

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO PARASITÁRIAS

Juliana da Trindade Granato

EFEITO ANTILEISHMANIAL DE DERIVADOS ESTEROIDAIIS EM *Leishmania* sp

**JUIZ DE FORA
2017**

JULIANA DA TRINDADE GRANATO

EFEITO ANTILEISHMANIAL DE DERIVADOS ESTEROIDAIIS EM *Leishmania* sp

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr. Elaine Soares Coimbra

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

**JUIZ DE FORA
2017**

Juliana da Trindade Granato

**EFEITO ANTILEISHMANIAL DE NOVOS DERIVADOS DO COLESTEROL EM
*Leishmania sp***

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Dissertação de Mestrado em Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias

Data de aprovação: ___/___/_____

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra - Universidade Federal de Juiz de Fora

(Suplente)

(Suplente)

DEDICO

Ao meu avô Francisco, que sempre esteve ao meu lado incentivando e apoiando, e infelizmente nos deixou em meio à realização deste trabalho. À minha mãe Maria Aparecida e ao meu pai Délio (*in memoriam*) por terem me presenteado com a vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida, pelo amparo, pela inspiração e proteção durante todo meu trajeto neste mundo.

À minha mãe Maria Aparecida, ao meu irmão Aécio e minha avozinha Anita, pelo incentivo, paciência e momentos bons que me proporcionaram através da amizade e convívio em família.

À Tainara pelo carinho, paciência e incentivo dado nos momentos difíceis durante essa trajetória.

À todos os amigos e familiares que acreditam em mim e torceram para que eu pudesse vencer mais uma etapa importante em minha vida.

À minha orientadora Elaine, pela dedicação, exemplo de ética e ensinamentos que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao professor Adilson pela co-orientação e participação na síntese dos compostos.

À Dra. Juliana Alves pela síntese dos compostos químicos utilizados neste estudo.

À todas as professoras do departamento de parasitologia pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório que ajudaram a tornar o ambiente divertido e alegre.

À Stephane, pela amizade, paciência e ajuda com os experimentos.

À Dra. Patrícia Machado e Dra. Luciana Antinarelli, pela amizade e por compartilharem seus conhecimentos comigo no início da minha caminhada.

Ao programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP).

À UFJF, Capes, FAPEMIG, CNPq pelo financiamento das pesquisas.

*“Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo. Quem acredita sempre
alcança”*
(Renato Russo)

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp, responsáveis por um grande impacto socioeconômico mundial. Os tratamentos disponíveis para leishmanioses são limitados por apresentarem alta toxicidade, administração parenteral, alto custo e efeitos colaterais. Os esteroides constituem um grupo de compostos bastante diversificados com variada aplicabilidade na farmacologia. No entanto, a atividade antileishmanial desta classe ainda é pouco explorada. No presente trabalho, investigamos os efeitos antileishmanial de grupos de derivados esteroidais: colesterol; ácido cólico e ácido desoxicólico. Além disso, determinamos, *in vitro*, possíveis alvos/alterações celulares importantes na atividade biológica do composto mais promissor bem como analisamos *in silico* sua biodisponibilidade oral e farmacocinética. A atividade antipromastigota em *Leishmania* sp e citotoxicidade em macrófagos peritoneais foram determinadas pelo método colorimétrico MTT. A atividade anti-amastigota foi avaliada em macrófagos infectados com *L. amazonensis* RFP após 72 horas de tratamento através de fluorimetria. Os efeitos do melhor composto em alvos de promastigotas foram realizados utilizando marcação fluorescentes em promastigotas tratadas, e as análises *in silico* foram realizadas usando ferramentas computacionais. Em uma análise geral dos resultados obtidos pelos testes *in vitro*, observa-se que entre os derivados esteroidais testados neste trabalho, os derivados do ácido desoxicólico apresentaram o melhor efeito antileishmanial para as formas promastigotas e amastigotas *in vitro*. Dentre esta série de compostos, o composto **11d** (CI₅₀ = 15,04 µM) é o mais seletivo para *L. amazonensis* (IS >9,78) e o mais específico para a forma intracelular desta espécie. Este composto tem como provável alvo celular a mitocôndria, aumentando a produção de EROs e diminuindo o $\Delta\Psi_m$. Além do mais, o composto mostrou causar danos no conteúdo de DNA do parasito. Estudos das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto **11d** mostrou que ele possui capacidade de permear por membranas biológicas sendo possível a administração por via oral.

Palavras-chave: Esteroides, *Leishmania* sp, colesterol, ácidos biliares, *in silico*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* sp, responsible for a great socioeconomic impact worldwide. The available treatments for leishmaniasis are limited because they present high toxicity, parenteral administration, high cost and side effects. Steroids are a diversified group of compounds with varied applicability in pharmacology. However, the antileishmanial activity of this class is still little explored. In the present work, we investigated the antileishmanial effects of groups of steroidal derivatives: cholesterol; colic and deoxycholic acid. In addition, we determined, *in vitro*, possible important cellular targets/alterations in the biological activity of the most promising compound and *in silico* analysis of its oral bioavailability and pharmacokinetics. The antipromastigote activity in *Leishmania* sp and cytotoxicity in peritoneal macrophages were determined by the colorimetric method MTT. The anti-amastigote activity was evaluated in with *L. amazonensis*-infected macrophages after 72 hours of treatment. The effects of the best compound on promastigote targets were performed using fluorescent labeling on treated promastigotes, and *in silico* analyzes were performed using computational tools. In a general analysis of the results obtained by the *in vitro* tests, it is observed that among the steroid derivatives tested in this work, the derivatives of deoxycholic acid presented the best antileishmanial effect for the promastigote and amastigote forms *in vitro*. Among this series of compounds, compound **11d** ($IC_{50} = 15.34 \mu M$) is the most selective for *L. amazonensis* ($SI > 9.78$) and the most specific for the intracellular form of this species. This compound has as probable cellular target the mitochondria, increasing the ROS production and decreasing the $\Delta\Psi_m$. Moreover, the compound has been shown to cause damage to the DNA content of the parasite. *In silico* studies of the physicochemical and pharmacokinetic properties of compound **11d** showed that it has the ability to permeate through biological membranes and oral administration is possible.

Key words: Steroids, *Leishmania* sp, cholesterol, bile acids, *in silico*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Status de endemicidade das leishmanioses no mundo.** (a) Ocorrência de leishmaniose cutânea; (b) Ocorrência da leishmaniose visceral. Fonte: WHO, 2015 (Adaptado).....17
- Figura 2: Número de casos notificados de leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no Brasil, no período de 1980 a 2015.** Fonte: Ministério da saúde.18
- Figura 3:Taxonomia da Leishmania sp.** Fonte: WHO, 2010a (Adaptado).....20
- Figura 4: Formas evolutivas de Leishmania sp.**(A) Promastigotas de *Leishmania amazonensis*; (B) Macrófago infectado com amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As setas indicam as amastigotas. Aumento de 1000x. Fonte: Próprio autor.21
- Figura 5: Ciclo de vida do parasito Leishmania sp.** (1) O inseto vetor ingere macrófagos infectados de um hospedeiro mamífero infectado. (2) Os macrófagos infectados se rompem no intestino do inseto vetor liberando as formas amastigotas. (3 e 4) as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas. (5) Promastigotas procíclicas se multiplicam no intestino médio do inseto (6) As promastigotas migram para a válvula estomodeal no intestino médio anterior e reiniciam o processo de divisão celular. (7) As promastigotas passam pelo processo de metaciclogênese e se tornam infectivas. (8) O inseto vetor infectado inocula promastigotas metacíclicas em um novo hospedeiro mamífero através da regurgitação durante repasto sanguíneo. (9) Promastigotas metacíclicas (10) Promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos. (11) As promastigotas se transformam em amastigotas dentro do vacúolo endocítico. (12) Amastigotas no vacúolo parasitóforo. (13) Amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Multiplicação intensa de amastigotas (15) A célula hospedeira se rompe liberando as amastigotas. (16) Forma amastigota (17) Amastigota sendo fagocitada por macrófago. Fonte: TEIXEIRA et al., 2013 (Adaptado).....24
- Figura 6: Estrutura química dos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.** Fonte: NAVARRO et al, 2010 (Adaptado).....31
- Figura 7: Estrutura em comum dos esteroides.** Fonte: NES, 2011 (Adaptado).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8: Estrutura da molécula de colesterol.** Fonte: NES, 2011 (Adaptado).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9: Esquema resumido da biossíntese dos ácidos biliares.** No fígado o colesterol é metabolizado pela enzima 7α -hidroxilase e é convertido em ácidos biliares primários, estes no intestino, sofrem ação de enzimas bacterianas e são convertidos em ácidos biliares secundários. Fonte: Próprio autor.34
- Figura 10: Estrutura química dos ácidos biliares mostrando sua curvatura devido a ligação cis entre os anéis A e B.** Face α é a porção hidrofílica, e face β a porção hidrofóbica. Fonte: ZHU e NICHIFOR, 2002 (Adaptado).35
- Figura 11: Desenho experimental do trabalho:** 19 compostos (derivados esteroidais) foram testados em formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania*. Em seguida, a citotoxicidade destes compostos foram avaliadas utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com intenção de direcionar os estudos da atividade destes na forma amastigota intracelular do parasito. Em seguida, foram calculados os índices de seletividade e especificidade dos compostos, com intuito de evidenciar os compostos mais ativos. Dentre estes, foi selecionado o composto de síntese financeiramente acessível, mais seletivo e específico para ambas as formas de *L. amazonensis*. Feito isso, foi avaliado o efeito do composto selecionado em alguns alvos em promastigotas de *L. amazonensis*: Morfologia celular; integridade da membrana plasmática; potencial de membrana mitocondrial; níveis da produção de ROS e ciclo celular.38

Figura 12: Alterações morfológicas em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d. (A) controle negativo; (B) promastigotas tratadas com 54,4 µM/mL; (C) promastigotas tratadas com 108,8 µM/mL. Após o tratamento, os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4%, lavadas em PBS, colocados em lâminas de vidro e corados com Giemsa. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e fotografadas utilizando a objetiva de 100x. As imagens representam três experimentos independentes.67

Figura 13: O tratamento com o composto 11d não altera a integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 µM do composto 11d. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com Iodeto de Propídeo. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Parasitos aquecidos à uma temperatura de 65°C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.68

Figura 14: O tratamento com o composto 11d diminui significativamente o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 µM do composto 11d. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com Mitotracker® Red CM-H2XROS. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. FCCP (20 µM/mL) foi utilizado como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.69

Figura 15: O tratamento com o composto 11d aumenta significativamente a produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 µM do composto 11d. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com H₂DCFDA. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Miltefosina (44,0 µM/mL) foi utilizada como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.70

Figura 16: O tratamento com o composto 11d na concentração de 108,8 µM/mL induz fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis*. As células foram incubadas com o composto 11d (54,4 e 108,8 µM) por 24h. Após este período os parasitos foram permeabilizados com etanol 70%, e incubados com PI. A avaliação do DNA das células foi realizada utilizando citometria de fluxo. (A) representação gráfica das células presentes em cada fase do ciclo celular. (B) porcentagem do número de células em cada fase do ciclo celular. Miltefosina (44,0 µM/mL) foi utilizada como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (Two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni: $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (***).72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas químicas e nomenclatura dos derivados do colesterol.....	39
Tabela 2: Estrutura e nomenclatura dos derivados do ácido cólico.....	40
Tabela 3: Estrutura e nomenclatura do ácido desoxicólico.....	41
Tabela 4: Efeito dos derivados do colesterol e seus precursores em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> e macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.....	56
Tabela 5: Efeito dos derivados do ácido cólico e desoxicólico em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> e macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.....	58
Tabela 6: Efeito dos derivados do colesterol e seus precursores em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> -RFP.....	59
Tabela 7: Efeito dos derivados dos ácidos cólico e desoxicólico em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> -RFP.....	62
Tabela 8: Seletividade dos derivados esteroidais para formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	65
Tabela 9: Especificidade dos derivados esteroidais em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66
Tabela 10: Propriedades físico-químicas do composto 11d , calculadas no software Molinspiration®.....	73
Tabela 11: Propriedades farmacocinéticas do composto 11d , calculadas pelo software admetSAR.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Infusão de coração e cérebro (“Brain Heart Infusion”)
BHE	Barreira Hemato-encefálica
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CC₅₀	Concentração molar que inibe 50% da viabilidade celular
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CI₅₀	Concentração molar que inibe 50% do crescimento celular
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPPF	Ciclopentano-per-hidro-fenantreno
CYP 450	Citocromo p 450
DL₅₀	Dose capaz de matar 50% da população em teste
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbocianeto-4-(trifluorometoxi)-Fenilhidrazona
HMG-CoA	3- hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A
H₂DCFDA	Diclorohidrofluoresceína diacetato
IE	Índice de Especificidade
IS	Índice de Seletividade
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólico
MTK	Mitotracker® Red CM-H2XROS
nALH	número de aceptores de ligação de hidrogênio
nDLH	número de doadores de ligação de hidrogênio
NO	Óxido Nítrico
NUPEP	Núcleo de Pesquisa em Parasitologia
NUPEQ	Núcleo de Pesquisas Químicas

OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	“Propidium Iodide” Iodeto de propídeo
RFP	Proteína fluorescente vermelha (“Red Fluorescent Protein”)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sb⁺³	Antimônio trivalente
Sb⁺⁵	Antimônio pentavalente
SBF	Soro Bovino Fetal
PBS	Salina Tampão Fosfato (“Phosphate Buffer Saline”)
WHO	World health organization
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	166
1.1 Leishmanioses	166
1.2 O parasito <i>Leishmania</i> sp.....	199
1.3 Manifestações clínicas	255
1.4 Quimioterapia das Leishmanioses	288
1.5 Esteroides, colesterol e ácidos biliares	322
2. OBJETIVOS	377
2.1 Objetivos gerais.....	377
2.2 Objetivos específicos	377
3. MATERIAL E MÉTODOS	388
3.1 Desenho experimental	388
3.2 Compostos Utilizados.....	399
3.3 Considerações éticas	422
3.4 Cultivo dos Parasitos.....	433
3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	444
3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em macrófagos peritoneiais de camundongos BALB/c.....	455
3.7 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	466
3.8 Determinação do índice de seletividade (IS) e índice de especificidade (IE) dos compostos.....	477
3.9 Modo de ação do composto 11d em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...488	
3.9.1 Avaliação da morfologia de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11d	488
3.9.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11d.....	499
3.9.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11d.....	50
3.9.4 Estudo dos níveis de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11d	511
3.9.5 Avaliação de alterações nas fases do ciclo celular em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11d.....	522
3.10 Estudos <i>in silico</i>	533

3.10.1	Propriedades físico-químicas do composto selecionado.....	533
3.10.2	Propriedades farmacocinéticas e potencial de toxicidade dos compostos	544
4.	RESULTADOS.....	555
4.1	Citotoxicidade dos compostos em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp e em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	555
4.2	Citotoxicidade dos compostos em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> -RFP 599	
4.3	Índices de seletividade e de especificidade dos derivados esteroidais	636
4.4	Efeito do composto 11d em alguns alvos celulares de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	677
4.4.1	Efeito do composto 11d na morfologia de Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	677
4.4.2	O tratamento com o composto 11d não altera a integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	688
4.4.3	Efeito do composto 11d no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	69
4.4.4	Efeito do composto 11d na produção de EROs em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	70
4.4.5	Efeito do composto 11d no ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	71
4.5	Estudos <i>In Silico</i>	733
4.5.1	Estudo das propriedades físico-químicas das moléculas.....	733
4.5.2	Propriedades farmacocinéticas e potencial de toxicidade dos compostos	744
5	DISCUSSÃO	766
6	CONCLUSÃO	855
7	REFERÊNCIAS.....	866

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

Os países tropicais e subtropicais em desenvolvimento são acometidos por doenças infecciosas e endêmicas que representam um importante problema de saúde pública. Algumas delas, apesar do grande número de infectados, não atraem a atenção dos órgãos de saúde ou de grandes corporações farmacêuticas, por isto, foram agrupadas e incluídas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “doenças tropicais negligenciadas” (DTNs). Essas doenças afetam mais de um bilhão de pessoas e estão distribuídas em 149 países (FEASEY et al., 2010; ERIKSSON e ERIKSSON, 2011). O incentivo à pesquisa nesta área é ainda muito restrito, devido ao pouco interesse da indústria farmacêutica, uma vez que essas doenças, na maioria das vezes, acometem populações carentes, que vivem em condições precárias, em afilado contato com os agentes infecciosos, seja por medidas de saneamento precárias, presença de vetores, e hospedeiros vertebrados (WHO, 2017a).

As DTNs são causadas por organismos patogênicos como bactérias, vírus e parasitos. Atualmente, existem 17 DTNs, a maioria parasitárias, incluindo leishmanioses. Essas doenças levam as populações acometidas a um sério quadro de enfermidades, baixa autoestima e morte, resultando em sérios impactos sociais e econômicos (DIAS e DESSOY, 2010; WHO, 2013).

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estes são transmitidos ao homem através da picada das fêmeas de Dípteros dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) durante o seu repasto sanguíneo (STEVERDING, 2017).

A doença pode ser assintomática ou apresentar-se com grande variedade de manifestações clínicas, classicamente podendo ser divididas entre formas cutânea, mucocutânea e a visceral, sendo esta última, a forma mais grave, podendo levar à

morte pacientes imunodeprimidos e aqueles que não forem tratados na fase inicial da doença (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015).

Como apresentado na figura 1, as leishmanioses são endêmicas em uma grande faixa mundial, atingindo noventa e sete (97) países e territórios das regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2017b). Estima-se que há cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, e aproximadamente 2 milhões de novos casos (WHO, 2016). As leishmanioses são consideradas doenças importantes não apenas pela alta incidência, mas também, por causar sérios danos em órgãos e tecidos, podendo acarretar em mutilações que comprometem o estado físico e psicológico dos pacientes, bem como sua integração social (COSTA et al., 1987; HERWALDT, 1999).

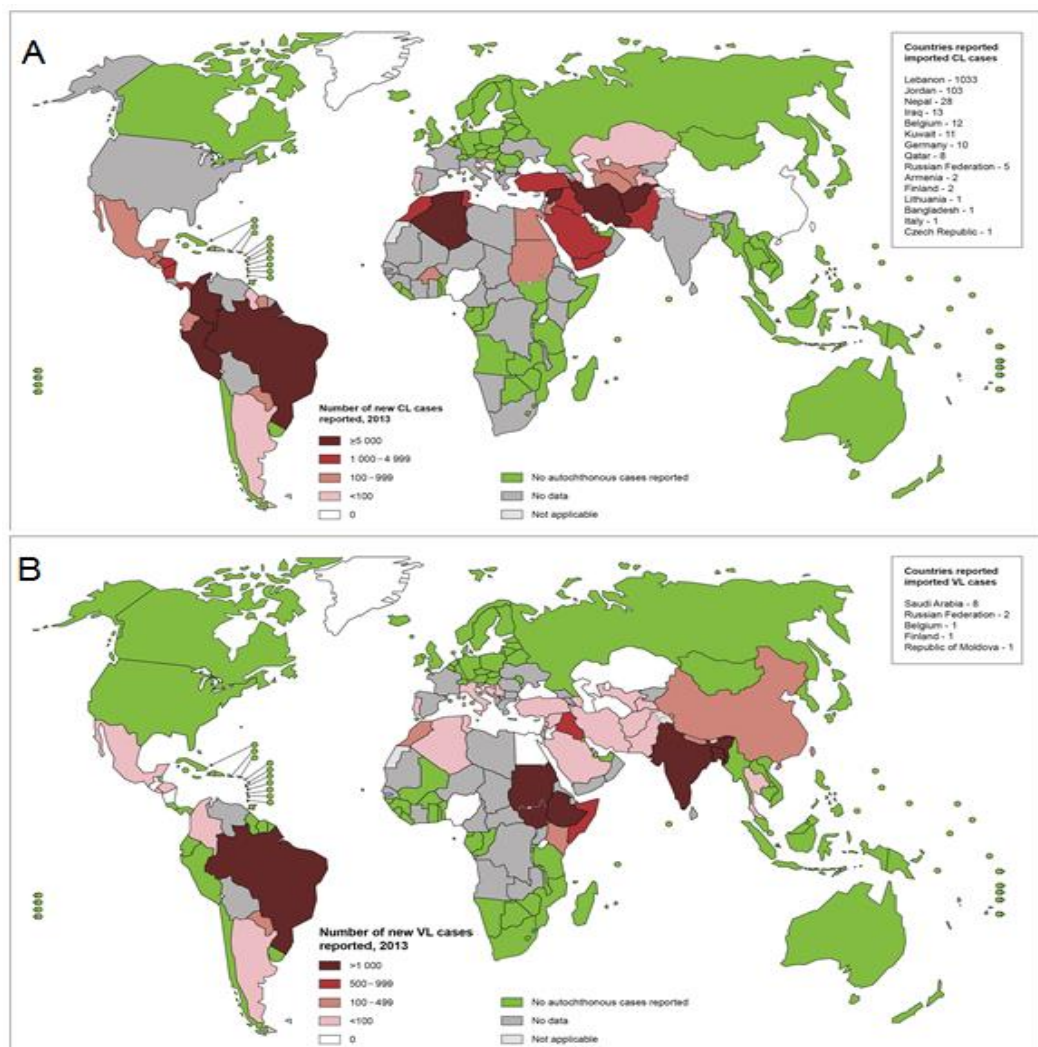


Figura 1: Status de endemicidade das leishmanioses no mundo. (a) Ocorrência de leishmaniose cutânea; (b) Ocorrência da leishmaniose visceral. Fonte: WHO, 2015 (Adaptado).

No Brasil, as leishmanioses têm sido amplamente descritas tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais de todos os estados. Segundo os dados do Ministério da Saúde (2017), a partir do ano de 1985, observa-se uma média anual de 25.763 novos casos registrados para leishmaniose tegumentar, e 3.156 novos casos de leishmaniose visceral (Figura 2). No entanto, buscando diminuir estes números, as estratégias aplicadas para controle da doença se resumiam basicamente na eutanásia de cães com sorologia positiva para doença (reservatório doméstico do parasito), controle do inseto vetor através da aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Porém, essas medidas de controle não estavam apresentando impacto no número de casos registrados, evidenciando a necessidade de reavaliação dos parâmetros adotados. Neste sentido, os municípios tem sido classificados segundo sua situação epidemiológica com o objetivo de conhecer a magnitude e a incidência de casos de leishmaniose, visando priorizar e direcionar medidas de controle mais específicas, pois é conhecido que a doença apresenta aspectos geográficos, climáticos e socioeconômicos diferenciados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

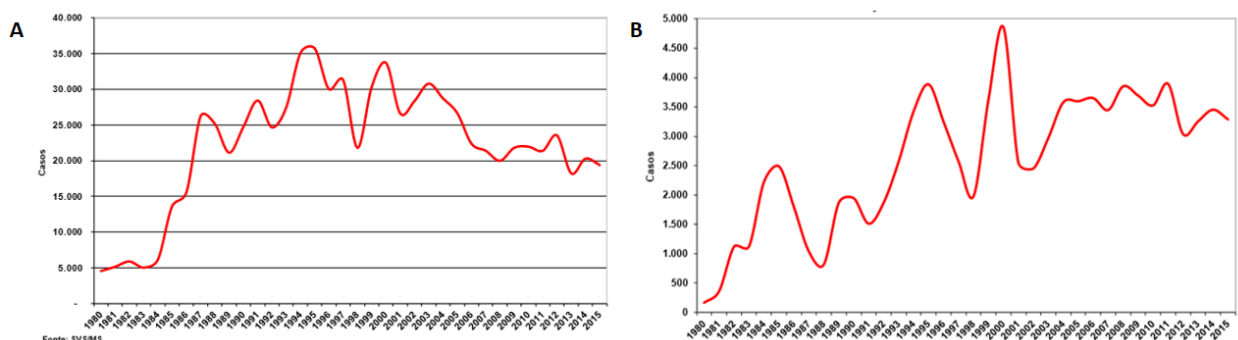


Figura 2: Número de casos notificados de leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no Brasil, no período de 1980 a 2015. Fonte: Ministério da saúde.

1.2 O parasito *Leishmania* sp.

O gênero *Leishmania* inclui protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastidae e família Tripanossomatidae (AUWERA e DUJARDINA, 2015). Os protozoários desta ordem possuem características peculiares, apresentando, por exemplo, uma única mitocôndria, muito ramificada, que estende por todo o seu citoplasma, possuindo em uma das regiões uma dilatação rica em DNA mitocondrial (kDNA) denominada cinetoplasto (FIDALGO e GILLE, 2011; MENNA-BARRETO e DE CASTRO, 2014).

O gênero *Leishmania* é bastante diversificado em relação aos outros gêneros pertencentes à família Tripanossomatidae. Atualmente, as espécies responsáveis por provocarem leishmanioses em seres humanos estão agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Figura 3). A organização das espécies nestes subgêneros está relacionada com o local de desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do inseto vetor, os flebotomíneos. O subgênero *Leishmania* engloba parasitos que se desenvolvem no intestino anterior e médio do inseto. Enquanto que o subgênero *Viannia*, inclui espécies que se desenvolvem aderidas à parede do intestino posterior na região do piloro. Em virtude da complexidade do gênero *Leishmania*, cada subgênero é organizado em complexos, e cada complexo abriga as espécies infectantes ao homem que compartilham características semelhantes no que diz respeito a manifestações clínicas (AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2010).

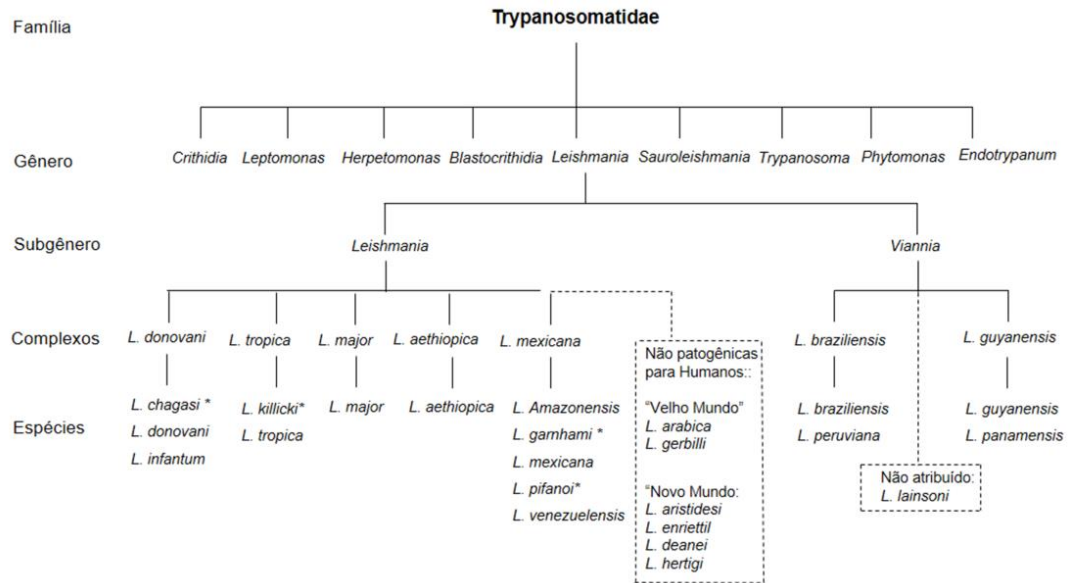


Figura 3: Taxonomia da *Leishmania* sp. Fonte: WHO, 2010a (Adaptado)

Durante a alternância entre hospedeiros, a *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: as formas promastigotas e amastigotas. As promastigotas (Figura 4a), estão presentes no inseto vetor e culturas axênicas, medem cerca de 10-20µm de comprimento. Sua morfologia é alongada e fusiforme, possui flagelo externo, o que favorece seu movimento (GLUENZ, et al., 2010). As formas promastigotas passam por vários processos de multiplicação e desenvolvimento no interior do tubo digestivo do vetor, o último deles, denominado metaciclogênese, o qual acarreta no desenvolvimento das formas infectivas para o hospedeiro mamífero, as promastigotas metacíclicas (NATALE et al., 2016).

As formas amastigotas (Figura 4b) apresentam formato esférico ou arredondado com diâmetro entre 3-7µm, são formas obrigatoriamente intracelulares (REY, 2008). Embora na microscopia óptica, as amastigotas pareçam sem flagelo, as mesmas possuem um flagelo interiorizado na bolsa flagelar observado na microscopia eletrônica de transmissão. Alguns autores sugerem que este flagelo tenha funções importantes como manter a integridade da bolsa flagelar e transporte de macromoléculas (GLUENZ et al., 2010).

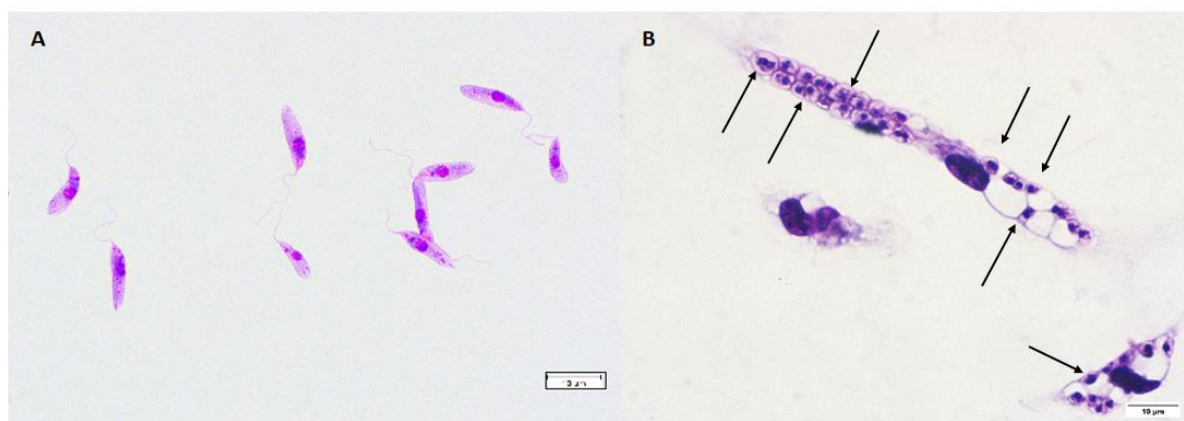


Figura 4: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Promastigotas de *Leishmania amazonensis*; (B) Macrófago infectado com amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As setas indicam as amastigotas. Aumento de 1000x. Fonte: Próprio autor.

O ciclo de vida destes parasitos é semelhante para todas as espécies do gênero *Leishmania* (Figura 5). Estes possuem ciclo de vida heteroxênico, o que é caracterizado pela alternância entre inseto vetor, neste caso os flebotomíneos, e hospedeiro mamífero, como humanos, animais domésticos, incluindo cães e gatos, peridomésticos e silvestres (REY, 2008; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos infectadas inoculam na pele do hospedeiro, juntamente com sua saliva, promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp (KAYE e SCOTT, 2011). A saliva do inseto vetor contém várias substâncias que induz rapidamente o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da picada. As promastigotas inoculadas no tecido então, são rapidamente internalizadas por estas células, no entanto, outras células fagocitárias como células dendríticas ou células de Langerhans podem também serem infectadas (TEIXEIRA et al., 2013)

Em relação aos neutrófilos, acredita-se que estas células cumprem um papel transitório na infecção e são conhecidos como “cavalos de Tróia” por facilitarem a instalação de “*Leishmania* sp” nos estágios iniciais da infecção. A referida célula é uma das primeiras a serem infectadas por promastigotas metacíclicas inoculadas pelo inseto vetor (LASKAY;VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; NYLÉN e GAUTAM, 2010). Os parasitos internalizados em neutrófilos são capazes de sobreviver e atrasar a apoptose espontânea destas células, porém, não são capazes de se diferenciarem em formas amastigotas ou se multiplicarem (LASKAY;VAN

ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2013). O aumento na vida útil dos neutrófilos acarreta em um maior tempo de liberação de suas substâncias quimiotáticas que tem o papel de atrair mais fagócitos circulantes para o local da infecção, garantindo assim, a presença de considerável número de macrófagos, célula hospedeira final destes parasitos, onde eles não apenas sobrevivem, mas também se multiplicam, resultando no desenvolvimento da doença. Desta maneira, após 2 ou 3 dias, os neutrófilos entram em apoptose, porém os parasitos continuam viáveis em seu interior. Estes corpos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos por vias de receptores que não conseguem desencadear a resposta de defesa dos macrófagos, garantindo então a sobrevivência do parasito e o estabelecimento da infecção (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

No caso dos macrófagos, consideradas como as principais células hospedeiras de *Leishmania* sp, o processo de adesão à superfície se dá através da interação entre as moléculas de superfície da promastigota, como os lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteínas (Gp63), e receptores presentes na superfície de macrófagos, como receptores de Fc γ (RFc γ), do complemento (RC) e de manose (RM) que poderão posteriormente influenciar no curso da infecção (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015).

No intuito de obter sucesso na infecção, *Leishmania* sp desenvolveu mecanismos de escape às respostas dos macrófagos à infecção. Uma das estratégias é a transferência de LPG de sua superfície para a membrana dos macrófagos durante a fagocitose. Este mecanismo é capaz de retardar o processo de maturação e fusão do fagossomo ao lisossomo antes da forma promastigota se diferenciar em amastigota, que possui capacidade de sobreviver dentro do ambiente ácido do fagolisossomo (DE MORAIS et al., 2015). Uma vez no interior dos macrófagos, dentro dos vacúolos parasitóforos, as promastigotas se transformam rapidamente em amastigotas, e então começam a se multiplicarem por processo de divisão binária simples até o momento em que a célula hospedeira se rompe liberando as amastigotas no meio extracelular. Posteriormente, as amastigotas liberadas no meio extracelular são novamente fagocitadas por outros macrófagos ali presentes (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Dando continuidade ao ciclo biológico do parasito, durante a hematofagia do flebotomíneo, formas amastigotas livres ou nos macrófagos infectados podem ser ingeridas por um inseto vetor que se tornará infectado. No trato digestivo do vetor os macrófagos se rompem e liberam as amastigotas, que se transformam em promastigotas procíclicas. Estes migram para o epitélio do intestino médio onde se fixam e iniciam a multiplicação por divisão binária simples. Em seguida eles migram para a válvula estomodeal, localizada no intestino médio anterior do invertebrado, onde iniciarão um novo processo de multiplicação. Neste local as promastigotas se concentram e passam pelo processo de metaciclogênese, o que resulta na formação de promastigotas metacíclicas, a forma infectiva para o homem. As formas promastigotas danificam a válvula estomodeal interferindo desta maneira em seu funcionamento e este processo facilita a regurgitação de parasitos durante o repasto sanguíneo possibilitando a infecção de um novo hospedeiro mamífero (TEIXEIRA et al., 2013).

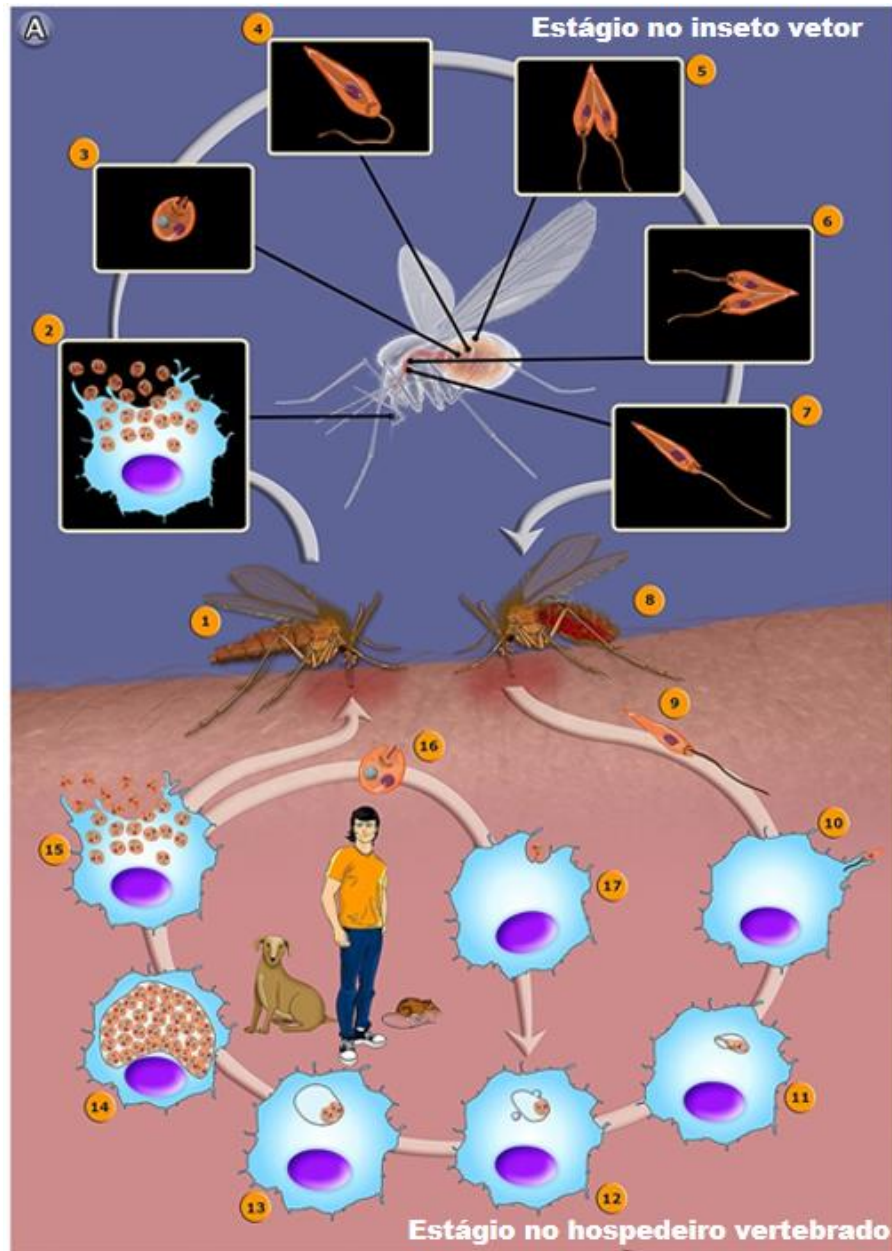


Figura 5: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* sp. (1) O inseto vetor ingere macrófagos infectados de um hospedeiro mamífero infectado. (2) Os macrófagos infectados se rompem no intestino do inseto vetor liberando as formas amastigotas. (3 e 4) as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas. (5) Promastigotas procíclicas se multiplicam no intestino médio do inseto (6) As promastigotas migram para a válvula estomodeal no intestino médio anterior e reiniciam o processo de divisão celular. (7) As promastigotas passam pelo processo de metaciclogênese e se tornam infectivas. (8) O inseto vetor infectado inocula promastigotas metacíclicas em um novo hospedeiro mamífero através da regurgitação durante repasto sanguíneo. (9) Promastigotas metacíclicas (10) Promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos. (11) As promastigotas se transformam em amastigotas dentro do vacúolo endocítico. (12) Amastigotas no vacúolo parasitóforo. (13) Amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Multiplicação intensa de amastigotas (15) A célula hospedeira se rompe liberando as amastigotas. (16) Forma amastigota (17) Amastigota sendo fagocitada por macrófago. Fonte: TEIXEIRA et al., 2013 (Adaptado)

1.3 Manifestações clínicas

As leishmanioses são um conjunto de manifestações clínicas diversas desencadeadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* diferentes. As peculiaridades parasitárias, como tropismo, resistência e virulência, associadas à resposta imune do hospedeiro podem desencadear manifestações clínicas diversas, as quais classicamente podem ser divididas em leishmaniose cutânea e visceral.

A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais comum e ocorre em 90% dos pacientes. Ela é desencadeada por diferentes espécies de *Leishmania*, sendo as principais: *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum*, no “Velho Mundo” e *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* no “Novo Mundo”(EIRAS, et al., 2015; STEBUT, 2015). A LC pode apresentar manifestações variadas, sendo as mais comuns a LC localizada; LC disseminada; LC difusa e leishmaniose mucocutânea (LMC) (COPELAND e ARONSON, 2015).

A LC localizada é a manifestação clínica mais comum da doença, sendo que a lesão inicial se desenvolve no local da picada do inseto vetor, formando inicialmente uma mácula, que pode levar semanas ou meses para se transformar em uma pápula. Esta pápula se transforma em um nódulo que pode ulcerar, dando origem a uma lesão inicial clássica (GOTO e LINDOSO, 2012). Normalmente a úlcera é indolor, arredondada e apresenta bordas bem delimitadas e salientes. Este tipo de lesão pode evoluir para cura espontânea, deixando uma cicatriz pouco pigmentada, ou evoluir para as outras formas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; EIRAS et al., 2015).

A LC disseminada é caracterizada pelo aparecimento múltiplo de lesões em duas ou mais localizações do tecido cutâneo. Provavelmente causada por disseminação linfática ou via corrente sanguínea a partir de uma lesão inicial. As lesões são ulceradas e papulosas. No Brasil, esta manifestação clínica é atribuída à espécie *L. braziliensis* embora outras espécies também possam estar envolvidas (GOTO e LINDOSO, 2012).

A LC difusa, embora mais rara, é uma das formas mais graves da LC, e ocorre em pacientes com anergia nas respostas imunológicas específicas. As lesões

aparecem em grandes áreas do tecido cutâneo, formando nódulos intradérmicos sem ulcerações e com grande presença de macrófagos vacuolados com alta carga parasitária. A LC difusa é atribuída à *L. amazonensis* e *L. mexicana* em países do “Novo Mundo” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A LMC é caracterizada por lesão dos tecidos da mucosa nasobucofaringeana. Este tipo de manifestação clínica pode ocorrer pela metástase dos parasitos do local da picada até a região mucosal da boca e das narinas, sendo que a grande maioria dos casos tem sido associada principalmente por abandono ao tratamento. Os sintomas iniciais não são muito específicos e podem incluir, dentre outros, o prurido nasal seguido de sangramento. A ulceração pode ocorrer lentamente causando a desfiguração do paciente, o que afeta a função respiratória e prejudica a nutrição. No Novo Mundo a doença está relacionada à *L. braziliensis*, mas *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* também podem desencadear o processo (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

A LV é também conhecida como calazar (“doença negra”) e este tipo de manifestação clínica é causada por espécies de *Leishmania* viscerotrópicas, sendo que não ocorre a formação de lesões cutâneas. É considerada como a forma mais grave das leishmanioses e pode ser fatal se não tratada (STEBUT, 2015). Na LV os parasitos fazem metástase do local da picada até órgãos internos, atingindo principalmente medula óssea, baço e fígado. Os sintomas são, na maioria das vezes, febre baixa e intermitente, mal estar, diarreia, dor abdominal e caquexia. Os pacientes apresentam hepatoesplenomegalia e alterações na contagem de leucócitos devido ao acometimento da medula óssea e sequestro esplênico. Os pacientes podem apresentar pigmentação escura na pele o que justifica o nome “doença negra” (VAN GRIENSVEN e DIRO, 2012). No “Velho Mundo” a LV é causada por *L. donovani* e *L. infantum* e, também, mais raramente, por cepas viscerotrópicas de *L. tropica*. No “Novo Mundo” a LV é causada por *L. infantum* (também conhecida por *L. chagasi* ou *L. infantum chagasi*) (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Alguns pacientes tratados para LV podem ser acometidos pela proliferação progressiva de parasitos no tecido cutâneo, o que é conhecido como leishmaniose dérmica pós calazar. Este tipo de recidiva pode ocorrer meses ou anos após a cura da LV e está ligado a fatores imunológicos do paciente (MCGWIRE e SATOSKAR,

2014). A manifestação clínica tem início com o aparecimento de máculas eritematosas e pápulas em torno das vias aéreas, podendo evoluir para a formação de placas e nódulos que se espalham para a região do tronco e membros do corpo paciente. As lesões são ricas em parasitos e tais pacientes são considerados potenciais reservatórios (VAN GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Neste trabalho foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. As duas primeiras espécies são consideradas as principais responsáveis pela LC no Brasil. Sendo que *L. amazonensis* é responsável pela LC localizada e LC difusa e LC disseminada, enquanto que *L. braziliensis* é responsável pela LMC e LC localizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). *Leishmania infantum* é a espécie responsável pela LV no Brasil e em alguns países do Velho Mundo. A espécie *L. major* está presente em vários países do Velho Mundo e é responsável por causar a LC disseminada e LC difusa (STEBUT, 2015).

1.4 Quimioterapia das Leishmanioses

O arsenal terapêutico utilizado contra leishmanioses é bastante limitado. Vários esforços têm sido realizados com o intuito de prevenir a infecção através dos métodos de vacinação, no entanto, nenhuma vacina está atualmente aprovada para uso humano (JERÔNIMO e PEARSON, 2016). O tratamento das leishmanioses é realizado através de quimioterapia. Várias drogas estão disponíveis para o tratamento da doença, porém, todas elas possuem grandes limitações como, alta toxicidade, variações quanto à eficácia, baixa adesão do paciente devido à administração parenteral prolongada e alto custo (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015).

Os medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses podem ser administrados no local da lesão ou de forma sistêmica. A escolha do tratamento varia de acordo com as diretrizes regionais (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014). No entanto, os critérios levam em consideração as manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, localização geográfica e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (WHO, 2012).

Os medicamentos de primeira escolha utilizados para o tratamento das leishmanioses consistem de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) como o n-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (BARBOSA et al., 2015), sendo que apenas o primeiro é utilizado no Brasil.

Os antimoniais estão em uso desde o início do século XX para o tratamento das leishmanioses, porém apresentam problemas com a eficácia, devido ao aparecimento de cepas resistentes, principalmente na Índia, em decorrência de tratamento descontínuo e aplicação de baixa dosagem (RATH et al., 2003). O modo de ação dos Sb^{+5} não está totalmente esclarecido. Eles são considerados uma pró-droga, no qual entram na célula hospedeira e sofrem conversão para a forma trivalente (Sb^{+3}), considerada como tóxica para amastigotas de *Leishmania* sp. O Sb^{+3} inibe a atividade glicolítica de amastigotas bem a β -oxidação de ácidos graxos levando à uma diminuição nos níveis de ATP do parasito. Além disso, as amastigotas possuem uma metaloprotease zinco dependente, indispensável para o desenvolvimento do parasito, e evidências apontam que o Sb^{+3} possa influenciar no

funcionamento desta enzima substituindo o zinco (RATH et al., 2003; ELMAHALLAWY e AGIL, 2015;).

O acúmulo dos antimoniais nos tecidos do paciente desencadeia sérios danos fisiológicos como cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade, levando o paciente a um severo quadro de efeitos colaterais (MENEZES et al., 2015). São eles: mialgia, anorexia, febre, mal-estar, cefaleia, sensação de gosto metálico na boca e letargia, entre outros (WHO, 2010a). Além disto, os antimoniais pentavalentes são contraindicados para o uso em gestantes pelo fato de atravessarem a barreira transplacentária e acumular no tecido nervoso do feto causando danos irreversíveis à criança. A utilização dos antimoniais também é contraindicada para pacientes acima de 50 anos, portadores de HIV, doenças cardíacas e renais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Não havendo resposta satisfatória com a utilização dos antimoniais pentavalentes, ou havendo alguma restrição para o uso destes, a opção é a utilização de drogas de segunda escolha que são a anfotericina B (Fungizon®), sulfato de paramomicina (Humatin®) e isotianato de pentamidina (Lomidina®) (BARBOSA et al., 2015). A anfotericina B é um antibiótico com potente atividade antileishmanial, utilizado para o tratamento de LC e LV. Sua eficiência está relacionada ao modo de ação, que se dá através da ligação aos ergosteróis da membrana celular do parasito, causando a desorganização desta estrutura, favorecendo a criação de poros que afeta a permeabilidade destas células, o que acarreta na morte do parasito por lise osmótica (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). Várias formulações da anfotericina B estão disponíveis: a anfotericina B deoxicolato, anfotericina B lipossomal e complexo lipídico de anfotericina B. A anfotericina B deoxicolato possui certa eficiência no tratamento das leishmanioses, porém, é também altamente tóxica. Seu uso é bastante restrito devido sua toxicidade. As formulações lipídicas de anfotericina B se mostram menos tóxicas, desta maneira, evitam maiores custos com os pacientes no que diz respeito a cuidados médicos em decorrência dos efeitos colaterais provocados pelo tratamento (BARBOSA et al., 2015). Porém, este último tipo de formulação é mais oneroso, o que limita seu uso generalizado (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

A paramomicina é um antibiótico considerado como medicamento de segunda escolha para o tratamento de LV e LC. Sua eficácia terapêutica possui variações no

que diz respeito à localização geográfica das regiões onde se encontram os pacientes. Alguns pacientes podem apresentar reações secundárias como hepatotoxicidade, dispneia, dores no local da injeção, ototoxicidade e nefrotoxicidade (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). Este medicamento possui uma formulação disponível para o uso tópico, indicado para tratamento de lesões cutâneas (WHO, 2010), porém não é indicado para o caso de leishmaniose mucocutânea (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

A pentamidina, outro medicamento de segunda escolha, tem sido usada para o tratamento de LC, LMC ou LV. Este fármaco possui ótima eficiência em relação aos outros, porém é limitado pelo fato de apresentar alta toxicidade, podendo desencadear um efeito de hipoglicemia, hipotensão, cefaleia e até mesmo morte súbita do paciente (BARBOSA et al., 2015).

A miltefosina (Milteforan®) foi inicialmente desenvolvida para o tratamento de câncer, e é considerado como o primeiro fármaco de uso oral efetivo para o tratamento de LV em países como Índia, Nepal e Bangladesh (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). Além disso, estudos recentes apontaram também a eficácia deste medicamento para leishmaniose dérmica pós calazar em algumas regiões do “Velho Mundo”. No que diz respeito ao seu uso no Brasil, em 2010, o Ministério da Saúde deliberou a incorporação da Miltefosina na Relação Nacional de Medicamentos essenciais (RENAME), e a partir de 2017, o medicamento seria disponibilizado para o tratamento da doença pelo Sistema único de saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Este medicamento apresenta algumas vantagens em relação aos medicamentos citados anteriormente, principalmente por ser administrado por via enteral, porém, pode desencadear processos alérgicos, insuficiência renal, hepatotoxicidade, dores de cabeça, náuseas, vômito e diarreia, principalmente nas primeiras semanas de tratamento (EIRAS et al., 2015). A miltefosina possui ainda potencial efeito teratogênico e por isso seu uso é contraindicado durante a gravidez e período de lactação (EIRAS et al., 2015; ELMAHALLAWY e AGIL, 2015; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014) Na figura 6 estão demonstradas as estruturas dos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

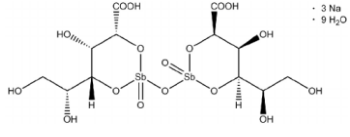
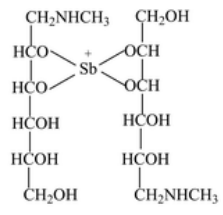
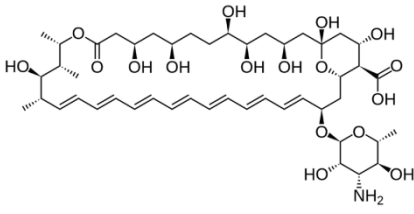
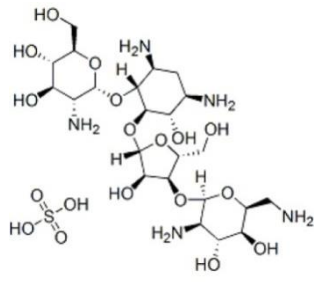
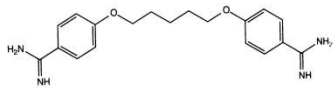
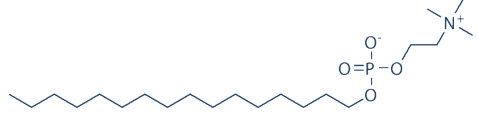
Fármaco	Estrutura
Estibogluconato de sódio	 <p>The structure shows a central antimony atom (Sb) coordinated to two gluconate rings and two hydroxyl groups. The gluconate rings are in their cyclic pyranose form. To the right, it is noted as a sodium salt: $\cdot 3 \text{ Na}$ and $\cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$.</p>
Antimoniato de Meglumina	 <p>The structure shows a central antimony atom (Sb) coordinated to two meglumine rings and two hydroxyl groups. The meglumine rings are in their cyclic pyranose form, with a methylamino group (-CH₂NHCH₃) at the C2 position.</p>
Anfotericina B	 <p>The structure shows a complex polyene macrolide with a long unsaturated side chain and a dihydroxyethyl side chain, and a dihydroxyethyl side chain with an amino group.</p>
Sulfato de Paramomicina	 <p>The structure shows a complex polyamine alkaloid with multiple amino groups and hydroxyl groups, and a sulfate group.</p>
Isocianato de pentamidina	 <p>The structure shows a symmetrical molecule with two 4-amino-2-isocyanatophenyl groups connected by a hexamethylene chain.</p>
Miltefosina	 <p>The structure shows a long alkyl chain (10 carbons) attached to a phosphorus atom, which is also bonded to a nitrogen atom with a methyl group and a dimethylamino group.</p>

Figura 6: Estrutura química dos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. Fonte: NAVARRO et al, 2010 (Adaptado).

1.5 Esteroides, colesterol e ácidos biliares

Os esteroides consistem em um conjunto de compostos apolares associados aos lipídios, encontrados em todos os seres eucariotos e alguns procariotos, e desempenham importantes funções biológicas. No que diz respeito à sua estrutura molecular, os esteroides possuem como característica principal uma estrutura tetracíclica formada por três anéis hexagonais (A, B e C), e um anel pentagonal (D), totalizando 17 carbonos (Figura 7). Este conjunto de anéis é denominado *ciclopentano-per-hidro-fenantreno* (CPPF) e é comumente denominado de núcleo esteroidal (MUKHOPADHYAY eMAITRA, 2004; NES, 2011).

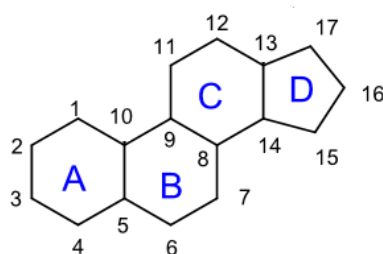


Figura 7: Estrutura em comum dos esteroides. Fonte: NES, 2011 (Adaptado).

Os esteroides constituem um grupo de compostos bastante diversificados, os quais incluem os hormônios como corticoides, progestinas, estrogênios, androgênios, vitamina D e o colesterol (DANGATE, SALUNKE e AKAMANCHI, 2011). Na terapêutica, os derivados esteroides tem sido largamente utilizados como agentes anti-inflamatórios e reguladores do sistema imune (ERICSON-NEILSEN eKAYE, 2014). Estes compostos são de grande interesse da indústria farmacêutica por possuírem variadas propriedades farmacológicas e grande capacidade de permear pela bicamada lipídica das células. Além disso, sabe-se que pequenas mudanças na estrutura destas moléculas podem resultar em respostas biológicas diversificadas (GUPTA, KUMAR e NEGI, 2013).

Ressalta-se que, dentre os esteroides, o colesterol deve ser um dos mais importantes, visto ser um dos constituintes da bicamada lipídica das células de mamíferos, sendo responsável por aumentar sua resistência mecânica e reduzir a permeabilidade no transporte passivo de água.

O colesterol também é precursor de diversos outros compostos importantes em um organismo, tais como hormônios sexuais, vitamina D e ácidos biliares (ERIKSSON e ERIKSSON, 2011). Parte do colesterol presente no organismo é sintetizada pelos hepatócitos, células constituintes do fígado, e outra parte é obtida através da alimentação. As moléculas de colesterol são transportadas via corrente sanguínea, e distribuídas para os tecidos através de lipoproteínas. A molécula de colesterol possui o núcleo CPPF, estrutura em comum dos esteróis, acrescida de uma hidroxila na posição C-3 do anel A, uma dupla ligação em C-5 do anel B e uma ligação em cadeia ramificada com 8 carbonos em C-17 do anel D-17, totalizando 27 carbonos conforme demonstrado na figura 8 (CAMPO e CARVALHO, 2007; MUKHOPADHYAY e MAITRA, 2004; NES, 2011).

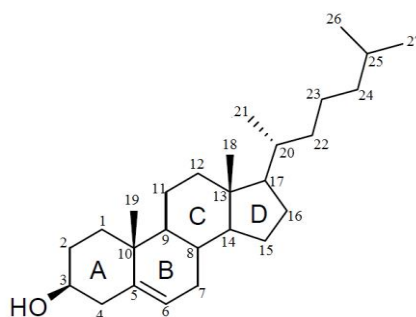


Figura 8: Estrutura da molécula de colesterol. Fonte: NES, 2011 (Adaptado).

A metabolização do colesterol pode ocorrer através de duas vias distintas, ambas envolvendo as enzimas desmolase e 7 α -hidroxilase. A clivagem do colesterol através da enzima desmolase gera a pregnenolona, um intermediário comum na biossíntese de todos os outros esteroides endógenos. Além disso, o colesterol pode ser convertido em ácidos e sais biliares; neste caso o processo ocorre através da enzima 7 α -hidroxilase e o processo é realizado através de várias etapas complexas envolvendo o núcleo esteroidal e a cadeia lateral destes compostos. Este representa o mais importante catabolismo do colesterol (CAMPO e CARVALHO, 2007).

Existem duas classes importantes de ácidos biliares, aqueles produzidos nos hepatócitos através da modificação do colesterol, denominados ácidos biliares primários, e aqueles produzidos através da modificação por bactérias da microbiota intestinal, denominados ácidos biliares secundários (Figura 9). O ácido primário sintetizado em maior quantidade em um organismo é o ácido cólico, este possui o

núcleo CPPF hidroxilado nas posições C-3, C-7 e C-12, e são conjugados às moléculas de taurina ou glicina antes de serem excretados pela bile. Quanto aos ácidos biliares secundários, durante o ciclo entero-hepático, as enzimas bacterianas removem a hidroxila da posição C-7 do ácido cólico, formando a nova classe de ácidos biliares 7-desoxi. O ácido desoxicólico é um dos mais comuns formados pela 7-desidroxilação bacteriana (HOFMANN e HAGEY, 2008). As moléculas de ácidos biliares são anfipáticas e se associam aos lipídeos da dieta formando micelas, que por sua vez auxiliam na digestão de gorduras e na absorção intestinal das mesmas (MUKHOPADHYAY e MAITRA, 2004).

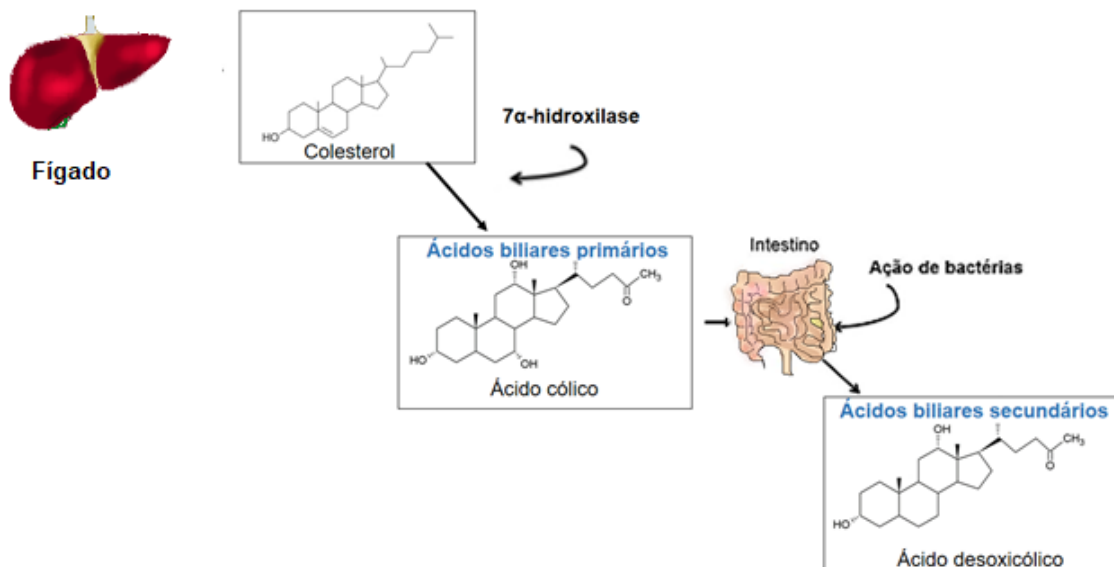


Figura 7: Esquema resumido da biossíntese dos ácidos biliares. No fígado o colesterol é metabolizado pela enzima 7 α -hidroxilase e é convertido em ácidos biliares primários, estes no intestino, sofrem ação de enzimas bacterianas e são convertidos em ácidos biliares secundários. Fonte: Próprio autor.

A ligação em *cis* entre os anéis A e B da porção esteroidal oferecem aos ácidos cólico e desoxicólico, bem como os outros ácidos representantes desta classe, uma curvatura na molécula gerando duas faces, como representado na figura 10. A face côncava (face α) apresenta natureza hidrofílica devido à presença

de hidroxilas, e a face convexa (face β) é completamente hidrofóbica devido à presença de apenas o grupo metila não polar (ZHU e NICHIFOR, 2002). Esta conformação oferece à molécula uma característica anfifílica e favorece, conseqüentemente a sua capacidade emulsionante, o que é bastante relevante para sua função biológica em um organismo. De um modo geral, o grau de hidroxilação influencia na hidrofiliidade da molécula, ou seja, quanto mais hidroxilas houver na molécula, mais hidrofílica ela será (PIRES e COLAÇO, 2004).

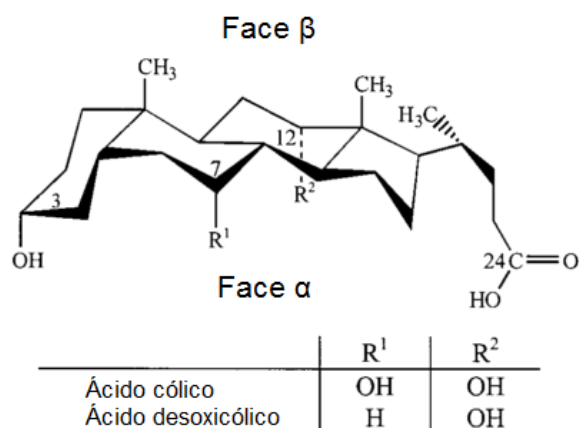


Figura 8: Estrutura química dos ácidos biliares mostrando sua curvatura devido a ligação cis entre os anéis A e B. Face α é a porção hidrofílica, e face β a porção hidrofóbica. Fonte: ZHU e NICHIFOR, 2002 (Adaptado).

Além da grande importância biológica que os ácidos biliares exercem em um organismo, eles representam grande expectativa na área farmacológica, no intuito de desenvolver novos medicamentos ou mesmo melhorar a capacidade farmacocinética de algumas drogas (MUKHOPADHYAY e MAITRA, 2004; VIRTANEN e KOLEHMAINEN, 2004). Estudos diversificados mostram que estes compostos e seus derivados podem ser utilizados em diversas áreas medicinais, como a utilização de ésteres biliares para o tratamento de doenças fúngicas (MARPLES e STRETTON, 1990), sensibilizadores de bactérias Gram-negativas a antibióticos (LI et al., 1998), bem como derivados de ácidos biliares apresentaram atividade antioxidante e fotoprotetora (SANTOS et al., 2015). Também, diversas modificações nas moléculas de ácidos biliares produziram compostos com atividade anticancerígena (GUPTA et al., 2013; SOUSA, 2015).

É interessante ressaltar que tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania* sp, possuem em sua membrana celular o ergosterol, um esterol bastante similar ao colesterol dos mamíferos. O ergosterol exerce um papel importante nos tripanossomatídeos, tanto na manutenção da arquitetura celular, interagindo com os ácidos graxos e fosfolipídeos para controlar a fluidez da membrana, quanto participando do metabolismo, regulação e desenvolvimento celular (ANDRADE-NETO, 2009). Desta maneira, os esteróis destes parasitos tornam-se importantes alvos para pesquisas que envolvem a descoberta de novos fármacos (SOUZA e COLA, 2009). No entanto, estudos que envolvem a atividade antileishmanial destes compostos e seus derivados ou conjugados, ainda são escassos.

É possível encontrar algumas publicações em relação a esta aplicação por nosso grupo de pesquisa e por outros. Por exemplo, um estudo realizado por Lara, e colaboradores (2010) mostrou que as cerageninas, um grupo de compostos formados por um esqueleto esteroidal ligado aos múltiplos grupos de amins catiônicas, apresentou efeito relevante em promastigotas de *L. major* e em amastigotas e tripomastigotas de *Tripanossoma cruzi*, este resultado foi relacionado às características do potencial de membrana celular do parasito associadas às estruturas das moléculas em estudo. Antinarelli e colaboradores (2012), realizaram um estudo avaliando a atividade antileishmanial de aminoquinolinas conjugados ao ácido cólico, mostrando desta maneira que, a atividade de alguns compostos pode ser melhorada quando estes são conjugados à esteroides, devido às características lipofílicas que estes possuem, facilitando desta maneira, a permeação do fármaco pela membrana celular. Neste mesmo sentido, Leverrier e colaboradores (2013) mostrou que os ácidos biliares são promissores como carreadores de fármacos, pois a conjugação de ácidos litocólico e quenodesoxicólico à um grupo de alcalóides cinchona naturais resultou em aumento na atividade dos compostos em *L. mexicana*, *T. brucei* e *P. falciparum*.

Assim, baseando na importância desta classe de moléculas, associadas a inegável necessidade de alternativas para o tratamento das leishmanioses, este trabalho buscou determinar a atividade de derivados de diferentes esteroides em diferentes espécies de *Leishmania*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antileishmanial *in vitro* de derivados esteroidais em formas promastigotas e amastigotas *Leishmania* sp, bem como o efeito tóxico em células de mamíferos. Além disto, objetivou-se determinar *in vitro* possíveis alvos/alterações celulares importantes na atividade biológica e *in silico* a biodisponibilidade oral e farmacocinética do composto mais promissor.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar a citotoxicidade dos derivados esteroidais, em promastigotas de espécies de *Leishmania* responsáveis por leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*) e visceral (*L. infantum*).
- 2- Avaliar a citotoxicidade dos derivados esteroidais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.
- 3- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em amastigotas de *L. amazonensis*;
- 4- Determinar o índice de seletividade e especificidade dos compostos testados;
- 5- Relacionar a estrutura com a atividade e citotoxicidade apresentada pelos compostos testados.
- 6- Determinar alterações celulares e bioquímicas importantes, em promastigotas de *L. amazonensis*, induzidas pelo composto mais ativo, tais como alterações de morfologia, funcionalidade mitocondrial, integridade da membrana plasmática e ciclo celular.
- 7- Avaliar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do melhor composto *in silico*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Visando facilitar a compreensão da proposta deste trabalho foi realizado um desenho experimental, apresentado na figura 11.

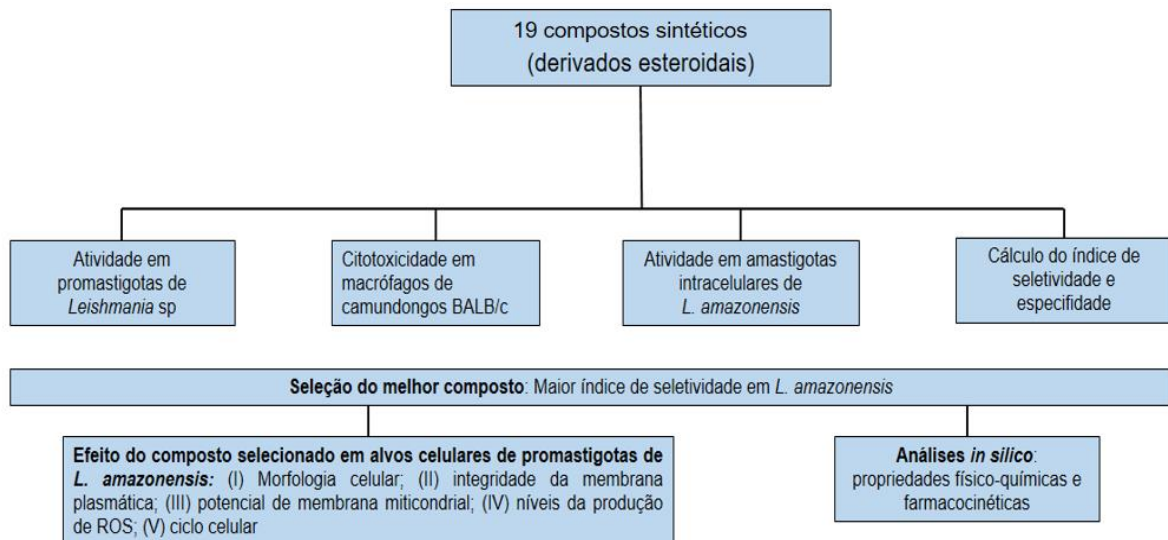


Figura 9: Desenho experimental do trabalho: 19 compostos (derivados esteroidais) foram testados em formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania*. Em seguida, a citotoxicidade destes compostos foram avaliadas utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com intenção de direcionar os estudos da atividade destes na forma amastigota intracelular do parasito. A partir dos resultados obtidos, foram calculados os índices de seletividade e especificidade dos compostos, com intuito de evidenciar os compostos mais ativos. Dentre estes, foi selecionado o composto de síntese financeiramente acessível, mais seletivo e específico para ambas as formas de *L. amazonensis*. Feito isso, foi avaliado o efeito do composto selecionado em alguns alvos em promastigotas de *L. amazonensis*: Morfologia celular; integridade da membrana plasmática; potencial de membrana mitocondrial; níveis da produção de ROS e ciclo celular.

3.2 Compostos Utilizados

Os compostos testes utilizados neste experimento foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas Químicas (NUPEQ) pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química/Instituto de Ciências exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os compostos consistem em derivados do colesterol (Tabela 1), derivados do ácido cólico (Tabela 2), e derivados do ácido desoxicólico (Tabela 3).

As drogas de referência foram: anfotericina B, fabricada pelo laboratório Cristália, São Paulo – Brasil e gentilmente cedida pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora; miltefosina fabricada pela Cayman Chemical Company, Michigan – USA.

Tabela 1: Estruturas químicas e nomenclatura dos derivados do colesterol.

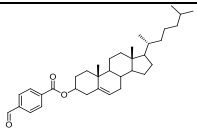
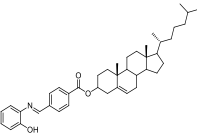
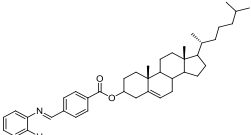
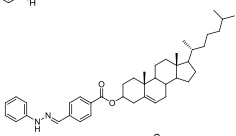
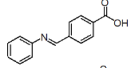
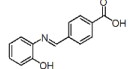
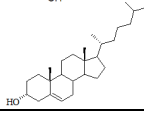
Composto	Estrutura	Nome Químico
1		4'-(3-colesteriloxycarbonil) benzaldeído
2		4'-(3-colesteriloxycarbonil) benzilideno-(2-hidroxi) anilina
3		4'-(3-colesteriloxycarbonil) benzilideno-anilina
4		4'-(3-colesteriloxycarbonil) benzilideno-fenil-hidrazina
5		(<i>E</i>)-4-carboxi-N-(benzilideno)anilina
6		(<i>E</i>)-4-carboxi-N-(2'-hidroxibenzilideno) anilina
Colesterol		Colesterol

Tabela 2: Estrutura e nomenclatura dos derivados do ácido cólico.

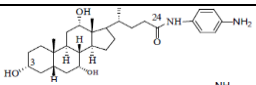
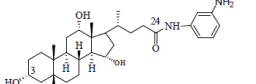
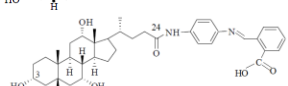
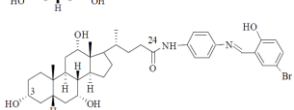
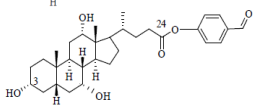
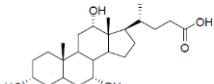
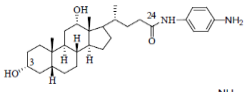
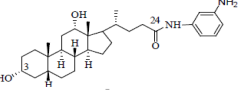
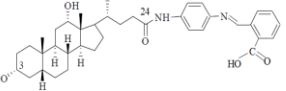
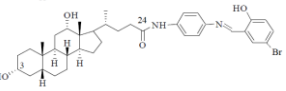
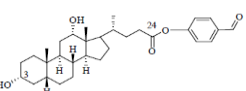
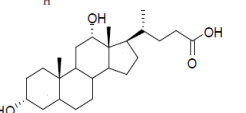
Composto	Estrutura	Nome químico
7c		<i>N</i> -(4-aminofenil) - 4 - (3,7,12-tri-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro- 1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
8c		<i>N</i> -(3-aminofenil) - 4 - (3,7,12-tri-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro- 1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
9c		Ácido-2-(4-(4-(4-(3,7,12-tri-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro- 1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamido) fenilimino) metil) benzoico
10c		4- <i>N</i> -(4-(5-bromo-2-hidroxibenzilidenoamino) fenil) -4-(3,7,12-tri-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
11c		4-formilfenil 4-(3,7,12-tri-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanoato
AC		Ácido Cólico

Tabela 3: Estrutura e nomenclatura do ácido desoxicólico.

Composto	Estrutura	Nomenclatura
7d		<i>N</i> -(4-aminofenil) - 4-(3,12-di-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
8d		<i>N</i> -(3-aminofenil) - 4-(3,12-di-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
9d		Ácido -2-(4-(4-(4-(3,12-di-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamido) fenilimino) metil) benzoico
10d		4- <i>N</i> -(4-(5-bromo-2-hidroxi-benzilidenoamino) fenil) -4 - (3,12-di-hidroxi- 10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanamida
11d		4-formilfenil 4-(3,12-di-hidroxi-10,13-dimetil-hexadeca-hidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[α]fenantren-17-il) pentanoato
AD		Ácido desoxicólico

3.3 Considerações éticas

Os camundongos fêmeas da linhagem BALB/c procedentes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora foram mantidos no Laboratório de parasitologia/UFJF em estante ventilada com sistema de exaustão de ar (Alesco, São Paulo, Brasil) e sob condições controladas de luminosidade (ciclo de 12/12h, luzes acesas das 6h da manhã as 06h da noite) e temperatura (19-22°C). Os animais foram mantidos em gaiolas com ração (Nuvilab, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram utilizados com idade aproximada entre 6-8 semanas e peso médio entre 18-22g. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (Protocolo nº 013/2015 e nº 012/2015 - CEEA), conforme apêndices A e B no final deste trabalho.

3.4 Cultivo dos Parasitos

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio Warrem (Infusão de coração e cérebro-BHI) suplementado com hemina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, USA) e ácido fólico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) major* (MRHO/SU/59/P) foram cultivadas em meio BHI (Infusão de coração e cérebro-BHI) suplementado com L-glutamina (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Promastigotas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2008/1112) foram cultivadas em meio 199 (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). Em todas as condições de cultivo foram acrescidos 10% de Soro Bovino Fetal inativado (SBF) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e 0,1% de antibiótico. Os parasitos foram mantidos à 25°C em estufa BOD (FANEM).

Utilizou-se ainda, neste estudo, cepas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) transfectada com o gene da proteína fluorescente vermelha (*Red fluorescent protein-RFP*) cedida gentilmente pelo Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares do Centro de Pesquisa René Rachou/ Fundação Oswaldo Cruz. As promastigotas do parasito foram cultivados em meio 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10 % de SBF inativado, hemina, 0,1% solução vitamínica [cloreto de colina (100 mg/mL); pantotenato de cálcio (100 mg/mL); ácido fólico (100 mg/mL); nicotinamida (100 mg/mL); riboflavina (100 mg/mL); hidrocloreto piridoxal (100 mg/mL); riboflavina (100 mg/mL); hidrocloreto de tiamina (100 mg/mL); i-inositol (100 mg/mL) (MEM Vitamin Solution Thermo Fisher Cientifc)] e 0,1% de solução de Penicilina/Estreptomicina , sendo mantidos em garrafas para cultivo de células, em estufa BOD (FANEM) a 25°C.

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em formas promastigotas de *Leishmania*

A atividade antipromastigota dos compostos foi realizada em *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. major* e *L. chagasi* e determinada através do método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazólico (MTT) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), o qual as desidrogenases mitocondriais de células vivas, reduzem o tetrazólio sódico de cor amarela em formazan, de cor lilás (MOSMANN, 1983). As formas promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram suspensas em meio de cultivo suplementado específico para cada espécie de *Leishmania*, como descrito no item anterior, em uma concentração de $2,0 \times 10^6$ células/poço para *L. amazonensis* e $3,0 \times 10^6$ para *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major*, após contagem em câmara de Neubauer. Os compostos testados foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para o preparo da solução estoque (300 mM), em seguida, a solução estoque foi diluída em água, chegando em uma concentração de 3mM do composto, e formando uma solução com baixa concentração de DMSO [$<0,8\%$ (v/v)], não tóxica para os parasitos. As soluções de 3mM então, foram adicionadas aos poços e através de diluição seriada foram realizados os tratamentos (100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195 e 0,097 μM /poço). As placas foram incubadas em BOD a 25°C, e após 72 horas de incubação, foi adicionado 10 μl de MTT à 5 mg/mL em cada poço, e as placas foram novamente incubadas por 4 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 μl de isopropanol acidificado (0,7% HCl 10N) e as placas foram lidas em espectrofotômetro à 570 nm (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vanta, Finlândia).

Os tratamentos foram realizados em duplicatas, em três experimentos independentes. Os resultados foram obtidos em porcentagem de inibição de crescimento das promastigotas em relação ao controle negativo, e a partir destes foi calculado o CI_{50} de cada molécula (concentração molar do composto capaz de inibir 50% do crescimento celular) pelo programa *GraFit 5* (Erithacus Sftware Ltda., Horley, U.K.). A Anfotericina B e a Miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

A citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos foi avaliada utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c estimulados com 2mL de Tioglicolato 3%. Após 72horas, foi realizado o lavado peritoneal dos camundongos em solução de HANK (Sigma Chemical Co-St. Louis, MO, USA). A solução de células obtida no lavado foi centrifugada a 1000rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi ressuspenso em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA). Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços (Corning, NY 14831 USA) em uma concentração de 2×10^6 células/mL, as placas foram incubadas overnight em estufa a 33°C com atmosfera de 5% de CO₂. Os poços foram lavados com PBS estéril em temperatura ambiente para remoção das células não aderidas. Posteriormente, foram adicionados meio RPMI-1640 enriquecido com SBF e os compostos a serem testados foram adicionados em várias concentrações (150,0; 75,0; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34; 1,17; 0,58; 0,290; 0,146µM) através de diluição seriada. As placas foram novamente incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C. Após 72 horas, foram adicionados 10µL de MTT à 5mg/mL em cada poço e após duas horas, a reação foi interrompida pela adição de isopropanol levemente ácido (7%HCl 10N). A leitura foi realizada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro (Multiskan EX- Thermo Electron Corporatoin, Vantaa, Finlândia).

Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e em alguns poços não houve adição de compostos (controle negativo). Os resultados foram obtidos em porcentagem de inibição dos macrófagos em relação ao controle e a partir destes foi calculado o CC₅₀ de cada molécula (concentração citotóxica capaz de matar 50% das células) pelo programa *GraFit 5* (Erithacus Sftware Ltda., Horley, U.K.).

3.7 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares

Os ensaios biológicos em formas amastigotas foram realizados utilizando macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c estimulados e obtidos como descrito no item anterior. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, elas foram plaqueadas em placas de 24 poços (Costar – Corning Incorporated) na concentração de 2×10^6 células/poço e incubadas em estufa a 33°C em atmosfera de 5% de CO₂ overnight. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril em temperatura ambiente para remoção das células não aderidas. Em seguida, promastigotas de *L. amazonensis*-RFP em fase estacionária foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas a uma concentração de 20×10^6 (proporção de 10 parasitos para 1 macrófago) em meio RPMI suplementado com 10% de FBS, e adicionadas nos poços contendo macrófagos deixando interagir por 4 horas a 33°C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, os poços foram novamente lavados com PBS estéril para retirada dos parasitos não fagocitados e os compostos a serem testados foram adicionados em diferentes concentrações (100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25µM) então, as placas foram novamente incubadas como descrito acima. Após 72 horas de tratamento, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 100µL de água deionizada/poço, e fundo de cada um deles foi raspado, e o conteúdo foi transferido para placa negra de 96 poços de fundo transparente. O processo foi realizado por duas vezes e as placas foram lidas em fluorímetro (FLx800™ *Fluorescence Reader*, BioTek) a 540nm de excitação, 600nm de emissão.

Os ensaios biológicos foram realizados em duplicata e em três experimentos independentes, sendo que alguns poços foram utilizados como controles: macrófagos infectados sem adição de compostos (controle negativo), poços somente com macrófagos (branco) e poços com macrófagos infectados tratados com miltefosina e anfotericina B (controle positivo). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle negativo.

3.8 Determinação do índice de seletividade (IS) e índice de especificidade (IE) dos compostos

O IS demonstra a relação da toxicidade do composto entre células de mamíferos e as formas parasitárias. Foi obtido pela razão entre o valor da concentração citotóxica (CC_{50}) do composto em células de mamíferos, neste caso macrófagos peritoneais, e a concentração inibitória (CI_{50}) em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (TEMPONE et al., 2011).

O IE estabelece a especificidade do composto entre as duas formas do parasito, promastigota e amastigota. Foi calculado pela razão entre o CI_{50} do composto para formas amastigotas e o CI_{50} para promastigotas (MUYLDER et al., 2011).

3.9 Modo de ação do composto 11d em promastigotas de *L. amazonensis*

3.9.1 Avaliação da morfologia de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d

Para avaliar a morfologia celular, promastigotas em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 54,40 e 108,8 μM do composto **11d** e incubadas por 24h a 25°C. Após este período, as células foram centrifugadas, fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e lavadas com PBS por duas vezes. Subsequentemente, as células foram colocadas em lâminas de vidro, em duplicatas, e devidamente identificadas. Após a secagem, as células foram coradas com Giemsa, analisadas por microscopia óptica (Olympus BX53, Shinjuku, Tokyo, Japan) e fotografadas (Olympus DP73, Shinjuku, Tokyo, Japan). Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

3.9.2 Avaliação da integridade de membrana Plasmática em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto **11d**

A integridade da membrana plasmática de promastigotas foi avaliada utilizando uma marcação com Iodeto de Propídeo (PI). O PI é um marcador fluorescente, que permeia pela membrana plasmática danificada, se liga ao DNA da célula.

Para avaliar se o tratamento com o composto **11d** induziu alterações na integridade da membrana plasmática de parasitos tratados, promastigotas em fase exponencial de crescimento foram tratadas ou não tratadas com 54,40 e 108,8 μM (valores correspondentes a 1 e 2 vezes o IC_{50} , respectivamente) do composto **11d** e em seguida, incubadas por 24h a 25°C. Após este período as células foram lavadas com PBS, ajustadas para 5×10^6 células em 200 μL , e transferidas para placa negra de fundo transparente. Subsequentemente, as promastigotas foram incubadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PI por 15 minutos. A intensidade de fluorescência foi determinada através de espectrofluorímetro (FLx800), utilizando os comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Parasitos aquecidos à 65 °C foram utilizados como controle positivo e células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

3.9.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d

A avaliação do $\Delta\Psi_m$ em promastigotas tratadas com o composto 11d foi determinada utilizando marcação com o Mitotracker® Red CM-H2XROS (MTK). O MTK é uma substância não fluorescente, que no interior de células vivas sofre oxidação tornando-se uma substância capaz de emitir fluorescência vermelha. O MTK se distribui pelo citoplasma da célula e acumula na mitocôndria devido ao $\Delta\Psi_m$ normal da célula (MACHADO, 2017). Desta maneira, promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) em fase logarítmica de crescimento, foram incubadas na presença ou ausência do composto 11d por um período de 24h, em uma temperatura de 25°C em BOD. Após este período, as células foram lavadas com PBS e 1×10^7 células foram transferidas para microtubos cônicos e incubadas com 500 nM de MTK e por um período de 40 minutos em uma temperatura de 25°C em BOD. Em seguida, os parasitos foram lavados por três vezes e ressuspensos em PBS. Então, uma alíquota de 200 μ L desta solução contendo os parasitos foram transferidas para uma placa negra de fundo transparente e a intensidade de fluorescência das células foi avaliada usando espectrofluorímetro (FLx800) em comprimentos de ondas de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo e FCCP (20,0 μ M/mL) foi utilizado como controle positivo.

3.9.4 Estudo dos níveis de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d

Os níveis da produção de EROs foram determinados utilizando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). Essa substância, quando na presença de EROs produzidos pela célula durante o estresse oxidativo, é oxidada e convertida à uma substância fluorescente, denominada diclorofluoresceína. Este protocolo foi realizado de acordo com Machado (2017). Promastigotas (1 x 10⁷ células/mL) na exponencial de crescimento, não tratadas (controle negativo) ou tratadas com 54,40 e 108,8 µM do composto **11d** foram incubadas por 24h, a 25°C em BOD. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, e o número de promastigotas ajustado para 20 x 10⁶ células em um volume de 200 µl de PBS em placa negra de fundo transparente de 96 poços. Um volume de 4µl de uma solução de H₂DCFDA (1mM) foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Após o período de incubação a intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofluorímetro (FLx800) em um comprimento de onda de 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Miltefosina (44,0 µM) foi utilizada como controle positivo.

3.9.5 Avaliação de alterações nas fases do ciclo celular em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) em fase exponencial de crescimento foram incubadas ou não (controle negativo) com o composto **11d** (54,40 e 108,8 μM) por um período de 24h, à uma temperatura de 25°C em BOD. Após este período, os parasitos foram lavados em PBS por duas vezes e incubados com uma solução de etanol 70% por um período de 60 minutos à uma temperatura de -20°C. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 280 μl de solução de Ribonuclease a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas a 37°C por 1 hora, ao abrigo da luz. Posteriormente, as células (3×10^6 células) foram transferidas para tubos de citometria e 20 μl de PI à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram adicionados e as células novamente incubadas por um período de 20 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os dados foram adquiridos pelo citômetro Cytoflex (Beckman Coulter, Indianapolis, IN 46268, EUA) equipado com o software CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, Indianapolis, IN 46268, EUA). Um total de 5.000 eventos foram adquiridos usando o canal PI610ND-A. Miltefosina (44,0 $\mu\text{M}/\text{mL}$) foi utilizada como controle positivo.

3.10 Estudos *in silico*

Com intuito de avaliar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos derivados esteroidais, foi selecionado o composto que obteve o maior IS para a forma amastigotas de *L. amazonensis* para os estudos *in silico*. Para a realização desta etapa foi utilizado dois softwares livres disponíveis em plataforma online. Os procedimentos estão descritos a seguir.

3.10.1 Propriedades físico-químicas do composto selecionado

A estrutura química do composto **11d** foi desenhada no software livre Molinspiration Chem informatics®, uma ferramenta online gratuita (<http://www.molinspiration.com/>). Este software calcula, com base em descritores moleculares, propriedades físico-químicas como LogP, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, massa molecular e número de violações à regra dos 5 de Lipinsk. Este software também gera, automaticamente, a notação SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) das moléculas. Esta notação descreve a natureza e a topologia da estrutura molecular e foi necessária para alimentar o software AdmetSAR, utilizado para calcular as características farmacocinéticas do composto em questão.

3.10.2 Propriedades farmacocinéticas e potencial de toxicidade dos compostos

A notação SMILES então, foi inserida na versão do software livre *admetSAR*® (<http://lmmmd.ecust.edu.cn:8000/>). Para avaliar os parâmetros de absorção, foram utilizados os modelos de permeação pela barreira hematoencefálica, absorção pelo intestino humano, permeabilidade em células Caco-2 (célula de carcinoma do colo intestinal). No que diz respeito ao metabolismo do composto, foi avaliado se o composto seria substrato e/ou inibidor de enzimas do complexo citocromo P 450 (CYP 450). Para avaliar parâmetros relacionados com a excreção do composto, foi avaliada a capacidade de inibição de transporte renal de cátions. O perfil citotóxico do composto foi traçado através do teste de toxicidade AMES, classificação de toxicidade oral aguda e potencial carcinogênico.

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade dos compostos em formas promastigotas de *Leishmania* sp e em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

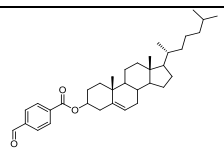
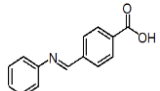
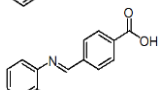
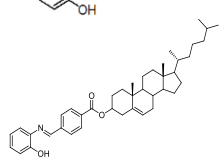
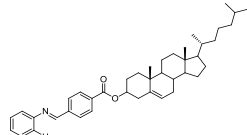
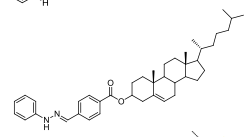
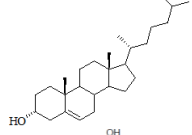
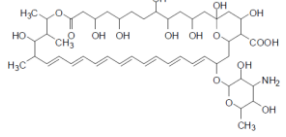
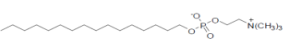
A avaliação da atividade antileishmanial dos compostos em formas promastigotas de *Leishmania* sp e citotoxicidade em macrófagos peritoneais foram realizadas após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.

Uma avaliação dos resultados da atividade antileishmanial dos derivados iminos aromáticos em formas promastigotas de *Leishmania* sp permitiu uma análise da relação estrutura-atividade. A partir da análise dos compostos 2 e 3 (tabela 4), que apresentam uma diferença estrutural de um grupo hidroxila na posição *orto* do anel aromático, levou a uma diferença considerável nos resultados de atividade. O composto 3, apresentou uma potente atividade antileishmanial em promastigotas de *Leishmania* sp, (CI_{50} = 1,81 μ M em *L. amazonensis*; 1,86 μ M *L. braziliensis*; 1,93 μ M *L. major*) sendo superior à atividade da miltefosina (CI_{50} = 22,0 μ M; 29,66 μ M e 20,0 μ M, respectivamente), e comparável à atividade apresentada pela anfotericina B (CI_{50} = 0,15 μ M; 1,24 μ M; 1,31 μ M, respectivamente), fármacos de referência utilizados para o tratamento das leishmanioses. Nota-se que a ausência da hidroxila na posição *orto* do anel aromático é um dos fatores que pode justificar a perda de atividade apresentada pelo composto 2 (CI_{50} >100 μ M). Na intenção de realizar modificações estruturais nas iminas aromáticas, com a adição de um grupo lipofílico, como por exemplo, neste caso o colesterol, os resultados mostraram uma diminuição na atividade da molécula resultante. Mais especificamente o composto 4 não apresentou as mesmas características em relação à atividade da molécula 3, exceto para *L. braziliensis* e *L. major* (CI_{50} de 7,00 μ M e 23,89 μ M, respectivamente). No entanto, estes resultados ainda podem ser comparados aos resultados apresentados pela miltefosina (CI_{50} = 29,66 μ M para *L. braziliensis*; 20,0 μ M para *L. major*). Sendo assim, o referido composto destaca-se por ser 4,2 vezes mais ativo para a espécie *L. braziliensis* em relação à miltefosina.

Com exceção para *L. braziliensis*, o colesterol, bem como os materiais de partida para obtenção dos derivados, foram testados e não apresentaram atividade antileishmanial para maioria das espécies.

É importante destacar que nenhum dos compostos derivados do colesterol apresentaram citotoxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (tabela 4). Apresentando desta maneira, uma grande vantagem em relação aos fármacos de referência que foram utilizados neste trabalho, os quais são conhecidos pela toxicidade que apresentam.

Tabela 4: Efeito dos derivados do colesterol e seus precursores em promastigotas de *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. infantum*, *L. major* e macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.

Composto	estrutura	CI ₅₀ * (µM)				CC ₅₀ (µM)
		<i>L. ama.</i>	<i>L. braz.</i>	<i>L. inf.</i>	<i>L. major</i>	Macrófagos
1		>100	>100	>100	>100	>150
2		>100	>100	>100	>100	>150
3		1,81 (±0,29)	1,86 (±0,17)	>100	1,93 (±1,93)	>150
4		>100	7,00 (± 0,61)	>100	23,89 (± 2,9)	>150
5		>100	>100	>100	>100	>150
6		>100	>100	>100	>100	>150
Colesterol		>100	27,9 (± 3,9)	>100	>100	>150
Anfotericina B		0,15 (±0,02)	1,24 (±0,06)	1,08 (±0,004)	1,31 (±0,07)	85,8 (± 30,4)
Miltefosina		22,0 (± 0,5)	29,66 (± 0,017)	2,64 (± 0,29)	20,0 (± 0,52)	131,9 (± 3,9)

*CI₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*.

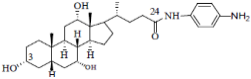
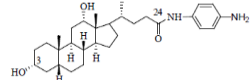
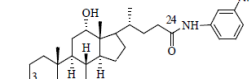
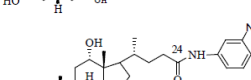
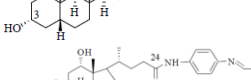
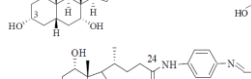
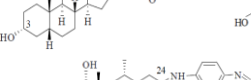
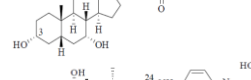
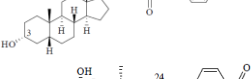
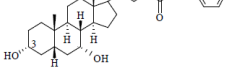
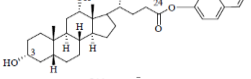
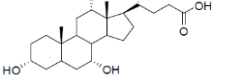
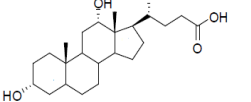
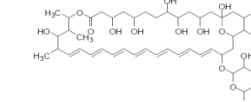
Outro grupo de iminas, aminas e aldeídos aromáticos, conjugados a ácidos biliares, ácido cólico e ácido desoxicólico, foram avaliados. Para permitir uma avaliação da relação estrutura-atividade, os resultados obtidos para estes dois grupos foram analisados concomitantemente, e os compostos derivados destes ácidos, foram dispostos de maneira intercalada e aos pares (tabela 5). Os derivados do ácido cólico e desoxicólico, diferem apenas pela presença ou ausência do grupo hidroxila na posição C-7 da porção esteroidal. Para facilitar a identificação dos derivados do ácido cólico, estes apresentam numeração acompanhada pela letra “c”, e conseqüentemente os derivados do ácido desoxicólico apresentam numeração acompanhada da letra “d”.

Analisando os resultados na tabela, pode-se observar que todas as moléculas que apresentam o núcleo esteroidal do ácido desoxicólico (**7d**; **8d**; **9d**; **10d** e **11d**) se mostraram ativas para as espécies de *Leishmania*, independente do grupo funcional adicionado à elas. Em contraste, todas as estruturas derivadas do ácido cólico (**7c**, **8c**; **9c**; **10c** e **11c**) não apresentaram atividade antipromastigota para as espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo, até a concentração máxima testada (100µM). Com isto, pode-se concluir que a porção esteroidal, não hidroxilada na posição C-7 do anel, é de fundamental importância na atividade destas moléculas.

Os compostos comerciais, ácidos cólico e desoxicólico, utilizados como materiais de partida para obtenção dos derivados, não apresentaram atividade em promastigotas de *Leishmania* sp. Portanto, as modificações realizadas na estrutura do ácido desoxicólico favoreceu sua atividade antileishmanial das moléculas resultantes.

Alguns compostos derivados do ácido desoxicólico apresentaram sutil citotoxicidade em macrófagos (tabela 5), a principal célula hospedeira da *Leishmania* sp, corroborando com a atividade apresentada por este grupo, e confirmando a capacidade destas moléculas em transpor membranas celulares. Porém, é importante chamar a atenção para os compostos **7d** e **11d**, pois estes se destacam por não serem citotóxicos para macrófagos peritoneais e apresentarem atividade em promastigotas de *Leishmania* sp, o que caracteriza vantagens em relação à Anfotericina B e Miltefosina (CC₅₀ = 85,8 e 131,9 µM respectivamente), fármacos de referência conhecidos pela alta toxicidade.

Tabela 5: Efeito dos derivados do ácido cólico e desoxicólico em promastigotas de *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. infantum*, *L. major* e macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.

Composto	Estrutura	CI ₅₀ * (µM)*				CC ₅₀ (µM)
		<i>L. ama.</i>	<i>L. braz.</i>	<i>L. inf.</i>	<i>L. major</i>	Macrófagos
7c		>100	>100	>100	>100	>150
7d		32,81 (± 0,76)	19,33 (± 1,36)	29,33 (± 3,07)	31,67 (± 0,61)	>150
8c		>100	>100	>100	>100	>150
8d		33,31 (± 0,24)	42,28 (± 2,26)	21,88 (± 4,08)	33,54 (± 0,90)	80,81 (± 0,32)
9c		>100	>100	>100	>100	>150
9d		29,06 (± 0,53)	15,83 (± 0,29)	28,88 (± 2,33)	31,80 (± 0,46)	53,13 (± 3,36)
10c		>100	>100	>100	>100	>150
10d		>100	56,10 (± 8,89)	52,33 (± 0,14)	56,17 (± 0,15)	89,85 (± 7,97)
11c		>100	>100	>100	>100	>150
11d		54,40 (± 2,17)	78,67 (± 11,99)	48,49 (± 0,52)	41,19 (± 0,58)	>150
AC*		>100	>100	>100	>100	>150
AD**		>100	>100	>100	>100	>150
Anfotericina B		0,15 (±0,02)	1,24 (±0,06)	1,08 (±0,004)	0,71 (±0,22)	85,8 (± 30,4)
Miltefosina		22,0 (± 0,5)	29,66 (± 0,017)	2,64 (± 0,29)	20,0 (±0,52)	131,9 (± 3,9)

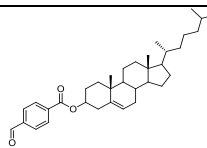
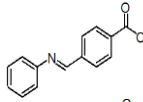
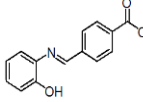
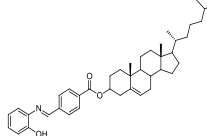
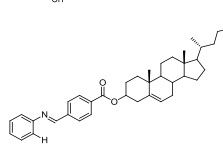
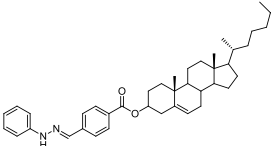
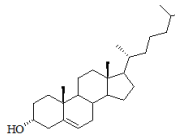
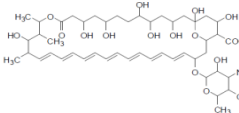
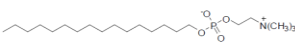
*CI₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*. *AC = ácido cólico; **AD = ácido desoxicólico.

4.2 Citotoxicidade dos compostos em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*-RFP

Dando continuidade aos testes de atividade antileishmanial dos derivados iminos aromáticos, a análise da relação estrutura-atividade em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*-RFP (Tabela 06) mostrou que o composto **3** apresentou uma atividade relevante para a forma intracelular do parasito ($CI_{50} = 35,45 \mu\text{M}$), porém, ao contrário do que se esperava, a conjugação com o colesterol (composto **4**), uma molécula lipofílica, mostra que a atividade é significativamente diminuída, ($CI_{50} = 97,97\mu\text{M}$).

O precursor aldeído do composto 4, mostrou menor, mas relevante atividade para formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*-RFP ($CI_{50} = 69,18\mu\text{M}$).

Tabela 6: Efeito dos derivados do colesterol e seus precursores em amastigotas de *L. amazonensis*-RFP.

Composto	Estrutura	CI ₅₀ (μM)
		<i>L. amazonensis</i> -RFP
1		69,18±13,76
2		>100
3		35,45±0,74
4		97,97±20,87
5		>100
6		>100
col		>100
AmB		0,71±0,22
Miltefosina		12,52±0,83

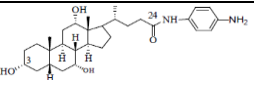
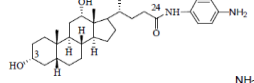
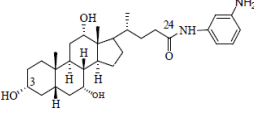
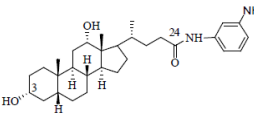
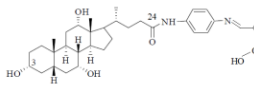
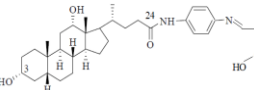
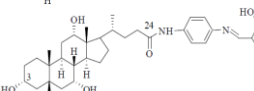
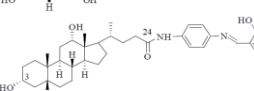
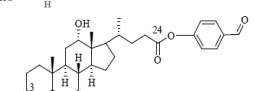
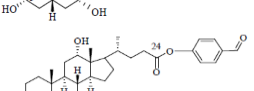
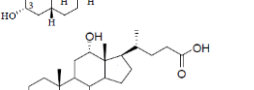
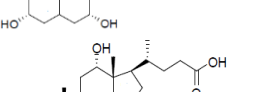
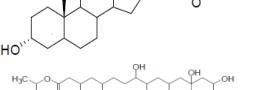
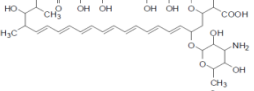
*CI₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*. *AC = ácido cólico; **AD = ácido desoxicólico.

Quanto à atividade anti-amastigota dos derivados do ácido cólico e ácido desoxicólico (Tabela 07), verifica-se que os compostos contendo o núcleo esteroidal do ácido desoxicólico, assim como o observado em promastigotas, apresentaram atividade em amastigotas de *L. amazonensis*. Em contraste, os compostos contendo o núcleo esteroidal do ácido cólico, não apresentaram atividade antileishmanial na sua grande maioria. Visto que os derivados do ácido desoxicólico apresentam estruturas semelhantes aos conjugados do ácido cólico, podemos concluir que a porção esteroidal não hidroxilada na posição C-7 do anel, foi elementar para a atividade anti-amastigota destas moléculas. Todavia, é importante salientar que dentre os compostos ativos, destacaram-se **11d**, **8d** e **7d**, com CI_{50} de 15,34 μ M; 23,33 μ M e 23,89 μ M, respectivamente. Analisando a estrutura dos compostos **7d** e **8d**, observa-se que eles possuem moléculas que se diferem apenas pela posição da amina (NH_2), o que não interferiu nos valores de CI_{50} para amastigota. Em contraste a estes dois compostos, observa-se que o **11d** apresentou a melhor atividade anti-amastigota com CI_{50} (15,34 μ M) comparável ao da miltefosina (12,52 μ M), o que permite inferir que a adição de um aldeído fenólico na posição C-24 da porção do núcleo esteroidal do ácido desoxicólico, contribuiu positivamente para a atividade desta molécula. Das moléculas constituintes deste grupo, apenas o composto **10d** não mostrou efeito para amastigotas de *L. amazonensis*-RFP até às concentrações máximas testadas (100 μ M). Este composto tem como precursor a amida biliar **7d**, e nota-se que a adição de um fenol alogenado contendo um grupo bromo (**10d**) à molécula precursora não foi favorável à sua atividade anti-amastigota.

No caso dos derivados do ácido cólico, apenas o composto **11c** apresentou atividade em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 88,57\mu$ M). Observando a relevante atividade apresentada pelo seu composto correspondente, no grupo dos derivados do ácido desoxicólico (**11d**), supõe-se que o aldeído fenólico, grupo funcional utilizado na síntese destas moléculas, tenha alguma relevância para que estas moléculas apresentem atividade.

É importante destacar que os compostos de partida, ácido cólico e desoxicólico não apresentaram nenhuma atividade até as concentrações máximas testadas (100 μ M). Sendo assim, conclui-se que a atividade apresentada pelas moléculas destes grupos, tenha sido possivelmente obtida através das modificações realizadas em suas estruturas.

Tabela 7: Efeito dos derivados dos ácidos cólico e desoxicólico em amastigotas de *L. amazonensis*-RFP.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ * (μM)
		<i>L. amazonensis</i> RFP
7c		>100
7d		23,89 ± 1,99
8c		>100
8d		23,33 ± 4,05
9c		>100
9d		40,43 ± 2,97
10c		>100
10d		>100
11c		88,57 ± 17,02
11d		15,34±1,16
AC*		>100
AD**		>100
Anf. B		0,71±0,22
Miltefosina		12,52±0,83

*Cl₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*. *AC = ácido cólico; **AD = ácido desoxicólico.

4.3 Índices de seletividade e de especificidade dos derivados esteroidais

Para avaliar a seletividade dos compostos entre macrófagos e as formas de *Leishmania* sp, foi calculado o índice de seletividade (tabela 8). Como descrito por Tempone e colaboradores (2011), valor de IS maior que 01 (um), indica que o composto é mais tóxico para o parasito do que para a célula hospedeira. Dentre os derivados do colesterol (**1**, **4**, **5** e **6**), foi possível estimar apenas a seletividade do composto **4**. Levando em consideração a classificação estabelecida por Tempone e colaboradores (2011), o referido composto apresentou relevante seletividade para promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* sendo (aproximadamente 21 e 6 vezes, respectivamente) mais tóxico para o parasito do que para a célula hospedeira. Vale ainda destacar que este composto foi 16 vezes mais seletivo do que a Miltefosina, que se mostrou ser apenas 4,44 vezes mais tóxica para esta espécie do que para macrófagos.

A molécula **3**, utilizada para formação do composto **4**, apresentou um alto índice de seletividade para promastigotas de *Leishmania* sp, com valores comparáveis aos valores da Anfotericina B.

Em relação aos derivados do ácido desoxicólico (**7d** ao **11d**), todos os compostos apresentaram IS maiores que 01 (um), desta maneira, estes compostos são mais tóxicos para promastigotas do que para a célula hospedeira. Dentre estes derivados, o composto **7d** foi o que mais se destacou por apresentar maior seletividade para promastigotas de todas as espécies utilizadas neste trabalho. O referido composto apresentou seletividade comparável à Miltefosina. Embora outros compostos (**8d** e **9d**) tenham mostrado valores de Cl_{50} semelhantes ao **7d**, se mostraram menos seletivos quando comparados a ele, devido à toxicidade que estes apresentaram para macrófagos. Porém, seus valores de IS não extrapolam a classificação proposta por Tempone e colaboradores (2011), sendo eles ainda assim, mais seletivos para promastigotas do que para as células hospedeiras.

A forma amastigota é mais relevante de se analisar índices de seletividade, pois ela é a forma encontrada no hospedeiro mamífero e desta maneira é responsável pelas manifestações clínicas da doença, e podem reproduzir resultados mais próximos do modelo animal.

No que diz respeito à seletividade dos derivados do colesterol em amastigota, destaca-se o composto **3**, sendo 4,23 vezes mais seletivo para a forma intracelular do parasito do que para a célula hospedeira. Porém, é importante destacar que quando este composto foi conjugado ao colesterol, houve uma diminuição expressiva da seletividade da molécula resultante, o composto **4** (IS = 1,53).

Quanto ao perfil seletivo dos derivados do ácido cólico e ácido desoxicólico para a forma intracelular do parasito, destacam-se os compostos derivados do ácido desoxicólico **7d** e **11d**, sendo cerca de 6 e 9 vezes, respectivamente, mais tóxicos para a forma intracelular de *L. amazonensis* do que para a célula hospedeira, o que pode ser comparado à seletividade da Miltefosina. Vale destacar que apenas o composto **10d** apresentou IS menor que um, o que demonstra sua seletividade para célula hospedeira. Os demais compostos deste grupo apresentam IS maior que um e, portanto, foram mais seletivos para a forma intracelular do parasito.

Nenhum dos derivados do ácido cólico (**7c** ao **11c**) apresentou atividade antipromastigota e anti-amastigota de *Leishmania* sp, desta maneira, não foi possível estimar seus índices de seletividade.

Tabela 8: Seletividade dos derivados esteroidais para formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp.

Composto	Promastigota				Amastigota
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. amazonensis</i> RFP
	IS*				
1	-	-	-	-	>2,17
2	-	-	-	-	-
3	>82,87	>80,64	-	>77,7	>4,23
4	-	>21,43	-	>6,27	>1,53
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7c	-	-	-	-	-
7d	>4,57	>7,76	>5,11	>4,74	>6,28
8c	-	-	-	-	-
8d	>2,42	>1,91	>3,69	>2,40	3,46
9c	-	-	-	-	-
9d	>1,82	>3,35	>1,83	>1,67	1,31
10c	-	-	-	-	-
10d	-	1,6	1,71	1,6	<0,90
11c	-	-	-	-	>1,69
11d	>2,75	>1,90	>3,10	>3,64	>9,78
Anfotericina B	572	69,2	79,4	65,5	120,84
Miltefosina	5,1	4,44	6,59	7,63	10,53

*I.S.=Índice de Seletividade foi calculado pela razão entre CC₅₀ para macrófagos e CI₅₀ para promastigotas. Anfotericina B e Miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência. Fonte: Do autor.

A especificidade dos compostos foi determinada através do IE, o que determina o quanto ele é mais ativo para uma das formas evolutivas em que o parasito se encontra. O índice de especificidade é estimado pela razão entre o CI₅₀ do composto para formas promastigotas e amastigotas. De acordo com a classificação estabelecida por Muylder e colaboradores (2011), compostos com valores de IE maiores que 2,0 são mais ativos para a forma intracelular do parasito, enquanto que compostos que apresentarem IE menores que 0,4 são mais ativos para a forma extracelular do parasito, e valores de IE entre 0,4 e 2,0 indicam que o composto tem o mesmo efeito para ambas as formas do parasito.

A Tabela 09, fornece informações a respeito da especificidade dos derivados esteroidais para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Dentre os derivados de todos os grupos o que mais se destaca é o composto **11d**, com uma

especificidade 3 vezes maior para o estágio intracelular do parasito do que para promastigotas. Os outros compostos possíveis de determinar o IE, com exceção do composto **3**, apresentaram valores que se enquadram entre 0,4 e 2,0, indicando desta maneira, que os compostos possuem o mesmo efeito para ambos os estágios evolutivos do parasito.

Tabela 9: Especificidade dos derivados esteroidais em amastigotas de *L. amazonensis* RFP.

Composto	<i>L. amazonensis</i> RFP	
	IE*	
1	>1,44	
2	-	
3	0,05	
4	>1,02	
5	-	
6	-	
7c	-	
7d	1,37	
8c	-	
8d	1,42	
9c	-	
9d	0,72	
10c	-	
10d	-	
11c	>1,12	
11d	3,54	
Anfotericina B	0,21	
Miltefosina	1,75	

*I.E.= Índice de especificidade, calculado pela razão entre o CI_{50} para promastigota e o CI_{50} para amastigota intracelular. Anfotericina B e Miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

A partir dos resultados preliminares obtidos *in vitro* com os derivados esteroidais, observou-se que o composto **11d** apresentou o menor CI_{50} para forma amastigota (15,34 μ M) e toxicidade seletiva para macrófagos (IS > 9,78), desta maneira, o mesmo foi selecionado para estudos visando elucidar seus efeitos em alguns alvos em promastigotas de *L. amazonensis*.

4.4 Efeito do composto 11d em alguns alvos celulares de promastigotas de *L. amazonensis*

4.4.1 Efeito do composto 11d na morfologia de Promastigotas de *L. amazonensis*

Com intuito de verificar se o tratamento com o composto **11d** (54,4 e 108,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$) induz alteração morfológica em promastigotas de *L. amazonensis*, após o período de incubação com o referido composto, os parasitos foram analisados por microscopia óptica. A figura 12 mostra que promastigotas tratadas com o composto **11d** apresentou diminuição em seu tamanho quando comparada ao controle negativo. Além do mais, foi possível observar, que ao final do período de incubação, os parasitos apresentavam pouco movimento em relação aos parasitos não tratados.

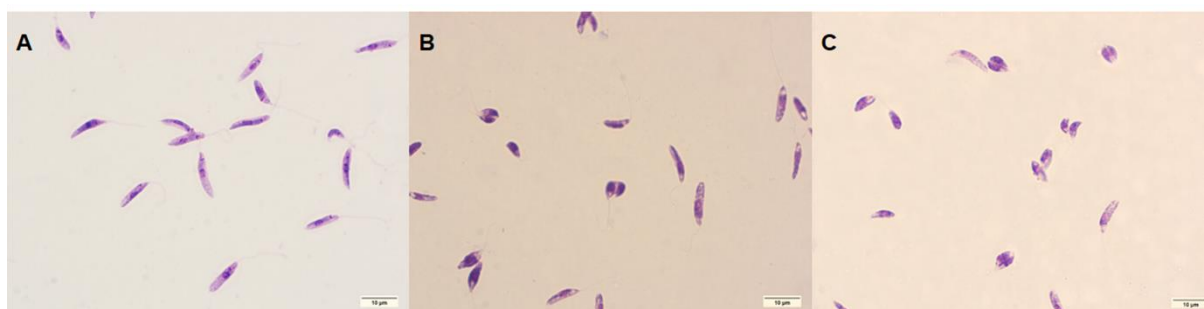


Figura 10: Alterações morfológicas em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto 11d. (A) controle negativo; (B) promastigotas tratadas com 54,4 $\mu\text{M}/\text{mL}$; (C) promastigotas tratadas com 108,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Após o tratamento, os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4%, lavadas em PBS, colocados em lâminas de vidro e corados com Giemsa. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e fotografadas utilizando a objetiva de 100x. As imagens representam três experimentos independentes.

4.4.2 O tratamento com o composto 11d não altera a integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*

Para verificar se o tratamento com o composto **11d** (54,4 e 108,8 μM) leva à perda da integridade da membrana plasmática em *L. amazonensis*, após o tratamento, os parasitos foram incubados com o marcador fluorescente iodeto de propídeo (PI). A intensidade de fluorescência foi avaliada por fluorimetria. A figura 13, mostra que não houve aumento significativo na intensidade de fluorescência quando comparado ao controle de células sem tratamento, indicando que a membrana plasmática do parasito se encontra íntegra. Parasitos aquecidos à 65°C foram utilizados como controle positivo e apresentou um aumento de 83,21% na porcentagem de células marcadas com PI, em comparação ao controle negativo.

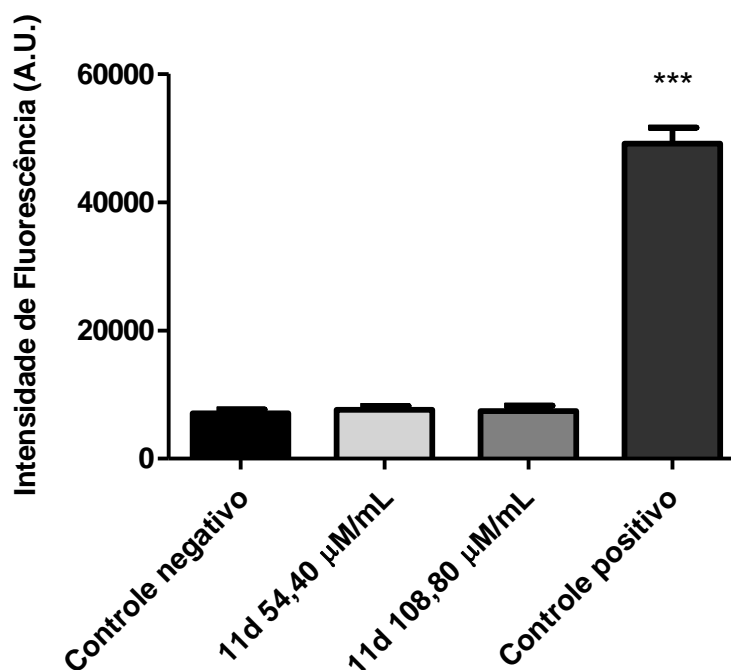


Figura 11: O tratamento com o composto 11d não altera a integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 μM do composto **11d**. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com Iodeto de Propídeo. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Parasitos aquecidos à uma temperatura de 65°C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***)). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.

4.4.3 Efeito do composto 11d no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *L. amazonensis*

O potencial de membrana mitocondrial em promastigotas tratadas com o composto **11d** foi avaliado por fluorimetria, utilizando marcação com o Mitotracker Red CM-H2XROS®. A figura 14, mostra que o tratamento com o composto **11d** (54,4 e 108,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$) induziu redução de 48,83% e 50,71%, respectivamente, na intensidade de fluorescência, em comparação ao controle negativo. O FCCP (20 μM) foi utilizado como controle positivo e induziu uma redução de 61,58% na intensidade de fluorescência quando comparado ao controle de células não tratadas.

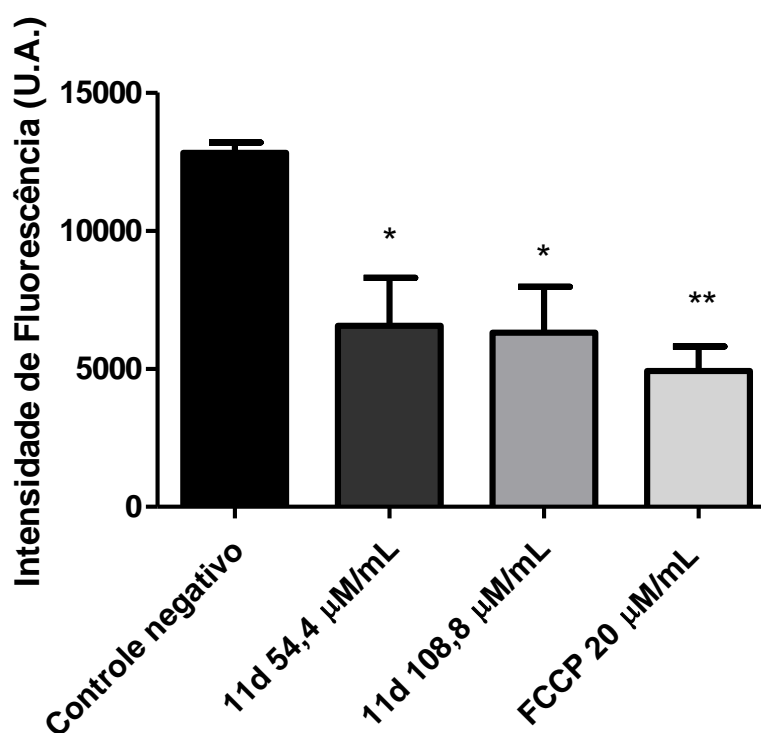


Figura 12: O tratamento com o composto 11d diminui significativamente o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 μM do composto **11d**. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com Mitotracker Red CM-H2XROS®. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. FCCP (20 $\mu\text{M}/\text{mL}$) foi utilizado como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.

4.4.4 Efeito do composto 11d na produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis*

A produção de EROs em promastigotas tratadas com o composto **11d** foi avaliada através de fluorimetria, utilizando o marcador H₂DCFDA. A figura 15 mostra que promastigotas tratadas com o composto **11d** (54,4 e 108,8 μ M) por 24h apresentou aumento significativo na produção de EROs de 50,5 e 60,9%, respectivamente, em comparação com o controle sem tratamento. Miltefosina foi utilizada como controle positivo e induziu um aumento de 98,25% na produção de EROs quando comparada ao controle de células não tratadas.

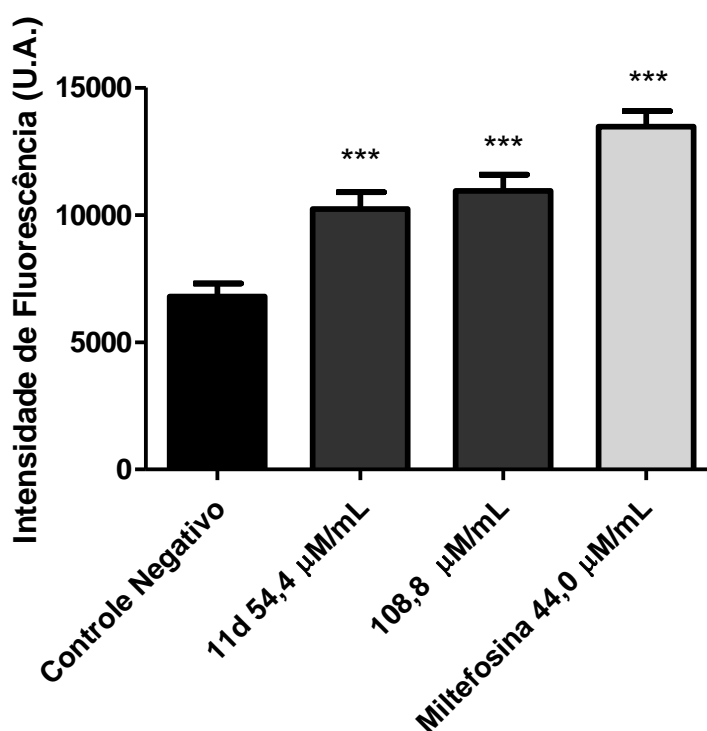
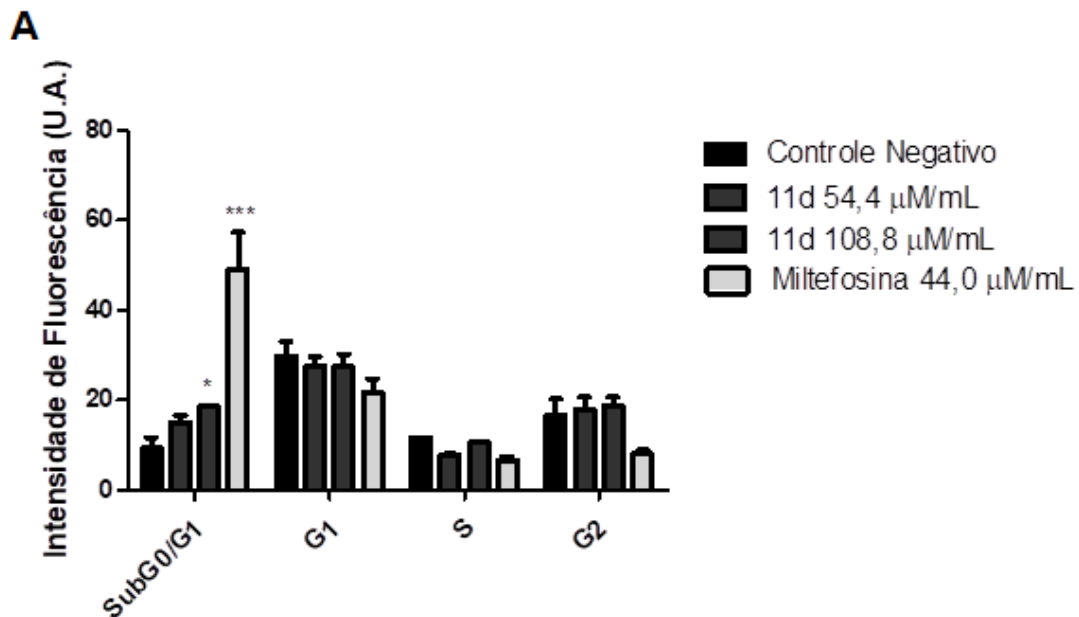


Figura 13: O tratamento com o composto 11d aumenta significativamente a produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com 54,4 e 108,8 μ M do composto **11d**. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com H₂DCFDA. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Miltefosina (44,0 μ M/mL) foi utilizada como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes.

4.6 Efeito do composto 11d no ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis*

Com intuito de avaliar se o tratamento com o composto **11d** induz fragmentação de DNA, foram avaliadas alterações no ciclo celular dos parasitos. A figura 16a e 16b, mostra que houve aumento significativo no número de promastigotas na fase SubG0/G1 (22,18% e 24,73%) tratados com o composto **11d** (54,4 e 108,8 μM , respectivamente), em relação ao controle não tratado (13,75%). É importante salientar que as células presentes na fase SubG0/G1 correspondem às células com baixo conteúdo de DNA, sendo menor que o conteúdo de células presente na fase G1 do ciclo celular, 1 x DNA, sugerindo desta maneira, que o DNA destas células se encontra fragmentado.



B

	Controle Negativo	11d 54,4 µM/mL	11d 108,8 µM/mL	Miltefosina 44,0 µM/mL
Sub G0/G1	13,75 %	22,18 %	24,73 %	57,47 %
G1	44,26 %	40,30 %	36,47 %	25,40 %
S	17,23 %	11,50 %	13,97 %	7,79 %
G2	24,74 %	26,00 %	24,81 %	9,33 %

Figura 14: O tratamento com o composto 11d na concentração de 108,8 µM/mL induz fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis*. As células foram incubadas com o composto 11d (54,4 e 108,8 µM) por 24h. Após este período os parasitos foram permeabilizados com etanol 70%, e incubados com PI. A avaliação do DNA das células foi realizada utilizando citometria de fluxo. (A) representação gráfica das células presentes em cada fase do ciclo celular. (B) porcentagem do número de células em cada fase do ciclo celular. Miltefosina (44,0 µM/mL) foi utilizada como controle positivo. Análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (Two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni: $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (***).

4.5 Estudos *In Silico*

4.5.1 Estudo das propriedades físico-químicas das moléculas.

As propriedades físico-químicas do composto 11d foram calculadas utilizando o software online gratuito Molinspiration®. Os fatores que determinam a biodisponibilidade oral de uma droga são determinados através de 4 parâmetros e ficaram denominados como "regras dos 5 de Lipinski": LogP menor ou igual a 5; massa molecular menor ou igual a 500; número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 e números de grupos doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10. Contudo, moléculas que violam mais do que duas destas regras poderão ter problemas com a biodisponibilidade oral (LIPINSKI, et al 1996).

Como pode ser verificado na tabela 10, o composto **11d** violou apenas um dos parâmetros da "regra dos 5", apresentando valor de LogP de 5,76. Como os compostos podem violar até dois parâmetros, o referido composto pode ser considerado como um bom candidato a fármaco para administração por via oral.

Tabela 10: Propriedades físico-químicas do composto **11d**, calculadas no software Molinspiration®.

Composto	logP	MM	nALH	nDLH	nviolações
11d	5,76	496,69	5	2	1

LogP= coeficiente de partição octanol-água; MM= massa molecular; nALH = número de aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH = número de doadores de ligação de hidrogênio; nviolações = número de violações.

4.5.2 Propriedades farmacocinéticas e potencial de toxicidade dos compostos

A tabela 11 aponta os resultados obtidos para vários parâmetros farmacocinéticos do composto **11d**, como absorção, metabolismo, excreção e toxicidade.

A primeira etapa que uma substância bioativa deve ultrapassar para alcançar a circulação é a barreira intestinal humana. Para isto a substância deve ser dissolvida e absorvida no estômago ou intestino. Desta maneira, é importante observar que, o composto **11d** apresentou resultado positivo no teste de absorção intestinal. Porém, o composto não foi classificado como permeável em células Caco-2, uma importante célula do carcinoma do colo intestinal, utilizada como modelo para mimetizar o transporte do intestinal de fármacos.

Outra característica importante de ser avaliada é a possibilidade de penetração do composto pela barreira hematoencefálica. Neste sentido, os resultados obtidos pelo composto **11d** para este parâmetro, mostraram que ele tem probabilidade de permeação por esta barreira.

Quanto ao transporte renal de cátions orgânicos, é importante destacar que o composto não foi classificado como inibidor deste sistema, uma importante ferramenta para que os medicamentos não permaneçam indeterminadamente no organismo.

A metabolização dos fármacos ocorre principalmente no fígado e no intestino, pois estes órgãos apresentam vários complexos especializados nesta função. Dentre estes complexos, destacam o complexo enzimático citocromo P450 (CYP450) e como pode ser observado, o composto **11d** foi classificado como substrato da CYP450 3A4, mas não inibidor das enzimas CYP450 1A2; 2C9; 2D6; 2C19; 3A4.

Quanto ao perfil tóxico do composto selecionado, nota-se que ele não apresentou toxicidade pelo teste AMES, e também não foi considerado carcinogênico. O composto **11d** foi classificado no nível III de toxicidade oral aguda.

Tabela 11: Propriedades farmacocinéticas do composto **11d**, calculadas pelo software admetSAR.

Modelo	Compostos
11d	
Absorção	
Barreira sangue-cérebro	+
Absorção no intestino Humano	+
Permeabilidade Caco-2	-
Metabolismo	
CYP450 2C9 Substrato	NS
CYP450 2D6 Substrato	NS
CYP450 3A4 Substrato	S
CYP450 1A2 Inibidor	NI
CYP450 2C9 Inibidor	NI
CYP450 2D6 Inibidor	NI
CYP450 2C19 Inibidor	NI
CYP450 3A4 Inibidor	NI
CYP Promiscuidade inibitória	Baixa
Excreção	
Transporte renal de cátions orgânicos	NI
Toxicidade	
Toxicidade AMES	NT
Carcinogênico	NC
Toxicidade oral aguda	III

(+) = Absorção positiva para o parâmetro avaliado; (-) = absorção negativa para o parâmetro avaliado; S = substrato; NS = não substrato; I = inibidor; NI = não inibidor; NT = não tóxico; NC = não carcinogênico; III = 3.

5 DISCUSSÃO

Apesar dos esforços para prevenção das leishmanioses, até o momento nenhuma vacina ainda foi desenvolvida para o uso humano (JERÔNIMO e PEARSON, 2016). O tratamento das leishmanioses é feito através de quimioterapia e vários medicamentos estão disponíveis para tal fim, entretanto, problemas como toxicidade, baixa eficácia, alto custo e abandono ao tratamento pelos pacientes devido à administração parenteral prolongada, são fatores que caracterizam as limitações no emprego destes medicamentos (ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). Neste contexto, a busca por medicamentos que possam apresentar vantagens em relação aos medicamentos disponíveis é uma importante ferramenta para mudar este cenário.

Os esteroides são uma importante e diversificada classe de compostos que desempenham funções variadas em organismos eucariotos e alguns procaríotos. A capacidade de penetrar facilmente pela membrana plasmática e se ligarem a receptores celulares torna este grupo de compostos um interessante alvo para desenvolvimento de novos fármacos (GUPTA, KUMAR, e NEGI, 2013). Diversas pesquisas têm, constantemente, mostrado que mudanças estruturais nas moléculas destes compostos culminaram em resultados significativos no que diz respeito a atividade antimicrobiana (LI, et al., 1998; ABDELHALIM, et al., 2007), antiparasitária (GROS et al., 2006) e anticâncer (GUPTA, KUMAR, e NEGI, 2013).

Neste trabalho foi avaliada a atividade antileishmanial de compostos sintéticos derivados do colesterol, ácido cólico e ácido desoxicólico em formas promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania* responsáveis pela forma cutânea e visceral de leishmaniose. Sendo assim, os compostos foram inicialmente testados em formas promastigotas das espécies: *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. infantum* e *L. major* formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Analisando os resultados dos compostos referentes aos derivados do colesterol, observa-se que apenas o composto **4** apresentou atividade antileishmanial para promastigotas das espécies de *L. braziliensis* e *L. major* (CI_{50} 7,0 e 23,89 μ M, respectivamente), o efeito deste composto foi 22,6 vezes maior ao da miltefosina em *L. braziliensis* (CI_{50} 29,66), e em *L. major* o valor é muito próximo

ao valor do fármaco de referência (CI_{50} 20,0 μ M). É importante destacar que a série de compostos derivados do colesterol apresenta grande vantagem em relação aos fármacos de referência, pois não apresentaram citotoxicidade em macrófagos de mamíferos.

No que diz respeito à atividade dos derivados de colesterol para a forma amastigota de *L. amazonensis*, pode-se observar que além do composto **4** (IC_{50} 97,97 μ M), o seu precursor, composto **1** também apresentou um moderado efeito anti-amastigota (IC_{50} 69,18 μ M). Observando os resultados apresentados para as formas promastigotas neste estudo, nota-se que os mesmos compostos não apresentaram efeitos semelhantes para as diferentes espécies e estágios evolutivos do parasito, evidenciando desta forma, a diferença de sensibilidade entre as espécies e entre os estágios evolutivos de *Leishmania* sp utilizadas neste estudo. Esta característica tem sido descrita em muitos estudos *in vitro* e *in vivo* tanto para compostos inéditos, quanto para fármacos de referência (CARRIÓ et al., 2000; ANTINARELLI et al., 2016). A diferença de sensibilidade entre as espécies e entre os estágios evolutivos da *Leishmania* sp pode ser decorrente das peculiaridades bioquímicas e moleculares que cada uma apresenta, influenciando na efetividade das drogas, acarretando em importantes implicações no tratamento da doença (ESCOBAR, et al., 2002).

Com relação aos resultados apresentados pelos ácidos biliares, observa-se que no geral, os derivados do AC não apresentaram efeito para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp utilizadas neste estudo. Ao contrário dos resultados apresentados por este grupo de moléculas, todos os compostos derivados do AD apresentam efeito tanto para as formas promastigotas de *Leishmania* sp (IC_{50} variando de 15,83 a 78,67 μ M), como para formas amastigotas de *L. amazonensis* (IC_{50} variando entre 15,34 a 40,43 μ M) (tabelas 5 e 7, respectivamente). Estes resultados são bastante interessantes, visto que as estruturas dos compostos se diferem apenas pela presença ou ausência da hidroxila na posição C-7 do núcleo esteroidal (AC e AD, respectivamente). Desta maneira, vale destacar que a porção esteroidal influenciou diretamente na atividade destes compostos.

É importante destacar que os derivados de ácidos biliares possuem estrutura molecular com caráter anfífilo e são amplamente utilizados como carreadores de

fármacos pela facilidade de permear por membranas celulares, além disso, são também capazes de influenciar na solubilidade gastrointestinal e na estabilidade química e enzimática dos fármacos (VIRTANEN e KOLEHMAINEN, 2004; POŠA e KUHAJDA, 2010). Estudos realizados com conjugados de aminoquinolina ao AC resultou em aumento na atividade dos compostos, evidenciando a importância deste ácido biliar como carreador de fármaco (ANTINARELLI et al., 2012). Curiosamente, os resultados apresentados pelos derivados do AC, neste estudo, não corroboraram com os resultados apresentados na literatura. A presença da hidroxila na posição C-7 do núcleo esteroidal não favoreceu a atividade dos compostos, provavelmente por influência dos grupos funcionais conjugadas à molécula. Além do mais, tendo em vista que no grupo de derivados do AD, todos os compostos apresentaram efeito antileishmanial, independente do grupo funcional conjugado à molécula, supõe-se que o núcleo esteroidal do AD possibilite uma maior capacidade de permeação pela membrana plasmática das células, em relação ao AC. O AD é mais lipofílico em relação ao AC, devido à ausência do grupo hidroxila na posição C-7 do núcleo esteroidal, o que torna maior a superfície apolar da molécula (POŠA e KUHAJDA, 2010). Desta maneira, supõe-se que moléculas derivadas do AD tenham maior facilidade de atravessar a membrana plasmática do parasito e chegar aos seus alvos celulares.

Entretanto, é importante destacar que os derivados do AD apresentaram sutil citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c, enquanto que os derivados do AC não foram tóxicos para esta linhagem celular. No entanto, nota-se que, com exceção do composto **10d**, todos os compostos derivados do AD apresentaram IS maior que 1, o que caracteriza que estes compostos são mais seletivos para o parasito do que à célula hospedeira. Tal característica é bastante relevante, visto que os medicamentos disponíveis para tratamento das leishmanioses apresentam sérias limitações, principalmente devido à alta toxicidade (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Estudos relacionados ao IE dos compostos também foram realizados e analisando os resultados encontrados, observa-se que aqueles derivados esteroidais ativos, no geral, apresentaram especificidade para ambas as formas do parasito, com exceção do composto **11d** (IE = 3,54), mais específico para a forma amastigota do parasito. Desta maneira, pode-se afirmar que o composto **11d** pode

apresentar alvos específicos em amastigotas, ou então ele atua através de mecanismos da célula hospedeira modulando sua resposta à infecção por *Leishmania* sp.

Após a realização dos estudos preliminares com os derivados dos ácidos biliares, foi selecionado um composto com intuito de elucidar o seu efeito em alguns alvos celulares de *Leishmania amazonensis*. Para isto, foi selecionado o composto com maior IS, neste caso o composto **11d** (IS > 9,78). Este composto atua em ambas as formas promastigotas (IC₅₀ = 54,4 µM) e amastigotas (IC₅₀ = 15,34 µM) o que facilita o estudo do modo de ação.

Observando as alterações morfológicas desencadeadas pelo tratamento com o composto **11d**, no qual foi observado redução no tamanho e na motilidade do parasito, a primeira questão levantada neste trabalho foi referente à integridade da membrana plasmática de *L. amazonensis* tratadas com este composto. O ácido desoxicólico, uma molécula altamente hidrofóbica, possui estrutura similar à molécula de ergosterol, um composto apolar encontrado associado aos lipídeos constituintes da membrana plasmática de *Leishmania* sp. A questão era se este composto, de alguma maneira, atuava ancorando-se à membrana plasmática possibilitando a formação de poros que culminaria na morte do parasito. A permeabilização na membrana plasmática é um processo de morte que acarreta no extravasamento de proteínas citoplasmáticas para o meio extracelular (RIBEIRO, 2011). Após um período de tratamento de 24h com o composto **11d**, os parasitos foram incubados com iodeto de propídeo e foram analisados por fluorimetria, para verificar se o composto induzia permeabilização da membrana plasmática. Os resultados encontrados, apontam que não houve aumento significativo na intensidade de fluorescência de células tratadas em relação ao controle negativo, descartando a possibilidade do composto atuar na membrana plasmática da célula através da formação de poros. Estudos realizados por Jean-Louis e colaboradores (2006), apresentaram evidências de que o ácido desoxicólico promove efeitos profundos na membrana plasmática, como aumento no colesterol da membrana e alterações na fluidez da membrana de células HTC116. No entanto, neste mesmo estudo, os autores associam os efeitos do ácido desoxicólico na membrana à ativação de cascatas de sinais que podem desencadear o processo de morte celular por apoptose.

Outro alvo importante a ser investigado em tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania* sp, é a mitocôndria, visto os mesmos possuírem uma mitocôndria única, diferente dos eucariotas superiores, como os mamíferos que possuem centenas ou até milhares de exemplares desta organela. Assim, em *Leishmania* sp, a mitocôndria constitui não apenas uma organela vital para o parasito mas também tem sido postulada como importante alvo para efeito de drogas anti-tripanosomatídeas (FIDALGO e GILLE, 2011). A mitocôndria é o principal sítio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são subprodutos da fosforilação oxidativa gerados no complexo de cadeia de transporte de elétrons (CTE) durante a respiração mitocondrial. Altas concentrações de EROs são prejudiciais às células e a manutenção do $\Delta\Psi_m$ é fundamental para o funcionamento adequado da CTE para gerar ATP e evitar alta produção de EROs (SKARABAHATAVA et al., 2015; MIRANDA et al., 2017). Assim, a produção de EROs e alterações no $\Delta\Psi_m$ são eventos interligados, e seguindo este raciocínio, investigamos o efeito do composto **11d** na mitocôndria de promastigotas de *L. amazonensis* através da alteração do $\Delta\Psi_m$ e produção de EROs. Após um período de incubação de 24h, os parasitos tratados apresentaram significativa diminuição do $\Delta\Psi_m$ e aumento na produção de EROs. Estes resultados sugerem que o funcionamento mitocondrial do parasito foi afetado pelo tratamento das células com o composto **11d**, culminando com o estresse oxidativo. Diminuições no $\Delta\Psi_m$ podem ocorrer em resposta à variados eventos como estimulação de proteínas, permeabilização da membrana mitocondrial interna e inibição da cadeia de transporte de elétrons, sendo que esta última pode resultar no aumento da produção de EROs (FIDALGO e GILLE, 2011). Desta maneira, os componentes mitocondriais se tornam expostos à ação de EROs que podem danificar a organela através de diversos processos bioquímicos como peroxidação lipídica, oxidação proteica e mutações no DNA mitocondrial, sendo estes, consequência do estresse oxidativo (SKARABAHATAVA et al., 2015). O comprometimento funcional da mitocôndria nos parasitos tratados constitui um fator suficiente para gerar danos irreversíveis que podem justificar a morte celular. Entretanto, associado a este evento, mostramos também que o ciclo celular de parasitos tratados com o composto **11d** foi alterado, sendo observado aumento de células na fase sub-G0/G1 quando comparadas às células não tratadas, o que

caracteriza células com baixo conteúdo de DNA, sugerindo fragmentação de DNA. Como foi analisado o DNA total do parasito, não é possível afirmar se o DNA afetado foi o nuclear e/ou o mitocondrial. Entretanto, visto a quantidade de DNA nuclear constituir a grande maioria celular, e os resultados da nossa análise ter mostrado um aumento de quase 2x de conteúdo na fase sub-G0/G1, supomos que nosso composto também atue no DNA nuclear, não excluindo entretanto ação sob o DNA mitocondrial. Este conjunto de dados demonstra que o composto **11d** exibe ação antileishmanial em várias organelas importantes e essenciais ao completo desenvolvimento celular, incluindo mitocôndria e núcleo.

A promissora atividade antileishmanial *in vitro* do composto **11d** estimula estudos em modelo experimental murino. Entretanto, estes estudos requerem protocolos onerosos que demandam de tempo, além do uso de animais de experimentação, que tem se tornado cada vez mais limitado devido a pressão pública e política (ALVES, 2014). Desta maneira, o uso de análises computacionais (*in silico*) tem sido apontada como excelente ferramenta preditiva para ensaios *in vivo*, e as informações obtidas por estas ferramentas podem ser utilizadas para avaliar o potencial de novos compostos sintéticos candidatos a fármacos.

Estudos *in silico* das propriedades físico-químicas podem ser utilizados para prever o comportamento de substâncias químicas em seres humanos, e de acordo com Lipinski, e colaboradores (1996), alguns parâmetros estruturais da molécula fornecem informações que podem ser utilizadas para prever teoricamente se uma droga é boa candidata para administração por via oral. Assim, de acordo com a "regra dos 5 de Lipinski" (LogP menor ou igual a 5; Massa molecular menor ou igual a 500; número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5; números de grupos doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10), o composto **11d** pode ser considerado como um bom composto para uso oral, visto obedecer a maioria dos critérios estabelecidos: (i) A massa molecular (MW) está relacionada ao tamanho da molécula, e quanto maior for, maior a cavidade que a molécula formará na água diminuindo assim sua solubilidade, o MW também influencia na difusão passiva da molécula através membrana plasmática (KERNS, 2008). Este composto apresenta MW de 496,69 e, portanto, está dentro do parâmetro estabelecido para esta característica; (ii) No que diz respeito ao número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, o composto **11d**, não apresentou

violações destes parâmetros. Portanto, este fato representa uma grande vantagem no que diz respeito à sua permeação pela membrana celular. A bicamada lipídica oferece uma quantidade limitada de grupos de ligação de hidrogênio. Portanto, um composto com excessivo número de doadores de ligações de hidrogênio (DLH) prejudica a permeabilidade deste pela membrana. Muitos grupos aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) em um soluto, podem também limitar a permeabilidade da molécula. Sendo assim, o composto deve ser lipofílico o suficiente para superar as perdas de energia que ocorrem na ruptura das ligações de hidrogênio com a água ou com a bicamada lipídica (LIPINSKI, et al., 1996; MÄLKIÄ, et al., 2004). O composto **11d**, violou apenas um dos itens, apresentando logP igual a 5,76, o qual extrapola ligeiramente a regra estabelecida por Lipinsk e colaboradores (1996). A lipofilicidade de um composto é a tendência que este apresenta para partição entre uma matriz lipídica (octanol) e outra aquosa com valores de pH onde todas as moléculas do composto estão na forma neutra. O coeficiente de partição octanol-água é dado como LogP (MÄLKIÄ, et al, 2004; KERNS, 2008;).

Estes resultados sugerem que o composto **11d** apresenta potencial para ser administrado por via oral, visto que apenas uma violação da “regra dos 5 de Lipinsk” não representa uma limitação para este tipo de administração.

A determinação de propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) são parâmetros importantes no estudo de candidatos à fármacos (LIPINSKI, et al., 1996; BOOBIS, et al., 2002). Neste sentido, o estudo preditivo promovido com o composto **11d**, no que diz respeito às suas propriedades farmacocinéticas, mostrou que o composto tem capacidade de ser absorvido pela barreira intestinal humana, o que caracteriza um processo importante para que os fármacos possam alcançar a corrente sanguínea e chegar aos seus alvos teciduais (TRIFUNOVI, et al., 2016). Curiosamente, o composto apresentou um comportamento contrário, no que diz respeito à absorção em células Caco-2. É importante destacar, que as células Caco-2, células do carcinoma do cólon humano, são amplamente utilizadas em estudos *in vitro* nas áreas de pesquisas farmacêuticas, como modelo para absorção intestinal de fármacos. Estas células apresentam fortes correlações com os enterócitos do intestino como alguns sistemas de transporte e algumas enzimas metabólicas, porém apresenta algumas limitações, como porosidade paracelular menor em

comparação ao intestino delgado, além do mais, a expressão dos transportadores nem sempre mimetizam o modelo *in vivo*. (FREDLUND, WINIWARTER, e HILGENDORF, 2017). Desta maneira, é importante destacar que alguns resultados de permeabilidade em células Caco-2, não condizem com a absorção intestinal humana *in vivo*. Além disto, embora seja reconhecido que um substrato com baixa permeabilidade em células Caco-2 possa apresentar baixa permeabilidade *in vivo*, existe a possibilidade destes compostos serem substratos de transportadores com menor índice de expressão nestas células quando relacionadas ao intestino humano (LARREGIEU e BENET, 2013).

A barreira hemato-encefálica (BHE) possui camadas de células que apresentam junções muito estreitas que reduzem a passagem de íons e outros pequenos solutos hidrofílicos através de suas fendas, formando assim uma importante barreira física. Desta maneira, ela restringe o tráfego de células e de algumas moléculas do sangue para o cérebro, proporcionando uma proteção contra substâncias tóxicas e agentes infecciosos (ABBOTT, 2013). Para que um fármaco consiga atravessar a BHE é preciso que sua molécula possua algumas características como a baixa capacidade de ligação à hidrogênio e lipofilicidade (GABATHULER, 2010). No estudo realizado com o composto **11d**, observa-se que ele foi classificado como permeável na BHE, provavelmente pelas características moleculares que ele possui. Este fator pode favorecer tratamento na leishmaniose visceral onde, em alguns casos, foram relatados a presença de amastigotas de *Leishmania* sp em tecidos do sistema nervoso central, tanto em humanos quanto em cães doentes (MÁRQUEZ et al., 2013).

Antes de serem eliminadas as drogas necessitam serem biotransformadas para se tornarem mais fáceis de serem excretadas. Este metabolismo ocorre no fígado, porém o intestino delgado também pode participar deste processo (KLOTZ, 2009). A fase I desta metabolização ocorre através das enzimas do citocromo P450 oxidase (CYP450) e nesta fase, um fármaco sofre modificações que resultam em compostos mais hidrofílicos. Na fase II, ocorrem algumas reações onde os compostos formados na fase I são conjugados com substâncias hidrossolúveis, facilitando desta maneira sua excreção (WILDT, TIBBOEL, e LEEDER, 2014).

As isoformas das enzimas CYP com maior número de substratos são: CYP450 1A2; 2C9; 2D6; 2C19 3A4 (DANTON et al., 2013; HABENSCHUS, 2016). É

importante salientar que a inibição de alguma destas enzimas podem levar à interação medicamentosa, onde o fármaco co-administrado não é metabolizado acarretando em seu acúmulo em níveis tóxicos no organismo (PARAMASHIVAM et al., 2015). Entretanto, é importante salientar que o composto **11d** foi classificado com baixa promiscuidade inibitória de CYP450, e entre as enzimas utilizadas como modelos pelo software admetSAR, o composto **11d** foi classificado como não inibidor das enzimas CYP450 e substrato da CYP450 3A4, a enzima responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos disponíveis.

O transporte renal de cátions orgânicos é constituinte do sistema de eliminação de fármacos e seus metabólitos, evitando desta maneira, a permanência de um medicamento por tempo indeterminado no organismo. Sabe-se que a inibição destes transportadores pode resultar no acúmulo de fármaco levando à nefrotoxicidade e lesão renal (YIN, DUAN e WANG, 2016). No entanto, o composto **11d** não foi classificado como inibidor deste sistema de transporte.

No que diz respeito à predição de toxicidade, o composto **11d** não apresentou toxicidade pelo teste de AMES, e foi classificado como não carcinogênico e no nível III de toxicidade oral aguda, o que inclui compostos com dose letal mediana (DL₅₀) entre 500mg/kg e 4999 mg/kg (CHENG et al., 2012; LI et al., 2014).

Com base nos resultados obtidos *in silico*, é possível afirmar que o composto **11d** apresentou resultados satisfatórios, com características que permitem sua classificação como um bom candidato a fármaco para administração por via oral.

6 CONCLUSÃO

Em uma análise geral dos resultados obtidos pelos testes *in vitro*, observa-se que entre os derivados esteroidais testados neste trabalho, os derivados do ácido desoxicólico apresentaram o melhor efeito antileishmanial para as formas promastigotas e amastigotas *in vitro*. Dentre esta série de compostos, o composto **11d** é o mais seletivo para *L. amazonensis* e o mais específico para a forma intracelular desta espécie. Este composto tem como alvo celular a mitocôndria, aumentando a produção de EROs e diminuindo o $\Delta\Psi_m$. Além do mais, o composto mostrou causar alterações no ciclo celular do parasito.

Estudos das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do composto **11d** mostrou que ele possui capacidade de permear por membranas biológicas sendo possível a administração por via oral.

7 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 36, n. 3, 437–449. 2013
- ABDELHALIM, M. M.; EL-SAIDI, M. M. T.; RABIE, S. T.; & ELMEGEED, G. A. (2007). Synthesis of novel steroidal heterocyclic derivatives as antibacterial agents. *Steroids*, v. 72, n. 5, 459–465. 2007
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016.
- ALVES, V. DE M. Desenvolvimento de modelos de QSAR e análise quimioinformática da sensibilização e permeabilidade da pele, 1–119. 2014
- ANDRADE-NETO, V. V. DE. Avaliação da utilização de colesterol exógeno por *Leishmania amazonensis* como possível alvo farmacológico. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Imunologia). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- ANTINARELLI, L. M.; CARMO, A. M.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S.; SALUNKE, D. B. Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 2, n. 1. 2012
- ANTINARELLI, L. M. R.; SOUZA, I. DE O.; GLANZMANN, N.; ALMEIDA, A. DAS C.; PORCINO, G. N.; VASCONCELOS, E. G.; ... COIMBRA, E. S. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazones against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 171, p. 10–16. 2016
- BARBOSA, J. F.; FIGUEIREDO, S. M. DE; MONTEIRO, F. M.; ROCHA-SILVA, F. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, v. 9, p. 90–102. 2015
- BEZERRA DE MENEZES, J. P.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. DE O. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. *BioMed Research International*, p.1–12. 2015
- BOOBIS, A.; GUNDERT-REMY, U.; KREMERS, P.; MACHERAS, P.; PELKONEN, O. *In silico* prediction of ADME and pharmacokinetics: Report of an expert meeting organised by COST B15. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 17, n. 4–5, p.183–193. 2002
- CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, 425–430. 2007

- CARRIÓ, J.; DE COLMENARES, M.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. ***Experimental Parasitology***, v. 95, n. 3, p. 209–14. 2000
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; RIBEIRO, T. G.; CASTILHO, R. O.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N.; COELHO, C. S. P.; ... COELHO, E. A. F. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. ***Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 48, n. 3, 235–242. 2015
- CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; ... TANG, Y. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. ***Journal of Chemical Information and Modeling***, v. 52, n. 11, p. 3099–3105. 2012
- COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis. ***Current Opinion in Infectious Diseases***, v. 28, n. 5, 426–437. 2015
- COSTA, J. M.; VALE, K. C.; CECÍLIO, I. N.; OSAKI, N. K.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; ... MARSDEN, P. D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. ***Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 20, n. 2, p. 77–81. 1987
- DANGATE, P. S.; SALUNKE, C. L.; AKAMANCHI, K. G. Regioselective oxidation of cholic acid and its 7B epimer by using o-iodoxybenzoic acid. ***Steroids***, v. 76, n. 12, p.1397–1399. 2011
- DANTON, A. C.; MONTASTRUC, F.; SOMMET, A.; DURRIEU, G.; BAGHERI, H.; BONDON-GUITTON, E.; ... MONTASTRUC, J. L. Importance of cytochrome P450 (CYP450) in adverse drug reactions due to drug-drug interactions: A PharmacoVigilance study in France. ***European Journal of Clinical Pharmacology***, v. 69, n. 4, p. 885–888. 2013
- DE MORAIS, C. G. V.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; DUTRA, P. M. L. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. ***BioMed Research International***, p. 1–19. 2015
- DE MUYLDER, G.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. ***PLoS Neglected Tropical Diseases***, v. 5, n. 7, 1–9. 2011
- DE WILDT, S. N.; TIBBOEL, D.; LEEDER, J. S. Drug metabolism for the paediatrician. ***Archives of Disease in Childhood***, v. 99, n. 12, 1137–1142. 2014

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1552–1556. 2010

DOS SANTOS, J. A.; POLONINI, H. C.; SUZUKI, É. Y.; RAPOSO, N. R. B.; DA SILVA, A. D. Synthesis of conjugated bile acids/azastilbenes as potential antioxidant and photoprotective agents. *Steroids*, v. 98, p.114–121. 2015

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A.; MURRAY, H. W. Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, v. 7, n. 1, 52–62. 2015

ELMAHALLAWY, E. K.; AGIL, A. Treatment of leishmaniasis: A review and assessment of recent research. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 17, 2259–2275. 2015

ERICSON-NEILSEN, W.; KAYE, A. D. Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *The Ochsner Journal*, v. 14, n. 2, p. 203–7. 2014

ERIKSSON, E. S. E.; ERIKSSON, L. A. The influence of cholesterol on the properties and permeability of hypericin derivatives in lipid membranes. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 7, n. 3, 560–574. 2011

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, v. 81, n. 2, 151–157. 2002

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin*, v. 93, n. 1, 179–200. 2009.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 11, 2758–2770. 2011

FREDLUND, L.; WINIWARTER, S.; HILGENDORF, C. *In Vitro* Intrinsic Permeability: A Transporter-Independent Measure of Caco-2 Cell Permeability in Drug Design and Development. *Molecular Pharmaceutics*, v. 14, n. 5, 1601–1609. 2017

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, v. 37, n. 1, 48–57. 2010

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 4, 473–479. 2010

GOTO, H.; LINDOSO, J. A L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 293–307. 2012

GROS, L.; LORENTE, S. O.; JIMENEZ, C.; YARDLEY, V.; RATTRAY, L.; WHARTON, H.;... GILBERT, I. H. Evaluation of azasterols as anti-parasitics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 20, p. 6094–6103. 2006

GUPTA, A.; KUMAR, B. S.; NEGI, A. S. Current status on development of steroids as anticancer agents. ***The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology***, v. 137, p. 242–70. 2013

HABENSCHUS, M. D. Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (–)-grandisina utilizando microssomas hepáticos de humanos. 2016. 45 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. ***Lancet***, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199. 1999

HOFMANN, A. F.; HAGEY, L. R. Review Bile Acids : Chemistry , Pathochemistry , Biology , Pathobiology , and Therapeutics, v. 65, p. 2461–2483. 2008

JEAN-LOUIS, S.; AKARE, S.; ALI, M. A.; MASH, E. A.; MEUILLET, E.; MARTINEZ, J. D. Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 281, n. 21, p.14948–14960. 2006

JERÔNIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. The challenges on developing vaccine against visceral leishmaniasis. ***Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 49, n. 4, 395–397. 2016

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

KERNS, E. Physicochemical Properties. In: Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization. 2008. v. 1.

KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. ***Drug Metabolism Reviews***, v. 41, n. 2, 67–76. 2009

LARA, D.; FENG, Y.; BADER, J.; SAVAGE, P. B.; MALDONADO, R. A. Anti-trypanosomatid activity of ceragenins. ***The Journal of Parasitology***, v. 96, n. 3, 638–42. 2010

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Drug Discovery and Regulatory Considerations for Improving *In Silico* and *In Vitro* Predictions that Use Caco-2 as a Surrogate for Human Intestinal Permeability Measurements. ***The AAPS Journal***, v. 15, n. 2, 483–497. 2013

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? ***Trends in Microbiology***, v. 11, n. 5, 210–214. 2003

LEVERRIER, A.;BERO, J.; FRÉDÉRICH, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; PALERMO, J. Antiparasitic hybrids of Cinchona alkaloids and bile acids. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 66, 355–363. 2013

LI, C.; PETERS, A. S.; MEREDITH, E. L.; ALLMAN, G. W.; SAVAGE, P. B. Design and Synthesis of Potent Sensitizers of Gram-Negative Bacteria Based on a Cholic Acid Scaffolding. **American Chemical Society**, v. 120, n. 12, 2961–2962. 1998

LI, X.; CHEN, L.; CHENG, F.; WU, Z.; BIAN, H.; XU, C., ... TANG, Y. *In silico* prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 4, 1061–1069. 2014

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, , 3–26. 1996

MACHADO, P. A. Efeito de bioisómeros do resveratrol complexados a metal em espécies de leishmania associadas à leishmaniose cutânea e estudo do mecanismo de morte do parasito. 2017. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MÄLKIÄ, A.; MURDOMÄKI, L.; URTTI, A.; KONTTURI, K. Drug permeation in biomembranes: *In vitro* and *in silico* prediction and influence of physicochemical properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, 13–47. 2004

MARPLES, B. A.; STRETTON, R. J. Patente: WO90/13298 (Use of Steroidal Compounds as Anti-fungal Agents).pdf. 1990. 1990

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J. R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, 142–146. 2013

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, 7–14. 2014

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf Acesso em 13 de julho de 2017. Acesso em 18 de agosto de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acesso em 20 de setembro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2016. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar_CP_40_2016.pdf. Acesso em 18 de novembro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em 18 de novembro de 2017.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, 55–63. 1983

MUKHOPADHYAY, S.; MAITRA, U. Chemistry and biology of bile acids. **Current Science**, v. 87, n. 12, 1666–1683. 2004

NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; ALMEIDA, D. M. A importância Dos Modelos Murinos Na Caracterização Das Respostas Imunológicas Às Leishmanioses : Uma Revisão. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v.4, n.3, p. 35-59, 2016.

NES, W. D. (2011). Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, 6423–6451. 2011

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p.135-146. 2010

PARAMASHIVAM, S. K.; ELAYAPERUMAL, K.; NATARAJAN, B. B.; RAMAMOORTHY, M. D.; BALASUBRAMANIAN, S.; DHIRAVIAM, K. N. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bioinformation**, v. 11, n. 2, p.73–84. 2015

PIRES, M. J.; COLAÇO, A. O papel dos ácidos biliares na patologia e terapêutica das doenças hepáticas no cão e no gato. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p.137–143. 2004

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. . Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p.111–29. 2015

POŠA, M.; KUHAJDA, K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. **Steroids**, v. 75, n. 6, p.424–431. 2010

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. DE, MARZAL, C.; ANDRADE-JÚNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.550–555. 2003

RIBEIRO, G. A. Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis*. 2011. 100 f. Dissertação (mestre em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SKARABAHATAVA, A. S.; ERGEEVNA; LUKYANENKO, L. M.; ICHAYLOVNA, SLOBOZHANINA, E. I.; VANOVA,; FALCIONI, M. L.; ETIZIA; ORLANDO, P.; SILVESTRI, S.; ... FALCIONI, G. Plasma and mitochondrial membrane perturbation induced by aluminum in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 31, p.37–44. 2015

SOUSA, E. P. DE. Síntese de esteroides hexacíclicos quirais com potencial atividade anticancerígena. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em química medicinal). Universidade de Coimbra, Coimbra.

SOUZA, W.; COLA, J. F. R. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 2009, p. 1-19. 2009

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

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p.8–11. 2013

TEMPONE, A. G.; MARTINS DE OLIVEIRA, C.; BERLINCK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, 572–585. 2011

TRIFUNOVI, J.; BOR, V.; GOLO, S.; MIKOV, M. Retention data of bile acids and their oxo derivatives in characterization of pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, , p.194–202. 2016

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDINA, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p.265–294. 2015

VAN GRIENSVEN, J., & DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322. 2012

VIRTANEN, E.; KOLEHMAINEN, E. Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications. *European Journal of Organic Chemistry*. v. 2004, n. 16, p. 3385–3399. 2004

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 13, n. 3, 191–201. 2015

WHO 2016. World Health Organization. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**. Disponível em: <http://www.who.int/entity/wer/2017/wer9250/fr/index.html>. Acesso em 29 de fevereiro de 2017.

WHO 2010a. Technical Report Series. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

WHO 2010b. World Health Organization. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/. Acesso em 20 de novembro de 2017.

WHO 2012. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases. **Treatment recommendation for leishmaniasis**. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/research/978924129496_pp67_71.pdf?ua=1. Acesso em 20 de abril de 2017.

YIN, J., DUAN, H.; WANG, J. Impact of Substrate-Dependent Inhibition on Renal Organic Cation Transporters hOCT2 and hMATE1 / 2-K-Mediated Drug Transport and Intracellular Accumulation s. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.359, p. 401-410. 2016

ZHU, X.; NICHIFOR, M. Polymeric Materials Containing Bile Acids Polymerization of Monomers Containing Bile. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 7, p. 539–546. 2002

APÊNDICE A



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

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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

Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA

APÊNDICE B



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

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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

Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA