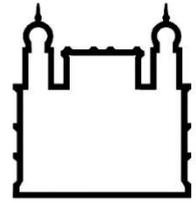




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO**



FIOCRUZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO TRATAMENTO DAS
LEISHMANIOSES *in vitro***

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

Salvador - Bahia

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO**

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO TRATAMENTO DAS
LEISHMANIOSES *in vitro***

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ricardo Khouri
Cunha

Salvador - Bahia

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

S237u Santos, Thaline Mabel Sousa

Uso da associação de hidroxilamina e detc no tratamento das
leishmanioses in vitro/ Thaline Mabel Sousa Santos. _ Salvador, 2021.

64 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da
Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação
Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Leishmaniose visceral. 3. *Leishmania
braziliensis*. 4. Dietilditiocarbamato. 5. Hidroxilamina. I. Título.

CDU 616.993.161

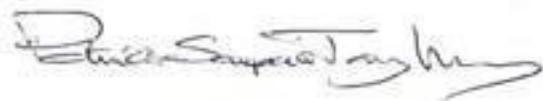
**USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO TRATAMENTO DAS
LEISHMANIOSES IN VITRO**

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

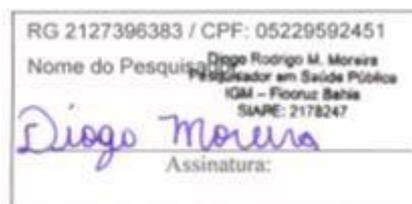
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de dezembro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Diogo Rodrigo de
Magalhães Moreira
Pesquisador IGM/FIOCRUZ



Dr. Antônio Ricardo Khouri
Cunha
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Aos meus pais, sem os quais,
nada disso faria sentido.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, dedicação, cuidado e incentivo. Obrigada por serem quem são e por estarem sempre presentes.

À Matheus, por ser a minha inesgotável fonte de combustível.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Khouri, pela orientação, confiança e dedicação a minha formação científica.

À Dra Luciane Amorim, por todos os conselhos e ensinamentos durante todos esses anos.

Ao grupo Khouriosos, por todas as trocas, suporte e por tornarem a nossa bancada, um ambiente agradável de trabalho.

À Dra. Juliana Perrone, pelo apoio e colaboração. E sua aluna Yasmin Luz, pela contribuição nos experimentos e por todas as trocas que tivemos nesse período.

À todos os meus amigos, que participaram direta ou indiretamente. Em especial à Michele, Victoria, Lara, Beatriz, Marina, Larissa, Ellen, Isabele, Laise e Gabriela. Obrigada pela escuta atenciosa, pelo colo e apoio.

Ao Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ–BA) e ao Programa de Pós-graduação em Patologia (PGPAT/FIOCRUZ-BA) por disponibilizar todo apoio e estrutura, assim como todos os funcionários pelo profissionalismo e apoio no decorrer do curso.

SANTOS, Thaline Mabel Sousa. Uso da associação de hidroxilamina e DETC no tratamento das leishmanioses *in vitro*. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leishmanioses são um conjunto de doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, que atingem cerca de 1 bilhão de pessoas que estão sob risco de infecção. As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie do parasito, da resposta imune e *background* genético do paciente. Para o tratamento da leishmaniose os fármacos mais utilizados atualmente são os antimoniais pentavalentes. Entretanto estas drogas possuem elevada toxicidade e efeitos colaterais desconfortáveis. Neste contexto, a busca de novos fármacos com alta ação leishmanicida e reduzida toxicidade faz-se necessária. Uma alternativa interessante tem sido o uso de fármacos que atuam em mecanismos da resposta imune, pois estes têm demonstrado resultados promissores. Dentre eles, o dietilditiocarbamato (DETC) é um quelante de cobre que inibe o funcionamento da superóxido dismutase, e já foi demonstrado que ele aumenta a produção de superóxido e diminui a carga parasitária na leishmaniose tegumentar experimental. Outro fármaco, a hidroxilamina, reage com o superóxido e durante esse metabolismo promove o aumento de peróxido de nitrito, molécula capaz de destruir parasitos intracelulares. **OBJETIVO:** Por isto, o objetivo deste trabalho foi testar a ação *in vitro* da associação de Hidroxilamina e DETC contra *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram realizados testes de toxicidade em *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* e em macrófagos murinos derivados de medula de camundongo BALB/C. Além disso, macrófagos derivados de medula óssea foram infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* e tratados por 48 horas para avaliar a percentagem de infecção e número de amastigotas através de contagem em microscópio de fluorescência. **RESULTADOS:** Nossos resultados mostraram uma redução do crescimento e viabilidade dos parasitos quando tratados a partir de 2 μM de DETC e na concentração mais alta de hidroxilamina (5mM). O índice de inibição de 50% foi de de 33,03 μM para hidroxilamina, 0,247 μM para DETC e 1,676 μM para combinação das drogas contra a *Leishmania braziliensis*. E contra os macrófagos murinos o índice de inibição de 50% foi de 237,0 μM para hidroxilamina, 11,47 μM para DETC e 67,16 μM para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5). Foi observado uma ação antagonista em macrófagos murinos usando a concentração combinada de 20uM de DETC e 500uM de hidroxilamina. Por outro lado, esta concentração combinada foi altamente sinérgica para *L. braziliensis*. A combinação dessas concentrações também foi capaz de reduzir significativamente a percentagem de infecção e o número de amastigotas por 100 células. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados demonstram que a associação de hidroxilamina com DETC tem efeitos antiproliferativos potentes em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* e apresenta baixa toxicidade em macrófagos murinos.

Palavras-chaves: Leishmaniose cutânea. Leishmaniose visceral. *Leishmania braziliensis*; *Leishmania mexicana amazonensis*. *Leishmania (Leishmania) infantum*. Dietilditiocarbamato. Hidroxilamina.

SANTOS, Thaline Mabel Sousa. Use of hydroxylamine and DETC association in the treatment of leishmaniasis *in vitro*. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis are a group of neglected diseases, according to the World Health Organization, that affects one billion of people that are at risk of infection. Clinical status vary according to the parasite species and the host immune response and genetic background. The most used drugs to the treatment of leishmaniasis are pentavalent antimonial. However, these drugs present high toxicity and uncomfortable collateral effects. In this context, it is necessary the search for new medicines with a high leishmanicidal action and reduced toxicity. An interesting alternative has been the use of drugs that act in the mechanisms of immune response as it has shown promising results. In regard of these drugs, there is the diethyldithiocarbamate, which is a copper-quelating compound that inhibits the function of the superoxide dismutase and it has been demonstrated that this compound increases the production of superoxide and decrease the parasitic load in the experimental cutaneous leishmaniasis. Another alternative drug is the hydroxylamine that reacts with the superoxide and during the metabolism promotes the increase of nitrite peroxide, a molecule capable of destroying intracellular parasites. **OBJECTIVE:** That being said, this study objective was to test the *in vitro* action of the association of Hydroxylamine and DETC against *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. **MATERIALS E METHODS:** It has been performed toxicity tests in *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* and also in murine macrophages derived from BALB/C bone marrow. In addition, BALB/C bone marrow-derived macrophages were infected by *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum* and treated for 48 hours to assess the percentage of infection and number of amastigotes by counting under a fluorescence microscope. **RESULTS:** Our results showed a reduction in the growth and viability of the parasites when treated from 2 μM onwards of DETC and at the highest concentration of hydroxylamine (5 mM). Inhibition index of 50% was 33.03 μM to hydroxylamine, 0.247 μM to DETC and 1.676 μM to the association between them against the *Leishmania braziliensis*. Regarding the murine macrophages the inhibition index of 50% was 237.0 μM to hydroxylamine, 11.47 μM to DETC and 67.16 μM to the association between the two drugs (DETC/Hydroxylamine=1:2.5). An antagonistic action was observed against the murine macrophages when using the combined concentration of 20 μM from DETC and 500 μM from hydroxylamine. On the other hand, these combined concentrations were highly synergistic to the *L. braziliensis*. The association between these concentrations was also capable of significantly reducing the infection percentage and the number of amastigotes per 100 cells. **CONCLUSION:** Our results demonstrated that the association of hydroxylamine and DETC has powerful antiproliferative effects in promastigotes and amastigotes from *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* and presents low toxicity to the murine macrophages.

Key-words: Cutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. *Leishmania mexicana amazonenses*. *Leishmania (Leishmania) infantum*. Diethyldithiocarbamate. Hydroxylamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	16
Figura 2 - Distribuição geográfica da leishmaniose.....	18
Figura 3 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea.....	21
Figura 4 - Aspectos imunológicos da Leishmaniose Cutânea.....	21
Figura 5 - Estrutura química do dietilditiocarbamato de sódio (DETC).....	30
Figura 6 - Estrutura química da hidroxilamina.....	30
Figura 7 - Desenho do experimento.....	34
Figura 8 - Desenho do experimento de infecção.....	36
Figura 9 - Ação leishmanicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na <i>Leishmania braziliensis</i>	38
Figura 10 - Ação leishmanicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na <i>Leishmania amazonensis</i>	39
Figura 11 - Ação leishmanicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na <i>Leishmania infantum</i>	40
Figura 12 - Ação citotóxica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos.....	41
Figura 13 - Citologia da ação citotóxica do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos.....	42
Figura 14 - Avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos através do ensaio de luminescência.....	44
Figura 15 - Avaliação da ação sinérgica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos e <i>Leishmania braziliensis</i>	46
Figura 16 - Efeito da ação da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato em macrófagos infectados com <i>Leishmania</i>	47
Figura 17 - Microscopia de fluorescência da ação leishmanicida do dietilditiocarbamato e hidroxilamina contra macrófagos murinos infectados com <i>Leishmania</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
LT	Leishmaniose Tegumentar
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Leishmaniose Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
DTH	Hipersensibilidade Tardia
IFN	Interferon
LCDA	Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IL-4	Interleucina
LCR	Leishmaniose Recidiva Cútis
SB(V)	Antimonial Pentavalente
SB(III)	Antimonial Trivalente
GSH	Glutationa
ANF-B	Anfotericina-B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GM- CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
HSP90	Proteína de Choque Térmico 90
17-AAG	<i>17-(allylamino)-17-demetoxigeldanamycin</i>
DNDi	Drogas para Doenças Negligenciadas
CPSF3	Fator de Especificidade de Decote e Poliadenilação 3
DETC	Dietilditiocarbamato de Sódio
SOD1	Superóxido Dismutase 1
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais

M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
IC	Índice de Combinação
IC50	Concentração Inibitória de 50%
ATP	Adenosina Trifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA	17
1.3	FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE	19
1.4	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	22
1.5	DROGAS PROPOSTAS	25
1.6	DETC E HIDROXILAMINA	27
2	JUSTIFICATIVA	31
2.1	HIPÓTESE	31
2.2	OBJETIVOS	31
2.2.1	Geral	31
2.2.2	Específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	CEUA	32
3.2	CULTIVO DE CÉLULAS L929	32
3.3	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO BALB/c	32
3.4	CULTIVO AXÊNICO DOS PARASITOS	33
3.5	AÇÃO LEISHMANICIDA DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA AXÊNICA DE <i>Leishmania spp.</i> POR COLORAÇÃO COM AZUL DE TRYPAN	33
3.6	AÇÃO LEISHMANICIDA DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA AXÊNICA DE <i>Leishmania spp.</i> POR QUANTIFICAÇÃO DE ATP PRODUZIDO	34
3.7	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA DE MACRÓFAGOS MURINOS POR COLORAÇÃO COM AZUL DE TRYPAN	35
3.8	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA DE MACRÓFAGOS MURINOS POR QUANTIFICAÇÃO DE ATP PRODUZIDO	35
3.9	CITOLOGIA DE MACRÓFAGOS MURINOS	35
3.10	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS	36
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

4	RESULTADOS	37
4.1	AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania braziliensis</i>	37
4.2	AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania amazonensis</i>	38
4.3	AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania infantum</i>	39
4.4	AÇÃO CITOTÓXICA DOS FÁRMACOS NOS MACRÓFAGOS MURINOS ATRAVÉS DA CONTAGEM POR AZUL DE TRYPAN	40
4.5	AÇÃO CITOTÓXICA DOS FÁRMACOS NOS MACRÓFAGOS MURINOS ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE ATP	43
4.6	ÍNDICE DE SELETIVIDADE COMBINADA DOS FÁRMACOS CONTRA <i>L. braziliensis</i>	44
4.7	AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS CONTRA MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania infantum</i>	47
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e subgênero *Leishmania* ou *Vianna*, que causam leishmaniose cutânea ou visceral. A transmissão para o hospedeiro mamífero ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas, do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, conhecido popularmente como Mosquito Palha (ALVAR et al., 2012; GABRIEL et al., 2019). Os hospedeiros mamíferos incluem além dos seres humanos, animais silvestres e domésticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A *Leishmania* é um parasito dimórfico e digenético, pois possui um ciclo de vida em dois hospedeiros (CHAPPUIS et al., 2007; HENARD et al., 2014). No hospedeiro invertebrado a *Leishmania* apresenta sua forma promastigota, caracterizada por ser uma forma móvel, alongada, flagelada, extracelular e infectante (KILLICK-KENDRICK, 1990). No hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* assume sua forma amastigota, que apresenta característica arredondada, intracelular obrigatória, não móvel e aflagelado (KAYE; SCOTT, 2011).

O ciclo de transmissão inicia-se quando o vetor realiza a hematofagia em um hospedeiro infectado e ingere o sangue contendo amastigotas do parasito ou macrófagos infectados (Figura 1). No trato digestório do flebotomíneo, o parasito se prolifera e sofre um processo de transformação com várias alterações bioquímicas em sua superfície denominado metaciclogênese (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). Durante esse processo as amastigotas ingeridas perdem sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino do vetor, reduzem o tamanho corporal, aumentam o tamanho e o batimento do flagelo e se transformam nas formas promastigotas procíclicas e posteriormente em promastigotas metacíclicas que são altamente infectantes (SACKS, 2001). Nessa forma, o parasito migra para a faringe e cavidade bucal do inseto, que pode ser inoculado na pele do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (AKOPYANTS et al., 2004). Nesse momento o parasito é rapidamente fagocitado por uma variedade de células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas ou são internalizados de forma ativa (CHAPPUIS et al., 2007).

Dentro das células há a formação dos fagolisossomos a partir da junção do fagossoma com os lisossomos. Nesta organela formada após a fagocitose, ocorrem vários processos celulares resultantes da interação parasito-hospedeiro, dentre eles degradação das enzimas produzidas dentro dos fagolisossomos (proteases, nucleases, fosfatases e lipases), estresse

oxidativo e produção de óxido nítrico (BESTEIRO et al., 2007; LODGE; DESCOTEAUX, 2005; VAN ASSCHE et al., 2011). Esses processos tornam o ambiente do fagolisossomo bastante ácido e hidrolítico e a forma promastigota é sensível a esse ambiente, com isso, as promastigotas começam a se diferenciar em amastigotas que são mais resistentes. Mantendo o controle das condições ambientais internas do vacúolo, a amastigota inicia o processo de replicação, causando a lise celular, e permitindo que os parasitos seja internalizados por outras células ou sejam sugados por outro flebotomíneo, recomeçando todo o ciclo (SANTOS et al., 2014a).

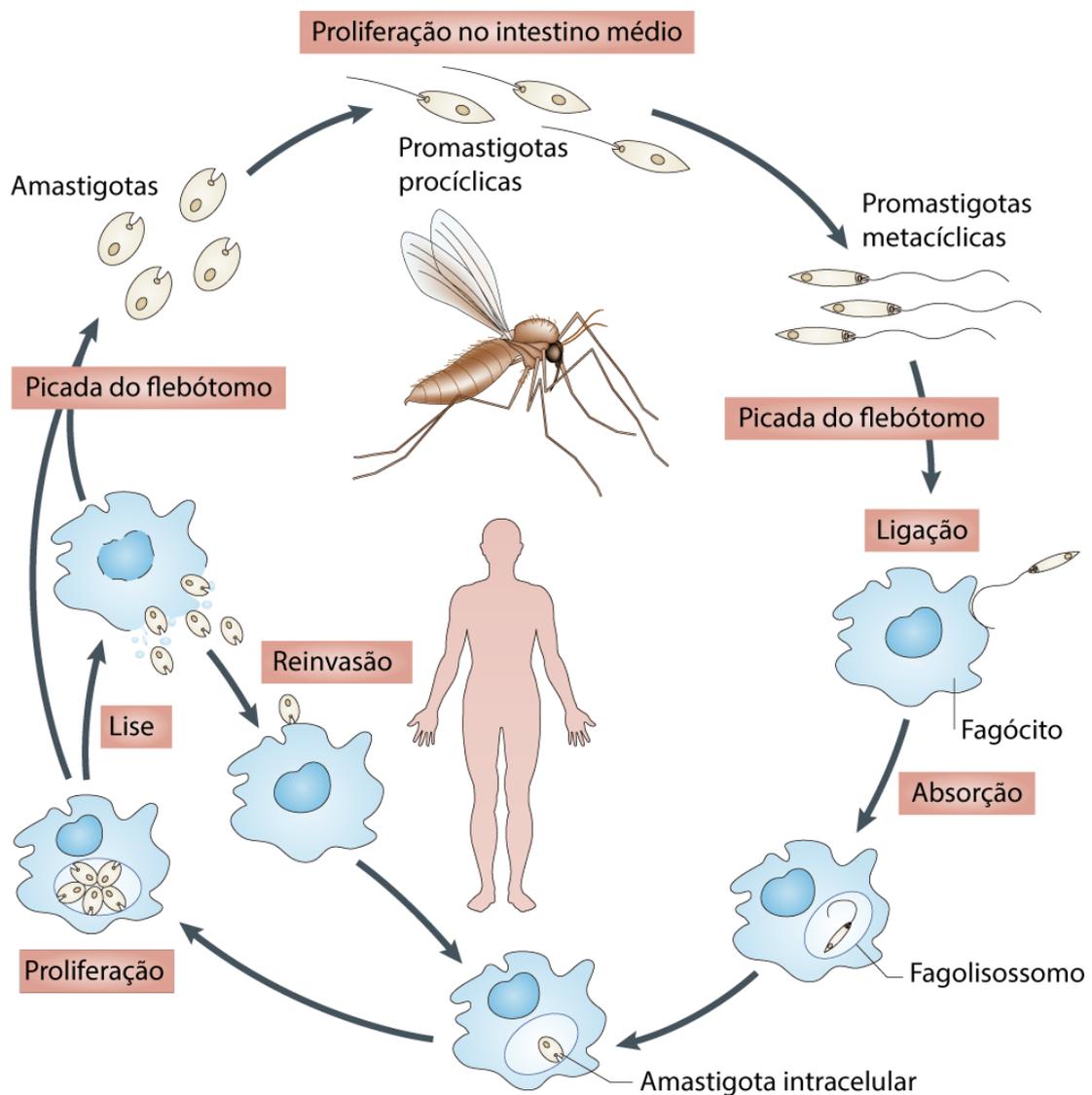


Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo, flebotomos infectados irão transmitir o parasito na forma promastigota metacíclica para o hospedeiro. No local da lesão, o parasito será fagocitado e haverá a formação do fagolisossomo, local onde o parasito irá se diferenciar na forma amastigota e se multiplicar. A replicação da amastigota pode causar ruptura da célula, permitindo a infecção de outros fagócitos. Quando uma célula infectada é sugada pelo flebotômio durante o repasto sanguíneo, as amastigotas irão sofrer o processo de metaciclogênese e se diferenciar em metacíclica, que é a forma infectante.

Fonte: Adaptado de (MOREIRA; BATISTELA, 2011)

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença tropical negligenciada, que afeta principalmente pessoas de baixa renda na África, Ásia e América Latina. Atualmente mais de 1 bilhão de pessoas estão sob risco de infecção e estima-se que 30 mil novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) ocorram anualmente (OMS, 2019). A leishmaniose é encontrada em todos os continentes, exceto Austrália e Antártica, já que o clima e outros aspectos ambientais influenciam na presença geográfica dos vetores e conseqüentemente nas áreas onde a doença é encontrada (CDC, 2020). Além disso, a doença está associada a desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, e falta de recursos (OMS, 2021).

Segundo OMS em 2019, 98 países eram endêmicos para as leishmanioses, desses, 71 países eram endêmicos tanto para LC, quanto para leishmaniose visceral (LV). Nesse mesmo ano, mais de 87% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia (Figura 2 A). E para a LV estima-se mais de 1 milhão de novos casos anualmente, sendo que em 2019, noventa por cento dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Figura 2 B) (OMS, 2019).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), de 2001 a 2019 foram notificados 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea por 17 dos 18 países endêmicos das Américas, sendo que o Brasil foi o país que notificou mais casos ao final de 2019. Essa situação se repetiu nos casos de leishmaniose visceral, no qual, o Brasil representou 97% do total de casos notificados em 2019 (2.529 casos de LV) (OPAS, 2020).

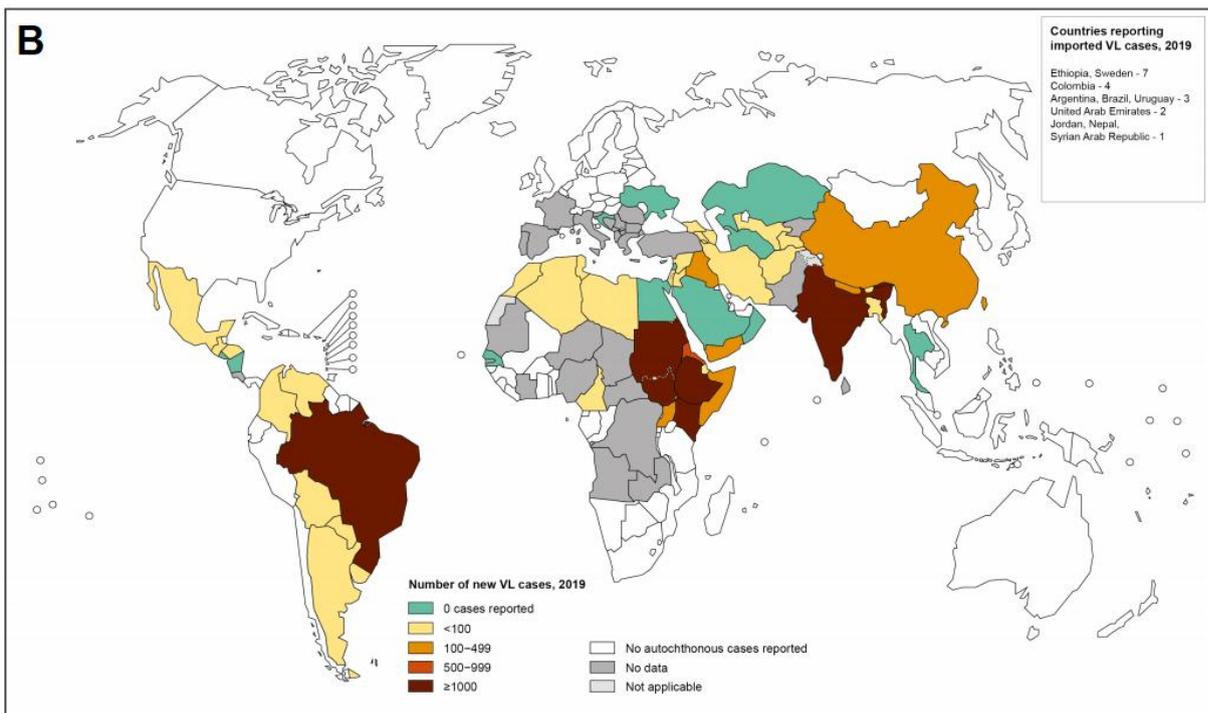
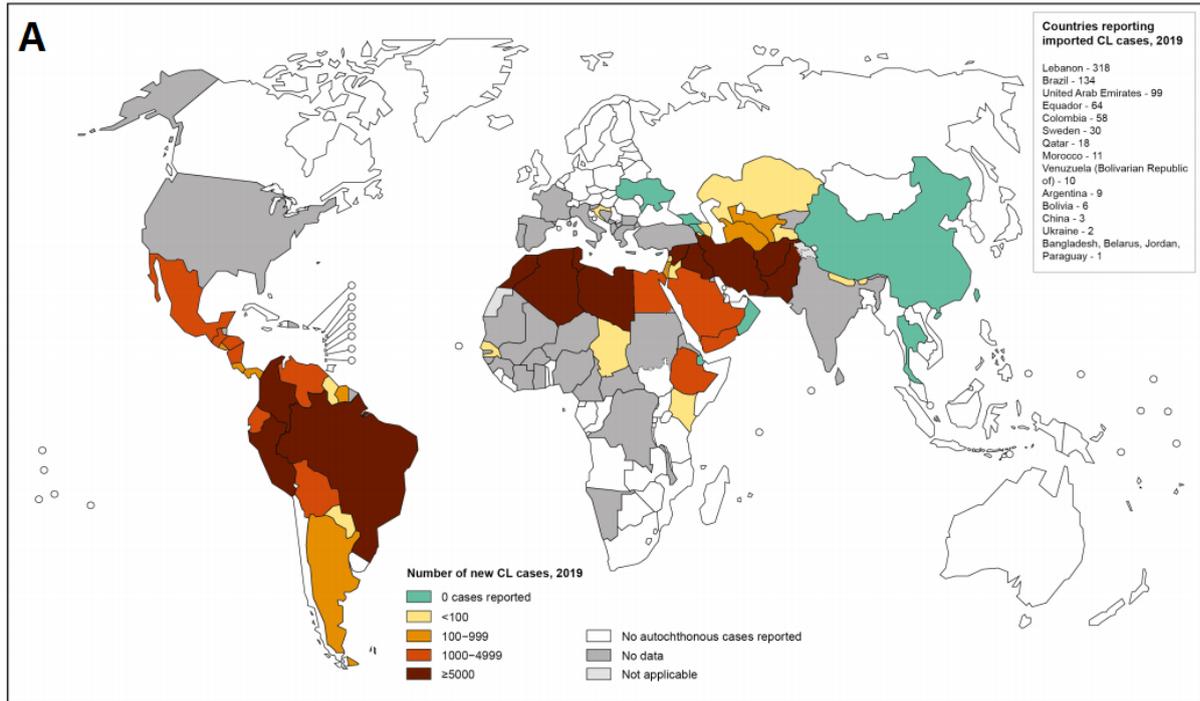


Figura 2 - Distribuição geográfica da leishmaniose. A. cutânea e B. visceral, no Mundo, 2019. As cores no mapa variam de acordo com o número de casos de leishmaniose relatados, numa escala que varia de verde, nos países que relataram zero casos, até marrom nos países que relataram mais de mil casos.

Fonte: (OMS, 2019).

1.3 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania*, que são divididos nos subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. Dependendo da espécie do parasito, da resposta imune e do *background* genético dos indivíduos, a doença pode apresentar manifestações clínicas bem distintas. São classificadas em dois grandes grupos: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar (LT) (DEPS et al., 2000; KAYE; SCOTT, 2011).

A LV, popularmente conhecida como kala-azar caracteriza-se por ser uma enfermidade crônica que atinge órgãos como fígado, baço e linfonodo, e é considerada a forma mais prejudicial da doença. No Brasil, essa forma clínica é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e o diagnóstico é feito através da combinação de sinais clínicos com exames parasitológicos ou sorológicos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; OMS, 2021). Os sintomas da LV incluem febre, fadiga, fraqueza, perda do apetite e de peso. Além de sintomas característicos de invasão parasitária do sangue, como: hepatoesplenomegalia, pancitopenia e linfonodos aumentados (CHAPPUIS et al., 2007; GRAMICCIA; GRADONI, 2005). A leishmaniose dérmica pós kala-azar (PKDL) é uma complicação da LV caracterizada por erupção cutânea nodular contendo muitos parasitos. O intervalo entre a LV tratada e a PKDL varia de meses até anos e pode ser encontrado em indivíduos imunossuprimidos residentes de áreas endêmicas de *Leishmania infantum* (CHAPPUIS et al., 2007).

A LT é uma doença espectral que acomete a pele, podendo estender-se até as mucosas (ALVAR et al., 2012; LAINSON; RANGEL, 2005). Existem diversas manifestações clínicas da LT e a classificação envolve parâmetros clínico-histopatológicos como o tipo da lesão, a resposta imunológica e o curso da doença (REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Entre essas manifestações clínicas, as mais comumente encontradas são: leishmaniose cutânea mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose disseminada (LD) e a leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 3). Não se sabe ao certo o que causa as grandes variações de apresentação clínica da LT, porém, acredita-se que essa variação ocorra devido as características relacionadas ao parasito e ao hospedeiro (GUIMARÃES et al., 2008; REITHINGER et al., 2007).

A LCM é frequentemente causada por parasitos das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* e na maioria das vezes é resultado da evolução da LCL (MACHADO-COELHO et al., 2005; TORRES-GUERRERO et al., 2017). A forma mucosa atinge principalmente a mucosa nasal, mas também pode envolver o palato, faringe e laringe, causando lesões desfigurantes. Essa forma da doença representa o polo hiperérgico da resposta

imune, que é impulsionada pela imunopatologia, caracterizada por uma hipersensibilidade tardia (DTH) (Figura 4), forte resposta imune do tipo Th1 com altos níveis de interferon γ (IFN- γ), o que leva a necrose da mucosa nasofaríngea e consequente escassez de parasitos nas lesões (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005; SCOTT; NOVAIS, 2016; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LCD é também chamada de leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA), já que representa o polo anérgico da resposta imune, caracterizado por elevados níveis de interleucina 4 (IL-4), IL-10, altos títulos de anticorpos circulantes e grande quantidade de parasitos nas lesões (SCOTT; NOVAIS, 2016; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A forma difusa é relativamente rara e no Brasil a *L. (L.) amazonensis* é a principal espécie causadora (SILVEIRA et al., 2008). Essa manifestação é clinicamente caracterizada por formação de placas e múltiplos nódulos não ulceradas distribuídos por grandes regiões do corpo do paciente (SILVEIRA et al., 2009; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A LD apresenta múltiplas lesões em várias partes do corpo e está associada aos parasitos das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (MACHADO et al., 2011; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Essa manifestação clínica era muitas vezes confundida com a LCD, entretanto mais recentemente foi clínica e imunologicamente melhor classificada. A resposta imune na LD é do tipo Th1, com níveis significativos de IFN- γ e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), e do ponto de vista histopatológico, é observado na lesão a presença de linfócitos e macrófagos com poucos parasitos (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LCL é a forma mais frequentemente encontrada e é caracterizada pela presença de uma ou mais úlceras na pele, com centro necrótico, bordas elevadas e desenvolvimento de resposta inflamatória intensa (COSTA, 2009; GUIMARÃES et al., 2008). No Brasil, o principal agente etiológico da LT é a *Leishmania braziliensis*, a qual na maioria das vezes leva ao desenvolvimento da LCL (MACHADO et al., 2010). A resposta imune na LCL é do tipo Th1, com elevados níveis plasmáticos de citocinas IL-2, IFN- γ e TNF, sendo a célula CD4 a que mais contribui com a produção dessas citocinas, tanto no sangue periférico quanto a nível tecidual. O aspecto histopatológico da lesão apresenta infiltrado mononuclear e poucos parasitos (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

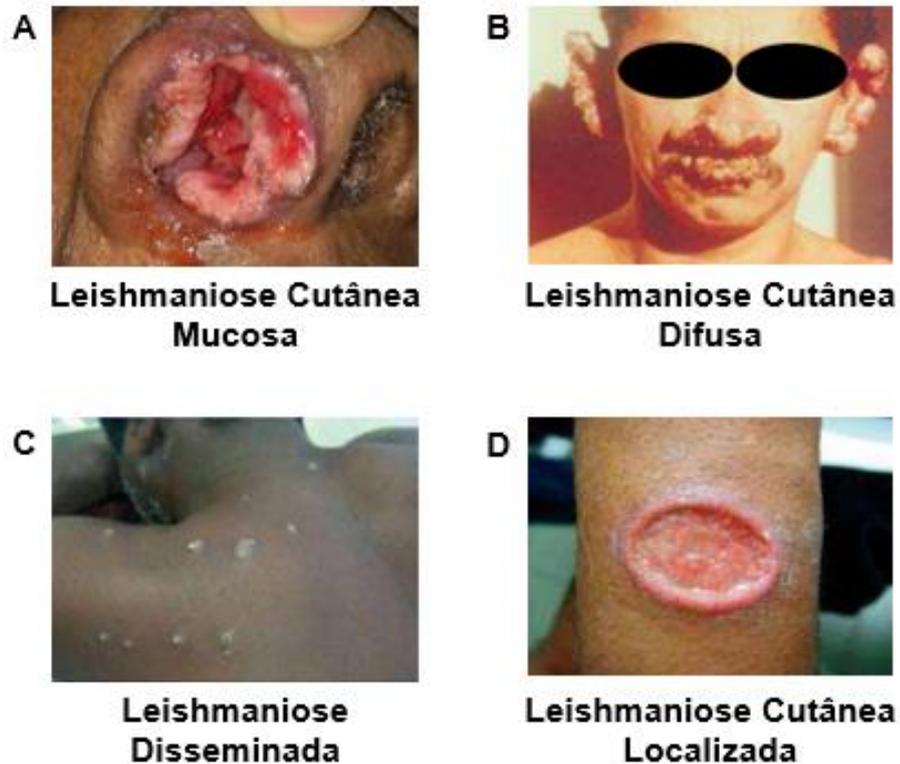


Figura 3 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea. A: representação da leishmaniose cutânea mucosa. B: representação da leishmaniose cutânea difusa. C: representação da leishmaniose disseminada. D: representação da leishmaniose cutânea localizada. Fonte: A: Imagem autoral. B-D: Fonte Adaptado de (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 201).

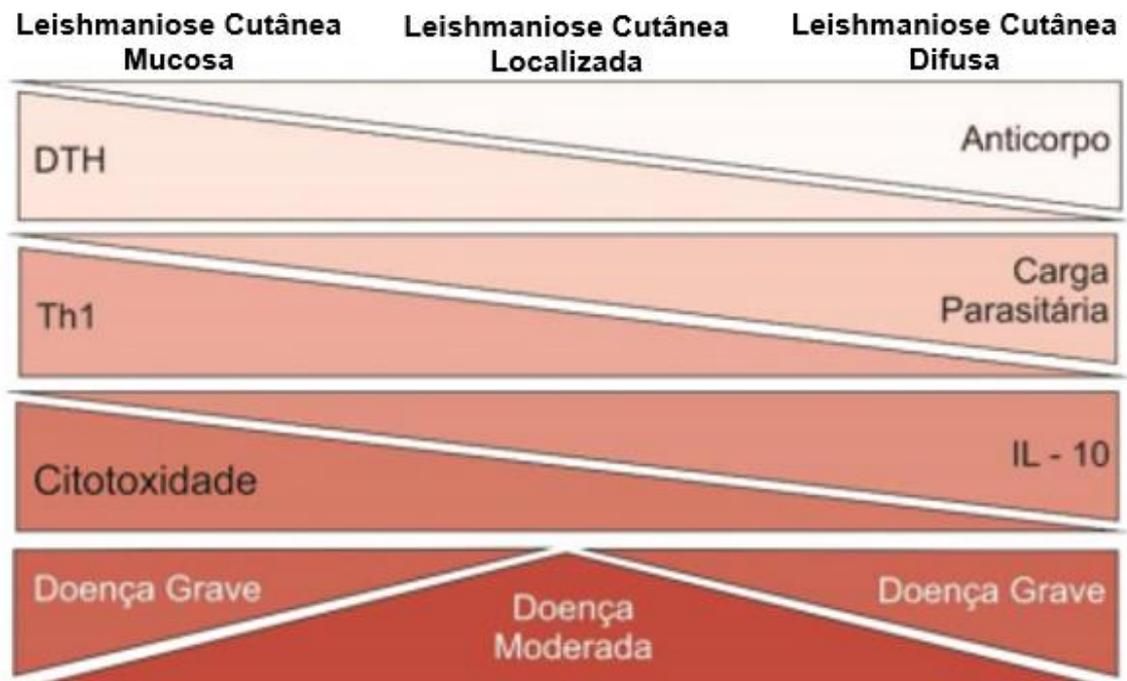


Figura 4 - Aspectos imunológicos da Leishmaniose Cutânea. O espectro imunológico da leishmaniose cutânea varia de altos níveis de imunidade mediada por células, representado pela manifestação clínica da leishmaniose cutânea mucosa, a uma resposta mediada por altos níveis de anticorpos, representada pela manifestação clínica da leishmaniose cutânea difusa.

Fonte: Adaptado de (SCOTT; NOVAIS, 2016).

1.4 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O tratamento de indivíduos com leishmaniose tem sido um desafio para médicos e pesquisadores. Os fármacos mais utilizados e com melhores resultados são os antimoniais pentavalentes: antimoniato de meglumina (glucantime) e o estibogluconato de sódio (pentostan) (DEPS et al., 2000; SALDANHA et al., 2000). O glucantime e o pentostan incluem as drogas de primeira linha, entretanto, drogas de segunda linha como pentamidina e anfotericina também são usadas para tratar a leishmaniose (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Apesar dos sucessos alcançados, estas drogas possuem alta toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, tem se observado um aumento preocupante de casos onde estes fármacos não levam à cura do paciente, permitindo o surgimento de cepas resistentes e aumento da frequência de casos de Leishmaniose Recidiva Cutis (LRC). Os indivíduos com LRC apresentam lesões nodulares ou pequenas pápulas ao redor de uma cicatriz anterior não curada (COSTA, 2009).

Embora os antimoniais pentavalentes [Sb(V)] sejam a primeira linha de medicamentos utilizados em todo o mundo, o seu mecanismo de ação não está muito bem esclarecido, ainda há dúvidas se a forma ativa contra a *Leishmania* é a Sb(V), ou a forma trivalente Sb(III) (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). No primeiro mecanismo proposto, o Sb(V) é considerado uma pró-droga que é reduzido dentro do organismo para a forma mais ativa e tóxica, o Sb(III), através da ação dos tióis: glutatona (GSH), o principal tiol localizado no citoplasma de células mamíferas, cisteína (Cis) e cisteína-glicina (Cys-Gly) que são predominantes nos lisossomos, e o conjugado de bisglutationil-espermidina T(SH)₂, que é o principal tiol localizado no parasito. Portanto, a redução da forma pentavalente à forma trivalente reduz a capacidade antioxidante e torna-se uma arma eficaz contra a *Leishmania* (FRÉZARD et al., 2001; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016; YAN et al., 2003).

De acordo com o segundo modelo, o Sb(V) apresenta atividade leishmanicida intrínseca (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). LUCUMI et al., 1998, demonstraram que o Sb(V) inibe a topoisomerase em *Leishmania donovanni*. DEMICHELI et al., 2002, relataram pela primeira vez a capacidade de Sb(V) formar uma interação estável com uma biomolécula, e nesse caso houve a formação de complexos de Sb(V) com adenina ribonucleosídeo. Esse complexo resultante pode atuar como inibidor dos transportadores de purina da *Leishmania*, interferindo no metabolismo de nucleosídeos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

De forma geral, os benefícios do uso do antimonial pentavalente incluem baixa dosagem, ação rápida e baixo custo. Porém, devido ao acúmulo dessa droga nos tecidos, os efeitos adversos incluem vômito, náuseas, anorexia, mialgia, dor abdominal, dor de cabeça,

artralgia e letargia, irritação local, aumento das enzimas hepáticas, da ureia, creatinina, e alterações eletrocardiográficas. Além disso, o uso prolongado e os efeitos adversos do antimonial pentavalente está associado com o aumento de casos de abandono do tratamento e conseqüentemente, contribuindo com o surgimento de cepas resistentes, causando falha no tratamento de até 65%, como relatado em Bihar, na Índia (DE MENEZES et al., 2015; GHORBANI; FARHOUDI, 2018; MURRAY et al., 2005; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A Anfotericina B (ANF-B) é considerada a segunda escolha para o tratamento das leishmanioses, porém em alguns países como Índia, o alto índice de falha ao antimonial pentavalente tornou a ANF-B o medicamento de primeira escolha (BARRETT; CROFT, 2012). A ANF-B é um antifúngico da classe dos polienos, originalmente produzidos por *Streptomyces nodosus*, uma bactéria filamentosa, e a atividade leishmanicida da ANF-B foi demonstrada pela primeira vez em 1960 (MCMILLAN, 1960; PURKAIT et al., 2012). O mecanismo de ação da ANF-B contra *Leishmania* ocorre através de dois meios distintos. No primeiro, há a auto-oxidação da ANF-B e a conseqüente produção de radicais livres (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). E o segundo mecanismo se dá através da ligação do medicamento ao ergosterol, um esterol presente na membrana da *Leishmania*, gerando poros transmembrana, que conseqüentemente aumenta a permeabilidade e permite a entrada alterada de cátions, água e glicose, o que gera um desequilíbrio iônico e afeta as enzimas localizadas na membrana do parasito. Além disso, a interação com os esteróis na membrana das células do hospedeiro diminui a entrada da *Leishmania* nas células não infectadas (PAILA; SAHA; CHATTOPADHYAY, 2010; PURKAIT et al., 2012).

Os efeitos adversos associados à ANF-B incluem febre, calafrio, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Outros efeitos tóxicos mas incomuns são hipocalcemia e miocardite. Embora outras formulações de ANF-B tenham sido desenvolvidas para diminuir as reações adversas e melhorar a sua biodisponibilidade, como as formas coloidal e lipossômica, essas formas são muito caras e sensíveis a temperaturas mais altas, questões que dificultam o uso desse medicamento em países em desenvolvimento (DE MENEZES et al., 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

A pentamidina, uma diamidina aromática, é um agente antiprotozoário que é utilizado como um medicamento de segunda linha para casos de leishmaniose resistente ao antimonial pentavalente, desde 1952 (CROFT; YARDLEY, 2002). O mecanismo de ação da pentamidina também permanece incompletamente compreendido, porém acredita-se que ocorra através de alguns alvos. No primeiro, a droga interfere na síntese de poliaminas, ao inibir o uso do

substrato pelas enzimas ornitina descarboxilase e espermidina sintetase. Essas poliaminas são importantes para a vida da *Leishmania*, pois auxiliam na regulação, crescimento e diferenciação celular. O outro mecanismo se dá através da ligação da pentamidina a regiões do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) do parasito ricas em adenina e timina, conseqüentemente interferindo na síntese de DNA da *Leishmania*. Além desses, acredita-se que a pentamidina também interfere no potencial da membrana interna da mitocôndria do parasito (CROFT; YARDLEY, 2002; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Apesar da eficácia, a resistência da *Leishmania* à pentamidina já tem sido descrita, além disso, essa droga é altamente tóxica e apresenta efeitos adversos como diabetes mellitus, hipoglicemia, hipotensão, miocardite, toxicidade renal e até morte. Por conta desses fatores, a pentamidina é utilizada com pouca frequência, e muitas das vezes é utilizada em protocolos terapêutico combinados (DE MENEZES et al., 2015; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma glicoproteína que tem importante papel no crescimento de células-tronco da medula óssea (ALMEIDA; BRITO; MACHADO, 2005). Os dois subconjuntos de linfócitos Th1 e Th2 respondem ao GM-CSF e além disso, ele é capaz de estimular a fibrose e a cicatrização de feridas teciduais, já que apresenta propriedades similares ao TGF- β (Fator de Transformação do Crescimento), uma citocina que desempenha papel central na cicatrização (JONES, 1993; PARRONCHI et al., 1991). Já foi demonstrado que o GM-CSF apresenta uma ação leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania donovani*, *L. amazonensis* e *L. major* a partir da ativação de macrófagos (AL-ZAMEL et al., 1996; HO et al., 1990; WEISER et al., 1987). Em humanos, o GM-CSF pode induzir resposta imune do tipo Th1, com ativação de macrófagos em resposta à *Leishmania*, gerando uma apresentação de antígenos mais eficaz e indução de cicatrização e fibrose (GRAHAM; BURGESS, 1992; JONES, 1993).

Um estudo duplo cego, randomizado, placebo controlado, demonstrou que o uso de GM-CSF intra-lesional associado ao tratamento com antimonial aumentou significativamente a chance de cicatrização da lesão em 40 dias. Quando comparado com o grupo tratado com antimonial e placebo, o tempo de cura do grupo tratado com GM-CSF e antimonial reduziu mais de 50%. Além disso, o tratamento com GM-CSF aumentou a produção de IL-10, citocina com propriedade imunorregulatória que contribui no controle da inflamação e do dano tecidual na leishmaniose cutânea. A redução do tempo de cura no grupo tratado com GM-CSF pode ocorrer por três mecanismos: destruição dos parasitos por ativação direta dos macrófagos, modulação da resposta imunológica e aumento da formação de cicatriz (ALMEIDA et al., 1999;

ALMEIDA; BRITO; MACHADO, 2005). Outros estudos que avaliaram a eficácia da aplicação tópica do GM-CSF combinado com o tratamento com antimonial, demonstraram uma redução no tempo de cicatrização das lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, sem efeitos colaterais e recidiva da doença (ALMEIDA et al., 2005; SANTOS et al., 2004).

Na última década, com a descoberta da importância do equilíbrio Th1/Th2 para o desfecho da leishmaniose, muitos estudos têm demonstrado o uso de citocinas e antagonistas de citocinas para o tratamento da leishmaniose (ALMEIDA; BRITO; MACHADO, 2005; SCOTT; NOVAIS, 2016; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). Nessa temática, o INF- γ é uma citocina liberada por linfócitos Th1, capaz de ativar macrófagos para destruir parasitos intracelulares como a *Leishmania* e tem demonstrado efeitos satisfatórios na cura de pacientes com leishmaniose (BADARÓ et al., 1993; REED; SCOTT, 1993; ROATT et al., 2020).

Kolde e colaboradores em 1996 avaliou a eficácia da administração de INF- γ por via subcutânea em um período de 28 dias em um paciente com leishmaniose cutânea. O estudo demonstrou que a terapia com INF- γ foi efetiva para a cura do paciente e pode ser um tratamento eficaz para leishmaniose cutânea, sem efeitos colaterais como observado no tratamento com o antimonial pentavalente (KOLDE et al., 1996). Outros estudos demonstraram que a administração de INF- γ promoveu o controle parasitológico em pacientes com leishmaniose visceral, e combinado com baixas doses de antimonial pentavalente foi eficaz para a cura de pacientes com leishmaniose cutânea (FALCOFF et al., 1994; SUNDAR; MURRAY, 1995).

1.5 DROGAS PROPOSTAS

Atualmente, a maioria dos tratamentos utilizados agem diretamente na destruição dos parasitos ou limitando a sua multiplicação (BARBOSA et al., 2015). As taxas de cura do antimonial pentavalente em uma área endêmica de transmissão da *L. braziliensis* variam entre 50 e 90% (ESPADA et al., 2017; MACHADO et al., 2010). Neste contexto, a busca de novos fármacos faz-se necessária para o tratamento destes casos.

A proteína de choque térmico 90 (HSP90) é uma das proteínas mais abundantes da *Leishmania* e representa cerca de 2,8% do teor total de proteínas do parasito. A HSP90 é responsável por interagir diretamente com fatores de transcrição e reguladores do ciclo celular e desempenha um importante papel na diferenciação da forma promastigota da *Leishmania* para a forma amastigota (LI et al., 2009; WIESGIGL; CLOS, 2001). Sendo assim, a manipulação do HSP90 por inibidores específicos gera modificações no processo de transformação da

Leishmania e tem sido considerada como um potencial alvo molecular para o tratamento da leishmaniose (PETERSEN et al., 2012; VARELA-M et al., 2014).

Nesse sentido, alguns estudos avaliaram o papel leishmanicida da 17-(allylamino)-17-demetoxigeldanamycin (17-AAG), um inibidor específico de HSP90, análogo à geldanamicina. 17-AAG inibiu efetivamente o crescimento de *Leishmania braziliensis*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e apresentou efeitos semelhantes sob a diminuição da carga parasitária de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* (PETERSEN et al., 2012; SANTOS et al., 2014b). Em *Leishmania infantum* e *L. panamensis*, 17-AAG induziu a parada do ciclo celular e induziu a morte celular (VARELA-M et al., 2014).

Os medicamentos fitoterápicos têm seus componentes farmacologicamente ativos derivados de ervas medicinais e são utilizados em tratamentos de muitas doenças, incluindo a leishmaniose (DE OLIVEIRA et al., 2017). Nesse contexto, vários estudos já avaliaram o efeito leishmanicida *in vivo* de compostos derivados de ervas no tratamento da leishmaniose (DE BARROS DIAS et al., 2020). Dentre eles, alguns dos derivados de ervas medicinais que apresentaram efeitos significativos no tratamento da leishmaniose experimental foram: fração diclorometano rica em lactona sesquiterpênica obtida de *Tanacetum parthenium*, óleo essencial da planta *Chenopodium ambrosioides* e alicina, presente no alho (*Allium sativum*). Todos esses compostos evitaram o desenvolvimento das lesões e diminuíram a carga parasitária com pouca ou nenhuma toxicidade em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*. A eficácia desses compostos foi semelhante ou maior que a eficácia do Glucantime ou do Pentostan (METWALLY et al., 2016; MONZOTE et al., 2014; RABITO et al., 2014).

A Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) identificou na última década três classes químicas com efeitos leishmanicidas potentes, os benzoxaboroles, os aminopirprazols e os nitroimidazoles (VAN BOCXLAER et al., 2019). Esses compostos demonstraram potente atividade antileishmania *in vitro*, perfis farmacocinéticos que garantem a biodisponibilidade na administração de medicamentos orais e altos níveis de atividade contra leishmaniose visceral e cutânea experimental (VAN BOCXLAER et al., 2019; VAN DEN KERKHOF et al., 2018).

Os benzoxaboroles, conhecidos também como DNDi-6148 é um composto orgânico aromático composto pela fusão de um anel de benzeno com um anel de oxazol, e sua atividade antileishmania se dá através da inibição do Fator de Especificidade de Decote e Poliadenilação 3 (CPSF3) (MOWBRAY et al., 2021). O CPSF3 é uma endonuclease envolvida no decote da região 3' de uma molécula de RNA pré-mensageiro (pré-mRNA) e no controle da

poliadenilação, sendo um possível alvo contra *Leishmania* (BEGOLO et al., 2018; WALL et al., 2018). O DNDi-6148 apresentou efeitos potentes *in vitro* contra *Leishmania aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. tropica*, e *in vivo* contra *Leishmania infantum*, *L. donovani* e *L. major* (VAN BOCXLAER et al., 2019; VAN DEN KERKHOFF et al., 2018). Como resultado do seu perfil promissor, o DNDi-6148 foi declarado um candidato pré-clínico e está em estudo de fase 1 para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea (MOWBRAY et al., 2021).

Os nitroimidazoles também conhecidos como DNDi-0690 são uma classe de antimicrobianos que apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias e protozoários, incluindo a *Leishmania* (VAN BOCXLAER et al., 2021). O DNDi-0690 apresentou atividade potente contra *Leishmanias* do velho e do novo mundo, além disso, demonstrou redução da carga parasitária e do tamanho da lesão em modelos *in vivo* de leishmaniose experimental tegumentar e visceral (PETRI E SILVA et al., 2016; VAN DEN KERKHOFF et al., 2018; WIJNANT et al., 2019). Também devido ao seu perfil promissor, o DNDi-0690 foi aprovado para prosseguir com os estudos de fase 1 para o tratamento da leishmaniose (DE BARROS DIAS et al., 2020).

1.6 DETC E HIDROXILAMINA

Outra alternativa interessante para o tratamento da leishmaniose é o uso de fármacos que atuam em mecanismos da resposta imune, pois estes têm demonstrado resultados promissores (GANTT et al., 2001). Um dos principais mecanismos imunes de destruição de parasitos intracelulares, como a *Leishmania spp.*, é o aumento da concentração de radicais livres de oxigênio – superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peróxido de nitrito (GANTT et al., 2001).

O dietilditiocarbamato de sódio (DECT) é um composto que pertence à família dos ditiocarbamatos e é formado por duas porções diferentes na sua estrutura química (Figura 5). Uma porção de amina formada por nitrogênio e dois grupos etílicos que podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, e uma porção que possui uma extremidade de dissulfeto de carbono que pode quelar metais, exibindo maior afinidade pelos íons de cobre (Cu^{2+}) (COUCOUVANIS, 1979; OLIVEIRA et al., 2019, 2021). Por estes motivos, várias aplicações farmacológicas foram observadas nesse composto que já é amplamente utilizado para o tratamento do alcoolismo, envenenamento por metais e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (BREWER, 1993; KAPLAN et al., 1989; PANG et al., 2007;

SHINOBU; JONES; JONES, 1983).

O DETC também é conhecido também como Imuthiol, um imunomodulador sintético da classe dos timomiméticos, que acelera a diferenciação e maturação de pró-mielócitos e modula as funções dos linfócitos T maduros (HENOUX et al., 1979). Além disso, o DETC é capaz de inibir o funcionamento da superóxido dismutase 1 (SOD1), enzima que tem como principal cofator o cobre, e é responsável por transformar o superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (ASSOLINI et al., 2020; KHOURI et al., 2010). O DETC também interfere no funcionamento de outras enzimas, como as metaloproteases, que são necessárias para a sobrevivência de parasitos (OLIVEIRA et al., 2019). Essa capacidade do DETC de interagir com metais pode estar relacionada a processos oxidativos, que são mecanismos importantes para a eliminação de outros microrganismos (BOND; MARTIN, 1984).

O efeito antimicrobiano do DETC foi inicialmente demonstrado contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor mucedo* e *Aspergillus omigatus* em doses aceitáveis para a administração intravenosa em humanos (ALLERBERGER et al., 1989). Outros trabalhos investigaram os efeitos do DETC como um agente anticancerígeno, antibacteriano, antiviral e antiparasitário (FEUSER et al., 2021; HÜBNER et al., 1991; KAPLAN et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2019). O DETC demonstrou efeitos microbicidas contra o *Mycobacterium tuberculosis*, o mesmo foi capaz de atrasar a progressão para a AIDS e reduziu a incidência de infecções oportunistas em pacientes com HIV-1, além de demonstrar atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi* (HERSH et al., 1991; HÜBNER et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2021; REISINGER et al., 1990).

O efeito leishmanicida do DETC foi inicialmente demonstrado contra *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* *in vitro*, no qual esse composto foi capaz de induzir a produção de superóxido e morte dos parasitos em culturas axênicas e em macrófagos infectados. Além disso, o DETC foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com o fármaco (KHOURI et al., 2010). Em 2016 foi demonstrado que a aplicação tópica de membranas de celulose bacteriana contendo DETC diminuiu significativamente o tamanho da lesão, a carga parasitária e a resposta inflamatória no local da lesão em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* (CELES et al., 2016). Recentemente, o DETC demonstrou efeitos leishmanicidas contra *Leishmania amazonensis* (ASSOLINI et al., 2020). Sendo assim, o DETC apresenta resultados promissores para o tratamento da leishmaniose (KHOURI et al., 2010).

A hidroxilamina é um composto inorgânico com propriedades redutoras e antioxidante

(Figura 6), e pode ser encontrada em processos biológicos como um metabólito do ciclo do nitrogênio de alguns microrganismos (CHEN et al., 2015; SOLER-JOFRA; PÉREZ; VAN LOOSDRECHT, 2021). Esse composto impacta na liberação de óxido nítrico (N_2O) e monóxido de nitrogênio (NO) por bactérias aeróbias oxidantes de amônio e o seu impacto em outros microrganismos é pouco estudado (SOLER-JOFRA; PÉREZ; VAN LOOSDRECHT, 2021). Além disso, sabe-se que a hidroxilamina é produzida durante a redução de nitratos por *Escherichia coli*, é formada também como um intermediário durante a oxidação da amônia em nitrato por *Nitrosomonas* e pode ser formada no corpo a partir de drogas como anfetaminas, efedrina e norofedrina (GROSS; SMITH, 1985; KOLASA; WARDENCKI, 1974; SOLER-JOFRA; PÉREZ; VAN LOOSDRECHT, 2021).

Apesar de seus efeitos contra microrganismos serem pouco estudados, recentemente foi demonstrado que compostos derivados de hidroxilamina apresentaram efeitos antimicrobianos, através da inibição da enzima ribonucleotídeo bacteriana redutase, essencial para a proliferação bacteriana durante a infecção. Os compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram negativas e positivas, com baixa toxicidade em células eucarióticas. Além disso, os compostos mais promissores foram capazes de reduzir a biomassa do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MIRET-CASALS et al., 2018). Outro estudo demonstrou o potencial efeito contra o *Toxoplasma gondii* *in vitro* e *in vivo*, por ser um inibidor da aminotransferase aspartato. Essa enzima catalisa a reação reversível de aspartato e α -cetoglutatra para glutamato, que são intermediários importantes para o metabolismo de carbono e o ciclo de aminoácidos para sobrevivência de parasitos. Portanto, esses dados indicam que a hidroxilamina pode ser útil para o tratamento da toxoplasmose (LI et al., 2020). Além disso, acredita-se que o metabolismo da hidroxilamina promova o aumento de peróxido de nitrito, destruindo com mais eficácia parasitos intracelulares (CHEN et al., 2015). Deste modo, estas observações sugerem que a hidroxilamina e o DETC podem ser potenciais candidatos alternativos para o tratamento da LT e LV.

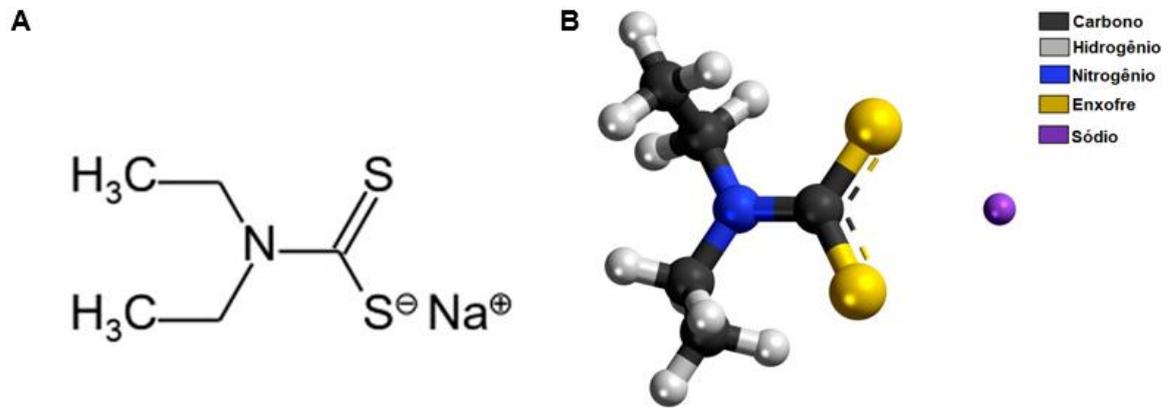


Figura 5 - Estrutura química do dietilditiocarbamato de sódio (DETC). A. Fórmula estrutural e B. Estrutura química tridimensional. Fonte: A. Google imagens. B.

Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2019).

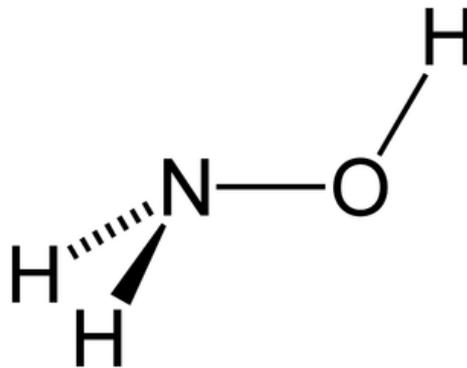


Figura 6 - Estrutura química da hidroxilamina.
 Fonte: Google imagens.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é considerada pela OMS uma das principais doenças negligenciadas no mundo, que afeta principalmente a população pobre e atualmente mais de 1 bilhão de pessoas estão sob risco de infecção. Os tratamentos das leishmanioses baseiam-se principalmente na quimioterapia, que é inadequada e cara. Os fármacos mais usados e com os melhores resultados são os antimoniais pentavalentes e eles têm sido usados desde a metade do século 20 para o tratamento dessa doença. Entretanto, essas drogas apresentam alta toxicidade, efeitos colaterais desconfortáveis e devem ser usadas por um longo prazo, com um esquema de administração parental diário. Esses fatores reduzem a aderência, resultando no abandono e insucesso do tratamento, que pode contribuir com o surgimento de cepas resistentes e o aumento de casos não curados. Por isso, é de suma importância a busca de novos fármacos com baixa toxicidade e alta capacidade leishmanicida para o tratamento da leishmaniose.

2.1 HIPÓTESE

A associação de hidroxilamina e DETC pode ser um tratamento eficaz para a leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, com baixa toxicidade.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Geral

Testar a ação *in vitro* da associação de Hidroxilamina e DETC contra *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

2.2.2 Específicos

- Avaliar o potencial leishmanicida da associação de Hidroxilamina e DETC contra a sobrevivência da cultura axênica de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade da associação de Hidroxilamina e DETC sobre a sobrevivência de células de mamíferos;
- Avaliar o potencial leishmanicida da associação de Hidroxilamina e DETC contra macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

3 METODOLOGIA

3.1 CEUA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 001/2018 e os animais foram mantidos em condições livres de patógenos e manipulados de acordo com as normas de ética do Instituto Oswaldo Cruz para experimentação animal.

3.2 CULTIVO DE CÉLULAS L929

Células de linhagem fibroblástica tumorigênico de camundongos L929, foram cultivadas para obtenção de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio RPMI (RPMI 1640 - Gibco) completo, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – Gibco) em estufa a 37 °C, com 5% de CO² por 5 dias. Em seguida, estas células foram incubadas com 4 mL de Tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco) durante 5 minutos e foram centrifugadas a 1200 rpm (rotações por minuto), por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, as células foram ressuspendidas e plaqueadas na concentração de 1x10⁶ em garrafas de 125cm² com 20 mL de meio RPMI completo por 12 dias. Após este período, o sobrenadante contendo M-CSF foi coletado e centrifugado a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, foi realizada a filtração em sistema de filtração de 0,22 µm a vácuo, distribuídos em tubos Falcon de 15mL e mantido a -20 °C.

3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO BALB/c

Foram utilizados camundongos BALB/c (fêmeas entre 4 a 6 semanas de vida) oriundos do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ-BA). Células precursoras de macrófagos foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia dos camundongos BALB/c. Em seguida, as células foram cultivadas em placas de Petri contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone), 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – Gibco) e 30% de sobrenadante de fibroblastos murinos L929. A cultura foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por sete dias para que ocorresse a diferenciação das células precursoras em macrófagos. Depois deste período, os macrófagos aderidos foram recuperados da placa por lavagem da placa de cultura com solução de PBS contendo 1 mM de EDTA.

3.4 CULTIVO AXÊNICO DOS PARASITOS

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma), suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF - Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep - Gibco) em estufa BOD a 26°C, durante cinco dias, até o parasito atingir a fase estacionária. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/88/BA-125) foram cultivadas de forma semelhante, com exceção a suplementação do SBF, que para esta espécie foi utilizado 10% de SBF inativado. Para o cultivo de *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) foi utilizado meio mínimo essencial modificado hemoflagelado médio (Meio HOMEM), suplementado com 10% de soro SBF e 24.5 mM hemina bovina (Sigma, Steinheim, Germany).

3.5 AÇÃO LEISHMANICIDA DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA AXÊNICA DE *Leishmania spp.* POR COLORAÇÃO COM AZUL DE TRYPAN

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* na fase estacionária foram cultivados em placas de 48 poços, na concentração de 5×10^5 /poço, com meio Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF - Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep - Gibco) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM) (Figura 7). As placas foram incubadas em estufa BOD a 26°C e após 48 horas foi realizada a contagem dos parasitos viáveis considerando a coloração com azul de trypan, o tamanho, a motilidade e a morfologia em câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em seis vezes, em dias independentes.

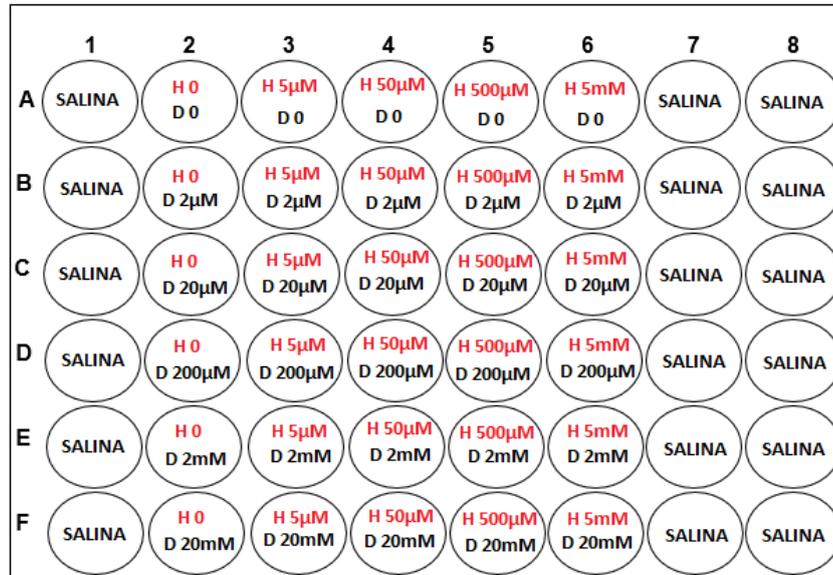


Figura 7 - Desenho do experimento. Representação do ensaio de ação leishmanicida da hidroxilamina e dietilditiocarbamato para *L. braziliensis*. H representa a hidroxilamina e D representa o dietilditiocarbamato.

Fonte: Elaborado pela autora

3.6 AÇÃO LEISHMANICIDA DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA AXÊNICA DE *Leishmania spp.* POR QUANTIFICAÇÃO DE ATP PRODUZIDO

Promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* na fase estacionária foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^6 /poço, com meio Schneider ou meio HOMEM completo, suplementado com soro bovino fetal (SBF - Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep - Gibco) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM) (Figura 7). As placas foram incubadas em estufa BOD a 26°C e após 48 horas, 100 μ L da suspensão celular foi transferida para microplaca de 96 poços, preta com fundo transparente. Após 30 minutos, 100 μ L do reagente CellTiter-Glo (Promega) foi adicionado nos poços com uma concentração final de reagente de 2%, com um volume final de 200 μ L. A luminescência foi mensurada utilizando o leitor de placas FilterMax F3 (Molecular Devices). Os ensaios com *Leishmania braziliensis* foram realizados cinco vezes, em dias independentes. O ensaio com *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* foi realizado uma vez. Cada experimento foi feito em triplicata.

3.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA DE MACRÓFAGOS MURINOS POR COLORAÇÃO COM AZUL DE TRYPAN

Os macrófagos murinos foram distribuídos em tubos de polipropileno na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/tubo, com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – Gibco) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM) (Figura 7). Os tubos foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e após 48 horas as células foram contadas considerando a coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

3.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOSE-DEPENDENTE E COMBINADA DA HIDROXILAMINA E DO DETC EM CULTURA DE MACRÓFAGOS MURINOS POR QUANTIFICAÇÃO DE ATP PRODUZIDO

Os macrófagos murinos foram distribuídos em tubos de polipropileno na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/tubo, com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – Gibco) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM) (Figura 7). Os tubos foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e após 48 horas, 100 μ L da suspensão celular foi transferida para microplaca de 96 poços, preta com fundo transparente. Após 30 minutos, 100 μ L do reagente CellTiter-Glo (Promega) foi adicionado nos poços com uma concentração final de reagente de 2%, com um volume final de 200 μ L. A luminescência foi mensurada utilizando o leitor de placas FilterMax F3 (Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 CITOLOGIA DE MACRÓFAGOS MURINOS

Os macrófagos murinos tratados com DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM) foram submetidos à citocentrifugação (Cytospin 4, ThermoFisher) em 500 rpm por 5 minutos para preparação das lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas no microscópio ótico.

3.10 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS

Após a diferenciação, os macrófagos murinos foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços na concentração 2×10^5 por poço. Após 24 horas do plaqueamento, foi realizada a infecção por *L. amazonensis* (na proporção 10:1) por 6 horas, *L. braziliensis* (na proporção 10:1) e *L. infantum* (na proporção de 20:1) por 24 horas. Passados os tempos de infecção, todos os poços foram lavados com salina, adicionado RPMI completo e tratados com diluições combinadas de hidroxilamina (0 μ M e 500 μ M) e de DETC (0 μ M e 20 μ M) (Figura 8) por 48 horas. Após esses tempos, as placas foram fixadas com paraformaldeído 4%, e montadas utilizando o kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen, ref: P36931) para marcação nuclear. Por fim, foram contadas 200 células por grupo em microscópio de fluorescência para determinação do percentual de infecção e o número de parasitos por célula. Os ensaios com *Leishmania braziliensis* foram realizados seis vezes em dias independentes, os de *L. amazonensis* cinco vezes em dias independentes, *L. infantum* sete vezes em dias independentes, e em cada experimento os grupos eram feitos em triplicata.

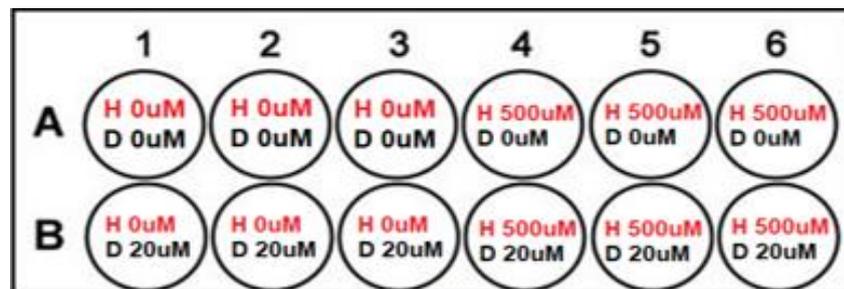


Figura 8 - Desenho do experimento de infecção. Representação do ensaio de ação leishmanicida da hidroxilamina e dietilditiocarbamato em macrófagos infectados com *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. H representa a hidroxilamina e D representa o dietilditiocarbamato.

Fonte: Elaborado pela autora

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados em gráficos e mapas de calor utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. A fração de inibição e o índice de combinação (IC) foram calculados utilizando o software CompuSyn. O escore de sinergia de Loewe foi realizado utilizando o software online SynergyFinder (<https://synergyfinder.fimm.fi/>). De acordo com a análise de normalidade pelo Shapiro–Wilk, foi realizado o One-way ANOVA para dado paramétricos, e o pós-teste foi o Tukey. Para os dados não paramétricos foi realizado o Kruskal-Wallis, e o pós-teste foi o Dunn. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. * $p = 0,0332$; ** $p = 0,0021$; *** $p = 0,0002$; **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE *Leishmania braziliensis*

Com o intuito de determinar a ação leishmanicida do DETC e hidroxilamina contra formas promastigotas de *L. braziliensis* foram conduzidos ensaios *in vitro*, utilizando concentrações individuais e combinadas da hidroxilamina (0 μM , 5 μM , 50 μM , 500 μM , 5 mM) e do DETC (0 μM , 2 μM , 20 μM , 200 μM , 2 mM, 20 mM). A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade de *L. braziliensis* considerando a coloração com azul de trypan, observou-se que houve uma redução de 81,31% no crescimento e viabilidade dos parasitos quando tratados a partir de 2 μM de DETC, e na concentração mais alta de hidroxilamina (5 mM) observou-se uma redução de 98,39% (Figura 9 A). A avaliação da ação dos fármacos considerando a quantificação de ATP, após 48 horas de tratamento, demonstrou uma redução de 33,88% do crescimento e viabilidade das *Leishmanias braziliensis* a partir da concentração de 20 μM de DETC, e uma redução de 99,13% na concentração mais alta de hidroxilamina (Figura 9 B). O índice de inibição de 50% foi de 33,03 μM para Hidroxilamina, 0,247 μM para DETC e 1,676 μM para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5) (Figura 9 C).

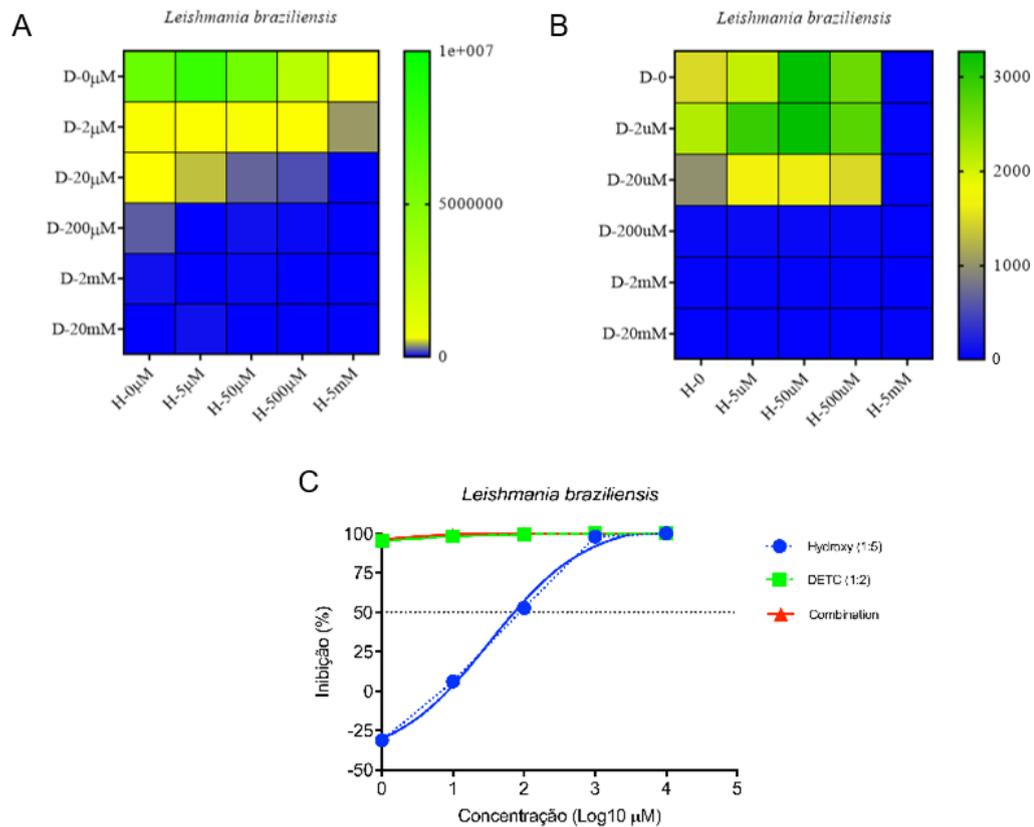


Figura 9 - Ação microbicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na *Leishmania braziliensis*. A) Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina (H) e do dietilditiocarbamato (D) no crescimento da *Leishmania braziliensis* por coloração com azul de trypan após 48 horas. Os resultados estão representados pela média do valor absoluto de promastigotas viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 1×10^7 de parasitos viáveis (verde). B) Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato no crescimento da *Leishmania braziliensis* por quantificação de ATP após 48 horas. Foram realizados cinco experimentos e cada experimento foi feito em triplicata. A representação gráfica é a média de cinco experimentos, numa escala variando de zero (azul) até 3000 de densidade ótica de parasitos viáveis (verde). C) Curva de % de inibição do DETC e da Hidroxilamina combinada (Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)).

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE *Leishmania amazonensis*

A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade de *L. amazonensis* considerando apenas a quantificação de ATP, observou-se uma redução de 76,18% do crescimento e viabilidade dos parasitos a partir da concentração de 200 μM de DETC, e uma redução de 98,83% na concentração mais alta de hidroxilamina, após 48 horas de tratamento (Figura 10).

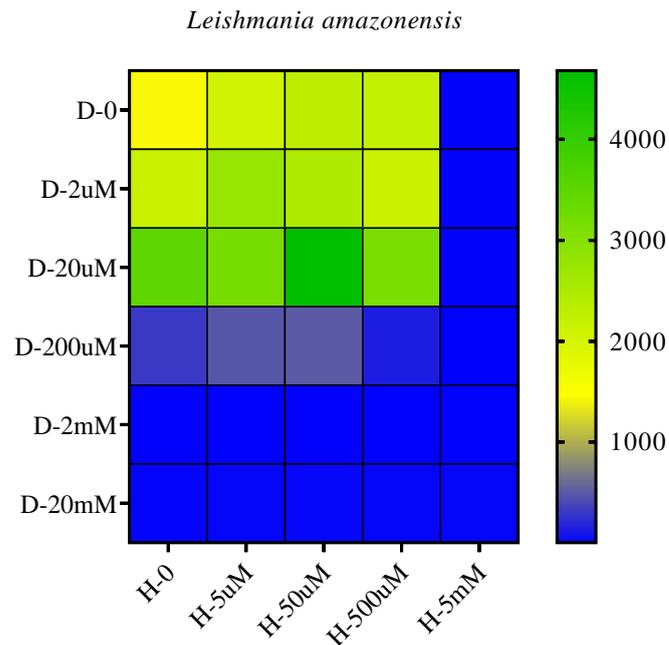


Figura 10 - Ação microbicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na *Leishmania amazonensis*. Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina (H) e do dietilditiocarbamato (D) no crescimento da *Leishmania amazonensis* por quantificação de ATP após 48 horas. Os resultados estão representados pela mediana do valor absoluto de promastigotas viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 4000 de densidade ótica de parasitos viáveis (verde).

Fonte: Elaborado pela autora

4.3 AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS NA FORMA PROMASTIGOTA DE *Leishmania infantum*

A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade de *L. infantum* considerando apenas a quantificação de ATP, observou-se uma redução de 57,27% do crescimento e viabilidade dos parasitos a partir da concentração de 2 μ M de DETC e uma redução de 54,14% a partir da concentração de 5 μ M de hidroxilamina, após 48 horas de tratamento (Figura 11).

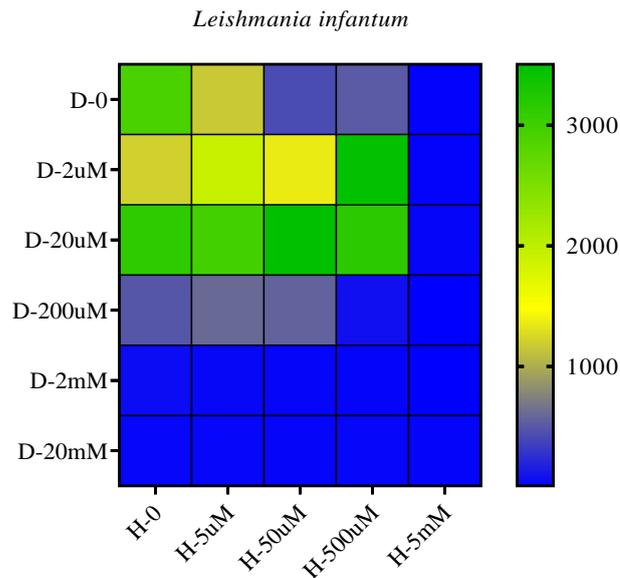


Figura 11 - Ação microbicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na *Leishmania infantum*. Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina (H) e do dietilditiocarbamato (D) no crescimento da *Leishmania infantum* por quantificação de ATP após 48 horas. Os resultados estão representados pela mediana do valor absoluto de promastigotas viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 3000 de densidade ótica de parasitos viáveis (verde).

Fonte: Elaborado pela autora

4.4 AÇÃO CITOTÓXICA DOS FÁRMACOS NOS MACRÓFAGOS MURINOS ATRAVÉS DA CONTAGEM POR AZUL DE TRYPAN

Para determinar a citotoxicidade dos fármacos em macrófagos murinos, foram conduzidos ensaios *in vitro*, utilizando concentrações individuais e combinadas da hidroxilamina (5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5 mM) e do DETC (2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2 mM, 20 mM). A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade dos macrófagos murinos por azul de trypan, observou-se que havia células viáveis até a concentração de 20 mM de DETC, com uma redução marcante da viabilidade das células na concentração de 200 μ M de DETC (Figura 12). A identificação dessa variação na sobrevivência das células sugeriu uma possibilidade de baixa especificidade da contagem por azul de trypan, determinando a necessidade da avaliação morfológica das células por análises de citologia. No que se refere ao aspecto morfológico das células (Figura 13), foi observado uma perda significativa da integridade morfológica a partir da concentração de 200 μ M de DETC (Figura 13 D) com a presença de células com núcleos picnóticos e muitos debris celulares.

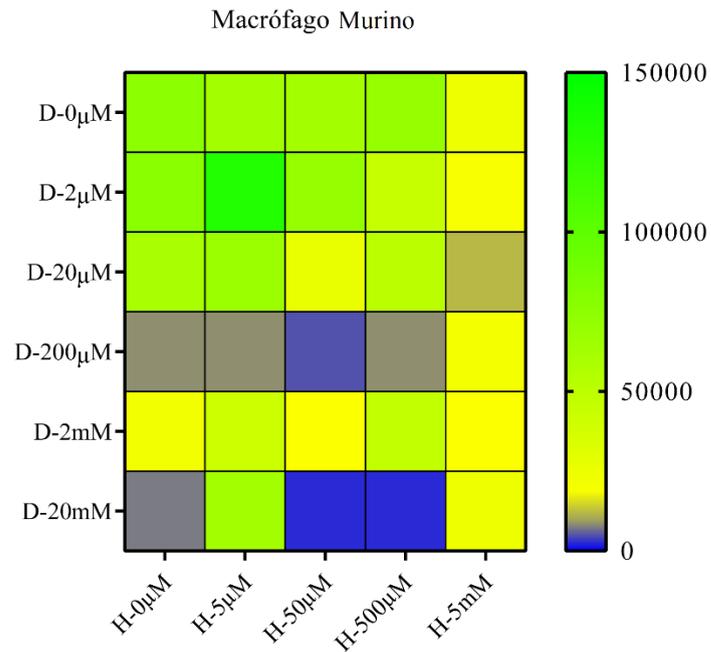


Figura 12 - Ação citotóxica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos. Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato no crescimento e viabilidade de macrófagos murinos. Os resultados estão representados pela média do valor absoluto de macrófagos viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 150.000 de células viáveis (verde). No eixo x é apresentado as diluições de Hidroxilamina (H) e no eixo y as diluições de DETC (D). Foram realizados seis experimentos independentes.

Fonte: Elaborado pela autora

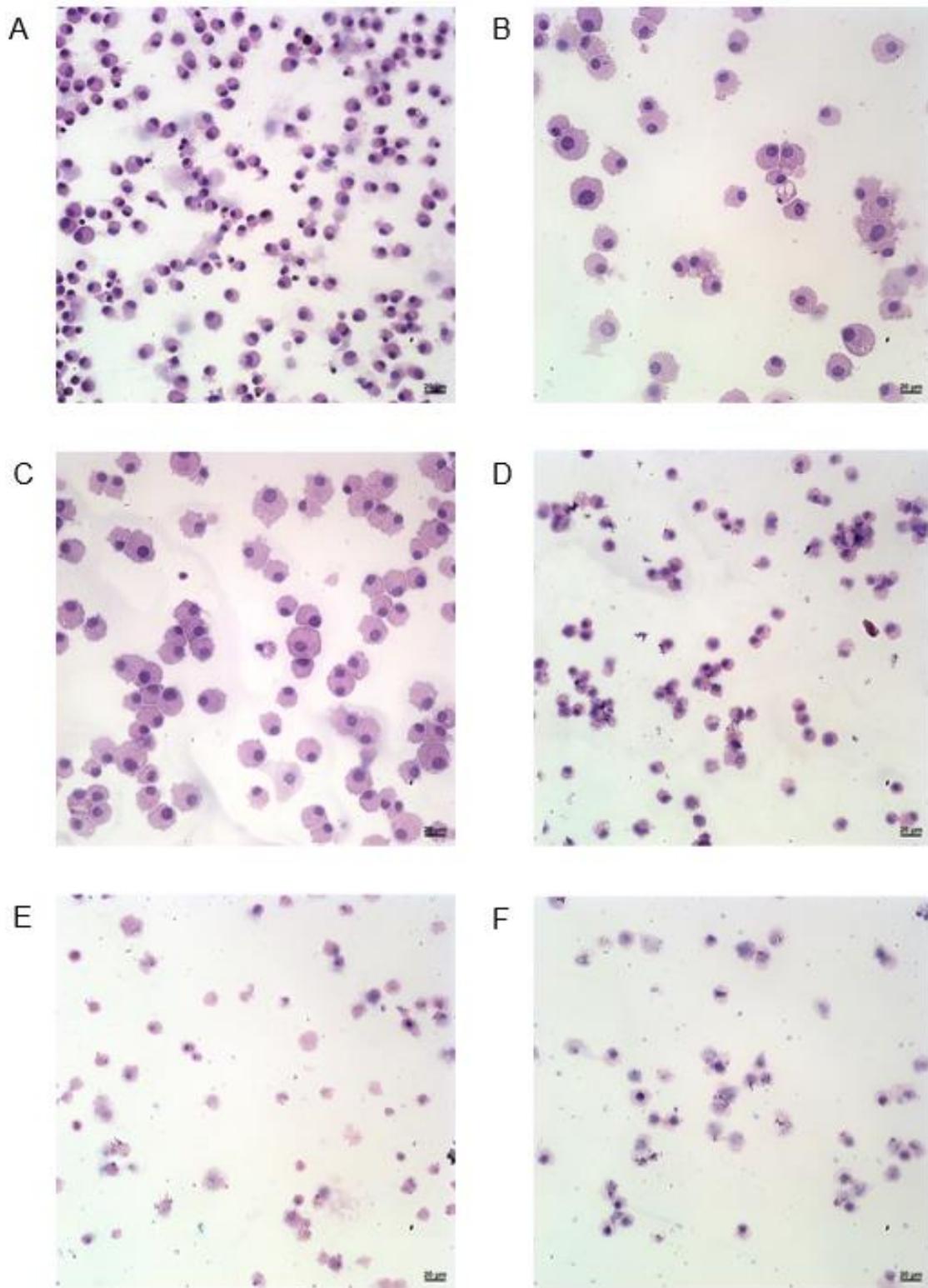


Figura 13 - Citologia da ação citotóxica do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos. A-F) Microscopia ótica com aumento de 400x, das lâminas nas concentrações de A) 0 μ M hidroxilamina e 0 μ M DETC, B) 0 μ M hidroxilamina e 2 μ M DETC, C) 0 μ M hidroxilamina e 20 μ M DETC, D) 0 μ M hidroxilamina e 200 μ M DETC, E) 0 μ M hidroxilamina e 2 mM DETC e F) 0 μ M hidroxilamina e 20 mM DETC.

Fonte: Elaborado pela autora

4.5 AÇÃO CITOTÓXICA DOS FÁRMACOS NOS MACRÓFAGOS MURINOS ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE ATP

Ensaio *in vitro* utilizando concentrações da hidroxilamina (5 μM , 50 μM , 500 μM , 5 mM) combinadas com o DETC (2 μM , 20 μM , 200 μM , 2 mM, 20 mM) foram conduzidos para determinar a citotoxicidade dos fármacos em macrófagos murinos. A avaliação da ação dos fármacos na viabilidade dos macrófagos murinos, demonstrou que as células se mantiveram viáveis até a concentração de 20 μM de DETC e a concentração mais alta de hidroxilamina resultou na morte dos macrófagos (Figura 14 A). O índice de inibição de 50% foi de 237,0 μM para Hidroxilamina, 11,47 μM para DETC e 67,16 μM para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5) (Figura 14 B).

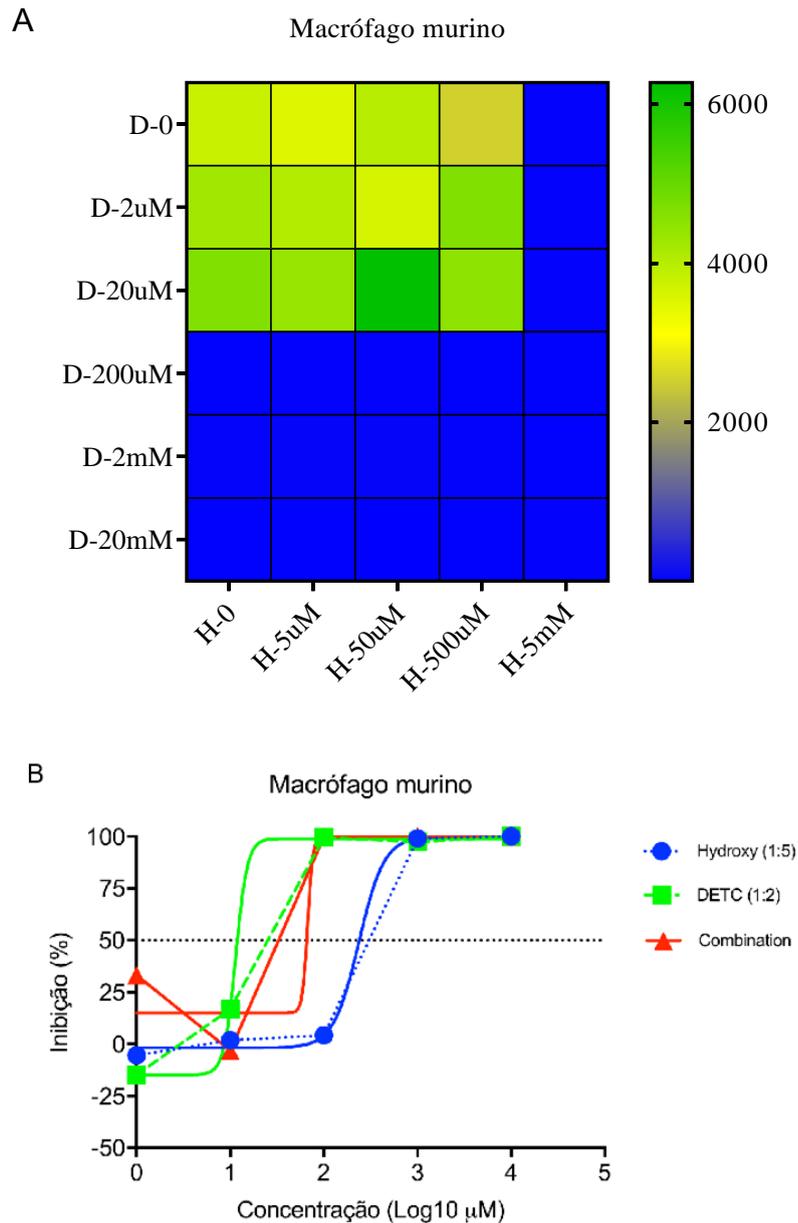


Figura 14 - Avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos através do ensaio de luminescência. A) Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina (H) e do dietilditiocarbamato (D) no crescimento e viabilidade de macrófagos murinos. Foram realizados três experimentos e cada experimento foi feito em triplicata. A representação gráfica é a média de três experimentos, numa escala variando de zero (azul) até 6000 de densidade óptica de células viáveis (verde). B) Curva de % de inibição do DETC e da Hidroxilamina combinada (Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)).

Fonte: Elaborado pela autora

4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE COMBINADA DOS FÁRMACOS CONTRA *L. Braziliensis*

Para avaliar a significância dos medicamentos combinados, foi analisado o índice de combinação (IC) (Figura 15 A) e o escore de sinergia de Loewe (Figura 15 B e 15 C). A questão

que está sendo abordada é se os dois medicamentos, atuando juntos produzem um efeito combinado que é consistente com suas potências individuais, denominado aditivo, um efeito maior que o aditivo, denominado sinérgico ou um efeito que é menos aditivo, denominado antagonista. Isso permite a seleção de concentrações apropriadas para a combinação dos dois agentes. Foi observado uma ação antagonista em macrófagos murinos usando a concentração combinada de 20uM de DETC e 500uM de Hidroxilamina (índice de inibição de 50% de 237,0 μ M para Hidroxilamina, 11,47 μ M para DETC e 67,16 μ M para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5). Por outro lado, esta concentração combinada foi altamente sinérgica para *L. braziliensis* (índice de inibição de 50% de 33,03 μ M para Hidroxilamina, 0,247 μ M para DETC e 1,676 μ M para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5) (Figura 15).

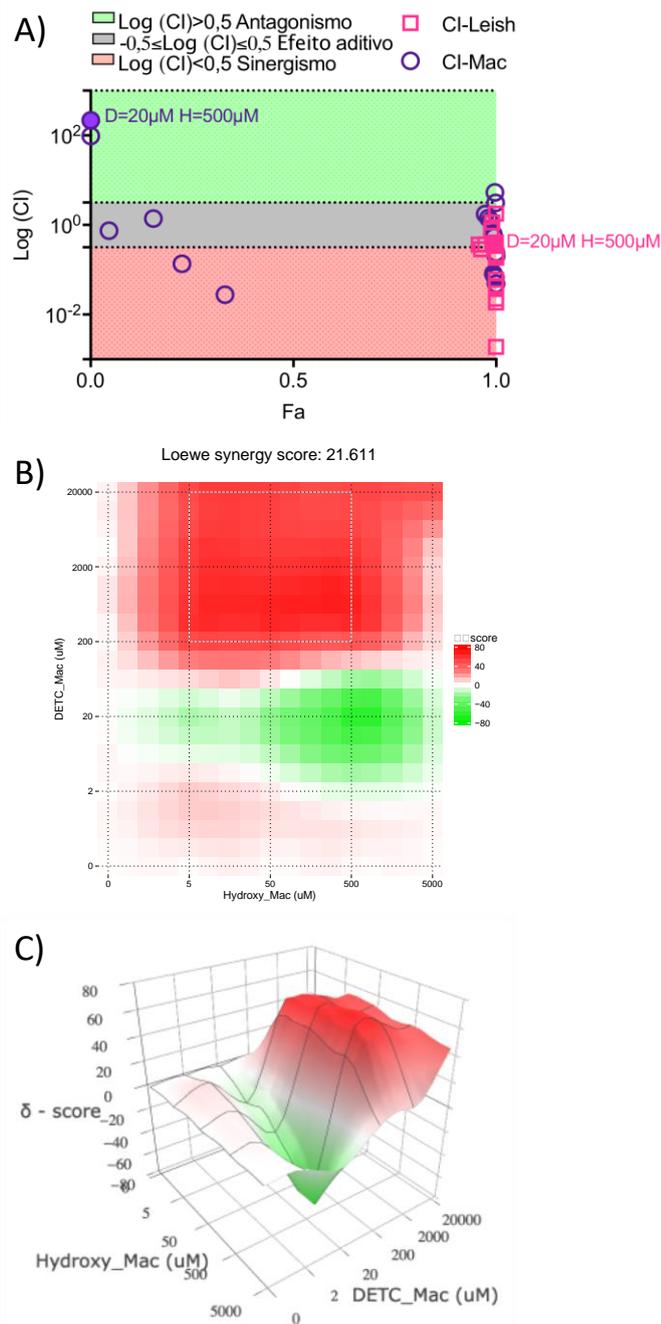
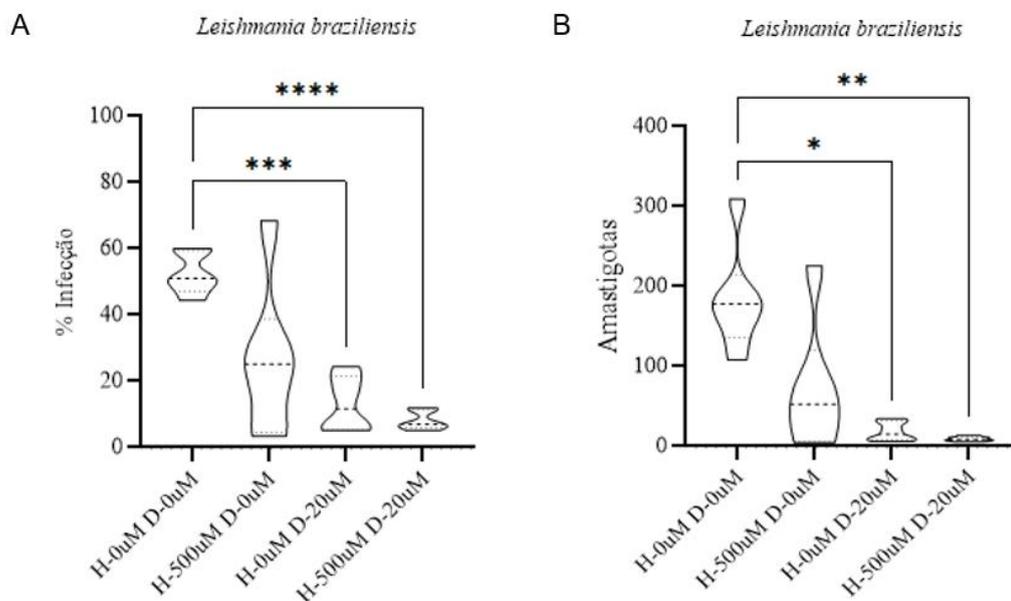


Figura 15 - Avaliação da ação sinérgica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos e *Leishmania braziliensis*. A) Log do índice de combinação (Log CI) das drogas DETC (D) e Hidroxilamina (H) versus Fração de inibição (Fa). A equação do índice de combinação derivada para dois medicamentos é: $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$. B e C) A pontuação de sinergia de Loewe para uma combinação de drogas na inibição da viabilidade dos macrófagos murinos é calculada em todas as células da combinação de doses. Os mapas de sinergia 2D e 3D destacam regiões de dose sinérgica e antagonista nas cores vermelho e verde, respectivamente, para o ensaio de viabilidade nos macrófagos murinos.

Fonte: Elaborado pela autora

4.7 AÇÃO LEISHMANICIDA DOS FÁRMACOS CONTRA MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*

Após identificar que a combinação de 20 μ M de DETC com 500 μ M de Hidroxilamina apresentou uma ação antagonista em macrófagos murinos e sinérgica para *L. braziliensis*, avaliou-se o potencial leishmanicida dessas concentrações individuais e combinadas em macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os tratamentos com hidroxilamina e DETC individualmente foram capazes de reduzir em aproximadamente 30% e 50%, respectivamente, o número de macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis* quando comparados com o grupo controle não tratado. Para a *Leishmania infantum*, a redução de macrófagos infectados foi de 10% e 40% quando tratado individualmente com a hidroxilamina e DETC, respectivamente (Figura 16 A, C, E e figura 17). Foi possível observar também uma redução no número de amastigotas por 100 células nas três espécies (Figura 16 B, D, F e figura 17). Essa redução foi mais acentuada e estatisticamente significativa nas três espécies de *Leishmania* quando as células infectadas foram tratadas com a combinação de 20 μ M de DETC com 500 μ M de hidroxilamina, quando comparadas com o grupo não tratado. Para as *Leishmanias braziliensis* e *L. amazonensis* observou-se também um maior efeito na redução da percentagem de infecção e número de amastigotas por 100 células, quando tratadas individualmente com 20 μ M de DETC. (One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; pós teste Tukey ou Dunn * $p = 0,0332$; ** $p = 0,0021$; *** $p = 0,0002$; **** $p < 0,0001$).



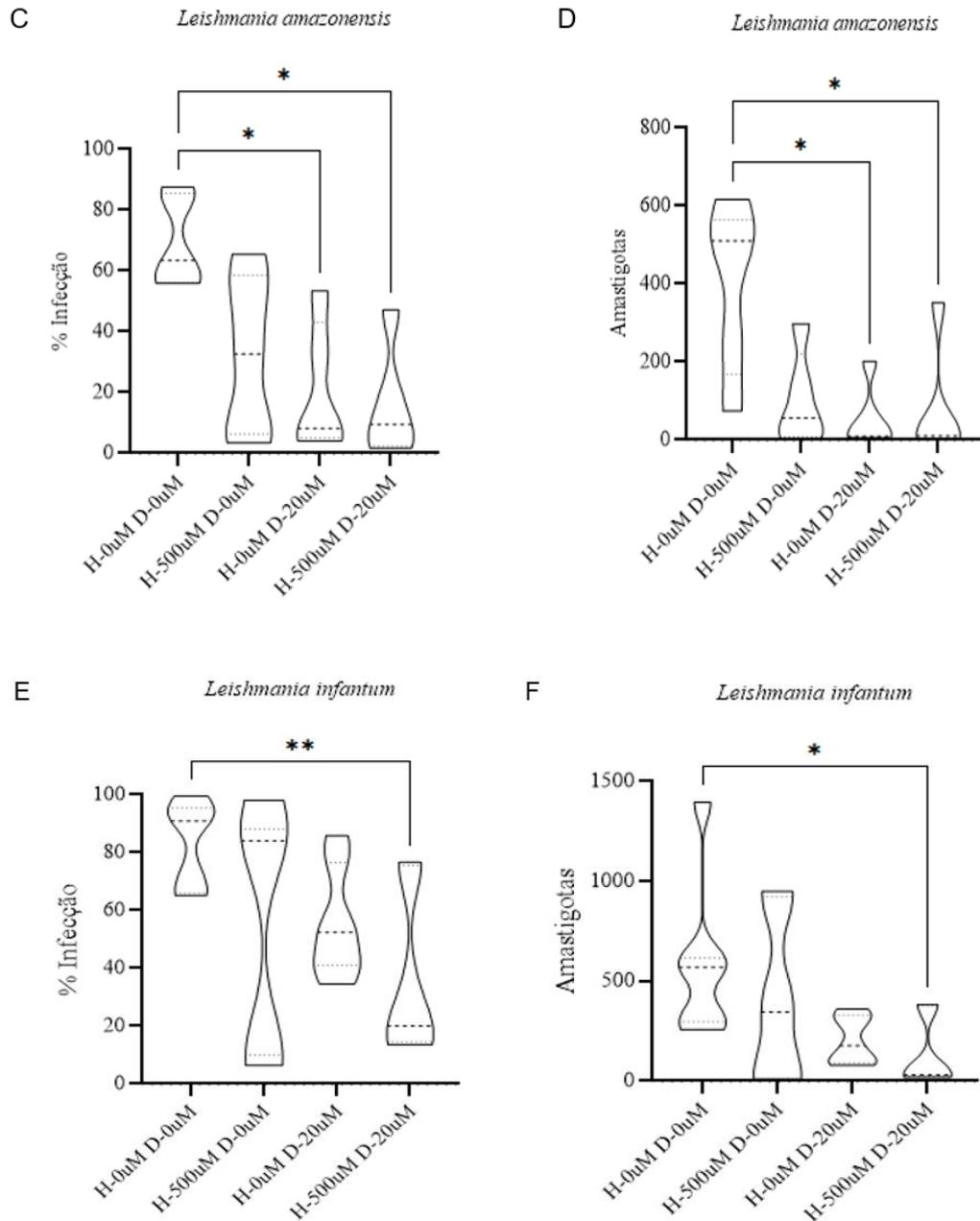


Figura 16 - Efeito da ação da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato em macrófagos infectados com *Leishmania*. A) Violin plot representando a porcentagem de macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis* após tratamento com hidroxilamina e DETC. B) Violin plot representando o número de amastigotas de *Leishmania braziliensis* por 100 células após tratamento com hidroxilamina e DETC. C) Violin plot representando a porcentagem de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis* após tratamento com hidroxilamina e DETC. D) Violin plot representando o número de amastigotas de *Leishmania amazonensis* por 100 células após tratamento com hidroxilamina e DETC. E) Violin plot representando a porcentagem de macrófagos murinos infectados com *Leishmania infantum* após tratamento com hidroxilamina e DETC. F) Violin plot representando o número de amastigotas de *Leishmania infantum* por 100 células após tratamento com hidroxilamina e DETC. A, C e E no eixo x é representado a porcentagem de infecção e no eixo y as concentrações de Hidroxilamina (H) e de DETC (D). B, D e F no eixo x é representado o número de amastigotas por 100 células e no eixo y as concentrações de Hidroxilamina (H) e de DETC (D). (One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; pós teste Tukey ou Dunn * $p = 0,0332$; ** $p = 0,0021$; *** $p = 0,0002$; **** $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela autora

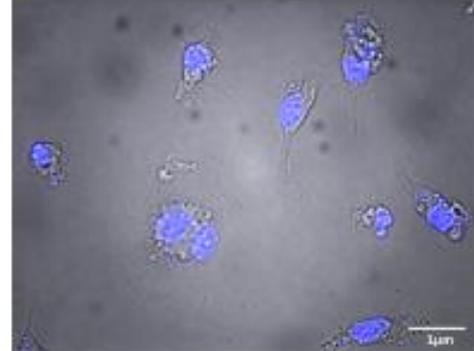
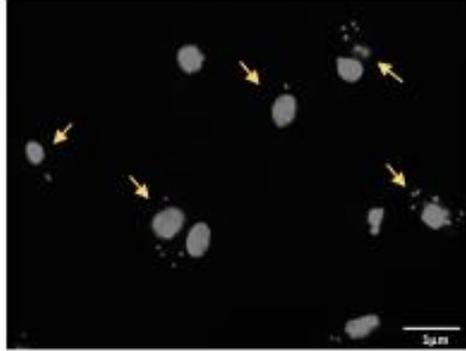
A

Leishmania braziliensis

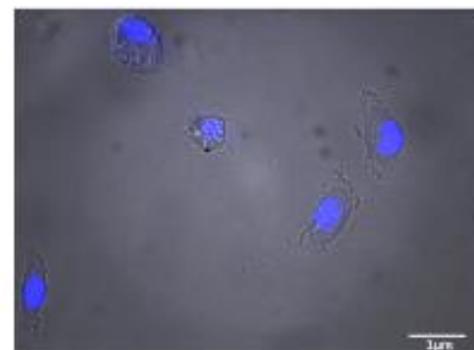
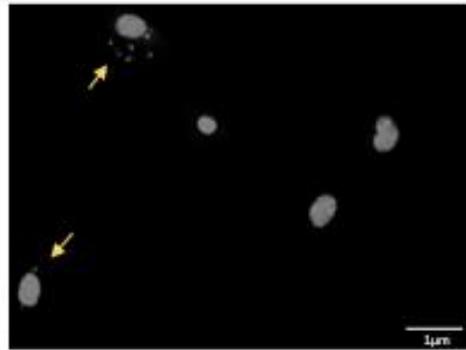
DAPI

MERGE

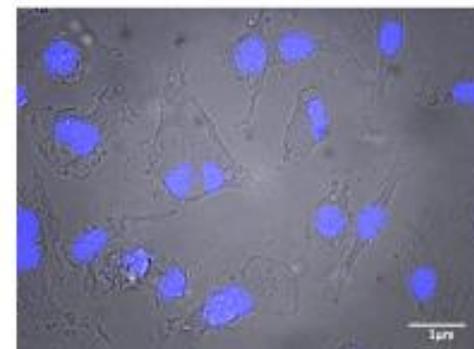
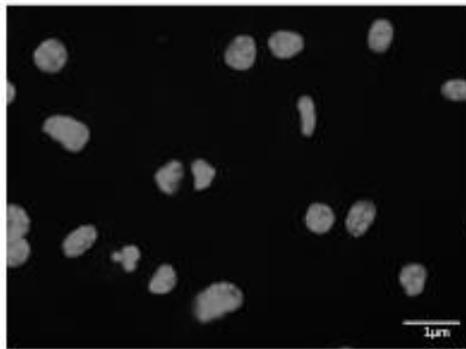
H-0nM D-0nM



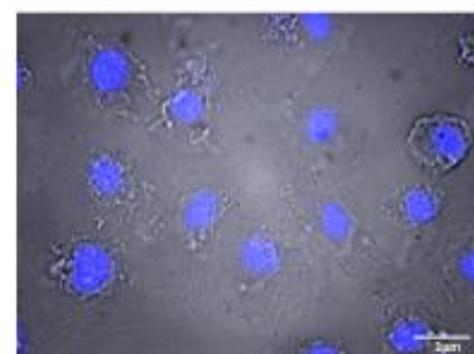
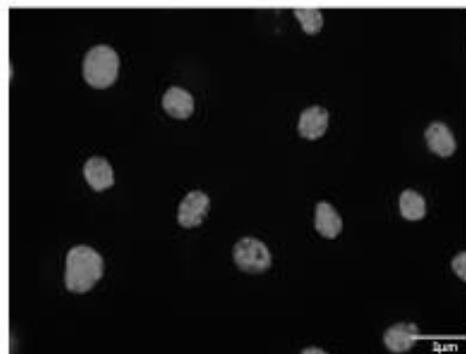
H-500nM D-0nM



H-0nM D-20nM



H-500nM D-20nM



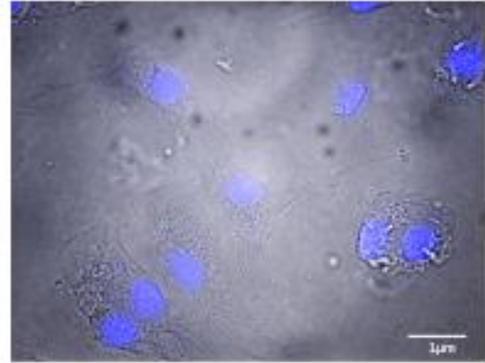
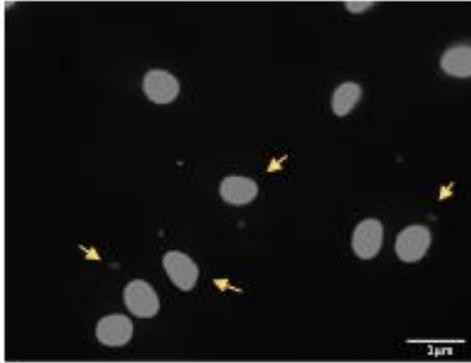
B

Leishmania amazonensis

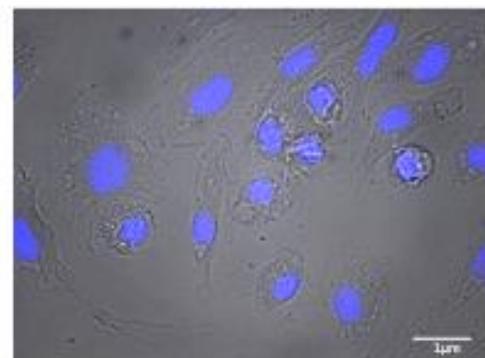
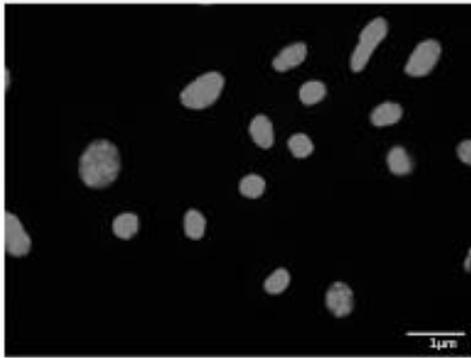
DAPI

MERGE

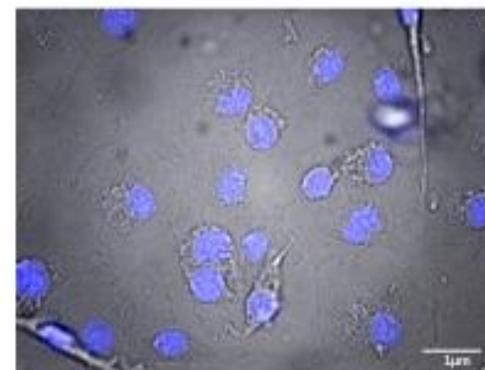
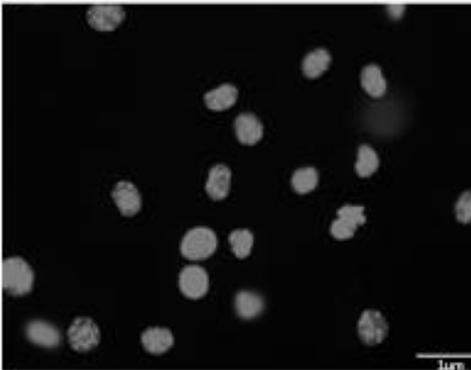
H - 0uM D - 0uM



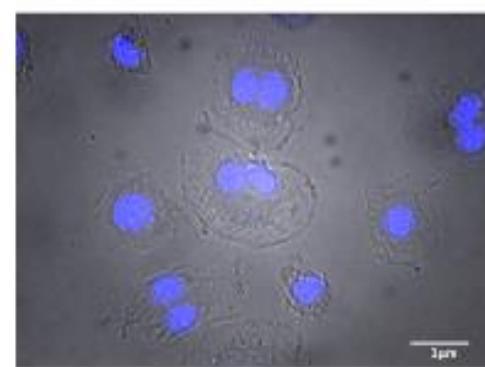
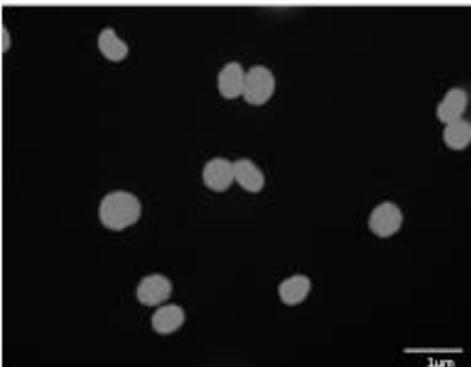
H - 500uM D - 0uM



H - 0uM D - 20uM



H - 500uM D - 20uM



C

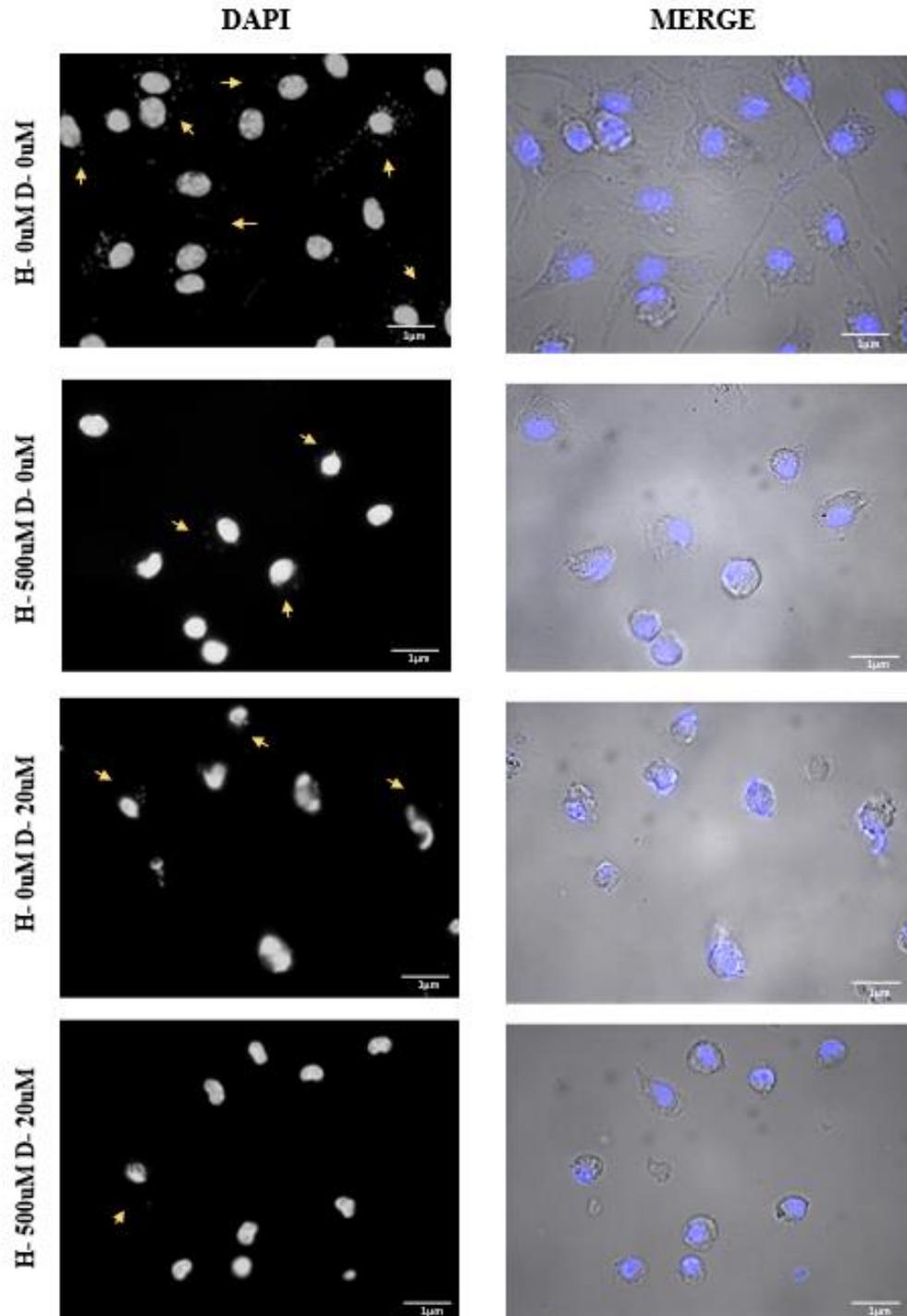
Leishmania infantum

Figura 17 - Microscopia de fluorescência da ação leishmanicida do dietilditiocarbamato e hidroxilamina contra macrófagos murinos infectados com *Leishmania*. Microscopia de fluorescência com aumento de 1000x, das lâminas nas concentrações de 0 μ M hidroxilamina e 0 μ M DETC, 500 μ M hidroxilamina e 0 μ M DETC, 0 μ M hidroxilamina e 20 μ M DETC, 500 μ M hidroxilamina e 200 μ M DETC. Representação da marcação nuclear com DAPI e a sobreposição Merge. A) *Leishmania braziliensis*. B) *Leishmania amazonensis*. C) *Leishmania infantum*.

Fonte: Elaborado pela autora

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o tratamento das leishmanioses tem sido um desafio para médicos e pesquisadores, pois os fármacos mais utilizados e com os melhores resultados possuem elevada toxicidade, efeitos colaterais indesejáveis, além da eficácia variável nas diferentes espécies de *Leishmania*, o que torna necessário a pesquisa de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses (DEPS et al., 2000; SALDANHA et al., 2000). O uso de combinações de medicamentos antileishmania ou imunoterapias que apresentem efeitos sinérgicos é uma alternativa promissora, uma vez que permite o uso de dosagens menores, reduzindo a toxicidade, os efeitos colaterais e a duração da terapia, que pode contribuir com a aderência ao tratamento (CHOU, 2006; DE MENEZES et al., 2015; JIA et al., 2009). Nesta perspectiva, o presente estudo demonstrou que a associação de DETC e hidroxilamina induz a morte de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* em baixas concentrações e apresenta baixa toxicidade em concentrações mais elevadas para ambos os fármacos em macrófagos murinos *in vitro*.

A associação da hidroxilamina com o DETC demonstrou atividade potente *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania*. A *Leishmania braziliensis* reduziu em 81,31% seu crescimento e viabilidade a partir da contração de 2 μM de DETC e na concentração mais alta de hidroxilamina (5 mM) a redução foi de 98,39%. A *Leishmania infantum* também apresentou uma sensibilidade ao tratamento a partir de 2 μM de DETC e 5 μM de hidroxilamina, com redução de 57,27% e 54,14% respectivamente. Enquanto a *Leishmania amazonensis* sofreu com o tratamento a partir da concentração 200 μM de DETC e na concentração mais alta de hidroxilamina, com redução de 76,18% e 98,83%, respectivamente. O índice de inibição de 50% contra a *Leishmania braziliensis* foi de 33,03 μM para hidroxilamina, 0,247 μM para DETC e 1,676 μM para combinação das drogas. Um estudo realizado para avaliar a ação do DETC contra *L. amazonensis* encontrou uma concentração inibitória de 50% (IC50) de 0,33 μM de DETC contra a forma promastigota do parasito, o tratamento com esse composto também foi eficaz em reduzir a porcentagem de macrófagos infectados e do número de amastigotas por macrófago, com o aumento de ROS (ASSOLINI et al., 2020). Outro estudo encontrou o valor de IC50 de 160 μM contra forma promastigota de *Leishmania amazonensis* (KHOURI et al., 2010).

O DETC é um quelante de metais capaz de inibir o funcionamento da superóxido dismutase. As mitocôndrias da *Leishmania*, produzem SOD de ferro que desempenham um importante papel na virulência e no equilíbrio redox, capaz de proteger o parasito contra o

estresse oxidativo e favorecer a sobrevivência em vacúolos parasitóforos em macrófagos. Já foi demonstrado que o DETC também é capaz de formar complexos com o ferro, que pode levar à inibição da atividade da SOD presente nas *Leishmanias* (ASSOLINI et al., 2020; KHOURI et al., 2009, 2010). KHOURI et al., 2010 demonstrou que na forma promastigota da *Leishmania*, o DETC age principalmente desestruturando a mitocôndria do parasito, e como essa organela é um grande compartimento de produção de radicais livres, leva a destruição da forma promastigota. Por outro lado, nas células dos mamíferos, existe a SOD de cobre e zinco, que está presente dentro dos compartimentos do fagolisossomo e é idealmente a SOD alvo do DETC. KHOURI et al., 2010 demonstrou que no macrófago infectado, a *Leishmania* tem uma destruição da membrana e de microtúbulos externos, mostrando que o uso de DETC nas células de mamífero leva a um estresse oxidativo e consequentemente destruição desse patógeno. Estudos anteriores demonstraram o efeito do DETC como adjuvante do sistema imunológico em pacientes infectados pelo HIV-1, e contra *Mycobacterium tuberculosis*. Nos pacientes infectados pelo HIV-1, o DETC foi capaz de atrasar a progressão para AIDS, além disso, foi capaz de aumentar a atividade microbicida *in vitro* de monócitos estimulados com DETC, contra *Mycobacterium tuberculosis* (HÜBNER et al., 1991; REISINGER et al., 1990).

A hidroxilamina é um composto químico utilizado, dentre outras coisas, para quantificar superóxido através da formação de nitrato e nitrito. Já foi descrito que no metabolismo celular normal, a hidroxilamina é produto intermediário em reações de redução enzimática de nitratos ou nitritos e pela oxidação de amônia (GROSS; SMITH, 1985). A hidroxilamina apresenta na sua fórmula um átomo de nitrogênio (H_3NO), e acredita-se que quando este reage com oxigênio há a formação de peróxido de nitrito, molécula capaz de destruir parasitos intracelulares (CHEN et al., 2015). Isso torna interessante o uso da hidroxilamina para o tratamento de células de mamíferos infectadas com *Leishmania*. Por isso, este estudo teve o intuito de avaliar a possível atividade leishmanicida deste composto. Na literatura não há muitos estudos avaliando a ação da hidroxilamina no tratamento de doenças. Recentemente foi demonstrado que a hidroxilamina apresentou um efeito contra *Toxoplasma gondii*, com IC50 de 4.286 $\mu\text{g/mL}$, sendo capaz de inibir o funcionamento de uma enzima importante para o parasito, a aspartato aminotransferase (LI et al., 2020). Em relação a ação da hidroxilamina contra *Leishmania*, não foi reportado nenhum estudo na literatura, portanto, nossos resultados são pioneiros.

Testes de toxicidade foram realizados utilizando as mesmas concentrações das drogas em macrófagos murinos com duas metodologias diferentes. Na primeira, a viabilidade celular foi avaliada através de contagem das células após coloração com azul de trypan, entretanto, observou-se um padrão de viabilidade nas células que foram tratadas com 2 mM e 20 mM de

DETC e uma maior quantidade de células mortas quando tratadas com uma concentração mais baixa (200 μM de DETC). Por este motivo, lâminas com a suspensão celular foram preparadas por citocentrifugação, e quando avaliadas em microscopia ótica, foi identificado que na concentração de 200 μM de DETC as células apresentavam alteração na morfologia, sugerindo um aspecto de morte celular. Um estudo conduzido por KRAUSE; CARLEY; WEBB, 1984, demonstrou que apenas 60% de células que foram previamente expostas a tratamentos letais, apresentaram-se coradas com azul de trypan. Outros estudos demonstraram que o azul de trypan não é um corante confiável para avaliação da viabilidade de células de mamífero em suspensão (FRASER et al., 1976; TENNANT, 1964). Por este motivo, os experimentos foram repetidos utilizando outra metodologia, na qual a viabilidade celular é medida através de um ensaio baseado na quantificação de ATP, indicador de células metabolicamente ativas. Neste ensaio, foi possível perceber que a partir da concentração de 200 μM de DETC, ocorreu morte celular. Estes resultados corroboram com a microscopia ótica, indicando que o padrão de viabilidade encontrado nas contagens diretas com azul de trypan não condizem com a viabilidade celular observada no ensaio de luminescência. Com isso, podemos perceber que a contagem de células com azul de trypan não é a melhor metodologia para avaliação da viabilidade celular de macrófagos.

O índice de inibição de 50% encontrado para macrófagos murinos foi de 237,0 μM para hidroxilamina, 11,47 μM para DETC e 67,16 μM para combinação das drogas. LI et al., 2020 encontrou 296,6 $\mu\text{g/mL}$ de IC50 da hidroxilamina para células epiteliais aderentes de rim de macaco (Vero). CELES et al., 2016 demonstrou que o valor de IC50 do DETC para macrófagos humanos foi de 284,9 $\mu\text{g/cm}^2$. Quando comparado com os valores encontrados para a *Leishmania braziliensis*, pode-se perceber que o índice de inibição de 50% encontrado para o parasito é menor. Sendo assim, a *L. braziliensis* apresenta uma maior sensibilidade à ação da hidroxilamina e do DETC, em comparação com os macrófagos murinos, os quais apresentaram efeitos citotóxicos apenas em concentrações mais elevadas dos fármacos.

Macrófagos murinos foram infectados com *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* e expostas ao tratamento com as concentrações de 20 μM de DETC e 500 μM de hidroxilamina individualmente e combinados e apresentaram uma taxa de infecção reduzida em todas as concentrações, quando comparadas com o grupo controle não tratado, com efeito ainda mais acentuado e estatisticamente significativo quando tratados com a associação das duas drogas. KHOURI et al., 2010 demonstrou que o DETC diminui a carga parasitária em macrófagos murinos e humanos infectados por *L. amazonensis in vitro*, com a IC50 de 1 mM de DETC, como consequência do aumento da produção de superóxido, além de diminuir

significativamente as lesões em camundongos infectados com *L. braziliensis*. Outro estudo avaliou a ação da formulação tópica de celulose bacteriana contendo DETC contra *L. braziliensis*, e observou um percentual de infecção de macrófagos reduzido após o tratamento, associado a uma baixa atividade da SOD1 e aumento das concentrações de superóxido (CELES et al., 2016).

A avaliação do índice de combinação e do score de sinergia de Loewe demonstrou que a associação de 20 μ M de DETC com 500 μ M de hidroxilamina apresentou uma ação antagonista nos macrófagos murinos e altamente sinérgica para *L. braziliensis*. De forma geral, o efeito sinérgico entre as duas drogas abre caminho para um possível novo tratamento para a leishmaniose tegumentar e visceral, já que a combinação das drogas apresentou um efeito leishmanicida em *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, com baixa citotoxicidade em macrófagos murinos. Novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito da combinação da hidroxilamina com o DETC em modelos *in vivo*, e a partir dos resultados discutidos aqui, a combinação de 20 μ M de DETC com 500 μ M de hidroxilamina pode apresentar um potencial efeito em modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar e visceral experimental.

6 CONCLUSÃO

A associação de hidroxilamina com DETC tem efeitos antiproliferativos potentes em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* e apresenta baixa toxicidade em macrófagos murinos. Juntos, esses resultados indicam que a associação de hidroxilamina com DETC poderia ser um tratamento promissor para a leishmaniose tegumentar e visceral, e apoiar futuros estudos *in vivo* em modelos murinos infectados com *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- AKOPYANTS, N. S. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 71–86, 2004.
- AL-ZAMEL, F. et al. Enhancement of leishmanicidal activity of human macrophages against *Leishmania major* and *Leishmania donovani* infection using recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 285, n. 1, p. 92–105, 1996.
- ALLERBERGER, F. et al. Antifungal Activity of Diethyldithiocarbamate Antimyzetische Aktivitat von Diethylcarbamate. **Mycoses**, v. 32, n. 10, p. 527–530, 1989.
- ALMEIDA, R. et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1735–1737, 1999.
- ALMEIDA, R.; BRITO, J.; MACHADO, P. Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 83–91, 2005.
- ALMEIDA, R. P. et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 79–81, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ASSOLINI, J. P. et al. Diethyldithiocarbamate encapsulation reduces toxicity and promotes leishmanicidal effect through apoptosis-like mechanism in promastigote and ROS production by macrophage. **Journal of Drug Targeting**, v. 28, n. 10, p. 1110–1123, 2020.
- BADARÓ, R. et al. The Role of Interferon- γ in the Treatment of Visceral and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. project 890442, p. S13–S17, 1993.
- BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery**, 2015.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- BEGOLO, D. et al. The trypanocidal benzoxaborole AN7973 inhibits trypanosome mRNA processing. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1–33, 2018.
- BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.
- BOND, A. M.; MARTIN, R. L. Electrochemistry and redox behaviour of transition metal dithiocarbamates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 54, p. 23–98, 1984.
- BREWER, C. Long-Term, High-Dose Disulfiram in the Treatment of Alcohol Abuse. **British**

Journal of Psychiatry, v. 163, p. 697–689, 1993.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S. T.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, p. 57–65, 2005.

CELES, F. S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. iii, p. 1–11, 2016.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHEN, L. et al. Production of Hydroxyl Radical via the Activation of Hydrogen Peroxide by Hydroxylamine. **Environmental Science and Technology**, 2015.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

COSTA, J. M. L. Modalidades Clínicas, Diagnóstico E Abordagem Terapêutica Da Leishmaniose Tegumentar No Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 143, n. 79, p. 70–83, 2009.

COUCOUVANIS, D. The Chemistry of the Dithioacid and 1, 1-Dithiolate Complexes, 1968–1977. In: **Progress in Inorganic Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 11p. 233–371.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319–342, 2002.

DE BARROS DIAS, M. C. H. et al. An Overview of the Compounds Tested In Vivo for Leishmania spp. of the Last 5 Years. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 21, p. 4226–4258, 2020.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2015.

DE OLIVEIRA, L. F. G. et al. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 2, p. 219–233, 2017.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 192–198, 2002.

DEPS, P. D. et al. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 535–543, 2000.

ESPADA, C. R. et al. Susceptibility to miltefosine in Brazilian clinical isolates of Leishmania (Viannia) braziliensis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 656–659, 2017.

FALCOFF, E. et al. Clinical healing of antimony-resistant leishmaniasis following the combined pentavalent antimonial compounds cutaneous or mucocutaneous administration of interferon- γ . **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**, v. 88, n. 1, p. 95–97, 1994.

FEUSER, P. E. et al. Co-encapsulation of sodium diethyldithiocarbamate (DETC) and zinc phthalocyanine (ZnPc) in liposomes promotes increases phototoxic activity against (MDA-MB

231) human breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, 2021.

FRASER, T. J. et al. COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF DETERMINING CELL VIABILITY AFTER EXPOSURE TO CYTOTOXIC COMPOUNDS. **Experimental Cell Research**, v. 97, n. 2, p. 275–280, 1976.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913–916, 2001.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 2001.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GRAHAM, L.; BURGESS, A. Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte - macrophage colony stimulating factor. **he New England Journal of Medicine**, v. 327, 1992.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.

GROSS, P.; SMITH, R. P. Biologic activity of hydroxylamine: A review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 87–99, 1985.

GUIMARÃES, L. et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, p. 66–74, 2008.

HENARD, C. A. et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HENOUX, G. et al. Differentiation and Regulation of Lymphocyte Populations: Evidence for Immunopotentiator-Induced T Cell Recruitment. **Immunopharmacology and Immunotoxicology. Journal of Immunopharmacology**, v. 1, n. 3, p. 415–422, 1979.

HERSH, E. M. et al. Ditiocarb Sodium (Diethyldithiocarbamate) Therapy in Patients With Symptomatic HIV Infection and AIDS. **Jama**, v. 265, n. 12, p. 1538–1544, 1991.

HO, J. L. et al. Granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors activate intramacrophage killing of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 1, p. 224–230, 1990.

HÜBNER, L. et al. Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by

- diethyldithiocarbamate (DTC). **International Journal of Immunopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 1067–1072, 1991.
- JIA, J. et al. Mechanisms of drug combinations: Interaction and network perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 111–128, 2009.
- JONES, T. C. The Effects of rhGM-CSF on Macrophage Function. **Eur J. Cancer**, v. 29, p. S10–S13, 1993.
- KAPLAN, C. S. et al. A randomized, controlled dose response study of intravenous sodium diethyldithiocarbamate in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **Life Sci**, v. 45, 1989.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KHOURI, R. et al. IFN- γ Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2525–2531, 2009.
- KHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14394, 21 dez. 2010.
- KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, n. SUPPL. 1, p. 37–42, 1990.
- KOLASA, T.; WARDENCKI, W. Quantitative determination of hydroxylamine. **Talanta**, v. 21, n. 8, p. 845–857, 1974.
- KOLDE, G. et al. Successful Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Using Systemic Interferon-Gamma. **Dermatology**, v. 192, p. 56–60, 1996.
- KRAUSE, A. W.; CARLEY, W. W.; WEBB, W. W. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 32, n. 10, p. 1084–1090, 1984.
- LAINSON, R.; RANGEL, B. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.
- LI, J. et al. Hydroxylamine and carboxymethoxylamine can inhibit Toxoplasma gondii Growth through an aspartate aminotransferase-independent pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 1–17, 2020.
- LI, Q. et al. Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in Leishmania donovani during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1539–1548, 2009.
- LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3 SPEC. ISS., p. 256–265, 2005.
- LUCUMI, A. et al. Sensitivity of Leishmania viannia panamensis to pentavalent antimony is

correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1990–1995, 1998.

MACHADO-COELHO, G. L. L. et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 55–61, 2005.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MCMILLAN, B. The inhibition of leptomonads of the genus leishmania in culture by antifungal antibiotics. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 293–299, 1960.

METWALLY, D. M. et al. Anti-leishmanial activity (in vitro and in vivo) of allicin and allicin cream using leishmania major (sub-strain zymowme LON4) and Balb/c Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–11, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. atual.** [s.l: s.n.].

MIRET-CASALS, L. et al. Hydroxylamine Derivatives as a New Paradigm in the Search of Antibacterial Agents. **ACS Omega**, v. 3, n. 12, p. 17057–17069, 2018.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of essential oil from Chenopodium ambrosioides and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8–9, p. 1048–1052, 2014.

MOREIRA, M. D. L.; BATISTELA, M. A. Euthanasia for the Zoonosis Control Program. In: **Euthanasia - The “Good Death” Controversy in Humans and Animals.** [s.l: s.n.].

MOWBRAY, C. E. et al. DNDI-6148: A Novel Benzoxaborole Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2021.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

OLIVEIRA, J. W. DE F. et al. Application of Dithiocarbamates as Potential New Antitrypanosomatids-Drugs: Approach Chemistry, Functional and Biological. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 15, 2019.

OLIVEIRA, J. W. F. et al. Insights of antiparasitic activity of sodium diethyldithiocarbamate against different strains of Trypanosoma cruzi. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.

OMS. **Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas.** [s.l: s.n.].

OMS. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

OMS. **Leishmaniasis.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2>. Acesso em: 12 nov. 2021.

- OPAS. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. Washington, D.C.: [s.n.].
- PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 3, p. 429–433, 2010.
- PANG, H. et al. Sodium diethyldithiocarbamate, an AIDS progression inhibitor and a copper-binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities in cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 19, n. 5, p. 809–816, 2007.
- PARRONCHI, P. et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 10, p. 4538–4542, 1991.
- PETERSEN, A. L. DE O. A. et al. 17-AAG Kills Intracellular *Leishmania amazonensis* while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.
- PETRI E SILVA, S. C. S. et al. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 163, p. 68–75, 2016.
- PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 2012.
- RABITO, M. F. et al. In vitro and in vivo antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 18–23, 2014.
- REED, S. G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 4, p. 524–531, 1993.
- REISINGER, E. C. et al. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. **The Lancet**, v. 335, n. 8691, p. 679–682, 1990.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Disease**, v. 7, n. 6, p. 581–596, 2007.
- ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020.
- SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189–196, 2001.
- SALDANHA, A. C. R. et al. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 383–388, 2000.
- SANTOS, A. L. S. et al. **Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma***. [s.l.: s.n.]. v. 74
- SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014b.

- SANTOS, J. B. et al. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 10, p. 1793–1796, 2004.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.
- SHINOBU, L. A.; JONES, S. G.; JONES, M. M. Mobilization of aged cadmium deposits by dithiocarbamates. **Archives of Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 235–242, 1983.
- SILVEIRA, F. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2008.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: Moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.
- SOLER-JOFRA, A.; PÉREZ, J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review. **Water Research**, v. 190, p. 116723, 2021.
- SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Effect of treatment with interferon- γ alone in visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1627–1629, 1995.
- TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497–507, 2016.
- TENNANT, J. R. **Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability** Transplantation, 1964.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, 2017.
- VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011.
- VAN BOCXLAER, K. et al. Novel benzoxaborole, nitroimidazole and aminopyrazoles with activity against experimental cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 129–138, 2019.
- VAN BOCXLAER, K. et al. Film-forming systems for the delivery of dndi-0690 to treat

cutaneous leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 1–14, 2021.

VAN DEN KERKHOF, M. et al. In vitro and in vivo pharmacodynamics of three novel antileishmanial lead series. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 81–86, 2018.

VARELA-M, R. E. et al. The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine. **Acta Tropica**, v. 131, n. 1, p. 32–36, 2014.

WALL, R. J. et al. Clinical and veterinary trypanocidal benzoxaboroles target CPSF3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 38, p. 9616–9621, 2018.

WEISER, W. Y. et al. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of leishmania donovani by human monocyte-derived macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 5, p. 1436–1446, 1987.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat Shock Protein 90 Homeostasis Controls Stage Differentiation in Leishmania donovani. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307–3316, 2001.

WIJNANT, G. J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole DNDI-0690 in mouse models of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 9, p. 1–11, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

YAN, S. et al. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 689–697, 2003.