; 1.0; 3.0; 5.0; 10.0; 20.0, 50.0, 100.00; 150.00 and 200.00  $\mu\text{M}$ ). After 48h, MTT solution (5mg / ml in PBS) was added to all wells, even those that did not have cells. For 4 h the cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Subsequently, 150  $\mu\text{L}$  was added per well of MTT solvent (1:1 of DMSO in isopropanol), the plate covered with aluminum foil was taken to the orbital shaker for 15 minutes. The reading was performed at an absorbance of 590nm with a reference filter of  $\lambda = 620\text{ nm}$ , TECAM spectrophotometer (Infinite® 200 PRO series).

## 2.7 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

The parasites treated with the complex (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) and not treated with the complex, for 36 h, and then were washed with serum-free medium. They were later collected by centrifugation and fixed in solution containing glutaraldehyde 2.5% and 4% of formaldehyde in sodium cacodylate 0.1 M with pH 7.4, dehydrated in acetone solutions (from 30 to 100%), dry using the critical point of  $\text{CO}_2$  and mounted in stubs. The samples were covered with gold (20-30 nm) for observation in Scanning Electron Microscope Jeol JSM 6490LV.

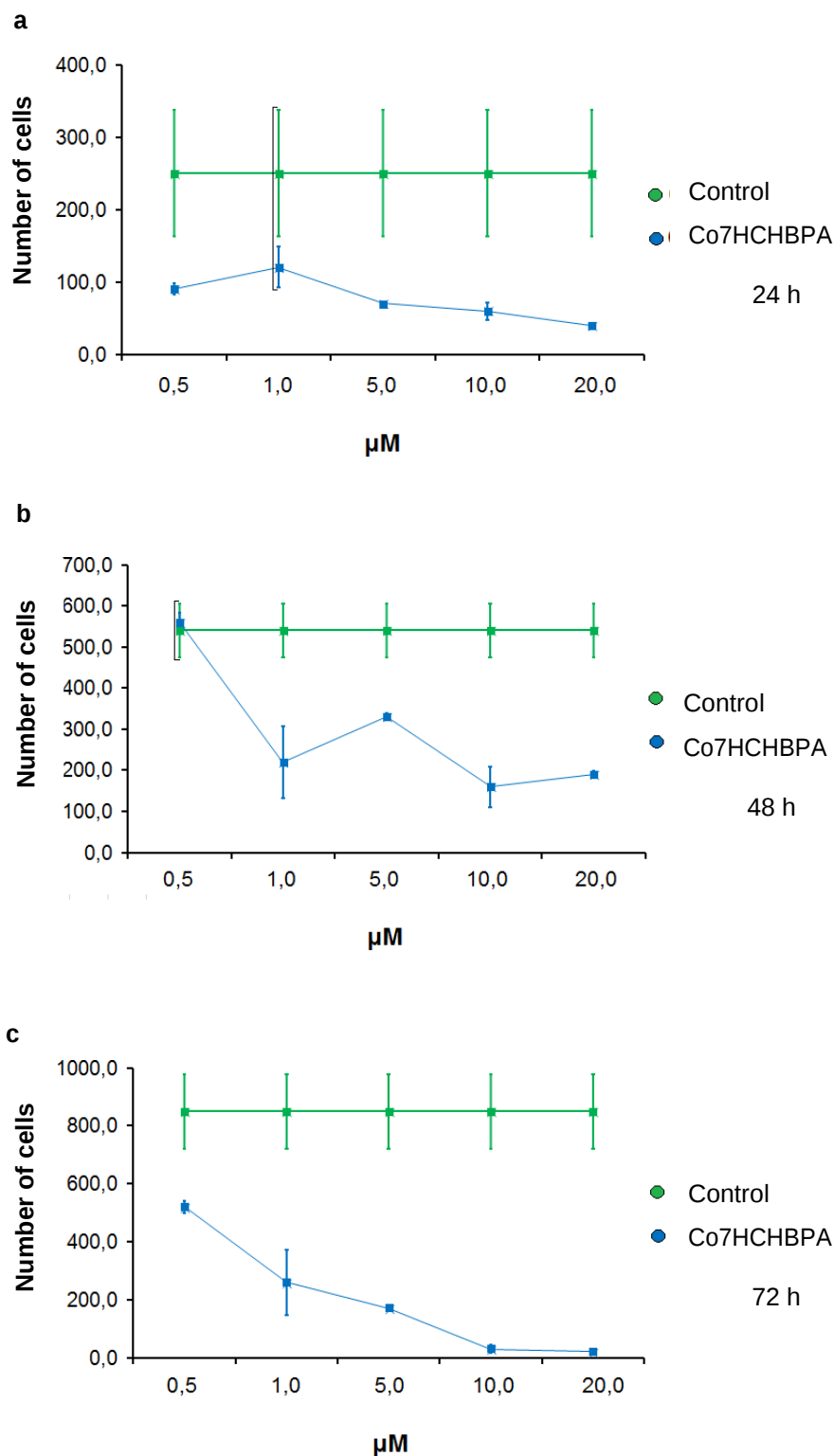
## 2.8 STATISTICAL ANALYSIS

The test data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The data were analyzed using the One-Way ANOVA test, followed by the Tukey test, using the Graphpad Prism 5 software. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## 3 RESULTS

The Co(II) complex was analyzed for its antiproliferative activity against the promastigote form of *L. amazonensis*. After treatment with this complex by 24 h, a considerable decrease in proliferation in *L. amazonensis* cultures was observed, compared to the untreated control, in all the concentrations employed. None of the concentrations showed values similar to the control (Figure 1a). The antiproliferative effect decreases after 48 h in relation to the control, which remained proliferating, in all concentrations, but mainly in the concentration of 0.5  $\mu\text{M}$ , where the culture showed greater growth than the control itself. The cultures treated with the 5.0  $\mu\text{M}$  concentration showed the greatest growth in relation to the other concentrations (1.0, 10.0 and 20.0  $\mu\text{M}$ ). Although the antiproliferative effect has decreased, cultures treated with a concentration of 1.0  $\mu\text{M}$  did not show growth close to the untreated control (Figure 1b). In 72 h of treatment, control remained proliferating, and cultures treated with 10.0 and 20.0  $\mu\text{M}$  stopped proliferating. Cultures treated with 1.0  $\mu\text{M}$  remained proliferating, and cultures treated with 0.5 and 5.0  $\mu\text{M}$  showed a decline in proliferation (Figure 1c). These results indicate that the drug has a time-dose-dependent effect, since despite the low proliferation in 24 h, the cultures proliferated again in 48 h, and again the proliferation decreased in 72 h. This effect was not observed only at the concentration of 1.0  $\mu\text{M}$ , which despite the decrease in proliferation compared to the control, presented a linear growth similar to the control.

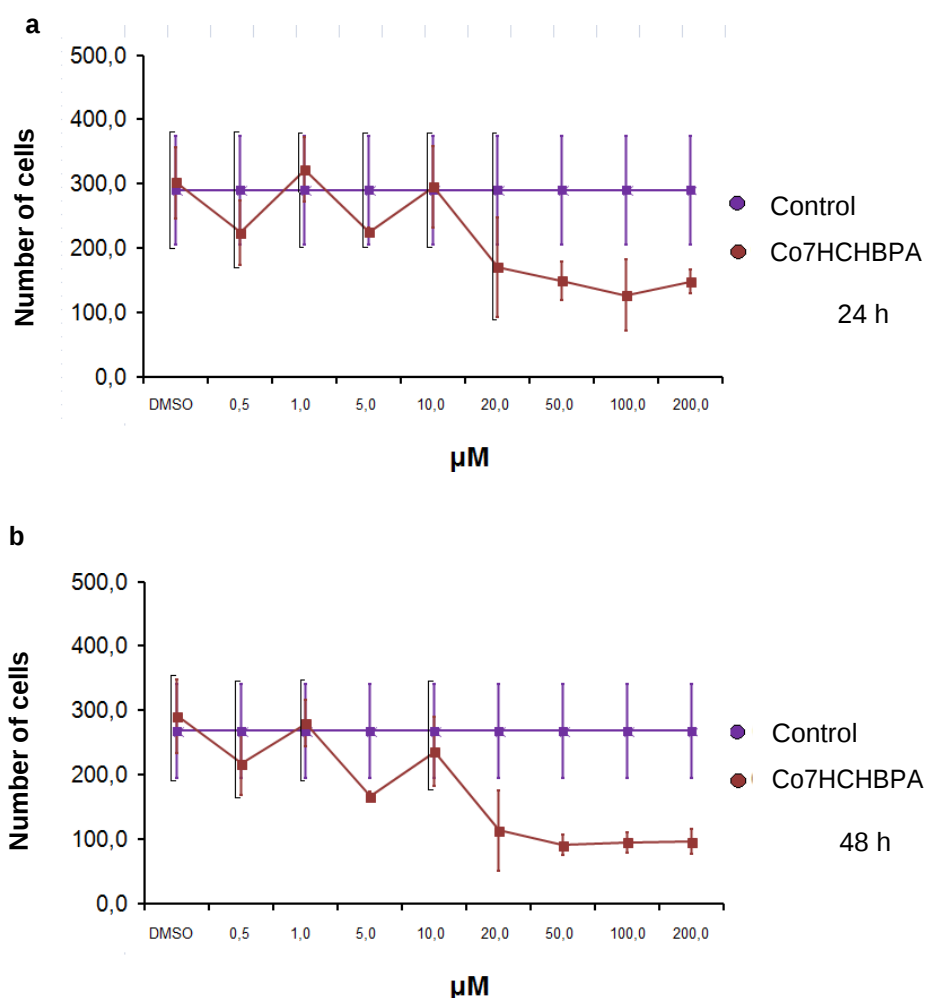
Figure 1: Antiproliferative assay in the promastigote form of the parasite *L. amazonensis*. (a) *L. amazonensis* treated with Co7HCHBPA for 24 h. (b) *L. amazonensis* treated with Co7HCHBPA for 48 h. (c) *L. amazonensis* treated with Co7HCHBPA for 72 h. The groups marked by square brackets do not differ within the same concentration, according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

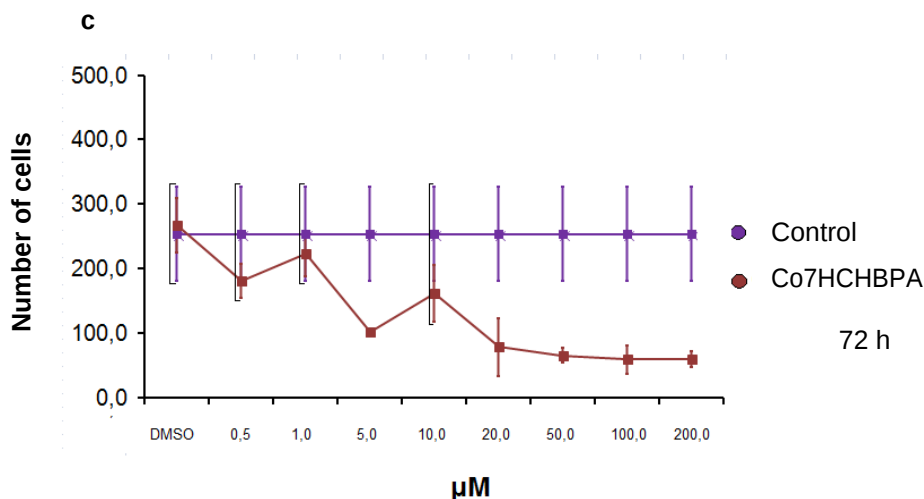


The J774A.1 macrophage antiproliferative activity of the complex was investigated. In 24 h, a considerable decrease in proliferation in macrophage cultures from

the concentration of 50.0  $\mu\text{M}$  was observed in comparison to controls. Concentrations of 0.5; 1.0; 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$  showed similar values to the control (Figure 2a). The antiproliferative effect remained similar to controls after 48 h at concentrations of 0.5; 1.0; 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ . Cultures treated with concentrations above 20.0  $\mu\text{M}$  showed a marked reduction in their growth (Figure 2b). In 72 h of treatment, controls remained proliferating, and cultures treated with 0.5, 1.0 and 10.0  $\mu\text{M}$  showed similar growth to controls. The cultures treated with 5.0  $\mu\text{M}$  showed a reduction in the proliferation. Cultures treated with concentrations above 20.0  $\mu\text{M}$  showed an even greater reduction in their growth (Figure 2c). These results indicate that the complex does not present cytotoxicity to macrophages in concentrations that were toxic to the promastigote form of *L. amazonensis*.

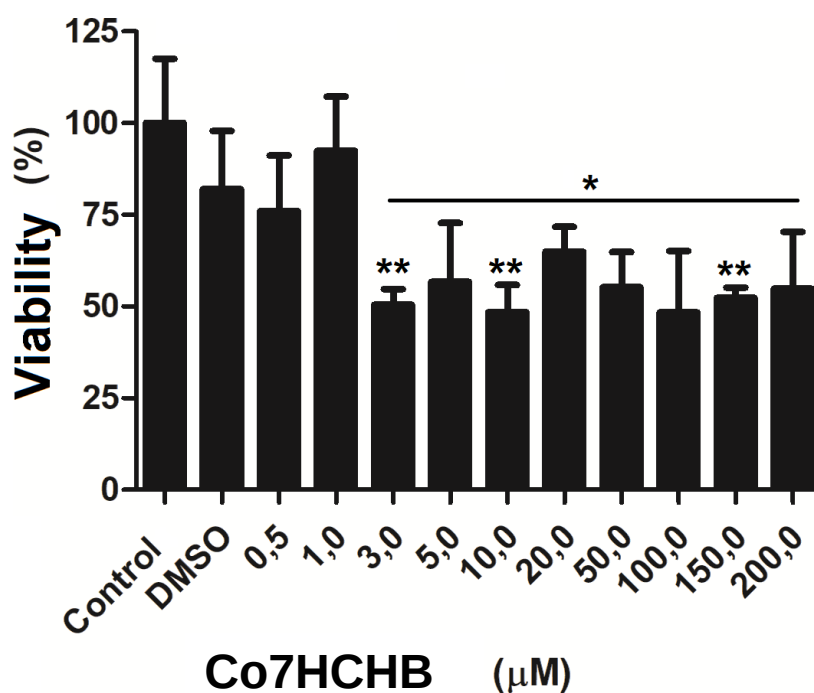
Figure 2: Antiproliferative assay on J774A.1 macrophages. (a) Macrophages treated with Co7HCHBPA for 24 h. (b) Macrophages treated with Co7HCHBPA for 48 h. (c) Macrophages treated with Co7HCHBPA for 72 h. The groups marked by square brackets do not differ within the same concentration, according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ).





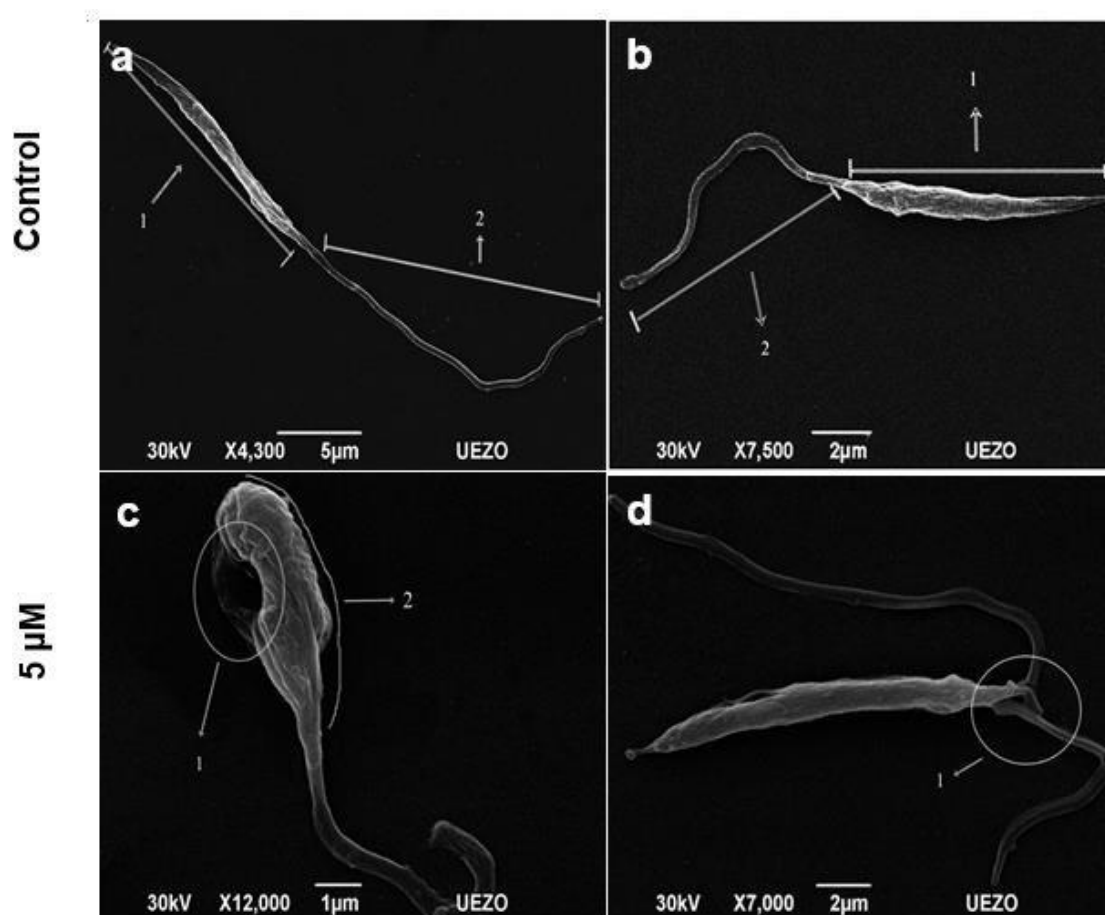
The toxicity of this complex for the J774A.1 strain was evaluated after treatment with different concentrations. By the MTT test it was observed that there was no statistical difference in relation to the control (Figure 3). We calculated the value of  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$  and the selectivity index (SI). In 24 h, we observed an  $IC_{50}$  value of 3.1 µM and  $CC_{50}$  of 205.66 µM, resulting in an SI value of 66.34.

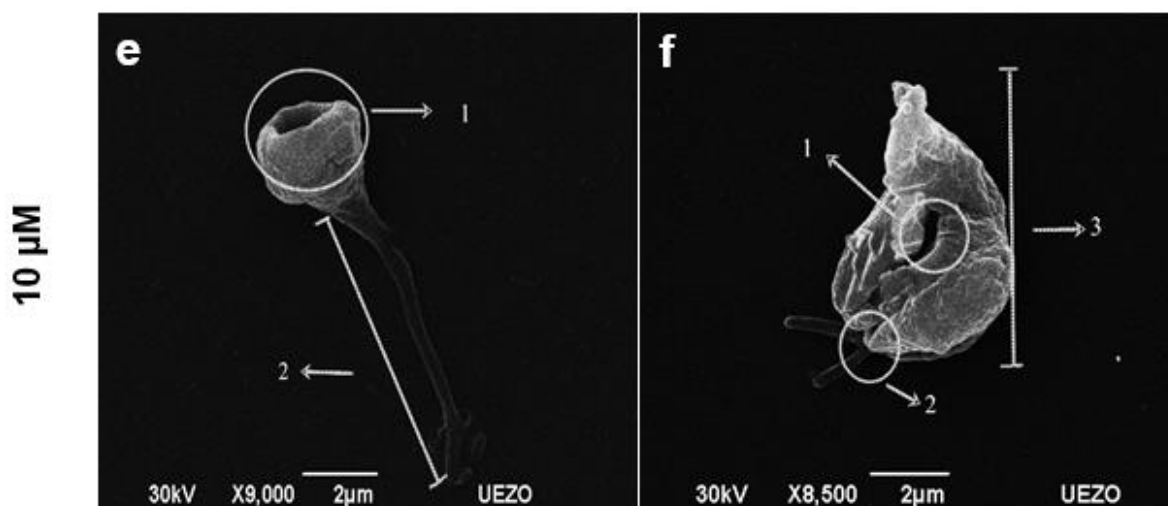
Figure 3: Viability of J774A.1 cells, after treatment with the Co7HCHBPA metallocomplex. The cell line J774A.1 was treated with increasing concentrations of the metallocomplex up to 200 µM, for 48 hours. Groups marked with an asterisk differ from the control, and groups marked with two asterisks differ from DMSO, according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ).



To observe the occurrence of changes in the morphology of the parasites treated with this complex, the promastigote forms of *L. amazonensis* were processed for observation by SEM (Figure 4). The images show that the treatment with this complex at concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$  concentrations, after 36 h, promotes changes in the promastigote forms of *L. amazonensis* (Figures 4c, 4d, 4e and 4f), which loses its normal elongated aspect (Figures 4a and 4b). The images revealed the presence of cells with more than one flagellum, shortening of the flagella, in addition to changes in the cell body, such as membrane invagination, reduction and rounding.

Figure 4: Scanning electron micrograph of *L. amazonensis* after 36 hours of treatment with 5  $\mu\text{M}$  of the Co7HCHBPA compound. (a and b) Untreated cells with an elongated and fusiform cell body (1) and flagellum logo (2), characteristic of the parasite. (c) Emergence of invaginations in the parasite membrane (1); changes in the shape and size of the parasite's cell body (2). (d) Occurrence of a double flagellum (1); (e) Emergence of invagination in the cell body (1) and changes in the size of the parasite's flagellum (2); (f) Emergence of invagination (1) reduction and formation of double flagellum (2), and the alteration and reduction in the cell body (3).





#### 4 DISCUSSION

In this work we evaluated the effects of a new Co(II) complex on the promastigote forms of *L. amazonensis* and macrophages J774A.1, *in vitro*. We observed that this complex under investigation presents a dose-time dependent antiproliferative effect (Figure 1) in the promastigote forms of *L. amazonensis*. Similar results have been observed in other studies. Palladium-coordinated compounds inhibited the growth of promastigotes in three species of *Leishmania*: *L. major*, *L. mexicana* and *L. donovani* (FRICKER et al., 2007); Lanthanide complexes were used in tests *in vitro* antiproliferative against activity *Leishmania* spp. and *T. cruzi* and demonstrated effects superior to the drugs already used (CABALLERO et al., 2014); Ruthenium complexes exhibited potent cytotoxic activity against all species *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* (COSTA et al., 2017); Several complexes with different metallic cores, including cobalt, have shown activity against *L. donovani* (HUBIN et al., 2019).

The cytotoxicity assessment tests on J774A.1 macrophages revealed that the complex studied here showed an antiproliferative effect on macrophages at concentrations that were toxic to *L. amazonensis* promastigotes (Figures 2 and 3). Other studies with complexes have already demonstrated that they do not have a cytotoxic effect in different strains of macrophages. Coordination compounds containing ruthenium were not toxic to the macrophage lineage RAW 264.7 (COSTA et al., 2017). Metallocomplexes with different metallic nuclei, including cobalt, did not show antiproliferative effect in THP-1 cells (HUBIN et al., 2019). In our studies, we also observed that this new Co(II) complex aggressively affected the growth rates and doubling time of the *L. amazonensis* promastigote forms, however, it did not show much interference in J774A.1 macrophage cultures. In our study, we observed an SI value of 66,34. In our study, we observed an SI

value of 66.34. Studies with *L. amazonensis* have shown that Glucantime has an SI of 1,39 and Amphotericin B has an SI of 22,34 (XAVIER et al., 2016) which demonstrates that our metallocomplex is promising.

Throughout this study, we observed, by scanning electron microscopy, that there are drastic morphological changes in the promastigote form of *L. amazonensis* caused by the Co(II) complex. The morphological effects were observed in the 36 h period (Figures 4 and 5). We observed that the parasite loses its normal elongated aspect, had more than one flagellum, shorter flagella, in addition to changes in the cell body, such as membrane invagination, reduction and rounding. These changes were attributed to the action of the complex, since the division of the parasite starts from the cell body to the flagellum, thus, the formation of the double flagellum characterizes an irregular division that begins with the flagellum. Under normal conditions, the parasite has specific characteristics such as spindle-shaped and elongated cell body and long flagellum.

## 5 CONCLUSION

Finally, we conclude that *in vitro* analyzes demonstrated that new Co(II) complex under investigation presents an antiproliferative effect in promastigote forms of *L. amazonensis* in concentrations that are not toxic to macrophages. Furthermore, the electronic microscopy assays revealed that this complex induces several morphological changes which may be associated with cell death induction by autophagy in the promastigote forms of *L. amazonensis*.

## REFERENCES

AHMAD, Saeed et al. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, n. 7, p. 1633-1645, 2006.

ASHFORD, Richard W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

ASHOK, Devika; ACHA-ORBEA, Hans. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 10, p. 499-507, 2014.

BRUIJNINCX, Pieter CA; SADLER, Peter J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.

CABALLERO, Ana B. et al. Lanthanide complexes containing 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4H)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 138, p. 39-46, 2014.

COSTA, Mônica S. et al. Anti-Leishmania activity of new ruthenium (II) complexes: Effect on parasite-host interaction. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 175, p. 225-231, 2017.

DA SILVA, Luciana Lemos Rangel et al. Further evidence that naphthoquinone inhibits Toxoplasma gondii growth in vitro. **Parasitology international**, v. 64, n. 6, p. 622-631, 2015.

De Souza W. Protozoologia Médica. Rubio, Rio de Janeiro, 2013.

FRICKER, Simon Paul. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton transactions**, n. 43, p. 4903-4917, 2007.

HUBIN, Timothy J. et al. Tetraazamacrocyclic derivatives and their metal complexes as antileishmanial leads. **Polyhedron**, v. 163, p. 42-53, 2019.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

MARSDEN, Phiplip D.; JONES, Tracey C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. **Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands**, p. 183-198, 1985.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7.ed. – Brasília Ministério da Saúde, 2009.

MOUGNEAU, Evelyne; BIHL, Franck; GLAICHENHAUS, Nicolas. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

NEVES, David Pereira; MELO Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marco; VITOR, Ricardo W. Almeida. **Parasitologia humana**. 11 a. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 2007.

PORTES, J. A. et al. In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 141-152, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.04.002.

PORTES, Juliana de A. et al. A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 117, n. 9, p. 2795-2805, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5967-7.

RAMÍREZ-MACÍAS, Inmaculada et al. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4 H)-one against *Leishmania* spp. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 813-819, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkq537.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 06, p. 588-596, 2015. DOI: 10.3855/jidc.6833.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SOUZA, Tayse Domingues et al. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary parasitology**, v. 200, n. 3-4, p. 233-241, 2014.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

VAN RIJT, Sabine H.; SADLER, Peter J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.

World Health Organization - WHO (2020). Leishmaniasis. <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. Acesso em 20 de Abril de 2020.

XAVIER, Francisco José Seixas et al. Synthesis and in vitro anti *Leishmania amazonensis* biological screening of Morita-Baylis-Hillman adducts prepared from eugenol, thymol and carvacrol. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1483, 2016.

**Evaluation of ultrastructural changes and cell death on *Leishmania amazonensis* promastigote forms induced by a new coordinated complex Co (II)**

**Avaliação de alterações ultraestruturais e morte celular em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* induzidas por um novo complexo coordenação Co (II)**

DOI:10.34117/bjdv7n2-584

Recebimento dos originais: 25/01/2021

Aceitação para publicação: 25/02/2021

**Aline Rodrigues de Mesquita Lorete-Terra**

PhD Student on the Program in Translational Biomedicine (BioTrans)

University of Grande Rio Prof. José de Souza Herdy - UNIGRANRIO

Address: Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ,  
Brazil

E-mail: alinelorete@gmail.com

**Renato Augusto Da Matta**

Professor of Cell Biology

State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Address: Av. Alberto Lamego, 2000, Parque California, Campos dos Goytacazes - RJ,  
Brazil

E-mail: renato@uenf.br

**Celso Barbosa de Santanna Filho**

Professor of Cell Biology

INMETRO

Address: Av. Nossa Sra. das Graças, 50, Xerém, Duque de Caxias - RJ, Brazil

E-mail: celso.santanna@gmail.com

**Christiane Fernandes**

Professor of Chemical synthesis

Federal University of Santa Catarina - UFSC

Address: Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina -  
Campus Trindade, Florianópolis - SC, Brazil

E-mail: christiane.horn@ufsc.br

**Adolfo Horn Junior**

Professor of Chemical synthesis

Federal University of Santa Catarina - UFSC

Address: Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina -  
Campus Trindade, Florianópolis - SC, Brazil

E-mail: adolfo@uenf.br

**Wanderley de Souza**

Professor of Parasitology

Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ

Address: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro - RJ, Brazil

E-mail: wsouza@biof.ufrj.br

**Fabio da Silva de Azevedo Fortes**

Professor of Physiology, Pathology and Biophysics

State University of the West Zone of Rio de Janeiro - UEZO

Address: Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, Brazil

E-mail: fabiofortes@hotmail.com

**Sérgio Henrique Seabra**

Professor of Parasitology

State University of the West Zone of Rio de Janeiro - UEZO

Address: Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, Brazil

E-mail: seabrash@gmail.com

**ABSTRACT**

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by vectors of the phlebotomine subfamily. In Brazil, the species *Leishmania amazonensis* is the etiological agent of the diffuse cutaneous form. Currently, the treatment employed is associated with several side effects, which stimulated the development of new alternatives for the treatment of this important neglected disease. Thus, metallocomplexes appear as a new alternative for antiparasitic therapy. Its action has been evaluated on different species of parasites of the *Trypanosomatidae* family, including species of the genus *Leishmania*. In this work, we evaluated the effect of a new Co (II) complex, against promastigotes of *L. amazonensis* of strain WHOM / BR / 75 / Josefa. Transmission electron microscopy (TEM) was performed to evaluate the parasite's ultrastructure and confocal laser microscopy to check for death by autophagy of the parasite. The complex was able to induce ultrastructural changes in the parasite, such as the formation of autophagic vacuoles near the pouch region flagellar and myelin figure formations. Finally, tests with anti-LC3B labeling indicated the possible death of the parasite by autophagy.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, Co(II) complex, TEM, autophagy.

**RESUMO**

As leishmanioses são doenças provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por vetores da subfamília dos flebotomíneos. No Brasil, a espécie *Leishmania amazonensis* é o agente etiológico da forma cutânea difusa. Atualmente, o tratamento empregado é associado a diversos efeitos colaterais, o que estimulou o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento desta importante doença negligenciada. Assim, os metalocomplexos surgem como uma nova alternativa de terapia antiparasitária. Sua ação tem sido avaliada em diferentes espécies de parasitas da família *Trypanosomatidae*, incluindo espécies do gênero *Leishmania*. Neste trabalho, avaliamos

o efeito de um novo complexo de Co (II), contra promastigotas de *L. amazonensis* da cepa WHOM / BR / 75 / Josefa. Foram realizadas microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliação da ultraestrutura do parasite e microscopia confocal a laser para verificar a morte por autofagia do parasita. Os resultados mostraram que o complexo foi capaz de induzir alterações ultraestruturais no parasita, como como formação de vacúolos autofágicos próximos a região da bolsa flagelar e formações de figura de mielina. Por fim, ensaios com marcação anti-LC3B indicaram a possível morte do parasita por autofagia.

**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*, complexo Co (II), MET, autofagia.

## 1 INTRODUCTION

Leishmaniasis are infectious and parasitic diseases that affect humans, caused by several species of protozoa of the genus *Leishmania* (ASHFORD, 2000; WHO 2020). According to the World Health Organization, they are considered an important public health problem, as well as a neglected tropical disease (WHO, 2020).

Parasites belonging to the genus *Leishmania* have a digenetic life cycle, living alternately in vertebrate hosts and vector insects, the latter being responsible for the transmission of parasites from one mammal to another (TEIXEIRA, 2013). In mammalian hosts, represented in nature by various orders and species, the parasites assume the amastigote shape, rounded and immobile, which multiplies in cells that may be hematopoietic or not, such as keratinocytes, Langerhans cells, neutrophils, macrophages and fibroblasts, however, the macrophage is considered the main host cell in which the parasite can survive and multiply (MOUGNEAU, BIHL and GLAICHENHAUS, 2011; KAYE and SCOTT, 2011; ASHOK and ARCH-ORBEA, 2014). In invertebrate hosts, leishmanias inhabit the lumen of the intestine of the female insect. There, the amastigote forms, ingested during the blood meal, differ in flagellate forms, morphologically and biochemically distinct from the amastigotes, being subsequently inoculated in the promastigote form in the skin of mammals during the bite (TEIXEIRA, 2013).

Leishmaniasis can present different clinical manifestations. In Brazil, the species *Leishmania amazonensis* is one of the species responsible for the cutaneous form of the disease; however, in some individuals the disease can evolve, leading to clinical manifestations of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (MARSDEN and JONES, 1985). DCL was first described in the Brazilian Amazon, in the state of Pará, by Silva (1958), who reported the first clinical findings in a rare form of cutaneous leishmaniasis,

highlighting the nature of keloid skin lesions and bone tissue lesions in extremities (hands and feet) (SILVEIRA, 2009).

The current treatment for leishmaniasis is the pentavalent antimonial drugs Glucantime® (meglumine antimoniate) and Amphotericin B, used in the first and second lines, respectively, being applied intramuscularly or intravenously. However, these drugs often cause side effects, such as arthralgia, myalgia, nausea, tachycardia, fever and vomiting, in addition to being expensive drugs (NEVES, 2007; BRASIL, 2009; DE SOUZA et al., 2013), thus, it is necessary to develop new drugs to be used in the treatment of this disease of great impact on public health.

Metallocomplexes are an excellent alternative. These compounds are made up of transition metals, coordinated with drugs, and have possibilities of coordination and geometries with the ligand (drug) (VAN RIJT and SADLER, 2009). This coordination allows to interact with the specific molecular target, mainly with biological molecules (FRICKER, 2007) allowing the increase of lipophilicity (AHMAD, 2006; BRUIJNINCX and SADLER, 2008). Several studies have already shown that metal-coordinated compounds can be an alternative in antiparasitic therapy. Compounds coordinated with lanthanides have shown antiparasitic potential against *L. infantum*, *L. brasiliensis* and *Trypanosoma cruzi*. Its *in vitro* activity was similar to or significantly exceeded those demonstrated by two of the most commonly used drugs for the treatment of leishmaniasis and Chagas disease, Glucantime and benznidazole, respectively (CABALLERO et al., 2014).

Studies by our group showed that coordination compounds with iron (III), Zn (II) and Cu (II) can control the growth of *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis, and even promote the death of the parasite (PORTES et al., 2018). The complexes reduced the growth of *T. gondii* and, at the same time, caused low cytotoxicity in the host cells. In addition, one of the complexes used induced distinct morphological and ultrastructural changes in the parasites (PORTES et al., 2017; 2018). Knowing that coordination compounds can be applied as a good antiparasitic strategy, this work aimed to evaluate the leishmanicidal effect of the new Co (II) complex, against the extracellular (promastigote) form of *L. amazonensis*, through the analysis of ultrastructure by Transmission Electron Microscopy (TEM), as well as evaluating the induction of parasite death by autophagy, using Confocal Laser Microscopy.

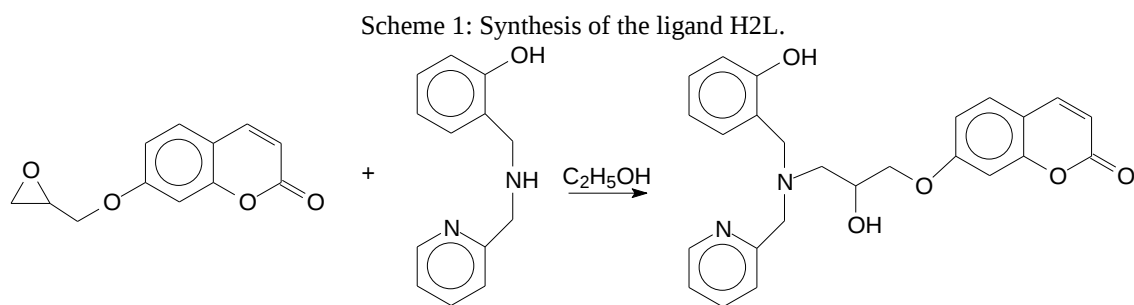
## 2 METHODS AND METHODS

### 2.1 CELL CULTURE OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

The promastigote forms of *L. amazonensis* were obtained from the differentiation of amastigotes isolated from lesions in Balb/C mice and grown in Warren's medium, (BHI - Brain Heart Infusion - Sigma®) plus 20 µg / L hemin - Sigma® and 10 µg / mL folic acid - Sigma®, in inoculum of 5% of volume plus 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco-Thermo Fisher Scientific®) in bottles for sterile cultures and kept at temperature of 25° C ± 1°C. The samples were maintained through weekly passages up to a total of six passages, ensuring that the parasites used in the experiments remained infectious.

### 2.2 SYNTHESIS OF THE LIGAND H2L

The ligand was obtained as described in Scheme 1, by the reaction between equimolar amount of the epoxide (4g, 18 mmol) and HBPA (3g), in 100 mL of ethanol, under reflux, for 5 days. The reaction was follow by TLC, using ethanol as eluent. Subsequently, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was to 50 cm<sup>3</sup> of water. The compound was extracted with five 50 cm<sup>3</sup> portion of CHCl<sub>3</sub> and the extracts were combined, washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. A orange oil was obtained.

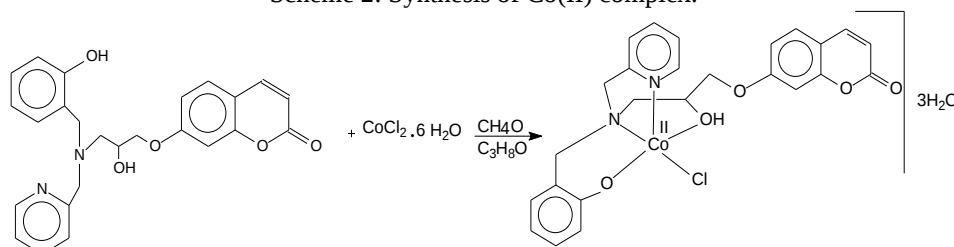


### 2.3 SYNTHESIS OF [Co(HL)Cl](H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>

The cited complex (Scheme 2) was prepared by the reaction between the ligand H2L (1 mmol, 432 mg) and CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1 mmol, 237 mg), in methanol/propan-2-ol (1:1), at room temperature. After allowing the purple solution to stand for a few days, purple crystals were filtered off, washed with cold propan-2-ol and dried in a desiccator. Yield: 70 mg (7%). m.p.: 245°C. Anal. Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>ClCoN<sub>2</sub>O<sub>8</sub>; MW= 579.90 g mol<sup>-1</sup>: C, 51.78; H, 5.04; N, 4.83. Found: C, 52.84; H, 5.15; N, 4.79. The IR spectrum exhibits bands at 3412 (ν OH), 3068 (aromatic CH), 2970-2864 (aliphatic CH), 1506, 1477, 1444, 1400 (ν C=N and C=C), and at 779 cm<sup>-1</sup> (δ C-H), ESI(+)-MS spectrum shows a peak with

$m/z$  of 490, attributed to the Co(III) complex:  $[\text{Co(III)(HL)}]^+$ , as a result of desprotonation of the ligand H2L with the releasing of a HCL molecule from the starting complex. Electronic spectrum of Co(II) complex, in DMSO, presents two d-d transitions at 596 nm ( $122 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) e outra em 689 nm ( $46 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

Scheme 2: Synthesis of Co(II) complex.



## 2.4 TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

To evaluate the ultrastructure of *L. amazonensis* promastigotes in the presence of the complex, the parasites were kept in the presence (10  $\mu$ M) and absence of the complex for 24 and 48 h, and then they were washed with serum-free medium and was fixed with 2.5% glutaldehyde and 4% recently prepared formaldehyde in sodium cacodilate buffer (0.1M, pH 7.2) for 2 h. Cells were washed with sodium cacodilate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide, 1.6% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in sodium cacodilate buffer for 1 h. Cells were dehydrated with acetone serial concentrations of 30%, 40%, 50%, 70% and 100%. Inclusion was performed with epoxy resin. Ultrafine sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Transmission Electron Microscope Zeiss®900, using voltage acceleration of 30 kv.

## 2.5 CONFOCAL LASER MICROSCOPY

In order to evaluate the induction of the parasite's death by autophagy, cultures of the *L. amazonensis* promastigote forms were treated with the complex at concentrations of 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. The control used was culture without treatment. These concentration values were stipulated according to the results of the growth curve tests and evaluation of the antiproliferative effects. For such experiments, the parasites were first fixed in PHEM buffer (60mM Pipes, 20mM Hepes, 10mM EGTA, and 5mM magnesium chloride - Sigma® pH 7.2) containing 4% (v/v) of paraformaldehyde (Merck®), for 30 min at room temperature (RT  $\cong$  36 ° C). Then, the parasites were adhered for 20 min to RT in coverslips previously coated with 0.1% poly-L-lysine. After fixation and adhesion, the

coverslips were washed, permeabilized in PHEM containing 0.3% Triton X-100 (Sigma®) for 5 min, and incubated with 50 mM Ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) for 30 min., then with Serum Albumin Bovine (SAB) 3% in PHEM buffer (PHEM-SAB) for 30 min at RT (room temperature). After incubation with the blocks, the coverslips were incubated with rabbit polyclonal antibody LC3B (dilution 1: 1000) for 1 h at RT. Subsequently, incubation was performed with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to Alexa-546 (dilution 1: 100) (Molecular Probes) for 1 h at RT. After labeling, the cells were washed with PBS and the coverslips were mounted with the “ProLong® Gold antifade” reagent (Invitrogen) with 4', 6-diamidino-2-phenyl- indole (DAPI) and observed using a confocal laser scanning microscope (LSM-710, Zeiss).

### 3 RESULTS

The Co(II) complex was analyzed for its antiproliferative activity against the promastigote form of *L. amazonensis*. Co(II) complex, were evaluated using TEM. Promastigote forms were treated with this complex at a concentration of 10 µM in the periods of 24 and 48 h. Control parasites, untreated, were also observed by MET and showed a normal ultrastructure, where the nucleus (N) was with its entire structure and decompressed chromatin, kinetoplast (k) in its characteristic compaction, flagellum (f) emerging from the flagellar pouch (fp) and subpellicular microtubules (sm) in the membrane (sm) (Figures 1a and 1b). After treatment with the complex, several changes were observed, among them: formation of autophagic vacuoles near the region of the flagellar pocket (Figures 1 and 2) myelin figure (mf) formations (Figure 1).

Figure 1: Transmission electron micrograph of *L. amazonensis* after 24 hours of treatment with 100  $\mu$ M of the compound Co7HCHBPA. (a, b) Untreated cells with characteristic parasite structures. (c) Altered flagellar pouch, indicating death by autophagy (1). (d) Altered flagellar pouch (1) and formation of myelin figures (2). (e) Alteration of the flagellar pouch (1). (f) Myelin figure - Image d enlargement (2).

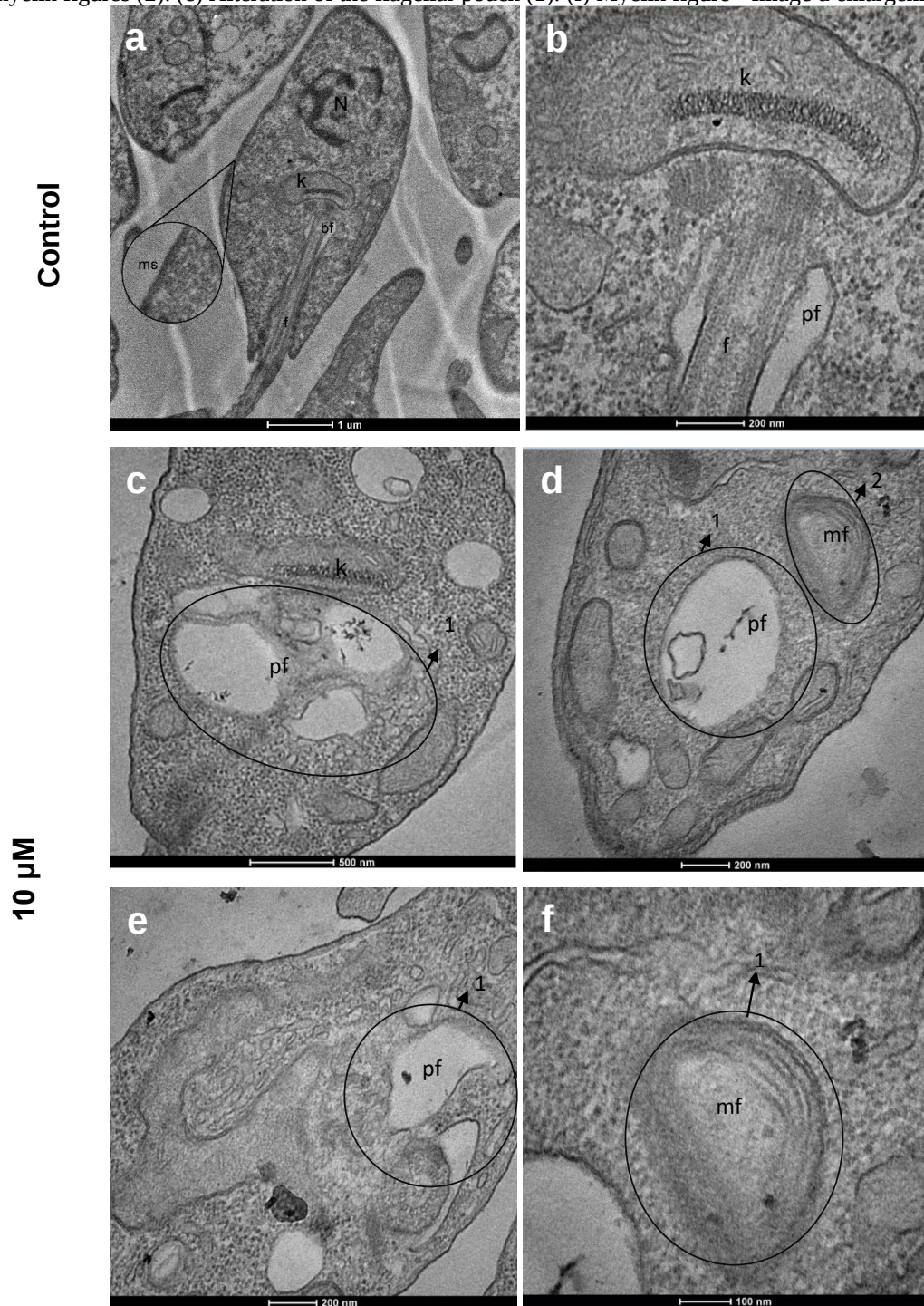
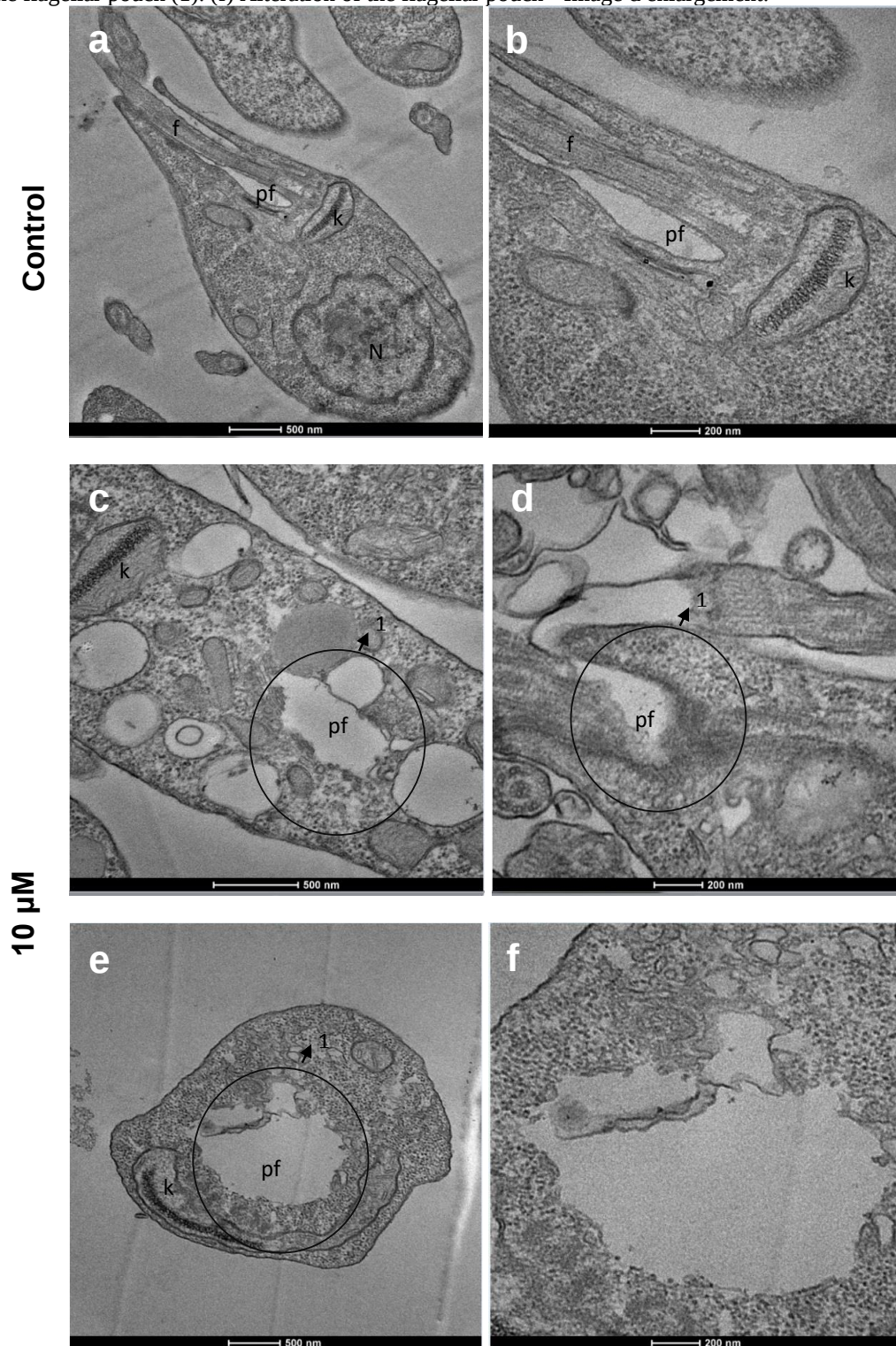


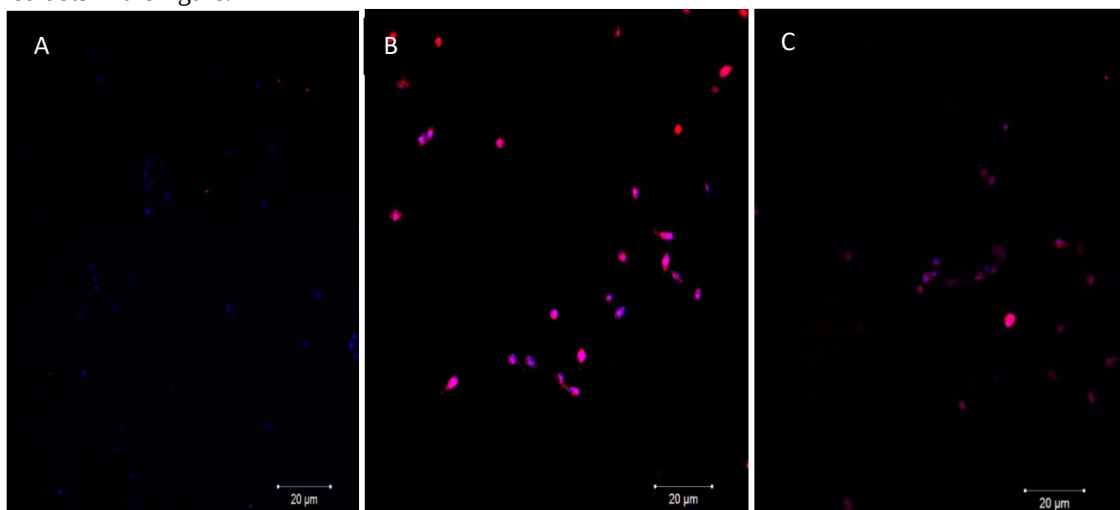
Figure 2: Transmission electron micrograph of *L. amazonensis* after 48 hours of treatment with 10  $\mu$ M of the Co7HCHBPA compound. (a, b) Untreated cells with characteristic parasite structures. (c) Altered flagellar pouch, indicating death by autophagy (1). (d) Altered flagellar pouch (1). (e) Alteration of the flagellar pouch (1). (f) Alteration of the flagellar pouch - Image d enlargement.



Since the ultrastructure analysis of *L. amazoensis* promastigotes treated with the Co(II) complex presented the formation of autophagic vacuoles (in the region of the flagellar pocket), it was investigated whether this current treatment is inducing autophagy

in these promastigotes. For this, the parasites treated at 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of Co(II) complex were incubated with an antibody against the LC3B protein and observed under an immunofluorescence microscope. In the control cells, there were no markings for autophagy, as expected (Figure 3a). The cells treated with 5  $\mu$ M showed positive staining for the LC3B protein (Figure 3b), which indicates that the complex is inducing the parasite to autophagy. Subsequently, cells treated with 10  $\mu$ M were subjected to the same evaluation (Figure 3c), also showing positive marking for anti-LC3B indicating autophagy.

**Figure 3: Laser confocal microscopy showing cell death by *L. amazonensis* autophagy after treatment with the Co7HCHBPA compound.** (a) Control cells in blue, with autophagy marking on cells treated with 5  $\mu$ M (b) and 10  $\mu$ M (c) of the compound Co7HCHBPA. The anti-LC3B marking corresponds to the pinkish red dots in the figure.



#### 4 DISCUSSION

In this work we evaluated the effects of a new Co(II) complex on the promastigote forms of *L. amazonensis* *in vitro*. Throughout this study, we observed, by transmission electron microscopy, that there are drastic ultrastructural changes in the promastigote form of *L. amazonensis* caused by the Co(II) complex. Regarding the ultrastructure, changes were observed in the periods of 24 and 48 h, where several changes were seen, among them: formation of autophagic vacuoles close to the region of the flagellar pocket, myelin figure formations (Figure 1 and 2), indicating cell death. Other complexes had an effect on the parasite's energy metabolism, also causing degradation in the membranes of organelles and cell death (RAMÍRES-MACÍAS, 2011; CABALLERO et al., 2014; COSTA et al., 2017; HUBIN et al., 2019). Investigations carried out with Fe(III) complexes already demonstrated morphological and ultrastructural changes in *T. gondii* (PORTES et al., 2015 and 2017).

Finally, considering that the ultrastructure analysis of *L. amazoensis* promastigotes treated with this Co(II) complex indicated the formation of autophagic vacuoles (in the region of the flagellar pouch), it was investigated whether these promastigotes could have cell death due to autophagy triggered by this treatment. The cells treated with 5  $\mu$ M showed positive staining for the LC3B protein (Figure 3), indicating that the Co(II) complex induced the parasite to autophagy. Subsequently, cells treated with 10  $\mu$ M were subjected to the same evaluation (Figure 3), also showing positive marking for anti-LC3B indicating autophagy.

## 5 CONCLUSION

In conclusion, all the results obtained from this work, strongly suggest that the tested metallocomplex has a leishmanicidal action, presenting significant effects on the promastigote form with a concentration (in  $\mu$ M) that does not affect macrophages. However, in the future, tests on intracellular amastigotes should be developed so that we can evidence its effect, and in this way, indicate it as a good candidate for future tests, whether used alone or coordinated with other compounds.

## REFERENCES

- AHMAD, Saeed et al. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, n. 7, p. 1633-1645, 2006.
- ASHFORD, Richard W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- ASHOK, Devika; ACHA-ORBEA, Hans. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 10, p. 499-507, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília Ministério da Saúde, 2009.
- BRUIJNINCX, Pieter CA; SADLER, Peter J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.
- CABALLERO, Ana B. et al. Lanthanide complexes containing 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4H)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 138, p. 39-46, 2014.
- COSTA, Mônica S. et al. Anti-Leishmania activity of new ruthenium (II) complexes: Effect on parasite-host interaction. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 175, p. 225-231, 2017.
- DE SOUZA, Wanderley. Protozoologia Médica. Rubio, Rio de Janeiro, 2013.
- FRICKER, Simon Paul. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton transactions**, n. 43, p. 4903-4917, 2007.
- HUBIN, Timothy J. et al. Tetraazamacrocyclic derivatives and their metal complexes as antileishmanial leads. **Polyhedron**, v. 163, p. 42-53, 2019.
- KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.
- MARSDEN, Phipp D.; JONES, Tracey C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. **Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands**, p. 183-198, 1985.
- MOUGNEAU, Evelyne; BIHL, Franck; GLAICHENHAUS, Nicolas. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.
- NEVES, David Pereira; MELO Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marco; VITOR, Ricardo W. Almeida. **Parasitologia humana**. 11 a. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 2007.
- PORTES, J. A. et al. In vitro treatment of Toxoplasma gondii with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 141-152, 2017.

PORTES, J. A. et al. Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron (III) compound. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7374-7386, 2015.

PORTES, Juliana de A. et al. A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 117, n. 9, p. 2795-2805, 2018.

RAMÍREZ-MACÍAS, Inmaculada et al. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4 H)-one against *Leishmania* spp. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 813-819, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkq537.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

VAN RIJT, Sabine H.; SADLER, Peter J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.

World Health Organization - WHO (2020). Leishmaniasis. <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. Acesso em 20 de Abril de 2020.