



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
SAÚDE - COSAS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIAMIDÍNICOS FLUORADOS E
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

PEDRO RAUEL CÂNDIDO DOMINGOS

Manaus, Amazonas

Junho, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE –
COSAS

PEDRO RAUEL CÂNDIDO DOMINGOS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIAMIDÍNICOS FLUORADOS E
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para a Saúde.

Orientadora: Dra. Antonia Maria Ramos Franco

Coorientador: Dr. Andriy Grafov

Manaus, Amazonas

Junho, 2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D671a Domingos, Pedro Rael Cândido
Avaliação da eficácia de diamidínicos fluorados e nanopartículas metálicas na Leishmaniose Cutânea / Pedro Rael Cândido Domingos. 2018
149 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientador: Andriy Grafov
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose. 3. nanotecnologia. 4. análogos. I. Franco, Antonia Maria Ramos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PEDRO RAUEL CÂNDIDO DOMINGOS

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIAMIDÍNICOS FLUORADOS E
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por PEDRO RAUEL
CÂNDIDO DOMINGOS e aprovada pela Banca Avaliadora em 29/06/2018.**

Banca Examinadora:

Dra. Antonia Maria Ramos Franco

Orientadora

Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Dr. José Fernando Marques Barcellos

Dra. Thaís Tibery Espir

Dra. Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e amigos que acreditaram e me incentivaram nesse projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida maravilhosa e vontade de aprender que gozo desde a juventude.

Aos meus pais, Raimundo e Rosa, por acreditarem nas minhas escolhas e pelo amor e apoio incondicional dado a mim. Também pela educação dada aos meus irmãos e a mim, destacando sempre a importância dela para o crescimento pessoal.

A minha querida esposa, Maiza Miranda Domingos, por todo o suporte e amor que dedica desde que nos conhecemos, sendo o principal motivo da minha busca constante pela excelência.

Aos meus irmãos, Rayana, João e Rafael, por todos os momentos vividos e compartilhados juntos, além do apoio as minhas escolhas e projetos.

A minha orientadora, Dra Antonia Maria Ramos Franco, por todas as oportunidades dadas para minha formação acadêmica, além da atenção, cuidado e paciência, principalmente nesse último ano, diante de todos os compromissos profissionais assumidos por mim.

A Prof^a Maricleide Naiff pelo apoio e carinho nunca economizados para todos os alunos do laboratório.

Aos técnicos do Lab. de Leishmaniose e Doença de Chagas, em especial a Francimeire, Lourival e Ana Cleide, pelo apoio nas atividades laboratoriais.

Aos amigos Ana Flávia Chagas, Bruno Jensen, Claudia Dantas, Anny e Pauline, formados nos momentos de trabalho e confraternização no Laboratório, e com os quais pude contar nos momentos bons e ruins.

A minha querida amiga Fabiane Veloso Soares, pessoa com a qual dividi momentos felizes e às vezes difíceis, em terras geladas (Finlândia) e quentes (Manaus), me auxiliando sempre que possível na realização desse projeto.

A Francimeire Gomes Pinheiro, por todo o ensinamento, carinho e dedicação nos momentos que mais precisei, possibilitando a realização de parte desse trabalho.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, Victor e Maianne, aos quais dediquei tempo que não tinha e paciência que não me sobrava, mas que me auxiliaram em diferentes etapas desse projeto. Me orgulho de ter participado da formação de vocês.

Aos demais alunos e integrantes do Laboratório pela atenção e auxílio dedicados a mim.

Aos meus amigos da Faculdade Estácio, do Lab. Distrital Sul da SEMSA, da UFAM e da UEA, pelas longas conversas, sugestões e discussões sobre assuntos importantes e triviais e, principalmente, por apoiarem, de uma maneira ou de outra, esse meu sonho.

A UFAM/PPG-BIOTEC e ao INPA/Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, pela oportunidade de cursar o doutorado e de executar as atividades necessárias à conclusão dele.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros anos do doutorado.

A todos vocês meu mais sincero agradecimento!

EPÍGRAFE

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.

Autor: Albert Einstein

RESUMO

Diante da necessidade de explorar novas opções de tratamentos para a Leishmaniose Cutânea (LC), avaliamos a eficácia de análogos fluorados da pentamidina [1,5-bis(4-amidinofenoxy)-3,3-difluoropentano - 5A6F; e 1,5-bis(4-amidinofenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano - 5A6F], medicamento utilizado no tratamento da LTA, além de sintetizar, caracterizar e avaliar a eficácia de nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e de tântalo (Ta), nanoformulações com propriedades terapêuticas ainda desconhecidas. Foram realizadas avaliações *in vitro* (eficácia contra promastigotas e amastigotas, além de citotoxicidade em macrófagos murinos) e *in vivo* (evolução clínica e parasitológica da LC em camundongos e hamsters) contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*. A concentração inibitória 50 (CI₅₀) dos análogos fluorados contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24 horas (h) de tratamento foi de 71,66 e 49,50 nM/mL para o 5A2F e o 5A6F, respectivamente, enquanto para o controle positivo (C+) foi de 47,94 nM/mL. A CI₅₀ para *L. (V.) guyanensis* após 24 h foi de 17,53, 45,17 e 41,03 nM/mL para o C+, o 5A2F e o 5A6F, respectivamente, evidenciando a maior sensibilidade dessa espécie aos diamidínicos. A eficácia contra amastigotas, medida a partir da taxa de infecção de macrófagos (MØ), de *L. (L.) amazonensis* após 48 h de exposição a 50 nM/mL foi maior que 70% para C+ e 5A2F, enquanto contra *L. (V.) guyanensis*, nas mesmas condições e período de exposição, foi superior a 90%. Não houve diferença significativa entre a evolução de LC em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com diamidínicos e o controle negativo (C-), enquanto em camundongos infectados com *L. (V.) guyanensis* foi observada cura clínica em todos os tratamentos, embora não tenha sido observada cura parasitológica. As NIB apresentaram tamanho de 76,53 nm e um potencial ζ de 19,63 mV para NIB-Nb, e 19,22 nm e potencial ζ de 22,57 mV para NIB-Ta, após a síntese. O NIB-Ta apresentou eficácia contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, enquanto as NIB-Nb estimularam a replicação de *L. (L.) amazonensis*, superando o número de parasitos do controle negativo na maioria das concentrações testadas. A eficácia das NIB contra amastigotas foi melhor que a observada para C+ em todos os tratamentos após 48 horas de exposição, especialmente sobre *L. (V.) guyanensis*, mantendo eficácia superior a 90% em tratamentos com 6,00 μ M/mL. A evolução da LC em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* e por *L. (V.) guyanensis* não foi satisfatória após o tratamento com as NIB, uma vez que apresentaram propriedades inflamatórias no tecido afetado, o que potencializou o aumento e a gravidade das lesões. Foi demonstrado durante o estudo que animais não infectados também apresentavam dano local e inflamação após administrações consecutivas das NIB, fato que explica a ineficácia e que pode fomentar o interesse em estudos futuros. Os resultados com os análogos de diamidínicos foram mais expressivos nos tratamentos experimentais, mas os resultados das NIB *in vitro* sugere que esses materiais ainda podem ser explorados em futuros estudos contra LC.

Palavras-chave: *Leishmania*; Leishmaniose; nanotecnologia; análogos; nióbio; tântalo, flúor.

ABSTRACT

In view of the need to explore new treatment options for Cutaneous Leishmaniasis (LC), we evaluated the efficacy of fluorinated analogues of pentamidine [1,5-bis (4-amidinophenoxy) - 3,3-difluoropentane-5A6F; and 1,5-bis (4-amidinophenoxy) -2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane-5A6F], a drug used in the treatment of LTA, besides synthesizing, characterizing and evaluating the efficacy of bioactive inorganic nanomaterials (NIB) of niobium oxides (Nb) and tantalum (Ta) oxides, nanoformulations with therapeutic properties still unknown. Were performed *in vitro* evaluations (efficacy against promastigotes and amastigotes, and cytotoxicity in murine macrophages) and *in vivo* (clinical and parasitological evolution of LC in mice and hamsters) evaluations against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*. Inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of fluorinated analogues against *L. (L.) amazonensis* promastigotes after 24 hours (h) of treatment was 71.66 and 49.50 nM/mL for 5A2F and 5A6F, respectively, while the positive control (C+) was 47.94 nM/mL. The IC₅₀ for *L. (V.) guyanensis* after 24 h was 17.53, 45.17 and 41.03 nM/mL for C+, 5A2F and 5A6F, respectively, evidencing the higher sensitivity of this species to the diamidines. The efficacy against amastigotes, measured from the infection rate of macrophages (MØ), of *L. (L.) amazonensis* after 48 h exposure to 50 nM/mL was greater than 70% for C+ and 5A2F, while against *L. (V.) guyanensis*, under the same conditions and exposure period, was higher than 90%. There was no significant difference between the evolution of LC in mice infected with *L. (L.) amazonensis* treated with diamidines and negative control (C-), while in infected mice with *L. (V.) guyanensis* was observed clinical cure in all treatments, although no parasitological cure was observed. The NIB presented size of 76.53 nm and a ζ potential of 19.63 mV for NIB-Nb, and 19.22 nm and potential ζ of 22.57 mV for NIB-Ta, after the synthesis. The NIB-Ta showed efficacy against promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*, whereas NIB-Nb stimulated the replication of *L. (L.) amazonensis*, surpassing the parasite number of negative control in the majority of concentrations tested. The effectiveness of NIB against amastigotes was better than those observed for C+ in all treatments after 48 hours of exposure, especially the effect on *L. (V.) guyanensis*, maintaining efficacy higher than 90% in treatments with 6.00 μM/mL. The evolution of LC in hamsters infected with *L. (L.) amazonensis* and by *L. (V.) guyanensis* was not satisfactory after treatment using NIB, since they presented inflammatory properties in the affected tissue, which increased the increase and severity of the lesions. It was demonstrated during the study that uninfected animals also presented local damage and inflammation after consecutive NIB administrations, a fact that explains the inefficacy and that may encourage future studies. The results with the diamidine analogs were more expressive in the experimental treatments, but the *in vitro* NIB results can still be explored in future studies against LC.

Key words: *Leishmania*; Leishmaniasis; nanotechnology; NP; analogues; niobium; tantalum, fluorine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i> . A = Promastigotas; B= Amastigotas parasitando macrófagos.	6
Figura 2: Ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i>	8
Figura 3: Formas clínicas da LTA. A – Cutânea; B – Mucocutânea; C – Cutânea-Difusa; D – Cutânea-Disseminada.	10
Figura 4: Distribuição de casos de Leishmaniose no mundo em 2013.	11
Figura 5: Pentamidina (A) e possíveis modificações para produção de análogos (B)	22
Figura 6: Escala nanométrica comparativa. *Exemplo de célula eucariota.	24
Figura 7: Formulações nanométricas aplicadas na medicina.	26
Figura 8: (Figure 1) Bisamidines 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride (A) e 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane dihydrochloride (B).	31
Figura 9: (Figure 2) Leishmanicidal activity of diamidines against promastigotes of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) and <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A.2 and B.2 - 48 hours. 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.	33
Figura 10: (Figure 3) Cytotoxicity in murine peritoneal macrophages after exposure to diamidines for 24 (A.1 and B.1) and 48 hours (A.2 and B.2). A.1 and A.2 = "*" indicates significant difference (<i>Tukey's test</i> , $p < 0.05$) between analogue and negative control (saline solution). B.1 and B.2 = "*" indicates significant difference (<i>Tukey's test</i> , $p < 0.05$) between analogue and Pentacarinat [®] ; 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidina.	36
Figura 11: (Figure 4) Rate of infection (IR) of macrophages by amastigotes of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) and <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A2 and B.2 = 48 hours. "*" Indicates significant difference (<i>Tukey's test</i> , $p < 0.05$) between analogue and Pentacarinat [®] ; 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.	38
Figura 12: (Figure 5) Percentage Efficacy (%E) of the analogues of macrophages infected with <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) and <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A2 and B.2 = 48 hours. "*" Indicates significant difference (<i>Tukey's test</i> , $p < 0.05$) between the analogues and Pentacarinat [®] ; 5A2F and 5A6F = fluorinated pentamidine analogues.	39
Figura 13: (Scheme 1) Procedures for the preparation of the 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride (5A2F). Reagents, solvent, pressure, temperature, time: (a) Et3N, CH2Cl2, 20 °C, 24 h; (b) NaH (60%), DMF, 20 °C, 48 h; (c) NH2OH·HCl, K2CO3, EtOH, reflux, 4 h; (d) H2, 5% Pd/C, CH3COOH, Ac2O, ambient pressure, 20 °C, up to saturation.	45
Figura 14: (Scheme 2) Procedures for the preparation of the 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane dihydrochloride (5A6F). Reagents, solvent, pressure,	

temperature, time: (a) NaH (60%), DMF, 60 °C, 2 h; (b) NH ₂ OH·HCl, K ₂ CO ₃ , EtOH, reflux, 9 h; (c) H ₂ , 5% Pd/C, CH ₃ COOH, Ac ₂ O, ambient pressure, 20 °C, up to saturation.....	46
Figura 15: 5A2F = 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-3,3-difluoropentano (A); e 5A6F = 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano (B).	57
Figura 16: Cronograma esquemático da experimentação animal. Três séries de tratamento, com intervalo de dois dias entre cada uma das séries, com aplicação intramuscular diária de 11,62 µM/kg/dia do controle positivo e dos tratamentos experimentais, e posterior avaliação clínica até completos 30 dias de tratamento.	59
Figura 17: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm ³) em camundongos Balb/c (<i>Mus musculus</i>), infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , tratados com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F	63
Figura 18: Evolução clínica de lesões em patas de camundongos (<i>Mus musculus</i>), inoculados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , após tratamento experimental com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F. As imagens foram obtidas no 1°, 15°, 30° e 45° dia de tratamento.	64
Figura 19: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm ³) em camundongos Balb/c (<i>Mus musculus</i>), infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , tratados com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F.	65
Figura 20: Evolução clínica de lesões em focinhos de camundongos (<i>Mus musculus</i>), inoculados com <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , após tratamento experimental com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F. As imagens foram obtidas no 1°, 9°, 21° e 30° dia de tratamento.	66
Figura 21: Taxa de infecção (TI) em macrófagos obtidos a partir de impressão em lâmina de lesões cutâneas por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B), observados em microscopia óptica, 400-1000x. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCNS (p<0,001)	68
Figura 22: Tamanho de partícula estimada por dispersão de luz (DSL). A = NIB-Nb; B = NIB-Ta. As curvas em cores diferentes representam as réplicas usadas na leitura. Size = Tamanho; Intensity = Intensidade; d.nm = diâmetro em nanômetros. Gráfico gerado no <i>Zetasizer software 7.11</i>	85
Figura 23: Fotomicrografias das NIB-Nb (A) e NIB-Ta (B) obtidos a partir de microscopia eletrônica de transmissão. NIB = Nanomatriz Inorgânica Bioativa. Escala (A) = 100 nm; Escala (B) = 50 nm.	86
Figura 24: Atividade leishmanicida de NIB contra promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A.2 e B.2 - 48 horas. C(-) = Controle negativo (solução salina); NIB = Nanomatriz inorgânica bioativa; Nb = Nióbio; Ta = Tântalo.	88

Figura 25: Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos após exposição as nanomatrizes (NIB) por 24 (A) e 48 horas (B). “*” = diferença significativa entre o tratamento e o controle negativo; “**” = diferença significativa entre o tratamento e o controle positivo (Glucantime®). *, **, *** e **** = p <0,05, p <0,01, p <0,005 e p <0,001, respectivamente (teste de Tukey).	90
Figura 26: Taxa de infecção (TI) de macrófagos por amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A2 e B.2 = 48 horas. “*” = diferença significativa (teste de Tukey, p<0,05) entre os tratamentos e o controle positivo (Glucantime®).	92
Figura 27: Percentual de Eficácia (%E) das NIB sobre macrófagos parasitados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A2 e B.2 = 48 horas. “*” diferença significativa (teste de Tukey, p<0,05) entre tratamentos e o controle positivo (Glucantime®).	93
Figura 28: Cronograma esquemático da experimentação animal. Dez séries de tratamento, com intervalo de dois dias entre cada uma das séries, com aplicação intralesional diária de 20 mg SbV/Kg/dia do controle positivo e 3,00 µM/dia dos tratamentos experimentais, e posterior avaliação clínica até completos 30 dias de tratamento	106
Figura 29: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm ³) em Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>), infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta.	110
Figura 30: Evolução clínica de lesões em focinhos de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>), inoculados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , após tratamento experimental com tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.	112
Figura 31: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm ³) em Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>), infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta	113
Figura 32: Evolução clínica de lesões em focinhos de Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>), inoculados com <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , após tratamento experimental com tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.	115
Figura 33: Evolução clínica de Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos a avaliação citotóxica após administração subcutânea de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo;	

GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.117

Figura 34: Taxa de infecção (TI) em macrófagos obtidos a partir de impressão em lâmina de lesões cutâneas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B) em Hamster (*Mesocricetus auratus*), observados em microscopia óptica, 400-1000x. GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCNS; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCPG; *, ** e *** = $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,005$, respectivamente.119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por região do Brasil de 2010 a 2015.	12
Tabela 2: Drogas sistêmicas utilizadas no tratamento de Leishmaniose tegumentar nas Américas ^{1;2}	14
Tabela 3: (Table 1) Inhibitory concentration (IC ₅₀) estimated on promastigotes of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> and <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> exposed to treatment with diamidines for 24-48 hours. 5A2F and 5A6F = Fluorinated analogs of pentamidine; ** = Not measurable.	34
Tabela 4: (Table 2) Mean of amastigotes by infected macrophage after treatment with diamidines for 24-48 hours. 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.	40

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = Análise de Variância	GI = Glucantime®
ATP = Adenosine trifosfato	GTP = Guanosina trifosfato
C = Carbono	H ₂ O = Água
CAS = <i>Chemical Abstracts Service</i>	HCl = Ácido Clorídrico
CDC = Centers for Disease Control and Prevention	IL = Intralesional
CE = Concentração efetiva	IM = Intramuscular
CE ₅₀ = Concentração efetiva para 50%	INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
CI = Concentração inibitória	LC = Leishmaniose cutânea
CI ₅₀ = Concentração inibitória para 50%	LCD = Leishmaniose cutânea disseminada
CEUA = Comitê de Ética e Experimentação Animal	LD = Leishmaniose cutânea difusa
CN ou C (-) = Controle negativo	LM = Leishmaniose mucocutânea
CO ₂ = Gás carbônico	LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana
CP ou C (+) = Controle positivo	LV = Leishmaniose visceral
CSAS = Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde	MET = Microscopia eletrônica de transmissão
d.C. = Depois de Cristo	MO = Macrófagos
DLS = <i>Dynamic light scattering</i> (tradução: dispersão de luz dinâmica)	N = Nitrogênio
DNA = <i>Deoxyribonucleic acid</i> (tradução: ácido desoxirribonucleico)	NaOH = Hidróxido de sódio
F = Flúor	Nb = Nióbio
FDA = <i>Food and Drug Administration</i>	Nb ₂ O ₅ = Pentóxido de nióbio
	NNN = Meio de cultura Neal, Novy, Nicolle
	NIB = Nanomatriz(es) Inorgânica(s)
	Bioativa(s)

NP = Nanopartícula(s)

O = Oxigênio

OMS = Organização Mundial de Saúde

OPAS = Organização Panamericana de Saúde

PAHO = Pan American Health Organization

PBS = *Phosphate Buffered Saline*

Pt = Pentacarinat®

RPM = Rotação por minuto

RPMI = Meio de cultura *Roswell Park Memorial Instit*

S = Enxofre

Sb⁺³ = Antimônio trivalente

Sb⁺⁵ = Antimônio pentavalente

SBFi = Soro fetal bovino inativado

T.A. = Temperatura ambiente

Ta = Tântalo

WHO = World Health Organization

GCNS = Grupo Controle Negativo Salina

GCPP = Grupo Controle Positivo

Pentacarinat®

GCPG = Grupo Controle Positivo Glucantime®

GE5A2F = Grupo Experimental 5A2F

GE5A6F = Grupo Experimental 5A6F

5A6F = 1,5-bis(4-Amidinofoxi)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano

5A2F = 1,5-bis(4-Amidinofoxi)-3,3-difluoropentano

5AHCl = 1,5-bis(4-Amidinofoxi)-pentano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A Leishmaniose.....	4
2.1.1. Considerações gerais	4
2.1.2. O parasito	5
2.1.3. Manifestações clínicas da LTA	8
2.2. Epidemiologia da LTA.....	10
2.3. Tratamentos convencionais da LTA	13
2.3.1. Considerações gerais	13
2.3.2. Principais características e efeitos adverso.....	15
2.3.3. Mecanismos de ação.....	16
2.4. Resistência aos tratamentos convencionais	17
2.4.1. Mecanismos de resistência	17
2.4.2. Resistência ao tratamento para LTA	19
2.5. Desenvolvimento de novos fármacos.....	20
2.5.1. Pentamidina e seus análogos	20
2.5.2. A Nanomedicina.....	23
2.5.3. Nanotecnologia farmacêutica e suas possibilidades.....	24
3. OBJETIVOS.....	28
Geral.....	28
Específicos	28
CAPÍTULO 1	
Comparative Leishmanicidal Activity of Fluorinated Analogs of Pentamidine Hydrochloride and Pentamidine Isethionate (Pentacarinat [®])	29
CAPÍTULO 2	
Ensaio pré-clínico de análogos fluorados da pentamidina na Leishmaniose Cutânea experimental.	55
CAPÍTULO 3	
Avaliação da atividade leishmanicida de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) à base de óxidos de Nióbio e Tântalo.....	77

CAPÍTULO 4

Ensaio pré-clínico de Nanomatriz Inorgânica Bioativa (NIB) à base de óxido de Nióbio e Tântalo na Leishmaniose Cutânea experimental.	102
4. DISCUSSÃO GERAL	129
5. CONCLUSÕES FINAIS	131
6. PERSPECTIVAS	132
REFERÊNCIAS	133
ANEXO – A	145
ANEXO – B	146
ANEXO – C	149

1. INTRODUÇÃO

Endêmica em 98 países (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017), sendo 18 deles na América Latina (OPAS/OMS, 2016), a Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma zoonose, não contagiosa, causada por protozoários parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* e que apresenta diversas formas de manifestação no homem, dependendo da espécie do parasito e, conseqüentemente, da resposta imunológica do hospedeiro (ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A transmissão da LT acontece durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de várias espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, em hospedeiros vertebrados (ARIAS; NAIFF, 1981; DUTHIE et al., 2012). Os humanos entram no ciclo desses parasitos de maneira acidental, mas existem pelo menos 23 espécies de *Leishmania* que já foram associadas à infecção humana. Nos continentes americanos a LT é identificada como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), onde destacam-se as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002; BRASIL, 2017a), como as principais envolvidas nessa parasitose. Essa diversidade de agentes, aliado a de reservatórios e vetores, proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de novos casos de LTA.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam 15 milhões de pessoas infectadas no Mundo e aproximadamente 1,5 milhão de novos casos a cada ano, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Nas Américas, entre 2001 e 2014, foi registrada média de casos anual de 56.898, onde o Brasil é o país que concentra maior número de casos (39,96%) [OPAS/OMS, 2016], com destaque para as regiões Norte e Nordeste, que apresentaram as maiores incidências nos últimos anos (2000 – 2015) [BRASIL, 2017b].

A LTA é classificada clinicamente em quatro formas: cutânea (LC), mucocutânea (LM), cutânea difusa (LD) e cutânea disseminada (LCD), apresentando uma grande diversidade nas formas e gravidade das lesões na pele e mucosas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; BRASIL, 2017a; PAN

AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Em comum entre elas está o estigma social que as lesões podem provocar, principalmente quando leva a desfigurações, assim como as drogas disponíveis para o tratamento, que a mais de nove décadas consiste em preparações a base de antimônio pentavalente (RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

O tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa é realizado utilizando antimoniato de N-metil glucamina ou estibogluconato de sódio, duas formulações diferentes do antimônio pentavalente. Além dessas opções, drogas como isetionato de pentamidina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e miltefosina, constituem opções terapêuticas aos casos de baixa eficiência dos tratamentos com antimoniais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os antimoniais apresentam eficácia limitada contra algumas espécies de *Leishmania*, como a *L. (V.) guyanensis* (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CAMARA COELHO et al., 2011), sendo substituída, na região amazônica, pelo isetionato de pentamidina (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CAMARA COELHO et al., 2011; NEVES et al., 2011), mas em comum entre os tratamentos estão os efeitos colaterais, abandono de tratamento e o alto custo para o Estado.

A ineficiência do tratamento em alguns casos e a falta de novas opções de drogas é um cenário ameaçador diante da reemergência de algumas doenças infecciosas e o desenvolvimento de resistência por alguns parasitos com espectro terapêutico menor, limitando ainda mais o aparato farmacológico disponível (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; AMATO et al., 2007; DUTHIE et al., 2012). Como resultado disso, políticas para desenvolvimento de novas drogas e/ou tratamentos estão sendo amplamente promovidas principalmente utilizando terapias combinadas, extratos vegetais, análogos de drogas já conhecidas e micro e/ou nanossistemas de partículas (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS et al., 2008; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; MACIEJEWSKA et al., 2012; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

O conhecimento atual sobre mecanismos de ação de substâncias utilizadas no tratamento da LTA possibilita a pesquisa de novos produtos com uma margem de erro menor (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), sendo muito interessante as abordagens que envolvem análogos e aquelas onde são utilizados nanocápsulas ou nanopartículas, a primeira pelo conhecimento prévio sobre os efeitos da substância original, enquanto a segunda pela

possibilidade de controlar e direcionar a ação de princípios ativos com potencial terapêutico (efeitos no parasito e/ou hospedeiro conhecido).

A produção de análogos é há muito tempo uma das principais abordagens na pesquisa de novas drogas (BELL et al., 1990; LINDSAY et al., 1991; TYAGI et al., 2013), e a utilização da pentamidina, droga de comprovada eficiência no tratamento da LTA, mas que é desaconselhada em muitos casos pelos efeitos adversos (LAI A FAT et al., 2002; COELHO et al., 2008), é uma excelente candidata a ser modelo para produção de análogos. A simples adição de heteroátomos no ligante alifático da pentamidina já apresenta grande potencial de exploração na busca por melhores resultados para essa droga (MACIEJEWSKA et al., 2012), havendo inclusive relatos desse tipo de abordagem visando o tratamento das leishmanioses (BELL et al., 1990; TYAGI et al., 2013). A escolha dos átomos a serem incluídos na estrutura é muito importante e a literatura já vem descrevendo as vantagens de se utilizar o Flúor (F) como heteroátomo na produção de análogos, relacionando essa prática a melhora na atividade contra patógenos e a redução dos efeitos adversos nos mamíferos hospedeiros em tratamento (SWINSON, 2005; WANG et al., 2014), mas dados relacionados a esse tipo de prática e o tratamento de leishmanioses ainda são desconhecidos.

Em contrapartida, há uma crescente na área de inovações farmacêuticas que utiliza a nanotecnologia como ferramenta para produzir novas drogas ou, ainda, possibilitar a utilização de drogas pré-existentes em menores concentrações e com maior eficiência terapêutica. A possibilidade de controle na liberação e de direcionamento dos fármacos faz com que a nanotecnologia seja encarada como o futuro no desenvolvimento de tratamentos (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; SINGH et al., 2012). Esse tipo de tecnologia esta sendo utilizada principalmente por possibilitar a utilização de produtos que antes desse avanço não teriam como ser aplicados na terapêutica de nenhuma patologia, ou pela toxicidade ou pela sua inatividade em sistemas fisiológicos.

O sucesso visto no tratamento experimental da Malária e da Leishmaniose Cutânea utilizando nanossistemas já é descrito na literatura (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; FRANCO et al., 2016). Isso mostra o quanto o desenvolvimento desse tipo de produto pode ser benéfico e vantajoso contra espécies diversas de *Leishmania*, assim como para outras parasitoses. A atividade de nanopartículas metálicos sintetizados a partir de ouro, zinco, prata

e titânio já mostraram eficiência contra *Leishmania*, assim como o semimetal antimônio (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; RAMEZANI; JEBALI; KAZEMI, 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; FRANCO et al., 2016) e a existência de muitos outros elementos químicos com potencial para esse fim é um atrativo a se considerar no desenvolvimento de novos produtos (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016).

Elementos como o Nióbio (Nb) e o Tântalo (Ta), os quais o Brasil tem grandes reservas, ainda são pouco explorados quanto ao potencial terapêutico que podem apresentar, havendo apenas trabalhos que evidenciam alguns efeitos celulares promovidos por eles (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016), mas sem referências quanto a atividade deles sobre as leishmânias.

Objetivando a produção de drogas mais eficazes, com menores efeitos colaterais e que possam ser aplicadas de alguma forma que estimule a conclusão dos tratamentos, a eficácia de análogos de drogas conhecidas e de nanopartículas de elementos diversos, produzidas visando a atividade sobre leishmânias, são fundamentais para sanar deficiências na terapêutica da LTA, além de possibilitar a comparação dos efeitos de produtos tão distintos no protozoário e, principalmente, no hospedeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Leishmaniose

2.1.1. Considerações gerais

A leishmaniose é uma zoonose causada por protozoários parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* e que apresentam diversas formas de manifestação no homem, dependendo da espécie do parasito e, conseqüentemente, da resposta imunológica do hospedeiro. A patologia tem evolução dependente da complexa relação parasito-hospedeiro, podendo assumir as formas clínicas visceral ou tegumentar (ROBERTS; HANDMAN;

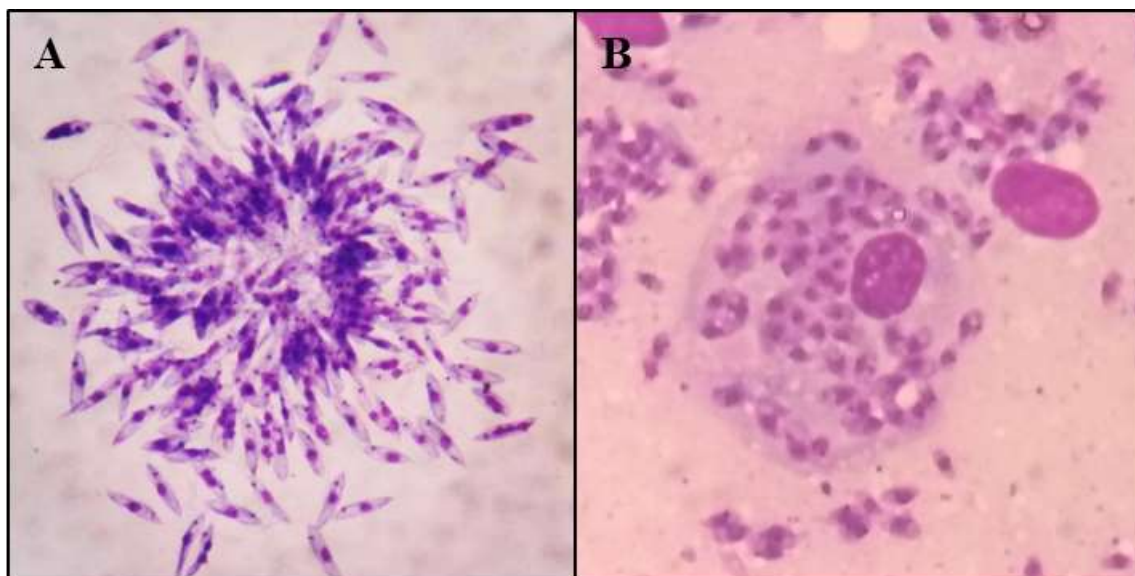
FOOTE, 2000; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Nas Américas se destacam as manifestações tegumentares, denominada por Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), das quais há registros que datam entre 400 e 900 d.C. onde são descritos em pinturas em cerâmicas as mutilações e desfigurações que podem estar relacionadas a manifestações mais graves dessa doença (LAINSON; SHAW, 1987). O conhecimento do ciclo biológico dessa parasitose é fundamental para se entender quando o homem, que é um hospedeiro acidental, se torna vulnerável a essa infecção.

2.1.2. O parasito

Os protozoários responsáveis pela LTA pertencem a família Trypanosomatidae, especificamente ao gênero *Leishmania*, o qual é dividido em dois subgêneros, o *Leishmania* e o *Viannia*. São parasitos dimórficos, apresentando, basicamente, duas formas evolutivas que podem ser vistas em etapas diferentes do seu ciclo biológico, uma delas flagelada, identificada como promastigotas e visível no interior dos insetos hospedeiro/vetores, e uma aflagelada, identificada como amastigota e visível no interior de células parasitadas ou livre no hospedeiro após a lise dessas células (Figura 1). As promastigotas ainda são diferenciadas em procíclicas, aquelas que acabaram de se diferenciar das amastigotas, e metacíclicas, que seriam as formas infectantes desenvolvidas após replicação no intestino médio do inseto e migração para suas glândulas salivares (LAINSON; SHAW, 1979; BATES, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; BEATTIE; KAYE, 2011; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2013)

Figura 1: Formas evolutivas dos protozoários do gênero *Leishmania*. A = Promastigotas; B= Amastigotas parasitando macrófagos.



Fonte: Arquivo pessoal

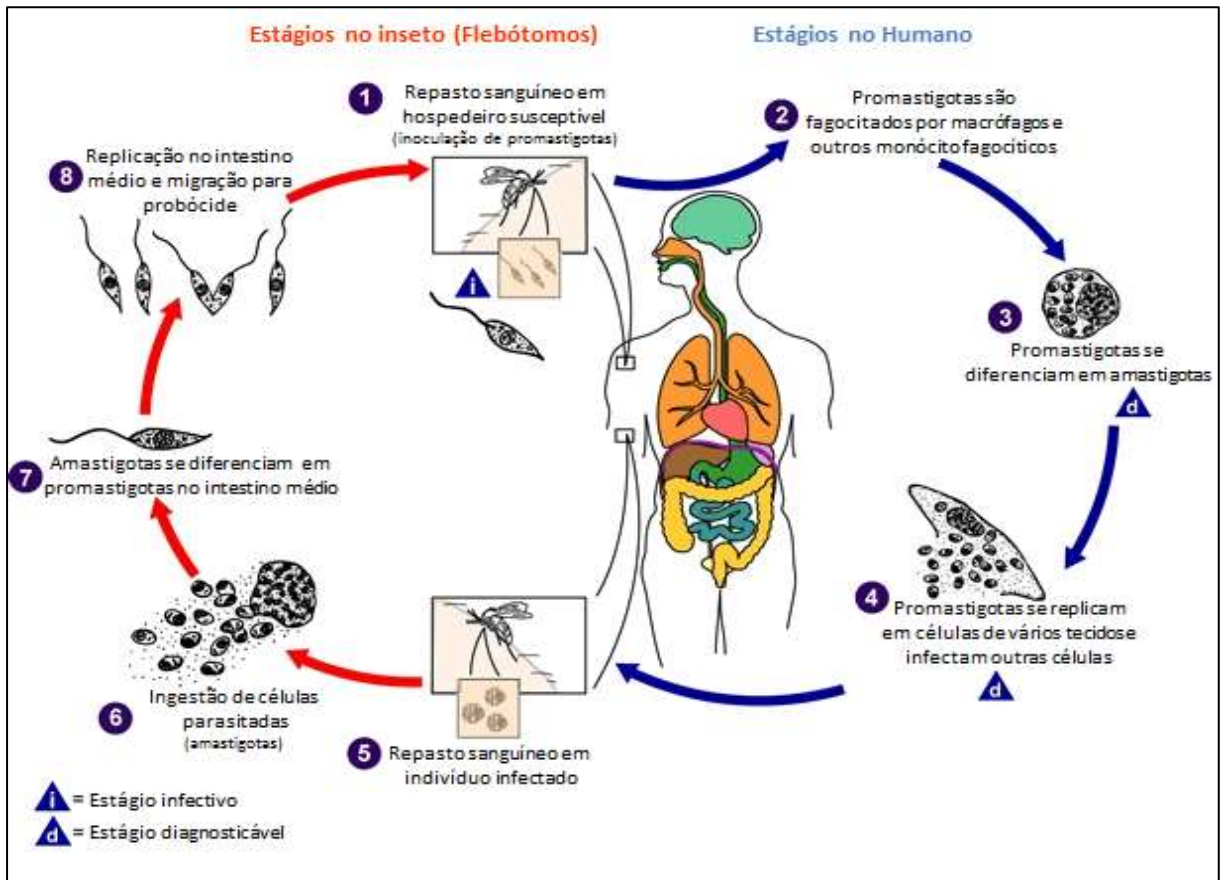
O seu ciclo biológico é heteroxênico, onde há um hospedeiro invertebrado, que também é o vetor, e um hospedeiro vertebrado. A transmissão dos parasitos ocorre durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, quando elas regurgitam as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado e que se diferenciam nas formas amastigotas no interior de células do sistema monocítico-fagocitário (Figura 2) [ARIAS; NAIFF, 1981; BEATTIE; KAYE, 2011; DUTHIE et al., 2012; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2013; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010]. Existem, aproximadamente, 800 espécies de flebotomíneos identificados no mundo (RANGEL; LAINSON, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), dos quais cerca de 53 já foram associados a transmissão das leishmânias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Apesar do humano ser um hospedeiro acidental, considerando o ciclo natural da leishmaniose, que envolvem mamíferos de outras espécies, existe uma grande variedade de espécies de *Leishmania* que já foram associadas à infecção em seres humanos, pelo menos 23 espécies, mas aquelas que se destacam por esta envolvida na maioria dos casos de LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.)*

shawi, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, apesar de todas essas espécies serem encontradas, duas se destacam pela maior prevalência: *L. (V.) guyanensis*, na região Norte e Amazônia brasileira, e *L. (V.) braziliensis*, nas demais regiões do país (ARIAS; NAIFF, 1981; CAMARA COELHO et al., 2011; DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013; BRASIL, 2017a). Na Amazônia, região que concentra o maior número de casos, a *L. (V.) guyanensis* é responsável por mais de 70% dos casos notificados de LTA (GRIMALDI et al., 1991; CAMARA COELHO et al., 2011). Vale destacar, que essa diversidade de agentes, reservatórios e vetores, proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de novos casos de LTA.

Apesar de apresentarem diferenças morfológicas mínimas, muitas vezes imperceptíveis a uma análise microscópica, as espécies apresentam diferenças genéticas que possibilitam que alguns deles estejam mais envolvidos em determinadas formas clínicas. Dentre as espécies mais prevalentes no Brasil, a *L. (V.) braziliensis* pode ser encontrada provocando as formas clínicas LC, LM e LD; a *L. (V.) guyanensis* geralmente esta associada a LC e LD; a *L. (L.) amazonensis* as formas LC, LM e LCD; a *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) naiffi* estão associados a manifestações do tipo LC (SILVEIRA et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Figura 2: Ciclo de transmissão da Leishmania.



Fonte: CDC, adaptado.

2.1.3. Manifestações clínicas da LTA

A LTA pode apresentar uma variedade de manifestações clínicas, sendo caracterizada por uma diversidade de lesões na pele e mucosas de gravidade variável, desde pequenas lesões autorresolutivas até grandes lesões com comprometimento tecidual extensivo e potencial desfigurantes. O número, forma e profundidade das lesões, apresenta relação com a espécie do parasito, que variam em virulência, e a resposta imune do hospedeiro a infecção (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SANTOS et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Segundo a OMS, a LTA pode apresentar quatro manifestações distintas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010):

- Leshmaniose cutânea (LC): Podem ser provocadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, caracterizada inicialmente como uma mácula seguida por uma pápula, que ulcera e se expande para uma lesão típica de cratera redonda-oval ou como uma lesão nodular (Figura 3A). Geralmente ocorre no local da inoculação, mas pode ser encontrado em qualquer parte do corpo;
- Leshmaniose mucocutânea (LM): Provocada principalmente por espécies do subgênero *Viannia*, iniciam-se de forma semelhante à descrita para a LC, mas sofre metástases a partir do sistema linfático ou hematológico, o que expande as lesões até a mucosa da boca e trato respiratório superior (Figura 3B). São fatores de risco, além da espécie envolvida na infecção e condições fisiológicas do hospedeiro, o sítio inicial da lesão, lesões múltiplas e/ou extensas e retardo na cura de lesões primárias.
- Leshmaniose cutânea difusa (LD): Relacionada geralmente as espécies *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, do subgênero *Leishmania*, ou a casos de imunodepressão. Caracterizada por máculas cutâneas amplamente disseminadas, pápulas, nódulos ou placas, ou por infiltração difusa da pele, especialmente nas superfícies extensoras dos membros e na face, onde há espessamento das sobrancelhas e dos lóbulos (Figura 3C). Não há lesões mucosas, mas também não cura espontaneamente, além de serem comuns recaídas após o tratamento.
- Leishmaniose cutânea disseminada (LCD): Relacionada geralmente as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, caracterizado por numerosas e extensas lesões ulceradas, com ou sem envolvimento da mucosa (Figura 3D).

Figura 3: Formas clínicas da LTA. A – Cutânea; B – Mucocutânea; C – Cutânea-Difusa; D – Cutânea-Disseminada.



Fontes: fig A – AFPMB, 2005¹, ispub²; fig B – Soto¹, Convit et al., 2004²; fig C – Hooja et al., 2014¹, Vandana et al., 2009²; fig D – Sousa et al., 2006.

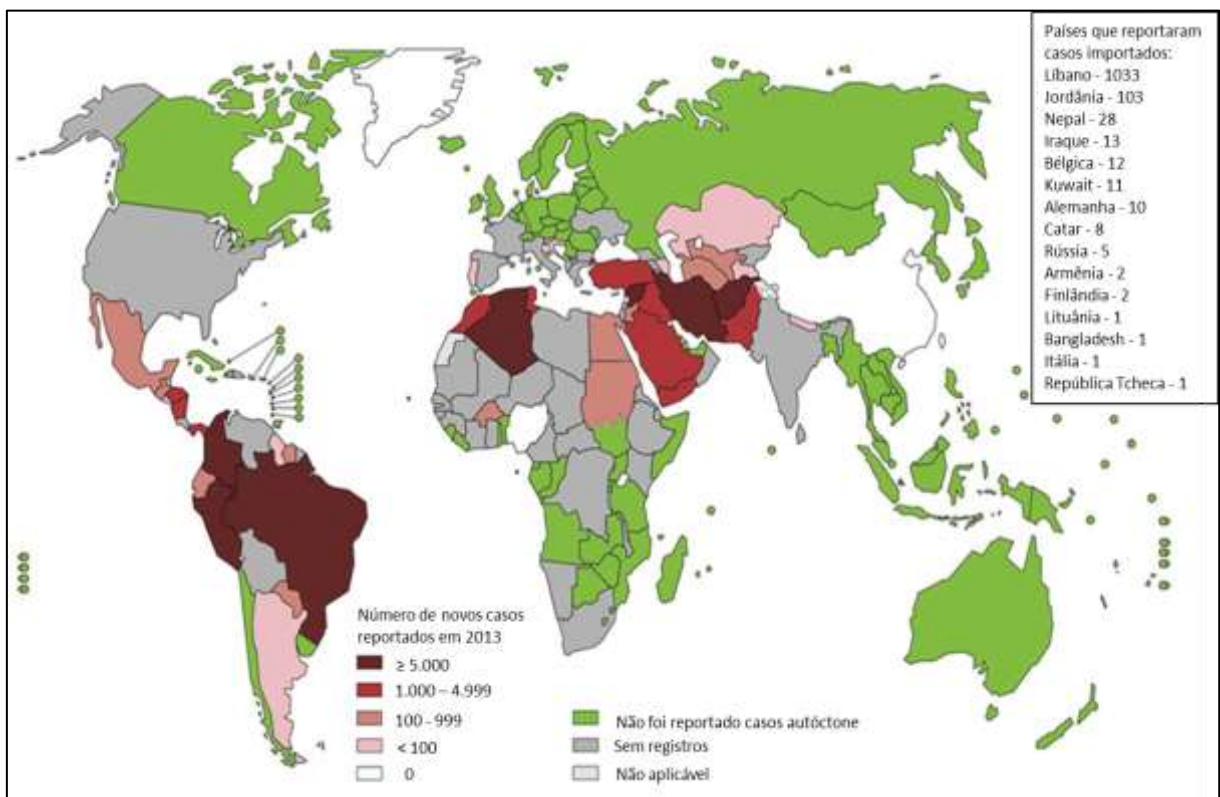
2.2. Epidemiologia da LTA

A OMS estima que existam 15 milhões de pessoas infectadas no Mundo e aproximadamente 1,5 milhões de novos casos a cada ano, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas, além de ser considerada endêmica de 98 países (Figura 4) [PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017]. Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), a média de casos de LTA nas Américas entre 2001 e 2014 foi de 56.898 casos por ano, sendo notificado no boletim epidemiológico mais atual (2014) o registro de 51.098 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas. O Brasil é o país americano que concentrou o maior número de casos (39,96%) [OPAS/OMS, 2016], destacando-se as regiões Norte e Nordeste com as maiores incidências nos últimos anos (2000 – 2015), apesar de haver registro de casos em todas as regiões (Tabela 1). Considerando os

casos registrados entre 2000 e 2015, o Brasil apresentou média de casos por ano de 24.088 e a região norte 9.756, destacando-se com a maior média nacional em todos os anos a partir de 2000, com exceção de 2010 quando a região Nordeste apresentou a maior incidência (BRASIL, 2017b).

Nos últimos anos ocorreu uma redução no número de casos registrados, chegando a pouco mais de 19.000 casos em 2015 (BRASIL, 2017b), mas em virtude das características epidemiológicas da LTA, há a necessidade de desenvolver estratégias de controle flexíveis, distintas e adequadas a cada região ou foco em particular, uma vez que é constante a invasão de novas áreas de mata pelo homem, o que os expõe a fatores de risco elevados para a aquisição dessa doença, como a maior presença de mamíferos reservatórios, maior diversidade de parasitos e de vetores competentes (CAMARGO-NEVES et al., 2002; REITHINGER et al., 2007).

Figura 4: Distribuição de casos de Leishmaniose no mundo em 2013.



Fonte: WHO, 2015 (traduzido).

Tabela 1: Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por região do Brasil de 2010 a 2015.

Regiões	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Média anual
Centro-Oeste	3.163	2.274	3.118	2.922	3.038	2.937	2.909
Nordeste	8.911	7.952	8.279	5.355	4.969	5.152	6.770
Norte	7.108	8.615	10.196	8.407	10.387	8.939	8.942
Sudeste	2.428	2.179	1.388	1.150	1.460	1.762	1.728
Sul	253	317	439	296	373	493	362
BRASIL	21.981	21.395	23.547	18.226	20.296	19.395	20.807

Fonte: BRASIL, 2017b.

O controle dessa parasitose por combate aos vetores é prejudicado principalmente pela dificuldade de acesso às áreas de vegetação onde se concentram (FELICIANGELI, 2004). Além disso, a manutenção dos casos também está relacionada aos fatores ligados ao processo desordenado de ocupação urbana e a adaptação dos flebótomos às condições peridomésticas, onde os vetores encontram ambientes propícios ao seu desenvolvimento e os animais domésticos atuam como reservatórios para os parasitos, aumentando assim o caráter antropofílico dessa doença (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999; CAMARGO-NEVES et al., 2002; REITHINGER et al., 2007). Logo, o controle da LTA se concentra na orientação quanto aos cuidados a serem tomados em áreas de risco de infecção e na identificação e tratamento precoce dos casos, visto que a evolução dos casos traz grandes problemas sociais e aumentam as chances de infecções secundárias graves (REITHINGER et al., 2007).

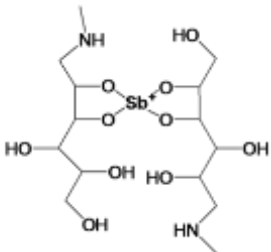
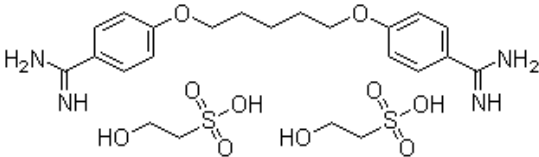
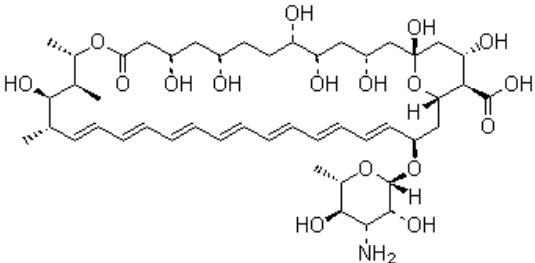
2.3. Tratamentos convencionais da LTA

2.3.1. Considerações gerais

A terapêutica contra a LTA é muito limitada, baseando-se a mais de nove décadas em preparações a base de antimônio pentavalente (RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Atualmente as principais abordagens para o tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa utilizam o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, duas formulações diferentes do antimônio pentavalente. Drogas como isetionato de pentamidina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e miltefosina, constituem opções terapêuticas aos casos de baixa eficiência dos tratamentos com antimoniais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). O tratamento recomendado no Brasil para a LTA é baseado na aplicação do antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]), mas esse apresenta alta toxicidade, efeitos colaterais e eficácia limitada no tratamento de alguns casos, o que ocasiona a elevação dos custos na terapia dessa patologia (MOREIRA; GUERRA; PETRILLO-PEIXOTO, 1992; RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; BRASIL, 2017a).

A escolha da droga a ser utilizada no tratamento das diversas formas de LTA deve levar em consideração as vantagens e desvantagens da aplicação de cada uma delas, visto que a toxicidade apresentada por algumas pode levar a piora no quadro clínico do paciente ou o surgimento de novos problemas (Tabela 2). O Ministério da Saúde do Brasil reformulou o protocolo de tratamento em 2017, como descrito no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2017a), onde o tratamento sugerido é baseado na espécie infectante e na forma clínica, visto os relatos da literatura sobre as diferenças de sensibilidade e eficácia terapêutica dependendo da espécie e forma clínica.

Tabela 2: Drogas sistêmicas utilizadas no tratamento de Leishmaniose tegumentar nas Américas^{1;2}.

Droga	Fórmula	Esquema terapêutico	Vantagens**	Desvantagens**
Antimônio Pentavalente		10 a 20 mg/kg/dia (depende da forma clínica) Mínimo: 20 dias de tratamento*	Eficácia comprovada na terapêutica; Facilidade de acesso ao tratamento.	Resistência de espécies, alta incidência de efeitos colaterais, e tratamento longo e doloroso.
Isetionato de Pentamidina		3 a 4 mg/kg/dia, em dias alternados 3 a 10 doses*	Acentuada atividade como terapia de substituição aos antimoniais; menor tempo de tratamento.	Alto custo; toxicidade por indução de diabetes <i>mellitus</i> insulino-dependente irreversível; variedade de efeitos adversos.
Anfotericina B		Convencional: 0,7 - 1 mg/kg/dia consecutivos ou alternados, não ultrapassando 50 mg/dia* 25 a 45 doses* Lipossomal: 2 - 5 mg/kg/dia consecutivo ou alternados* Até dose total de 25 a 40mg/kg	Ótima atividade como terapia de substituição aos antimoniais; menor tempo de tratamento.	Alto custo; alta toxicidade; variedade de efeitos adversos; necessidade de internação.

Fonte: (1) = WHO, 2010; (2) = BRASIL, 2017; LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucocutânea; LV = Leishmaniose visceral; (*) a quantidade utilizada por aplicação e o período de aplicação depende da forma clínica e/ou espécie de *Leishmania* envolvida; (**) DNDi, 2016; REITHINGER, 2007; WHO, 2010.

2.3.2. Principais características e efeitos adversos

Os antimoniais apresentam efeitos colaterais como mialgia, rigidez articular, dor abdominal, anorexia, alterações eletrocardiográficas e bradicardia, sendo descrito nos casos mais graves, sintomas relacionados à hepatotoxicidade, pancreatite, anemia hemolítica, nefrotoxicidade e anafilaxia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Essa série de efeitos colaterais, aliado a necessidade de aplicações diárias por longos intervalos, favorece o abandono do tratamento, o que contribui na seleção de cepas resistentes (CAMARA COELHO et al., 2011).

A pentamidina apresenta a vantagem de ter um número menor de aplicações, mas apresenta custo maior, alta toxicidade e a possibilidade de indução de diabetes *mellitus* (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), sendo associado a sua administração, ainda, efeitos colaterais como dor no local da injeção, gosto metálico na boca, cefaleia, congestão, dispneia, febre, transpiração e fadiga, além de haver a necessidade de monitoramento dos pacientes quanto à hipotensão arterial e hipoglicemia (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; KIM et al., 2016).

A anfotericina B é aplicada, originalmente, no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009), mas que se mostrou uma alternativa boa no tratamento da LTA em casos de ineficácia de outras drogas (GOTO; LINDOSO, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; CUNHA et al., 2015). Além do custo elevado, o seu uso é associado uma alta toxicidade, podendo ter manifestações agudas com náuseas, vômitos, rigidez, febre, hipertensão ou hipotensão, e hipóxia, podendo ainda ter manifestações nefrotóxicas crônicas (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), apresentando uma menor toxicidade as formulações lipossomais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; CUNHA et al., 2015).

A miltefosina é um anticancerígeno, em sua origem de aplicação, que se mostrou eficiente no tratamento oral da LC provocada pelas espécies *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e de LCD, apenas na Bolívia. Os efeitos adversos relacionados a sua administração envolvem, principalmente o sistema digestório, o que pode provocar anorexia,

náusea, vômito e diarreia, sendo também considerado um teratígeno potencial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; COELHO, 2016).

Variações quanto a eficácia contra algumas espécies, assim como aos próprios efeitos adversos que possam surgir em decorrência do uso dos medicamentos, são consequências diretas dos mecanismos de ação da droga administrada e de como o organismo interage com esses medicamentos. Conhecer os mecanismos de ação sobre os parasitos, assim como as consequências que determinada droga pode ocasionar no hospedeiro são fundamentais na hora de definir quais as metodologias melhores e mais seguras para o enfermo.

2.3.3. Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação das drogas utilizadas no tratamento da LTA ainda apresentam lacunas no entendimento, sendo descrito para os antimoniais uma ação inibitória enzimática que alteraria o metabolismo parasitário, destacando-se a sugestão da necessidade de redução biológica do antimônio pentavalente (Sb^{+5}), que seria um pró-fármaco, para o antimônio trivalente (Sb^{+3}), atuando a partir daí na inibição de oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, diminuindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP), além de ser descrito atividade estimulatória de apoptose em amastigotas (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

A ação da pentamidina está relacionada à interferência dessa droga na síntese de DNA pelo parasito, inclusive com comprometimento do cinetoplasto e mitocôndrias (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010). Também é relacionado a inibição na produção das poliaminas e alteração no potencial de membrana de mitocôndrias (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010), o que em conjunto alteram todas as funções relacionadas a transcrição e replicação do DNA, principalmente os extranucleares.

A anfotericina B interage, preferencialmente, com o ergosterol nas membranas desses protozoários, formando agregados que criam canais transmembranares que alteram a permeabilidade na membrana e, conseqüentemente, levam a morte celular (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009), podendo reagir de forma cruzada com colesterol de células humanas, o que pode ocasionar efeitos indesejados ao paciente (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

A miltefosina age na membrana celular do parasito, alterando a sua composição lipídica e, conseqüente, a permeabilidade e fluidez através da membrana, o que induz a morte celular por apoptose (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CHOUDHURY et al., 2008; COSTA FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008), além de interferir no potencial da membrana mitocondrial e na atividade da enzima citocromo-c oxidase, importante no processo de respiração celular (COELHO, 2016).

2.4. Resistência aos tratamentos convencionais

2.4.1. Mecanismos de resistência

A literatura já descreve casos de resistência de espécies de *Leishmania* as drogas sugeridas pela OMS (2017). Essa resistência a droga ocorre, principalmente, em decorrência da seleção de cepas resistentes após falha terapêutica, escolha errada do fármaco, ou abandono de tratamento.

A resistência aos antimoniais é associada geralmente ao aumento na capacidade de produção de tióis por linhagens resistentes. Os tióis, como a glutationa e a tripanotiona, são capazes de se conjugar com o metal que é o princípio ativo da droga, proporcionando a sua excreção da célula, após a formação de um conjugado, por meio de sistemas naturais de efluxo localizados nas membranas plasmáticas (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

A resistência a pentamidina também é associada ao seu efluxo da célula, sendo descrito como um mecanismo semelhante ao visto para resistência aos antimoniais, mas detalhes quanto as substâncias envolvidas e os processos relacionados ainda não são bem descritos (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; COELHO et al., 2007). Mas foi observado que clones de espécies diferentes *Leishmania*, caracterizados como resistente a pentamidina apresentaram uma absorção da droga até 75 vezes menor do que as linhagens sensíveis das mesmas espécies, em testes realizados com promastigotas cultivadas, o que foi relacionado a um menor acúmulo da droga nas mitocôndrias e, conseqüente, um mais eficiente efluxo da célula (BASSELIN et al., 2002; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

A resistência a anfotericina B é associada principalmente a presença nos protozoários de ergosterol modificado, o que reduz a eficiência da ligação da droga ao seu sítio alvo (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004), mas a apresentação de mais tióis, maior taxa de efluxo e modificação na fluidez da membrana plasmática também já foram envolvidas em casos de resistência de *Leishmania* (PURKAIT et al., 2012).

A miltefozina tem casos de resistência associadas à baixa absorção da droga, diferença na permeabilidade da membrana plasmática, metabolismo mais acelerado e atividade maior de bombas de efluxo (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; COELHO, 2016).

A pressão seletiva produzida pelo uso inadequados das drogas, ou mesmo por protocolos de tratamento incompatíveis com a espécie causadora das lesões, pode levar a emergência de novos casos de resistência (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012). Vale destacar também que a grande variedade de espécies envolvidas nessa parasitose e a grande diversidade de vetores e hospedeiros susceptíveis podem contribuir também com a seleção de cepas mais resistentes.

2.4.2. Resistência ao tratamento para LTA

A ineficiência do tratamento com o Glucantime[®], no Brasil, é associada principalmente aos casos de indivíduos infectados com *L. (V.) guyanensis*, o qual já vem apresentando resistência aos antimoniais. Esse cenário de baixa sensibilidade ao tratamento com antimoniais é mais comum principalmente na região amazônica, onde essa espécie apresenta maior importância epidemiológica, por ser a mais prevalente em casos de LTA na região (ROMERO et al., 2001; CAMARA COELHO et al., 2011; DNDI, 2016). Vale destacar, ainda, que a cura clínica aparente das infecções, dada pela cicatrização das lesões, não é “real”, uma vez que os parasitos ainda podem ser encontrados no hospedeiro, desta forma, a ocorrência de parasitos viáveis na cicatriz leva a discussão quanto a ausência de cura parasitológica (SCHUBACH et al., 1998b, 1998a; MENDONÇA et al., 2004).

Na região amazônica é utilizado, geralmente, o isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) em casos de resposta insatisfatória ao tratamento com o antimonial (BRASIL, 2017b), apesar de já haver relatos de resistência a pentamidina no Brasil (COELHO et al., 2008), o que chama a atenção para os protocolos de tratamento que vem sendo utilizados, assim como a possibilidade de reemergência de doenças parasitárias com perfis de susceptibilidade reduzidos

A ineficiência do tratamento cada vez mais constante, a falta de novas opções de drogas e a possibilidade da reemergência de algumas doenças infecciosas, cria um cenário susceptível ao surgimento e seleção de parasitos com espectro terapêutico ainda menor, limitando o já escasso aparato farmacológico atual (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; AMATO et al., 2007; DUTHIE et al., 2012). Como resultado disso, políticas para desenvolvimento de novas drogas ou formulações mais adequadas contra os parasitos estão sendo amplamente pesquisadas e incentivadas, utilizando extratos vegetais, análogos de drogas já conhecidas e micro e nanossistemas de partículas, como formas de se apontar possibilidade terapêuticas para as áreas mais deficientes (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS et al., 2008; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; MACIEJEWSKA et al., 2012; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

A partir de inovações farmacêuticas como essas, a ciência tenta produzir novas opções de tratamento, que sejam eficientes e que superem obstáculos como a alta toxicidade apresentada por algumas substâncias com potencial terapêutico.

2.5. Desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos geralmente parte de um conhecimento prévio, que envolve informações químicas sobre a substância pesquisada e sobre um alvo molecular no organismo de interesse, além de informações sobre a fisiopatologia (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Logo, a produção de análogos oferecem vantagens significativas, visto que já se conhece o grupo químico que será pesquisado, assim como seus possíveis efeitos e limitações (BELL et al., 1990; LINDSAY et al., 1991), assim como a utilização de nanossistemas, podem possibilitar uma ação mais controlada e precisa de alguma substância (BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; SINGH et al., 2012), já que prováveis mecanismos de resposta dos patógenos já são conhecidos.

A grande questão na produção de análogos é qual o grupo de substâncias é ideal para se começar os estudos, assim como para os nanossistemas quais são os elementos, substâncias ou moléculas ideais para se atingir o alvo desejado.

2.5.1. Pentamidina e seus análogos

Dentre as opções de drogas conhecidas e que apresentam potencial terapêutico para o tratamento da LTA e para a produção de análogos, a pentamidina se destaca como um modelo muito atrativo, uma vez que as principais limitações a sua aplicação estão relacionadas a sua alta toxicidade (LAI A FAT et al., 2002; COELHO et al., 2008), mas que podem ser sanadas

realizando as modificações corretas na sua estrutura (MACIEJEWSKA et al., 2012; WANG et al., 2014).

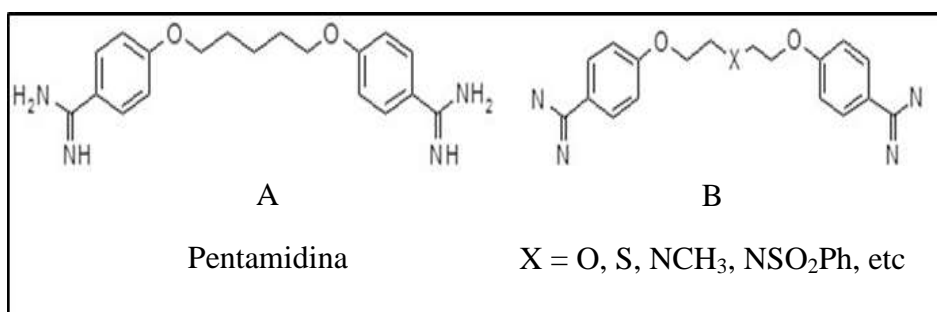
A pentamidina (CAS 100-33-4) é uma diamidina aromática utilizada em formulações salinas com o ácido isetiônico (diisetonato) e o ácido metanossulfônico (dimesilato) para o tratamento de parasitoses (KIM et al., 2016). A síntese desse composto geralmente é realizada a partir de bis-nitrilos, por metodologia de conversão de nitrilos em amidinas, descrito pela primeira vez por Pinner e Klein (1877), e posteriores reações com as amidinas (SOEIRO et al., 2013). Compostos aromáticos de bis-amidina exibem uma vasta gama de atividades contra vários patógenos, mas apenas a 1,5-bis(4-amidinofenoxy)pentano, chamada apenas de pentamidina (Figura 5.A) [STEPHENS et al., 2001], tem sido usada clinicamente, sendo inicialmente administrada para o tratamento de pneumonias por protozoários do gênero *Pneumocystis* (RUSSELL, 1959; MARSHALL; WESTON; BODIAN, 1964) e, atualmente, recomendada também para tratamentos contra a Toxoplasmose e Tripanossomíases (KIM et al., 2016).

O Centro de Controle de Doenças (CDC) sugere a utilização do isetionato de pentamidina para o tratamento da LTA nos casos de resistência as outras drogas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2013). O tratamento pelos antimoniais pentavalentes, droga de primeira escolha recomendada pela OMS, apresentam ineficácia em alguns casos, sendo o isetionato de pentamidina uma das opções para segunda escolha, se destacando em relação a anfotericina B pelo menor custo (CAMARA COELHO et al., 2011; NEVES et al., 2011). Na região amazônica, como destacada anteriormente, a espécie de *Leishmania* mais prevalente é a *L. guyanensis*, a qual tem uma resposta melhor ao tratamento com pentamidina, sendo proposto por alguns autores como a primeira escolha terapêutica (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CAMARA COELHO et al., 2011).

A elevada eficiência da pentamidina contra as formas promastigotas e amastigota da *Leishmania* está associada a uma elevada toxicidade e baixa biodisponibilidade no organismo em tratamento, o que acaba atrapalhando a sua aplicação em alguns casos (LAI A FAT et al., 2002; COELHO et al., 2008). Seus pontos negativos reforçam a necessidade da pesquisa de análogos ou derivados que proporcionem a manutenção da sua atividade leishmanicida, mas que tenham eficiência maior e toxicidade menor do que as observadas na utilização da pentamidina.

A maior parte das abordagens para a descoberta de novos medicamentos se concentram no desenvolvimento de novos ligantes que possam ser associados a estruturas com potencial efeito terapêutico (LINDSAY et al., 1991). O desenvolvimento de análogos de pentamidina com diferentes heteroátomos (p.e.: O, N e S) [Figura 5.B] no ligante alifático ainda é um campo bom a ser explorado e que apresenta grande potencial de sucesso (MACIEJEWSKA et al., 2012), sendo descrito na literatura a obtenção e aplicação desses compostos contra leishmânias (BELL et al., 1990; TYAGI et al., 2013).

Figura 5: Pentamidina (A) e possíveis modificações para produção de análogos (B)



Fonte: Maciejewska et al. (2012), adaptado.

Geralmente, a inclusão de um heteroátomo no ligante alifático é associada a maior atividade contra patógenos, o que pode representar também efeitos secundários menores em mamíferos hospedeiros em tratamento (WANG et al., 2014), sendo a escolha do melhor elemento a ser incluído fundamental para o sucesso na produção de novas substâncias.

A introdução do Flúor (F) em moléculas biologicamente ativas proporciona oportunidades atraentes no desenvolvimento de novas drogas, uma vez que aproximadamente um terço dos medicamentos de alto desempenho, disponível atualmente no mercado, contém átomos de flúor em suas estruturas. A adição de F às estruturas químicas, destacando a boa estabilidade que as ligações entre esse elemento e o Carbono (C) mantêm, são excelentes ferramentas para aumento de meia vida da droga, evitando, inclusive, a produção de metabólitos tóxicos como resultado do metabolismo de substâncias aromáticas, por exemplo (SWINSON, 2005; WANG et al., 2014).

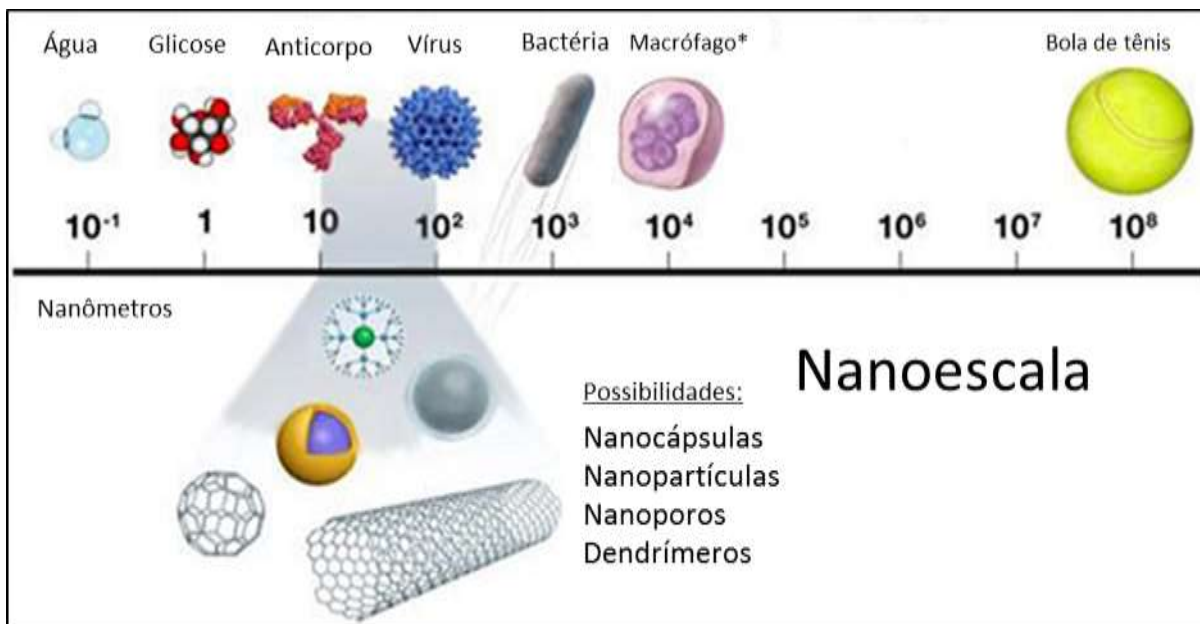
Dados como esses sugerem claramente que o flúor tem um papel primordial em projetos químicos voltados à drogas medicinais, sendo rotina no desenvolvimento de medicamentos a adição desse elemento para obter melhorias nas suas características (SWINSON, 2005). Apesar disso, derivados de pentamidina que utilizam ligantes fluorados ainda não são conhecidos, sendo um campo a ser explorado no desenvolvimento de drogas contra espécies causadoras de LTA.

2.5.2. A Nanomedicina

A nanomedicina corresponde a uma das áreas, das múltiplas áreas da nanotecnologia, que se baseia na aplicação biomédica de nanomateriais para os mais diferentes fins, que englobam desde a área de diagnóstico até a produção de novas drogas (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008; ALAGARASI, 2013). Para se enquadrar na categoria de nanomaterial, as dimensões do produto devem estar entre 1 - 100 nanômetros, tamanhos tão ínfimos que se vão desde uma molécula de glicose até uma estrutura viral (Figura 6) [THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; ALAGARASI, 2013].

A utilização de dimensões tão reduzidas assim confere um aumento na área de superfície desses materiais, o que geralmente é relacionado a aumento da atividade química elementar do material (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; ALAGARASI, 2013) e variações em propriedades físicas, químicas e biológicas, possibilitando à exploração de materiais que seriam tóxicos em outras condições, ou mesmo de materiais de áreas diversas a saúde (FERREIRA et al., 2011).

Figura 6: Escala nanométrica comparativa. *Exemplo de célula eucariota.



Fonte: <http://introtonanotechnology.weebly.com/the-nanoscale.html> (adaptada)

2.5.3. Nanotecnologia farmacêutica e suas possibilidades

A indústria farmacêutica busca, por meio da nanotecnologia, desenvolver novos sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica que sejam capazes de direcionar e/ou controlar a liberação de fármacos, melhorando assim seu potencial farmacológico, ou mesmo induzir células parasitadas a apoptose (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; SINGH et al., 2012).

A malária é um exemplo de doença provocada por parasitos e que sofre com os mesmos problemas na sua terapêutica por quais passam os acometidos pela LTA, mas que vem a mais tempo investindo em soluções para uma maior e melhor distribuição de drogas no tratamento da malária, utilizando nano e microssistemas para esse objetivo (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012), sendo destacado o sucesso também em abordagens desse tipo para o

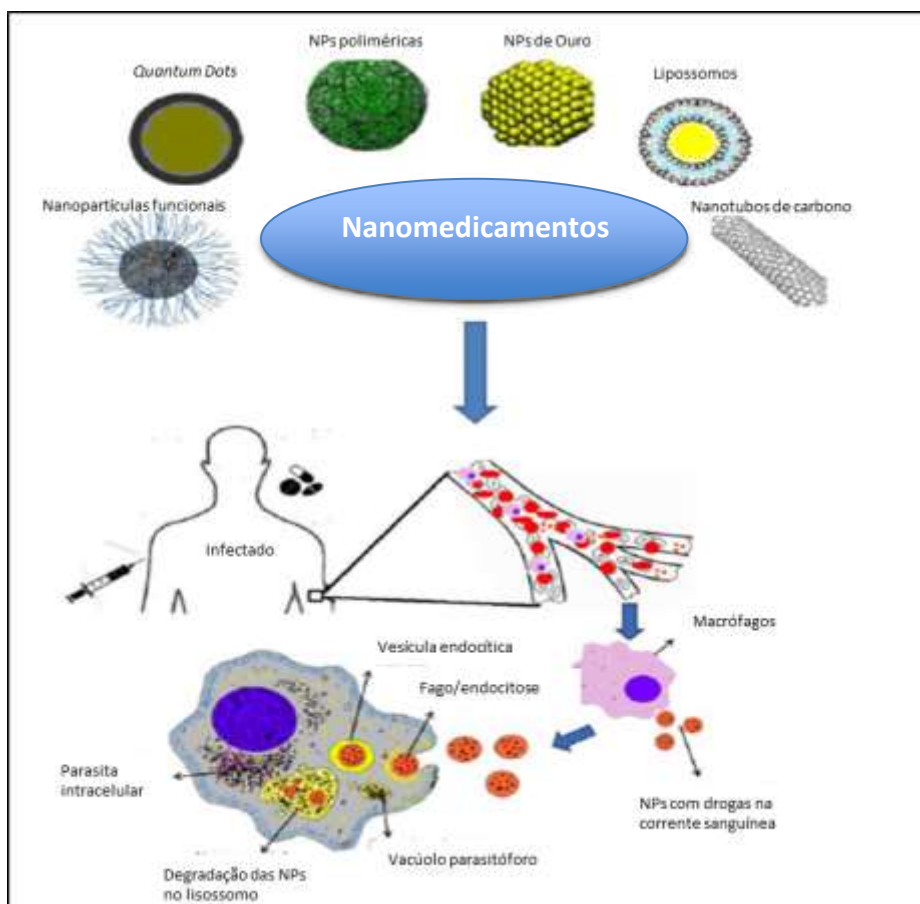
tratamento das leishmanioses (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014; FRANCO et al., 2016).

A utilização desses sistemas permite um melhor controle da cinética de liberação dos fármacos no organismo, o que pode amenizar os efeitos tóxicos das drogas, assim como poderia regular a manutenção de concentrações menos danosas ao paciente por períodos de tempo mais extensos, o que colaboraria com o sucesso do tratamento (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010). Além dessa regulação na liberação, esses sistemas podem ser utilizados para aumentar a biodisponibilidade, devido ao aumento na penetração celular, além de proteger os fármacos contra mecanismos de desintoxicação do organismo tratado, o que somaria no aumento da eficácia desses compostos (PIMENTEL et al., 2007; CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014).

As nanopartículas são partículas poliméricas na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica ou inorgânica) nas quais o fármaco está encapsulado, adsorvido ou absorvido pelo material da matriz (Figura 7) [PIMENTEL et al., 2007]. Alguns desses sistemas, que são compostos por partículas (ou moléculas) inorgânicas de até 100 nm, podem ser complexados a moléculas inorgânicas, orgânicas ou bio-orgânicas, com alguma atividade farmacológica conhecida, contribuindo para a ação delas. Essa complexação pode inserir sinalizadores para receptores específicos de uma célula alvo facilitando a endocitose das partículas, ou proteger o fármaco complexado da ação do organismo, garantindo uma maior biodisponibilidade (PIMENTEL et al., 2007; FRANCO et al., 2016).

Nanopartículas metálicas são estudadas na atualidade para verificar a sua eficácia na inibição de parasitos e células infectadas, sendo descrito na literatura a utilização de metais como ouro, zinco, prata, titânio, cobre, entre outros metais, contra diversos microrganismos patogênicos, inclusive com relato de atividade contra *Leishmania* (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; RAMEZANI; JEBALI; KAZEMI, 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014). Como existem muitos elementos químicos na natureza com potencial para promover influências significativas na saúde humana (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016), ainda existindo um grande campo que pode ser explorado na produção de drogas a partir de elementos que já tiveram sucesso na síntese de nanoformulações ou que apresentam potencial para serem utilizados por apresentarem semelhanças químicas com os bem sucedidos.

Figura 7: Formulações nanométricas aplicadas na medicina.



Fonte: BHARDWAJ *et al.*, (2012) [adaptado].

A utilização de óxidos metálicos na produção de nanopartículas é uma das principais abordagens na utilização de metais no tratamento experimental de parasitoses (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014; FRANCO *et al.*, 2016), e a exploração de novos elementos devem buscar propriedades semelhantes a essas bem sucedidas. Dentre os diversos elementos que poderiam ser explorados, o Nióbio (Nb) e o Tântalo (Ta) se destacam por apresentarem características químicas semelhantes ao Antimônio (Sb), como baixa toxicidade para humanos e possibilidade de produção de óxidos (KIM *et al.*, 2016), além de ter o atrativo comercial do Brasil estar entre as maiores reservas desses minerais no Mundo, sendo o maior produtor mundial de Nb e o segundo maior produtor de Ta (USGS, 2017).

O Nióbio é um metal, considerado de transição, com número atômico 41 e massa molar 92,9064 g/mol, utilizado principalmente na indústria siderúrgica para produção de ligas metálicas (KIM et al., 2016). Esse metal vem sendo pesquisado na esfera da saúde principalmente quanto ao potencial de promoção de angiogênese, mobilização de resposta celular e indução de inflamação (SAGHIRI et al., 2016), mas também é relacionado como potencial para produção de antivirais (CHELLAN; SADLER, 2015) ainda sendo pouco explorado quanto a aplicações contra parasitos, como os da *Leishmania*.

O Tântalo também é um metal de transição, apresentando número atômico 73 e massa molar 180,9479 g/mol, sendo um dos principais componentes em implantes e próteses, graças a sua resistência e por não causar rejeições, mas também é utilizado na indústria para produção de componentes eletrônicos e equipamentos que precisam resistir a situações de estresse mecânico e químico dos mais diversos (KIM et al., 2016). É outro candidato a exploração para fins farmacêuticos, não tendo informações descritas para aplicações nanométricas na terapêutica parasitária, sendo comumente identificado como elemento inerte e de aplicabilidade possível em diversos tipos de enxertos e implantes (CHELLAN; SADLER, 2015).

A escolha desses elementos também deve levar em consideração a aplicabilidade da substância contra células cancerígenas, o que a literatura já relacionou ter um bom potencial contra leishmânias pelo seu acelerado processo replicativo (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014). Vale destacar, a partir disso, que o Ta já vem sendo pesquisado para cânceres, como marcador para diagnóstico e para ação local nas células (JIN et al., 2015), o que chama a atenção para sua aplicação contra leishmânias, e que apesar de não haver dados semelhantes para o Nb, esse elemento trás grandes semelhanças físico-químicas com o Ta, sendo também um candidato a esse tipo de estudo. A aplicação desse tipo de tecnologia contra a LTA pode revolucionar o campo da terapêutica contra parasitoses, podendo ainda abrir caminho para o tratamento de outras enfermidades provocadas por protozoários e que sofrem problemas quanto a eficiência dos tratamentos (BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014).

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a eficácia de análogos fluorados de pentamidina e de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIBs) de Nióbio e de Tântalo contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Específicos

Capítulo 1

- Avaliar a eficácia leishmanicida, contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, e a citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos dos análogos fluorados 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-3,3-difluoropentano (5A2F) e de 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano (5A6F);

Capítulo 2

- Avaliar a eficácia dos análogos fluorados 5A2F e 5A6F no tratamento experimental da LCA em camundongos (*Mus musculus*) Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*;

Capítulo 3

- Sintetizar e caracterizar Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas de óxidos de Nióbio (NIB-Nb) e de Tântalo (NIB-Ta);
- Avaliar a eficácia leishmanicida, contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, e a citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos, das NIB-Nb e NIB-Ta;

Capítulo 4

- Avaliar a eficácia das NIB-Nb e NIB-Ta no tratamento experimental da LCA em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

CAPÍTULO 1

Comparative Leishmanicidal Activity of Fluorinated Analogs of Pentamidine Hydrochloride and Pentamidine Isethionate (Pentacarinat[®])

(Artigo Submetido – ANEXO-A)

Pedro Ruel Cândido Domingos,^{a,b,#} Fabiane Veloso Soares,^b Iryna Grafova,^c Yurii Pustovit,^d Anatoliy Alekseenko,^d Andriy Bezdudnyy,^d Antonia Maria Ramos Franco,^b Andriy Grafov^c

^aPost-Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil;

^bLaboratory of *Leishmaniasis* and Chagas Disease, National Institute of Amazonian Research, Manaus, Amazonas, Brazil;

^cDepartment of Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, 00560 Helsinki, Finland;

^dInstitute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Murmanska str.5, 02660 Kyiv, Ukraine.

Running Head: Analogs of Pentamidine against *Leishmania spp.*

Abstract

The use of substances containing fluorine may provide therapeutic advantages in the administration of such analogues of pentamidine. The results herein presented indicate the efficacy of the analogues against two distinct subgenus and species of *Leishmania*, in both evolutionary stages of the parasite, when compared to the treatment using pentamidine isethionate (Pentacarinat[®]) and pentamidine hydrochloride (5AHCl), as well as variations regarding cellular toxicity when compared to pentamidine in experimental models *in vitro*. Based on the *in vitro* results, the most promising was the analogues 5A6F, but also with good results the use of 5A2F, since the results showed little difference between the analogues and Pentacarinat[®] and that success in applying any treatment depends on how it will behave in *in vivo* models.

Keywords: *Leishmaniasis*, Pentamidine, Fluorinated Analogs, Neglected disease

Introduction

The American Cutaneous *Leishmaniasis* (ACL) is a disease characterized by a variety of lesions on the skin and / or mucosa caused by species of the genus *Leishmania*, which vary in form of manifestation and can lead to severe and disfiguring injury (1). Treatment with Pentavalent Antimonate/Glucantime[®], the first-choice drug recommended by WHO (2014), may be ineffective in some cases, with Pentamidine isethionate (Pentacarinat[®]) as one of the alternative options, in addition to Amphotericin B (2-5). In the Amazon region, the most prevalent species is *Leishmania (Viannia) guyanensis*, which has a better response to treatment with Pentamidine, and is proposed by some authors and the Brazilian Ministry of Health as the first therapeutic choice (4-6).

Pentamidine (CAS 100-33-4) is an aromatic diamidine used in saline formulations with isethionic acid (diethionate) and methanesulfonic acid (dimesylate) for the treatment of parasites (2, 7, 8). The synthesis of this compound is generally performed from bis-nitrile, by method of conversion of nitriles to amidines and subsequent reactions between amidines, first described by Pinner and Klein in 1877 (9). Bis-amidine aromatic compounds show a wide range of activities against several pathogens (10), but only 1, 5-bis (4-amidinophenoxy) pentane (pentamidine) has been used clinically, which was initially administered for the treatment of pneumonia caused by protozoa of the genus *Pneumocystis* (11, 12) and is currently recommended for treatment of Toxoplasmosis and Trypanosomiasis (8, 13).

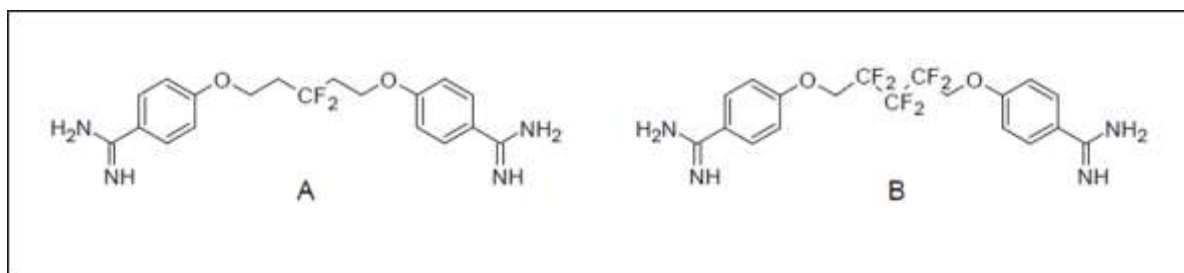
The Centers for Disease Control (CDC) suggests the use of pentamidine isethionate against ACL in cases of resistance to other treatments (14). The inefficiency of treatment (4-6, 15) and increased susceptibility of some species of the genus *Leishmania* to diamidines (16, 17), are the main reasons to indicate the pentamidine as a therapeutic choice against ACL.

The activity of pentamidine is associated with high toxicity and low bioavailability, indicating the necessity for derivatives that provide greater therapeutic efficiency without toxicity. Approaches for the discovery of new drugs currently focus on the development of new ligands that may be associated with structures with potential therapeutic effect (18). The development of pentamidine analogues with different heteroatoms (O, N and S) in the aliphatic linker is still an important field to be explored and has great potential for success (19, 20). In general, the inclusion of a heteroatom in the aliphatic binder is associated with

increased activity against pathogens, which may also represent minor side effects in host mammals undergoing treatment (20). Fluorine (F) is an opportunity to develop new drugs, as it is currently found in approximately one-third of the high-performance drugs available on the pharmaceutical market. The use of F in chemical structures with known pharmacological properties has already been associated with improvement in action, increased bioavailability and lower production of toxic metabolites, being routine the addition of Fluorine in the development of new drugs (20, 21).

In this study, the leishmanicidal activity (LAct) of new fluorinated bis-benzamidines (Figure 1) was tested against different species that cause ACL with epidemiological importance in the Amazon region.

Figura 8: (Figure 1) Bisamidines 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride (A) e 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane dihydrochloride (B).



Results

The results described below were used to estimate the efficacy of the proposed treatments on the different species and evolutive forms of the genus *Leishmania* when compared with Pentacarinat[®] (Pentamidine isethionate), one of the drugs used to treat the ACL in Brazil. This type of analysis suggests which substances could be also indicated for treating ACL patients with lower cytotoxicity and better leishmanicidal effects.

Leishmanicidal activity (LAct) - assays with promastigote forms: The 5A2F and 5A6F diamidines, as well as the positive control with Pentacarinat[®], presented LAct against promastigote forms of the species tested, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *L. (Viannia) guyanensis*. The effects of dose-dependent and cumulative response were evident in the assays (Figure 2). The 5AHCl, used as a control of the synthesis, was more effective than all the treatments performed in this study, even in relation to the commercial treatment (Pentacarinat[®]); however, with the increase in concentration, all the parasites tended to show 100% mortality rate 48 hours after initial exposure. There was variation of the IC₅₀ between the *Leishmania* species and the substances used for each compounds (Table 1).

Figura 9: (Figure 2) Leishmanicidal activity of diamidines against promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A.2 and B.2 - 48 hours. 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.

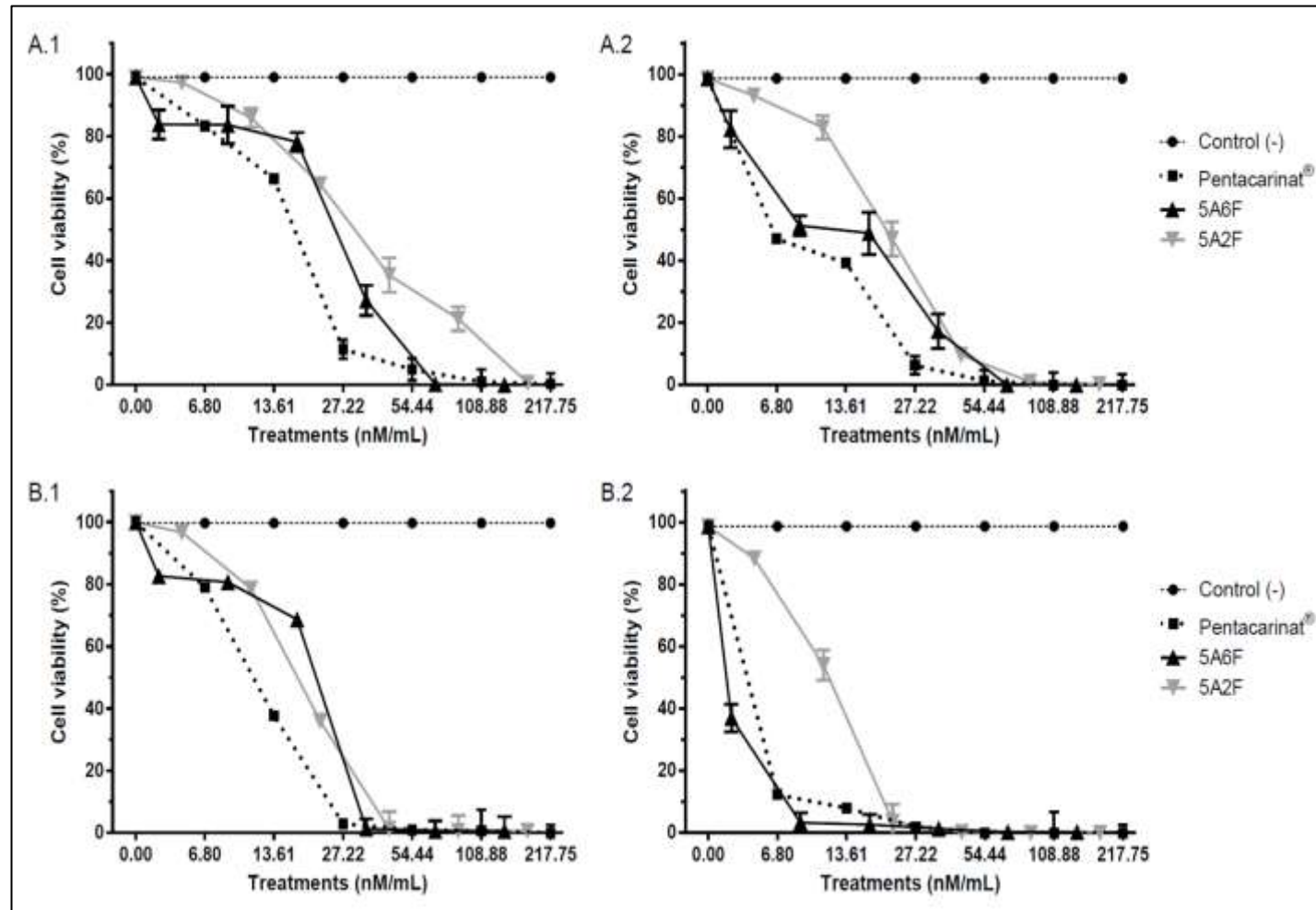


Tabela 3: (Table 1) Inhibitory concentration (IC₅₀) estimated on promastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* exposed to treatment with diamidines for 24-48 hours. 5A2F and 5A6F = Fluorinated analogs of pentamidine; ** = Not measurable.

Species of <i>Leishmania</i>	Experimental treatments					nM/mL
	Exposure (hours)	Pentacarinat [®]	5AHCl	5A2F	5A6F	
<i>L. amazonensis</i>	24	47.94 ± 1.24	29.90 ± 1.48	71.66 ± 1.69	49.50 ± 2.70	nM/mL
	48	11.54 ± 9.28	22.72 ± 2.49	50.98 ± 2.94	31.13 ± 3.72	nM/mL
<i>L. guyanensis</i>	24	17.53 ± 3.06	5.71 ± 3.90	45.17 ± 2.20	41.03 ± 0.70	nM/mL
	48	**	**	18.61 ± 0.95	**	nM/mL

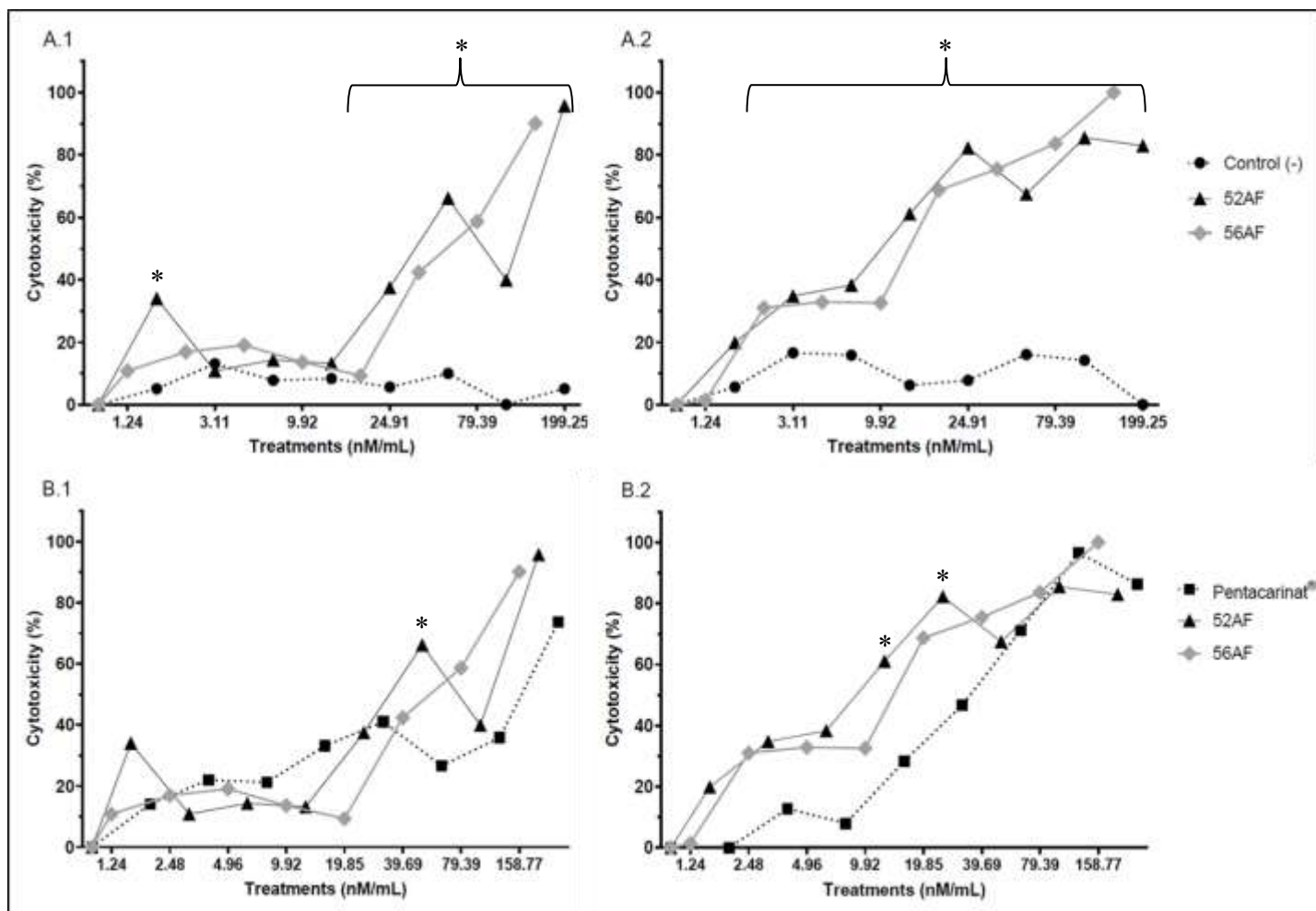
The concentrations required to reach 50% efficacy on *L. (L.) amazonensis* promastigotes were higher in all treatments when compared to *L. (V.) guyanensis*, which indicates a higher resistance of this species to the diamidines. When comparing the IC₅₀ of the analogues, a higher activity of 5A6F was observed in relation to 5A2F against the species evaluated, also showing a lower activity to the treatment against *L. (V.) guyanenses* compared to Pentacarinat[®], but presenting similar efficacy against *L. (L.) amazonensis*. Such data demonstrates greater efficacy of 5A6F compared to 5A2F, determined from IC₅₀ values analysis, being lower for 5A6F, although the results were lower than the controls.

Cytotoxicity: After analyzing the cytotoxicity of the treatments, a significant variation was observed between them (ANOVA two-way, $p < 0.05$). However, when comparing the analogs with the negative control, the variation was not significant after 24 h of exposure at the lowest concentrations evaluated (up to 19.85 nM/mL), showing an increased toxic effect compared to the negative control from 24.91 nM/mL for 5A2F and 5A6F, based on the *Tukey* test ($p < 0.05$) [Figure 3, A.1]. According to the same test, there is no significant

variation between the values observed for the analogs in relation to the positive control, which indicates for the same cytotoxicity profile (Figure 3, B.1), except for 49.81 nM/mL of 5A2F.

After 48 h of exposure, the positive change in cytotoxicity analysis from the negative control is already evident from 9.92 nM /mL (Figure 3, A.2). No significant variation was verified between the analogues and Pentacarinat[®], except for treatment with 5A2F (12.45 to 24.91nM/mL), after treatment for 48 h, according to *Tukey's* test ($p < 0.05$) [Figure 3, B.2].

Figura 10: (Figure 3) Cytotoxicity in murine peritoneal macrophages after exposure to diamidines for 24 (A.1 and B.1) and 48 hours (A.2 and B.2). A.1 and A.2 = "*" indicates significant difference (*Tukey's test*, $p < 0.05$) between analogue and negative control (saline solution). B.1 and B.2 = "*" indicates significant difference (*Tukey's test*, $p < 0.05$) between analogue and Pentacarinat®; 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidina.



Leishmanicidal activity (LAct) - assays with amastigote forms: From the percentage of cells infected by viable amastigote forms (without apparent morphological changes), the infection rate (IR) was estimated, and a reduction in IR was verified in all treatments against both species when compared to negative controls (*Tukey's test, p <0.05*). The effect against *L. (L.) amazonensis* presented variation when treatments are compared, with the analogous 5A6F being more efficient than 5A2F in all the concentrations tested after 24 h of exposure, except for the initial concentration, in which there was no significant difference between the analogues, besides no significant difference between treatments with Pentacarinat[®] and 5A6F (*Tukey's Test, p <0.05*) [Figure 4, A.1]. After 48 h exposure to fluoridated diamidines at concentrations of 50.00 and 25.00 nM/mL, no significant difference was observed in relation to the control with Pentacarinat[®], but at lower concentrations the 5A6F was less effective than all other substances, including control of synthesis / 5AHCl (*Tukey's test, p <0.05*) [Figure 4, A.2].

There was no significant difference in any of the concentrations used in the trials against *L. (V.) guyanensis* after 24 and 48 h of exposure between the analogues and the controls used, Pentacarinat[®] and 5AHCl (*Tukey's test, p <0.05*), with the reduction of IR after the longer exposure period (Figure 4, B.1 and B.2).

The number of amastigotes per macrophage varied, decreasing with respect to the number observed in the negative control, but there was no significant variation when comparing the different concentrations of the same treatment (Table 2).

The percentage of Efficacy (%E) of fluorinated analogues against *L. (L.) amazonensis* was lower than Pentacarinat[®] at concentrations of 50.00 - 12.50 nM/mL and at 6.25 nM/mL for 5A2F, after 24 h of exposure. When evaluated to %E on this same species after 48 h of treatment, 5A2F showed superior efficacy compared to Pentacarinat[®] and to 5A6F at concentrations of 50.00 - 12.50 nM/mL. The efficacy against cells parasitized by *L. (V.) guyanensis* after 24 h was higher for 5A2F than Pentacarinat[®] and 5A6F at 12.50 and 6.25 nM/mL, and was lower than Pentacarinat[®] in 50 nM/mL. After 48 h, the efficacy of 5A6F stands out in relation to the other two treatments at concentrations of 12.50 and 6.25 nM/mL, maintaining similar results to Pentacarinat[®] at 25.00 nM/mL and lower at the highest concentration (50.00 nM/mL) [Figure 5].

Figura 11: (Figure 4) Rate of infection (IR) of macrophages by amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A.2 and B.2 = 48 hours. "*" Indicates significant difference (Tukey's test, $p < 0.05$) between analogue and Pentacarinat[®]; 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.

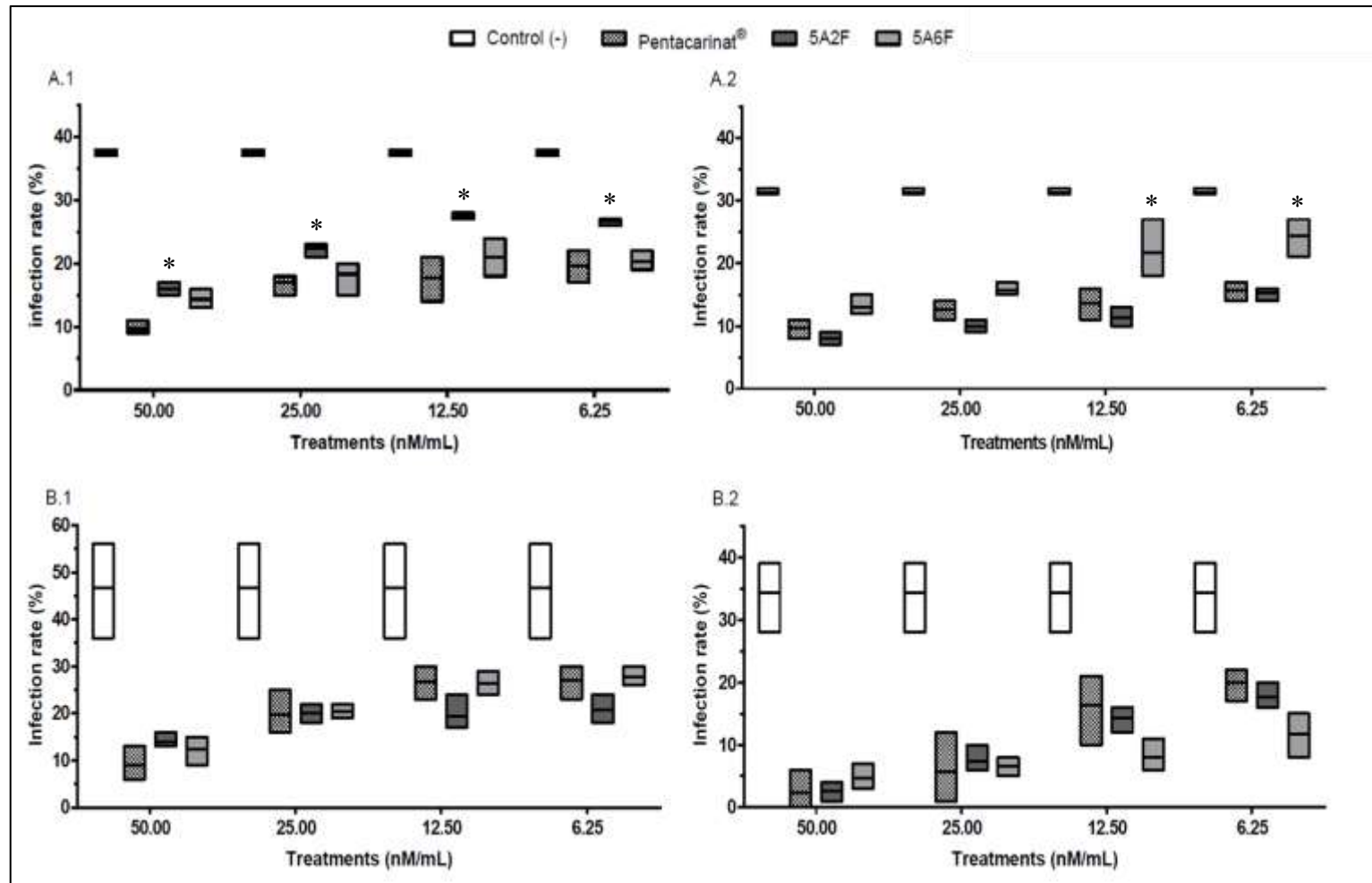


Figura 12: (Figure 5) Percentage Efficacy (%E) of the analogues of macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 and B.1 = 24 hours; A.2 and B.2 = 48 hours. "*" Indicates significant difference (Tukey's test, $p < 0.05$) between the analogues and Pentacarinat[®]; 5A2F and 5A6F = fluorinated pentamidine analogues.

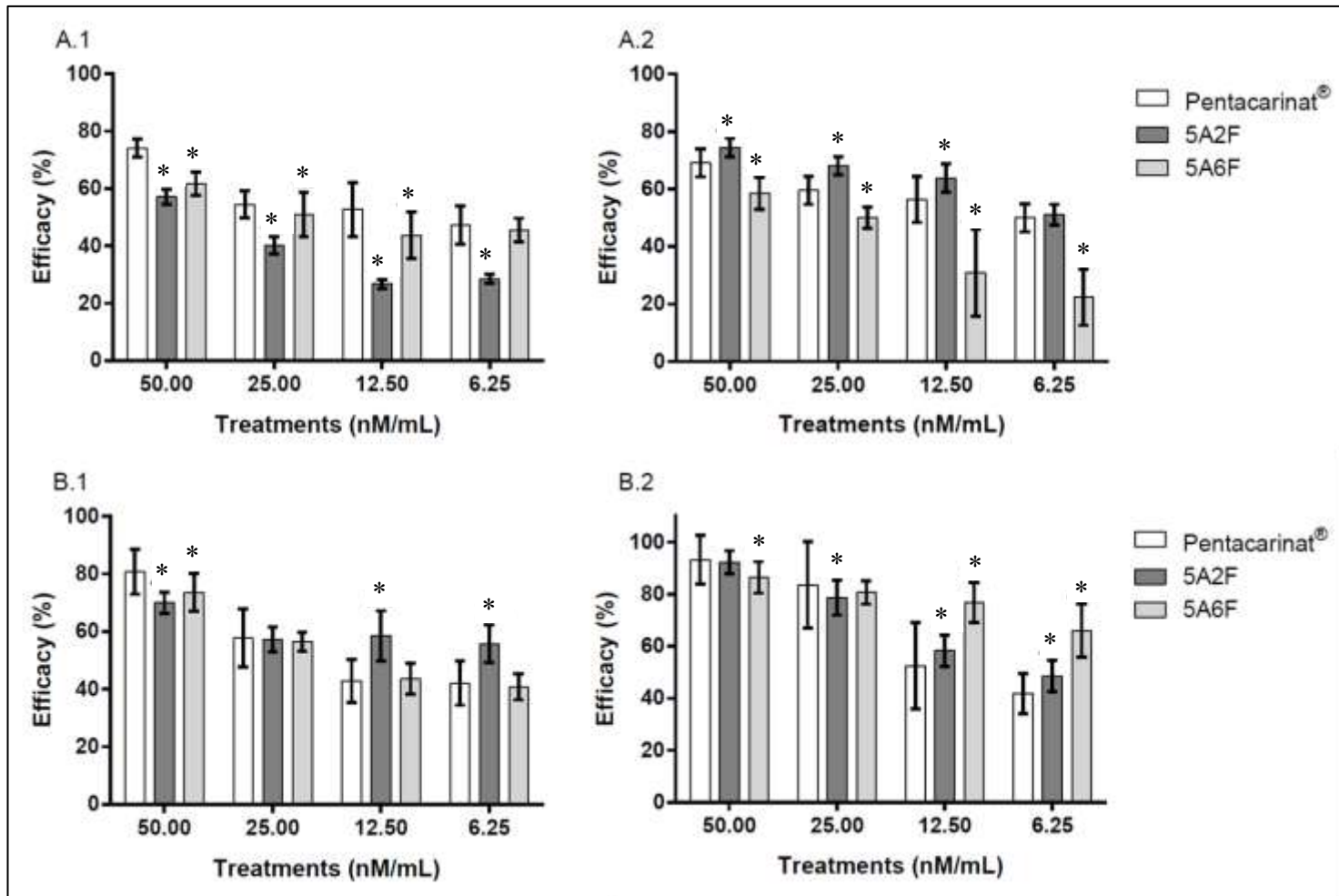


Tabela 4: (Table 2) Mean of amastigotes by infected macrophage after treatment with diamidines for 24-48 hours. 5A2F and 5A6F = fluorinated analogues of pentamidine.

Exposure (hours)	nM/mL	Control (-)	Pentacarinat [®]	5A2F	5A6F
24	50.00		1.22 ± 0.44	1.67 ± 0.87	1.89 ± 1.05
	25.00	2.22 ± 0.83	1.30 ± 0.48	1.50 ± 0.71	1.80 ± 0.79
	12.50		1.70 ± 0.67	1.90 ± 0.88	1.70 ± 0.82
	6.25		2.20 ± 1.14	2.00 ± 0.67	2.00 ± 0.67
50.00	1.11 ± 0.33		1.44 ± 0.73	1.78 ± 0.83	
48	25.00	2.78 ± 0.83	1.30 ± 0.48	1.60 ± 0.84	1.60 ± 0.84
	12.50		1.40 ± 0.52	1.90 ± 0.88	2.00 ± 0.82
	6.25		1.50 ± 0.53	2.00 ± 0.82	1.90 ± 1.10

Discussion

The results of leishmanicidal effects in *in vitro* experimental models showed the efficacy of the analogues, as well as Pentacarinat[®], being possible to observe the activity against both evolutive forms of *Leishmania* of the *Leishmania* and *Viannia* subgenus. The high efficiency of these compounds is mainly associated with the mechanism of action of diamidines, based mainly on the binding of the drug to the parasitic DNA, among other nuclear components (15, 23, 24). In addition, it is important to observe the potentiality of the analogues proposed in the present study, since the literature describes the action of diamidines on diverse pathogens, such as bacteria, fungi and protozoa, already described (15, 25-27).

The LAct against promastigotes showed differences when compared to the two proposed species of *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*, corroborating

the results from literature that have showed such diversity in susceptibility to diamidinics (5, 15-17). Although different, the IC₅₀ remained on the nM/mL scale, the 5A6F analogue stood out for its effect on the two species/subgenus, with similar results to the positive control (Pentacarinat[®]) on *L. (L.) amazonensis* after 24h and *L. (V.) guyanenses* after 48 h. The literature describes a high effect of Pentacarinat[®] on *L. (V.) guyanenses* (4, 5). The Brazilian Ministry of Health recommends this medicine as the first choice in the treatment of ACL caused by this species (6). The higher susceptibility of *L. (V.) guyanensis* to diamidinics was also verified in the present study, in which the lower IC₅₀ were observed for this species.

The variation in the susceptibility of the amastigotes to the diamidinics was also verified, in which it was possible to observe the lower infection rate (IR), after the treatment, in the macrophages that were parasitized with *L. (V.) guyanensis*. The difference in sensitivity to LAct was evident even when the effects between the two fluorinated analogues were compared, since 5A2F achieved the lowest IR, but without significant difference in relation to Pentacarinat[®] (*Tukey's test*, $p < 0.05$), in the macrophages with *L. (L.) amazonensis*, whereas the 5A6F analog had the lowest IR in the macrophages with *L. (V.) guyanensis* (Figure 5).

This type of observation is fundamental when referring to the identification of the species of the parasite involved in the infection. Even in the WHO protocol it is suggested that differentiated treatments depending on the clinical form and / or the species involved in the infection should be considered (6).

The high toxicity and low bioavailability of diamidines, including pentamidine, has been described in the literature as one of the main reasons for its non-administration, despite its good activity against different forms and species of *Leishmania*, among other pathogens of medical interest (28, 29). Analogues 5A2F and 5A6F showed cytotoxicity greater than 40% at concentrations of 24.91 nM/mL, but at lower concentrations showed low toxicity when compared to the negative control. Toxicity data showed the similarity between the analogues and Pentacarinat[®], in which only 5A2F showed higher toxicity than the positive control used (Figure 3).

The limitations observed herein, mainly regarding susceptibility and toxicity, are the main reasons for producing new analogues, since the development of new ligands may allow greater therapeutic potential, with greater bioavailability and lower production of toxic metabolites (30). This toxicity is described in the scientific literature with the same

importance of the action of the compound on the parasites to define the success in the treatment, since the high toxicity would prevent the therapeutic application. Cytotoxicity ratings usually point to increased toxicity with increased concentration, where there are analogues that show cellular toxicity from 1.69 μM of IC_{50} , but which may have IC_{50} higher than 195 μM (26, 31, 32). It is important to note that low cytotoxicity is often associated with a lower antiparasitic effect.

The literature has described the application of pentamidine analogues against *Leishmaniasis* in promastigote forms, in which the lowest dose of the analogues was 0.290 μM , but reached concentrations higher than 108.00 μM in the IC_{50} for *Leishmania (Leishmania) donovani* (33). BELL *et al.* (1990) described the effect of non-fluorinated analogues on amastigotes of *L. (L.) amazonensis*, and other protozoa, in which it describes IC_{50} ranging from 0.298 ± 0.055 to 26.243 ± 1.952 μM , concentrations higher than those used in this study (32). TYAGI *et al.* (2013) evaluated the effect of pentamidine analogues (pyrimidine-pentamidine hybrids and chalcone-pentamidine hybrids) against amastigote of the *Leishmania (L.) donovani*, in which IC_{50} ranged from 0.30 to 28.39 μM , also higher than those used in this study. In another study with axenic amastigotes of *Leishmania (L.) donovani*, Bakunova *et al.* (2009) calculated the IC_{50} of several pentamidine analogues at concentrations ranging from 0.254 to more than 200 μM (31). All the authors emphasized the importance of the research of new components, highlighting the great variety of answers that can be found depending on the type and location of the addition made to the structure of the diamidinic (26).

Verma *et al.* (2010), using quantitative structure-activity relationships (QSAR), demonstrate that substitutions on the aromatic ring and / or amines may decrease the activity of these analogues on parasites of the genus *Leishmania*, as compared to pentamidine, since this type of modification was associated to the difficulty of interaction between the analog and one of the action sites of pentamidine, the topoisomerase II (34). This report highlights the proposed structures, 5A2F and 5A6F, as interesting options because there are no additions in the rings, which may have contributed to the maintenance of the antiparasitic effect, comparable to Pentacarinat[®] in several of the trials.

Pentamidine analogues with additions and/or substitutions on the benzene radicals of the molecule or between them, in the aliphatic chain, were associated with better action against the parasite or to lower concentrations compared to pentamidina (19, 30, 31, 33, 35).

This observation, despite opposing that described by Verma *et al.* (2010) [34], emphasizes that both position and substitution are important for the final result of the compound. It has been also reported in the literature the lower cytotoxicity of these analogues against cell lines (19, 26, 31).

The selection of fluorine for the synthesis of 5A2F and 5A6F analogs has taken into account the existence of several successful examples in the production of new bioactive substances from the addition of this element. In the literature, it is described that one-third of the high-performance drugs currently available in the pharmaceutical industry contain F in their structures (20-22). Fluorine is interesting to the industry because it offers several advantages for the molecules that are inserted: diversity of physical properties and chemical reactivity, good stability of carbon bonds (C) and receptivity of enzymatic receptors, increase of liposolubility and consequent rates *in vivo* absorption and transport of the drug, increased oxidative and thermal stability, as well as limiting the enzymatic deactivation of these substances. These possibilities exist due to their high electronegativity, small atomic radius and low polarizability of the link that exists between C – F (20-22, 36, 37). This type of approach makes it possible to obtain drugs with an increased half-life and to produce less toxic metabolites as a result of the metabolism of aromatic substances (20-22, 38). Increasing the half-life of a drug allows the administration of lower drug concentrations or longer intervals between each application, which minimizes the toxic effects of the substances in the organism treated. This data clearly suggests that fluorine plays a key role in drug-related chemical designs, with the addition of this element being a routine in drug development to achieve improvements in its characteristics (20-22).

The effect of fluorinated analogs of pentamidine on *L. (L.) donovani* and mammalian cell line was evaluated by Bakunova *et al.* (2009). It was verified at the end of the study that fluorine insertions in the aromatic ring did not alter the LAct in relation to the control (26). The author also pointed out the loss of parasitic activity when the modifications were made using hydroxylates, esters and amides, a fact that emphasized the importance of fluorine in the development of more efficient analogues.

The results of this study demonstrate a good efficacy of the analogues against two distinct species of *Leishmania*, of different subgenus, in distinct evolutionary phases of the parasite. The results could be comparable with those of pentamidine isethionate (Pentacarinat[®]) in the *in vitro* model. This was the first report of the application of these

substances, 5A2F and 5A6F, against different *Leishmania* species/subgenus of medical importance in the development of ACL from Brazil. In addition, the tested analogues seem promising, since the literature already reports the advantages that fluorine can bring the chemical structures, in addition to highlighting the lower loss in efficacy of products obtained from modifications in the aliphatic chain of pentamidine.

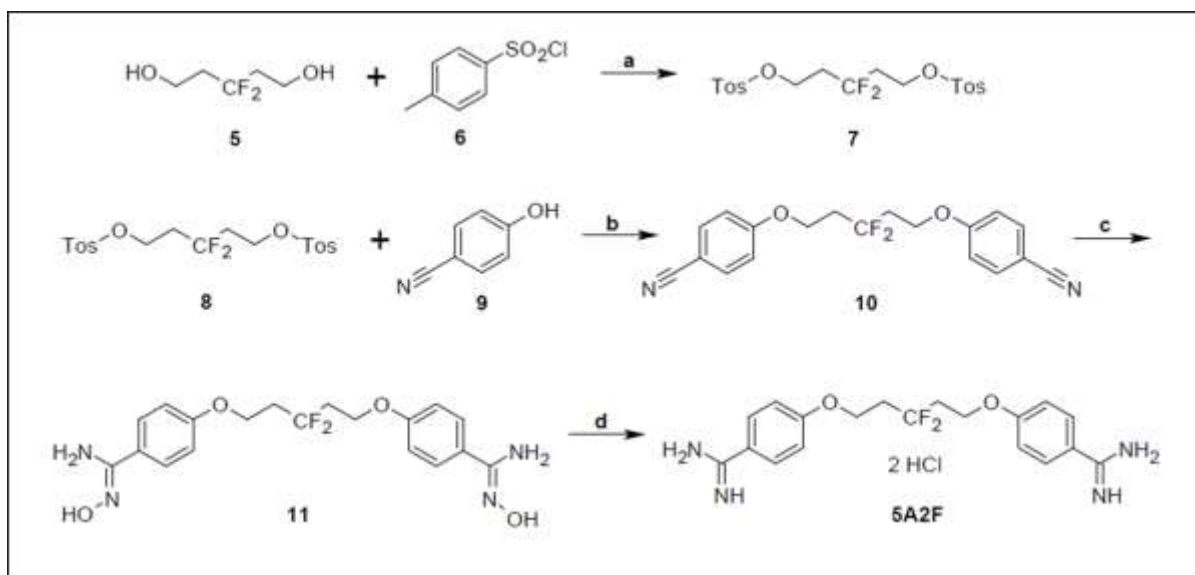
Although there are variations in the leishmanicidal activity of both analogues tested, these can be considered as candidates for studies in experimental animal models to confirm their activity. In this case, other parameters such as bioavailability, adverse effects, spleen and liver toxicity normally observed in treatments with Pentacarinat[®] could be improved with fluorine addition to the pentamidine structure and better evaluated and monitored *in vivo* experimental models.

Materials and Methods

Fluorinated analogs of Pentamidine: The bisamidines *1,5-bis (4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentanedihydrochloride* ($M = 376.407 \text{ g.mol}^{-1}$) and *1,5-bis (4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentanedihydrochloride* ($M = 472,389 \text{ g.mol}^{-1}$) [Figure 1], identified by the abbreviations 5A2F and 5A6F, respectively, have been synthesized according to Schemes 1 and 2. The synthesis of these bis-amidines generally follows procedures involving the preparation of bis-sulfonates, identified in the reaction scheme by numbers 7 and 11, in addition to 4-hydroxybenzotrile, indicated by number 9. After this reaction, these intermediates were converted into the bis-amidines 5A2F and 5A6F, identified in the reaction schemes. The bis-toluene sulfonate (number 7) was prepared from the corresponding 3,3-difluoropentane-1,5-diole (number 5) as described by Berglund and Fuchs (1989) [39]. The bis-trifluoromethane sulfonate (number 12) was synthesized according to the procedure described by Chen *et al.* (2013) [40]. Because they were two hydrochlorides, a control with pentamidine dihydrochloride (5AHCl), in addition to the control with the selected commercial formula (Pentacarinat[®]300 - pentamidine isethionate for injection B.P. 300 mg – Sanofi, Gentilly, FRA) had to be added in this study.

Synthesis of 1,5-bis (4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride – 5A2F [YM Pustovit *et al.*, 26 march 2018, Ukraine Patent Office]: The solution of the 1,5-bis (4-amidoximephenoxy)-3,3-difluoropentane (number 11, 0.28 g, 0.7 mmol) in the mixture of 3.5 mL acetic anhydride and 20 mL acetic acid was hydrogenated with 0.4 g Pd/C (5%) at ambient pressure and temperature up to the end of hydrogen absorption. The catalyst was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was treated with 20 mL of diluted (1:1) hydrochloric acid and activated charcoal at 100 °C. The charcoal was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 20 mL H₂O at 50 °C and was kept at ambient temperature for 16 h. The precipitate was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The product was recrystallized from minimum volume of the concentrated hydrochloric acid to give 0.12 g (38.9%) of the desired product (Mp 185-187°C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 2.50 (m, 4H, CH₂CF₂), 4.29 (t, ³J_{HH} = 6.1 Hz, 4H, OCH₂), 7.17 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 4H, C₆H₄), 7.73 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 4H, C₆H₄), 9.11 (br s, 4H, NH₂), 9.31 (br s, 4H, NH₂) ppm; ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ = -91.98 (quintete, ³J_{FH} = 16 Hz, 2F, CF₂) ppm.).

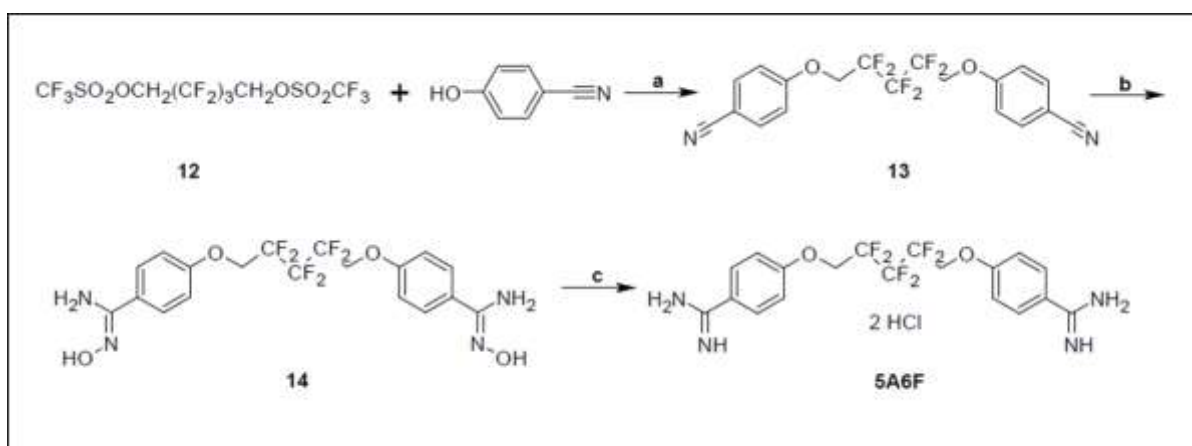
Figura 13: (Scheme 1) Procedures for the preparation of the 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride (5A2F). Reagents, solvent, pressure, temperature, time: (a) Et₃N, CH₂Cl₂, 20 °C, 24 h; (b) NaH (60%), DMF, 20 °C, 48 h; (c) NH₂OH·HCl, K₂CO₃, EtOH, reflux, 4 h; (d) H₂, 5% Pd/C, CH₃COOH, Ac₂O, ambient pressure, 20 °C, up to saturation.



Synthesis of 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane – 5A6F:

The solution of the 1,5-bis(4-amidoximephenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane (number 14, 0.85 g, 1.8 mmol) in the mixture of 5 mL acetic anhydride and 30 mL acetic acid was hydrogenated with 0.8 g Pd/C (5%) at ambient pressure and temperature up to the end of hydrogen absorption. The catalyst was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was treated with 40 mL of 1N hydrochloric acid and activated charcoal at 100 °C. The charcoal was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 20 mL H₂O at 50 °C and was kept at ambient temperature for 18 h. The precipitate was filtered off and filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was recrystallized from 20 mL of the diluted (1:1) hydrochloric acid to give 0.27 g (27.1%) of the desired product (Mp 207-208°C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 4.96 (t, ³J_{HF} = 13.8 Hz, 4H, OCH₂), 7.31 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 4H, C₆H₄), 7.93 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 4H, C₆H₄), 9.24 (br s, 4H, NH₂), 9.42 (br s, 4H, NH₂) ppm; ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ = -118.14 (br s, 4F, CF₂CH₂), -123.58 (br s, 2F,CF₂ CF₂CF₂) ppm.).

Figura 14: (Scheme 2) Procedures for the preparation of the 1,5-bis(4-Amidinophenoxy)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentane dihydrochloride (5A6F). Reagents, solvent, pressure, temperature, time: (a) NaH (60%), DMF, 60 °C, 2 h; (b) NH₂OH·HCl, K₂CO₃, EtOH, reflux, 9 h; (c) H₂, 5% Pd/C, CH₃COOH, Ac₂O, ambient pressure, 20 °C, up to saturation.



Physico-chemical analysis of products: The physical and chemical properties of the products obtained were investigated using 2D ^1H -NMR (500 MHz) and ^{19}F -NMR (470 MHz) Spectroscopy on a Bruker Avance 500 DRX spectrometer, using the internal standards TMS and CFCl_3 , respectively. The melting points were measured with a Buchi melting point apparatus. Microanalyses were performed at the Microanalytical Laboratory of the Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine. Elemental analyzes were obtained from the average of two independent determinations. Preparative chromatography was performed on SiO_2 .

Evaluation of leishmanicidal efficacy: The antiprotozoal efficacy of the 5A2F and 5A6F analogs was evaluated in bioassays using promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Viannia) guyanensis* (reference strain MHOM/BR/75/IM4147) and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (reference strain MHOM/BR/2009/IM5584). The protozoa culture was performed in cell culture bottles containing the culture medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), supplemented with heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBSi) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of gentamycin. The parasite expansion was evaluated after incubation at 24 °C, followed at eight - hour intervals, in order to obtain parasites in stationary phase II of the growth curve, parameter used to choose the parasites for the following bioassays. The bioassays were divided into three stages: activity against promastigote forms (bioassay I); cytotoxicity in murine macrophages (bioassay II); and activity against amastigote forms (bioassay III).

Bioassay I / activity against promastigote forms: The RPMI-1640 culture medium supplemented with different concentrations of each analogue produced, 5A2F and 5A6F, besides the positive controls (Pentacarinat[®] and 5AHCl) and negative (saline 0.8%) were added to wells of 96 well plates. For all the treatments proposed, serial dilution was performed from the initial concentration of 217.75 (75.00 μg) to 4.95 nM/mL (2.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Parasitic suspensions with protozoa of each species were prepared and adjusted to the concentration of 2×10^5 parasites/mL and then added to the wells. The plaques were incubated at 24-26 °C for 24-48 h and protozoan viability was analyzed after every 24 h of incubation, and flagellar motility and damage to the plasma membrane of promastigotes were used as

parameters for viability, evidenced after staining with Trypan Blue (Trypan Blue 0.5% - EUROCLONE, Pero, MI, ITA) performed in Neubauer chamber under optical microscopy, increasing by 400x.

Bioassay II / cytotoxicity in murine macrophages: Macrophages obtained from BALB/c mice (*Mus musculus*) by isolation of peritoneal lavage cavity cells (collection of naïve tissue resident macrophages) with RPMI-1640 medium, supplemented with 10% FBSi, were used in the preparation of cell suspension adjusted to 1×10^4 macrophages/mL and then distributed in 96 well plates by volume of 200 μ L/well. The plate was then incubated at 37 °C / 5% CO₂ for 24 h for adhesion of the cells to the surface of the polystyrene plate. After incubation, the volume of the wells was discarded, with only macrophages remaining adhered to the plate, and solution of the analogs in RPMI-1640 in concentration gradient (217.75-1.24 nM/mL) was added. The plates were then incubated for 24-48 h, using as positive controls Pentacarinat[®] and 5AHCl, and saline solution as negative control. Cytotoxicity was evaluated after adding 10 μ L of resazurin (3mM), Alamar Blue[®] reagent (Alamar Blue Cell Viability Reagent - Invitrogen™, Eugene, OR, USA) to each well and incubation (37 °C / 5% CO₂) for 4 h. After this period, the absorbance of each treatment was measured in a microplate reader at wavelength of 570 nm, comparing the values observed in the treatments with those of the control curve, established from the measurements of the negative control for cell viability (wells without cells) and positive control for cell viability (wells containing untreated cells) to determine the percentage of cellular activity (42).

Bioassay III / activity against amastigote forms: Naïve tissue resident macrophages obtained from BALB / c mice by peritoneal lavage with RPMI-1640 medium, supplemented with 10% FBSi, were used in the preparation of the cell suspension adjusted to 1×10^4 macrophages/mL and then distributed in a 24 well plate containing glass coverslips in its interior, in volume of 1 mL/well. After incubation for 24 h at 37 °C / 5% CO₂, the whole volume was discarded, with only the macrophage adhered to the coverslips, and 1 mL of parasite suspension [*L. (L.) amazonensis* or *L. (V.) guyanensis* promastigotes] was added to RPMI (10% SBFi), adjusted to 1×10^5 parasites/mL, in each well, to promote macrophage infection and the consequent development of amastigote forms after incubation (34 °C / 5%

CO₂). After the infection period, the entire volume of the well was discarded and, after successive washes with saline solution (0.8%), 1 mL of solution of the compounds (5A2F and 5A6F) and positive controls (Pentacarinat[®] and 5AHCl), in equal concentration gradients defined from the results of bioassays I and II (50.00-6.25 nM/mL). The plates were incubated at 37 °C / 5% CO₂ for 24 h and 48 h and at each incubation period, well volumes were discarded, coverslips washed with saline solution (0.8%) and adhered cell material was fixed and stained using Panoptic staining kit (Panótico Rápido – Laborclin[®] Produtos para Laboratórios Ltda., Pinhais, PR, BRA). The coverslips were fixed in glass slides and analyzed under optical microscopy in an increase of 400-1000x, in which the percentage of parasitized cells and the mean number of parasites per infected cell were observed to determine the infection rate (IR).

AntiLeishmanial efficacy calculation: The results of the bioassays III were used to calculate the percentage of efficacy (%E), according to the following formula, where \bar{X}_{NCG} e \bar{X}_{TG} are the arithmetic means of parasite viability (%) in the negative control group (NCG) and treated groups (TG), respectively (43):

$$\%E = \frac{\bar{X}_{NCG} - \bar{X}_{TG}}{\bar{X}_{NCG}} \times 100$$

Statistical analysis: From the results of bioassay Number I, the inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined from linear regression. All the observations were submitted to Analysis of Variance – ANOVA (p <0.05), in order to identify variations between the different treatments tested, in addition to the *Tukey's* test (p <0.05) observed in treatments and control. The statistical evaluations proposed were performed using GraphPad Prism 6.0 Software.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support for the herein presented research by the University of Helsinki and the Magnus Ehrnrooth Foundation, Finland; the Centre of Excellence on Atomic Layer Deposition of the Academy of Finland; the European Union (EU) international staff exchange project FP7-PEOPLE-IRSES-2011-295262, (VAIKUTUS) and the Horizon2020 Program (H2020-MSCA-RISE-2016 – 734759: VAHVISTUS); the National Institute of Amazonian Research (INPA), and the Ministry of Scientific, Technological Innovation and Communication Development (MCTIC), Brazil

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. 2008. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol.* 120: 204–208.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. Cutaneous and Mucosal *Leishmaniasis*. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en (Last Updated, 01 May 2014). Access: 12/04/2018
3. Brasil. Ministério da Saúde. 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. 2^a ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

4. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Da Silva Júnior RM, Guerra JAO, Ferreira LCL, Talhari S. 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 86: 1092-101.
5. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. 2011. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous *Leishmaniasis* in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Research*. 108:671-677.
6. Brasil. Ministério da Saúde. 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual for Surveillance of cutaneous *Leishmaniasis*. 1^a ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 189 p. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
7. PubChem. Compound Summary for CID 4735. Pentamidine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735#section=Top>. Acess: 03/01/2017.
8. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*. 44: D1202-1123.
9. Pinner A, Klein F. 1877. Umwandlung der nitrile in imide. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 10:1889–1897.
10. Stephens CE, Farisl T, Kim S, Wilson WD, Schell WS, Perfect JR, Franzblau SG, Boykin DW. 2001. Diguanidino and “Reversed” Diamidino 2,5-Diarylfurans as Antimicrobial Agents. *J. Med. Chem*. 44: 1741–1748.
11. Russell JGB. 1959. Pneumocystis Pneumonia Associated with Agammaglobulinaemia. *Arch Dis Chil*. 34: 338-341.
12. Marshall WC, Weston HJ, Bodian M. 1964. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Congenital Hypogammaglobulinaemia. *Arch Dis Chil*. 39:18-25.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 18th WHO Model List of Essential Medicines (April 2013): http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1. Access: 12/04/2018.
14. Center Of Diseases Control. 2017. Parasites Home. *Leishmaniasis*. Resources for Health Professionals.

- http://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/health_professionals/index.html#tx (Last Updated, 10 August 2017). Access: 12/04/2018.
15. Soeiro MNC, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. 2013. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitol.*140: 10.1017
 16. Chakravarty J, Sundar S. 2010. Drug Resistance in *Leishmaniasis*. *J Global Infectious Diseases.* 2:167-176.
 17. Neves D, Melo A, Linardi P, Victor R. 2005. *Parasitologia Humana*. 11^a ed., Atheneu, São Paulo.
 18. Jahnke W, Florsheimer A, Blommers MJJ, Paris CG, Heim J, Nalin CM, Perez LB. 2003. Second-Site NMR Screening and Linker Design. *Curr Top Med Chem.* 3: 69-80.
 19. Maciejewska D, Zabinski J, Kazmierczak P, Rezler M, Krassowska-Swiebocka B, Collins MS, Cushion MT. 2012. Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics. *Eur J Med Chem.* 46: 164-173.
 20. Wang J, Sanchez-Rosello M, Acena JL, Del Pozo C, Sorochinsky AE, Fustero S, Soloshonok VA, Liu H. 2014. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* 114: 2432–2506.
 21. Swinson J. 2005. Fluorine – A vital element in the medicine chest. *Pharma Chem. Pharmaceutical Chemistry.* 1: 26-30.
 22. Zhou Y, Wang J, Gu Z, Wang S, Zhu W, Aceña JL, Soloshonok VA, Izawa K, Liu H. 2016. Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem Rev.* 116: 422–518.
 23. Jarak I, Marjanovi M, Piantanida I, Kralj M, Karminski-Zamola G. 2011. Novel pentamidine derivatives: Synthesis, anti-tumor properties and polynucleotide-binding activities. *Eur J Med Chem.* 46: 2807-2815.
 24. Baraldi PG, Bovero A, Fruttarolo F, Preti D, Tabrizi MA, Pavani MG, Romagnoli R. 2004. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med Res Rev.* 24:475-528.
 25. Wilson WD, Tanious FA, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW. 2008. Antiparasitic Compounds That Target DNA. *Bioch.* 90: 999–1014.

26. Bakunova SM, Bakunov SA, Patrick DA, Kumar EVKS, Ohemeng KA, Bridges AS, Wenzler T, Barszcz T, Jones SK, Werbovets KA, Brun R, Tidwell RR. 2009. Structure-activity study of pentamidine analogues as antiprotozoal agents. *J Med Chem*, 52: 2016-2035.
27. Maciejewska D, Zabinski J, Kazmierczak P, Wojciuk K, Kruszewski M, Kruszewska H. 2014. *In vitro* screening of pentamidine analogs against bacterial and fungal strains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24: 2918–2923.
28. Lai A Fat EJ, Vrede MA, Soetosenojo RM, Lai A Fat RFM. 2002. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* in Surinam. *Int J Dermatol.* 41: 796-800.
29. Coelho AC, Gentil LG, Silveira JF, Cotrim PC. 2008. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Exp Parasitol.* 120: 98-102.
30. Lindsay DS, Blagburn BL, Hall JE, Tidwell RR. 1991. Activity of Pentamidine and Pentamidine Analogs against *Toxoplasma gondii* in Cell Cultures. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 1914-1916.
31. Tyagi V, Khan S, Shivahare R, Srivastava K, Gupta S, Kidwai S, Srivastava K, Puri SK, Chauhan PM. 2013. A natural product inspired hybrid approach towards the synthesis of novel pentamidine based scaffolds as potential anti-parasitic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 23: 291-296.
32. Bell CA, Hall JE, Kyle DE, Grogl M, Ohemeng KA, Allen MA, Tidwell RR. 1990. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrobi. Agents Chemother.* 34: 1381–1386.
33. Huang TL, Eynde JJV, Mayence A, Donkor IO, Khan SI, Tekwani BL. 2006. Anti-plasmodial and anti-*Leishmanial* activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J Pharm Pharmacol.* 58:1033–1042.
34. Verma M, Bhandari A, Nema RK. 2010. QSAR Studies of 1,5-di(4-amidinophenoxy)pentane and its analogues for their anti-leishmanial activity. *J. Chem. Pharm. Res.* 2: 387-391.
35. Tidwell RR, Jones SK, Geratz JD, Ohemeng KA, Bell CA, Berger BJ, Hall JE. 1990. Development of Pentamidine Analogues as New Agents for the Treatment of

- Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 616: 421-441.
36. Bégué J-P, Bonnet-Delpon D. 2006. Recent advances (1995–2005) in fluorinated pharmaceuticals based on natural products, *J Fluorine Chem*. 127: 992-1012.
 37. Isanbor C, O'Hagan D. 2006. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *J Fluorine Chem*. 127: 303-319.
 38. Esfahanizadeh M, Omidi K, Kauffman J, Gudarzi A, Shahraki Zahedani, S, Amidi S, Kobarfard, F. 2014. Synthesis and Evaluation of New Fluorinated Anti-Tubercular Compounds. *Iran J Pharm Res*. 13: 115–126.
 39. Berglund RA, Fuchs PL. 1989. Synthesis of fluorinated dienyllic stannanes via the Wadsworth-Emmons reaction. *Synthetic Communications*. 19: 1965-1980.
 40. Chen H, Liu P, Li H, Zhang H, Daniel S, Zeng Z. 2013. Fluorocarbon and Hydrocarbon N-Heterocyclic (C5-C7) Difluorooxymethylene-Bridged Liquid Crystals. *Eur. J. Org. Chem*. 7517-7527.
 41. Pustovit YM, Alekseenko AM, Grafov AV, Grafova IO, Bezdudnyy AV, Pereira AMRF. 1,5-bis (4-Amidinophenoxy)-3,3-difluoropentane dihydrochloride. Ukraine Patent Office n° 116492, 26 March 2018.
 42. Rodrigues KC. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.
 43. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*. 44:35–44.

CAPÍTULO 2

Ensaio pré-clínico de análogos fluorados da pentamidina na Leishmaniose Cutânea experimental.

Pedro Rael Cândido Domingos;^{a,b} Andriy Grafov;^c Antonia Maria Ramos Franco^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

^bLaboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil;

^cDepartamento de Química, Universidade de Helsinque, Helsinque, Finlândia.

RESUMO

A utilização da pentamidina no tratamento da Leishmaniose Cutânea Americana (LCA) já é indicada em situações onde é observada resistência parasitária aos outros medicamentos. Com a emergência de casos de resistência para a maioria dos medicamentos utilizados na LCA, inclusive a pentamidina, abordagens que visam a inovação farmacêutica se tornaram ainda mais importantes e necessárias. O Flúor (F) é constantemente utilizado na produção de novos medicamentos e pode possibilitar a produção de novas pentamidinas com eficácia aumentada e efeitos adversos minimizados. Foi avaliado o efeito de duas pentamidinas fluoradas no tratamento experimental de camundongos Balb/c infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e por *L. (Viannia) guyanensis*. Nenhuma das pentamidinas utilizadas no estudo, incluindo a formulação comercial, o Pentacarinat[®], apresentou efeito terapêutico no tratamento das lesões por *L. (L.) amazonensis*, assim como no controle parasitário verificado nas impressões em lâmina e no isolamento em cultivo. As lesões por *L. (V.) guyanensis* tiveram redução de 3,88 (5A2F) a 6,00 (5A6F) vezes em relação ao volume das lesões iniciais, apresentando redução final em relação ao controle negativo de 3,44 (5A2F) a 6,88 (5A6F). As taxas de infecção (TI), assim como de viabilidade parasitária (VP), por *L. (V.) guyanensis* foram reduzidas significativamente em relação ao controle negativo após o tratamento com as pentamidinas fluoradas, mantendo uma TI de aproximadamente 10% e VP de 1 a 3 parasitos/campo. Protocolos que incluam a reavaliação do tratamento ao final dos 30 dias do tratamento primário poderiam favorecer a completa cura clínica e parasitária nos animais infectados por *L. (V.) guyanensis*. O tratamento para *L. (L.) amazonensis* não demonstrou ser eficaz, o que corrobora com relatos da literatura.

Palavras-chave: Tratamento experimental; Leishmaniose cutânea; 5A2F; 5A6F; Doenças Negligenciadas; Flúor.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária caracterizada por uma variedade de lesões que podem comprometer a pele e mucosas do hospedeiro parasitado. Existe uma variedade de espécies do gênero *Leishmania* que podem ser associados a LCA, podendo evoluir para formas graves e desfigurantes em determinados casos (SANTOS et al., 2008; BRASIL, 2017).

O tratamento da LCA vem sofrendo com o crescente número de casos de resistência, principalmente em decorrência da seleção de cepas resistentes após falha terapêutica, escolha errada do fármaco ou abandono de tratamento. O tratamento a muito tempo se concentrou nos antimoniais pentavalentes, tendo o isetionato de pentamidina, a anfotericina B e a anfotericina B lipossomal como opções a falta de sensibilidade ao tratamento com os antimoniais (BRASIL, 2017; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). O grande problema relacionado a esses tratamentos, e que acaba impulsiona as falhas terapêuticas, é a alta toxicidade, efeitos colaterais e eficácia limitada que podem apresentar (MOREIRA; GUERRA; PETRILLO-PEIXOTO, 1992; RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; BRASIL, 2017).

Na região Amazônica a espécie mais prevalente é a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, a qual é mais sensível a ação da Pentamidina, quando comparado aos antimoniais pentavalentes, sendo por esse motivo sugerido por alguns autores (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CAMARA COELHO et al., 2011; NEVES et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015), e pelo Ministério da Saúde do Brasil (2017), com a primeira escolha no tratamento de LCA por essa espécie (CAMARA COELHO et al., 2011; NEVES et al., 2011; BRASIL, 2017). Além disso, a ineficiência do tratamento com antimoniais e os custos elevados de outros tratamentos (CAMARA COELHO et al., 2011; NEVES et al., 2011; SOEIRO et al., 2013; BRASIL, 2017), acabam contribuindo com a maior sugestão da pentamidina para tratamento de LCA causadas por algumas espécies do gênero *Leishmania* (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; NEVES et al., 2011; BRASIL, 2017).

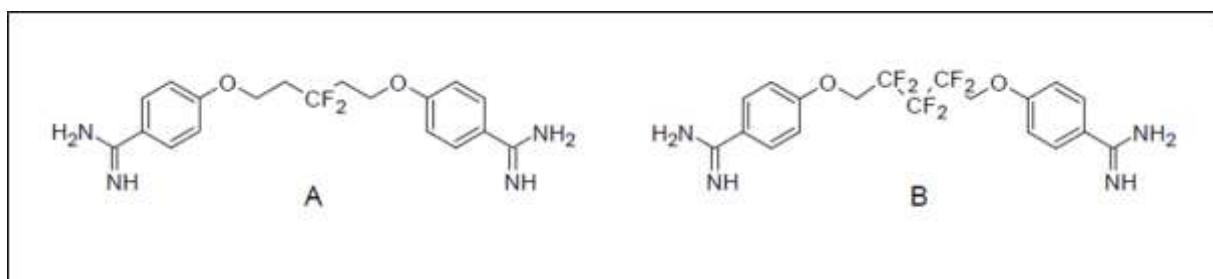
A pentamidina, como os outros medicamentos utilizados no tratamento da LCA, é associado a alta toxicidade e a baixa biodisponibilidade, o que acaba limitando sua eficácia. Muitos estudos procuraram evidências de maior eficácia de análogos da pentamidina contra

diferentes patógenos, inclusive do gênero *Leishmania*, que possam estar associados também a menor toxicidade. Essa busca por análogos é um dos principais caminhos seguidos pela ciência para propor novas substâncias com propriedades terapêuticas melhores e mais seguras. (JAHNKE et al., 2003).

Análogos da pentamidina com diferentes heteroátomos na cadeia alifática já foram sugeridos na literatura como promissores na busca por melhor eficácia e biodisponibilidade, além de menor toxicidade (MACIEJEWSKA et al., 2012; WANG et al., 2014). Dentre os diversos heteroátomos possíveis, o Flúor (F) chama a atenção pela sua constante utilização em projetos de desenvolvimento de novas drogas, sendo relacionado na literatura com grande parte das drogas consideradas de alto desempenho disponíveis no mercado atualmente. Graças a características físico-químicas do F foi possível promover mudanças em estruturas químicas de substâncias com potencial farmacológico, garantindo a elas uma maior biodisponibilidade, uma maior ação nos sítios alvos, além de também ser relacionada à menor toxicidade de metabólitos secundários (SWINSON, 2005; WANG et al., 2014; ZHOU et al., 2016).

No presente estudo foi avaliado a atividade de dois análogos fluorados da pentamidina, o dicloridrato de 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-3,3-difluoropentano e o dicloridrato de 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano, identificados como 5A2F e 5A6F, respectivamente (Figura 15), no tratamento experimental da LCA por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* em camundongos Balb/c.

Figura 15: 5A2F = 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-3,3-difluoropentano (A); e 5A6F = 1,5-bis(4-Amidinofenoxi)-2,2,3,3,4,4-hexafluoropentano (B).



MATERIAIS E MÉTODOS

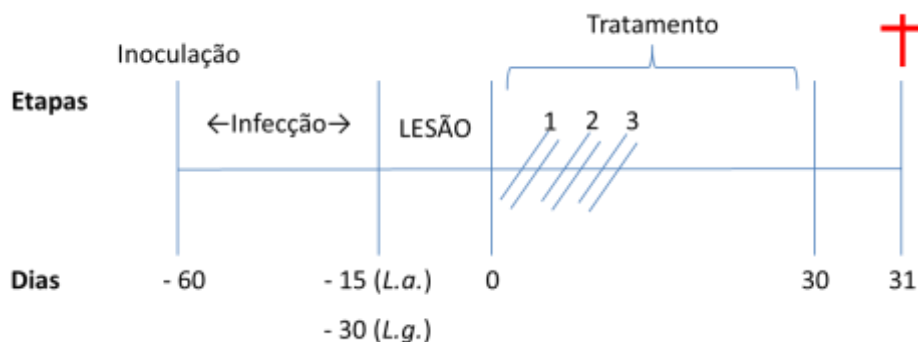
Os ensaios pré-clínicos seguiram as normas do Guia para cuidado e uso de animais de laboratório (<http://www.cobea.org.br>) do Conselho Nacional de Experimentação Animal, com parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA aprovando os experimentos (nº do parecer 008/2015 – ANEXO-B). O Biotério Central do INPA além de fornecer os animais necessários a experimentação, também disponibilizou a estrutura para manutenção, infecção e tratamento dos animais durante o experimento.

Foram utilizados camundongos Balb/c com idade de 60 dias e peso médio de 29,6 g, acondicionados em gaiolas contendo seis animais, que receberam alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos, com seis animais cada, na seguinte disposição: Controle negativo – GCNS (Grupo Controle Negativo com salina); Controle positivo – GCPP (Grupo Controle Positivo com Pentacarinat[®]); Grupo experimental 1 – GE5A2F; Grupo experimental 2 – GE5A6F.

Infecção experimental em camundongos (*Mus musculus*):

Os animais foram submetidos a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e por *L. (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) a partir de inoculação subcutânea na pata traseira direita (PTD), utilizando seringa estéril, de 0,10 mL de suspensão de amastigotas, ajustada à 10^5 amastigotas/mL. Os animais infectados foram mantidos nas gaiolas, conforme a divisão em grupos, sob os cuidados do biotério central e acompanhamento diário para verificação de surgimento de lesões. O tempo médio para surgimento das lesões difere entre as espécies avaliadas, sendo verificados após 15 dias de inoculação nos animais com *L. (L.) amazonensis*, e após 30 dias nos animais com *L. (V.) guyanensis*, sendo iniciado o tratamento dos grupos conforme cronograma a seguir (Figura 16).

Figura 16: Cronograma esquemático da experimentação animal. Três séries de tratamento, com intervalo de dois dias entre cada uma das séries, com aplicação intramuscular diária de 11,62 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$ do controle positivo e dos tratamentos experimentais, e posterior avaliação clínica até completos 30 dias de tratamento.



Tratamento experimental:

Os animais incluídos no experimento foram tratados a partir de injeção intramuscular, utilizando seringas estéreis, de 50 μL do composto testado ressuspenso em água estéril para injeção, em três séries aplicações (Figura 16), com intervalo de dois dias entre cada série. Ao grupo GCNS foi administrado solução salina, enquanto aos grupos GCPP, GE5A2F e GE5A6F foram administrados Pentacarinat[®], 5A2F e 5A6F, respectivamente, em concentrações de 11,62 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{dia}$. A dose aplicada foi ajustada de acordo com a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017) para o tratamento de Leishmaniose Cutânea (LC) em humanos com o Pentacarinat[®] (4mg/kg/dia) e, posteriormente, convertidas para concentração molar para facilitar futuras comparações.

Após a 1ª aplicação os animais foram acompanhados por 30 dias, a fim de se avaliar a evolução clínica da LC nos camundongos, conforme descrito no tópico a seguir, havendo a possibilidade de repetição do ciclo de aplicações, e avaliação por mais 15 dias, no caso de não haver cura clínica em nenhum dos tratamentos. Ao final do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para uso de animais de experimentação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA, e, após necropsia, amostras das lesões foram obtidas para realização de avaliação parasitológica.

Avaliação clínica:

Realizou-se acompanhamento clínico, com aferição dos volumes das lesões nos mesmos intervalos, a partir da medida de comprimento e largura da lesão, além do diâmetro da pata (comprimento X largura X diâmetro), utilizando paquímetro digital (*Zaas Precision/ Amatools*). O registro fotográfico era realizado após a medida para acompanhar a evolução do aspecto morfológico a cada três dias por período de 30 dias após início do tratamento. O efeito terapêutico foi classificado por critérios clínicos de cura, melhora e falha avaliados após um período de 30 dias, depois de finalizado o tratamento. A cura clínica foi caracterizada como cicatrização completa e ausência de eritema, edema e descamação; a melhora foi definida como epitelização completa caso a presença de úlceras com persistência dos demais sinais flogísticos; a falha caracterizou-se pela ausência de epitelização completa das lesões, piora dos sinais inflamatórios, aumento do tamanho da lesão ou aparecimento de lesões satélites em relação às lesões primárias. Também foi avaliado o estado geral dos animais (desidratação, diarreia, resposta a estímulos, entre outros), além dos pesos corporais, a fim de se detectar alguma característica que indicasse debilidade nos indivíduos.

Eutanásia dos animais:

Ao final dos tratamentos os animais foram anestesiados (Ketamina e Xylazina) e em seguida eutanasiados (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA.

Avaliação parasitológica:

Após a eutanásia dos animais, ao final do tratamento, foram obtidos fragmentos dos locais de inoculação, mesmo nos casos de ausência de lesão. Esses fragmentos foram utilizados para confecção de lâminas por método de impressão em lâmina (duplicata), com o objetivo de se estabelecer a Taxa de Infecção (TI) de macrófagos, e para cultivo em meio bifásico NNN (duplicata), a fim de se determinar a Viabilidade Parasitária (VB).

As lâminas, após impressão, foram fixadas e coradas com kit Panótico rápido (Laborclin[®], Pinhais, PR, BRA), e então avaliadas sob microscopia óptica, em aumento de 400-1.000x, onde se determinou o percentual médio de macrófagos parasitados (%MO) como indicador da TI. A partir do cultivo em NNN, após incubação por sete dias à 24-26 °C, foram confeccionadas lâminas para observação a fresco, onde se quantificou o número médio de parasitos viáveis por campo, em um total de 100 campos, para a determinação da VB. Todos os valores foram expressos em médias com os respectivos desvios padrões.

Análise estatística:

Foi utilizada a Análise de Variância – ANOVA ($p < 0,05$), a fim de se verificar se havia diferença significativa entre os tratamentos propostos, incluindo os controles. Os resultados para os tratamentos com as pentamidinas fluoradas foram comparados com os controles do ensaio (GCNS e GCPP), utilizando teste de *Tukey* ($p < 0,05$), a fim de se verificar diferenças significativas entre cada tratamento e o respectivo controle. Os testes estatísticos e os gráficos foram obtidos a partir do *Software GraphPad Prism 6.0*.

RESULTADOS

Os resultados quanto à evolução clínica é um importante parâmetro para a LC, sendo descrita no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2017) como um objetivo do tratamento tão importante quanto a cura parasitológica. A reepitelização das lesões ulceradas e a regressão total da infiltração e eritema são as características descritas pelo Manual para cura clínica. Os resultados obtidos apontaram para diferença de sensibilidade entre as espécies avaliadas, assim como para a importância do acompanhamento tanto da cura clínica como a parasitológica.

Respostas ao tratamento experimental:

a) Avaliação clínica:

Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade, uma vez que mantiveram o aspecto saudável, como vitalidade e resposta a estímulos, durante todo o período de experimentação, além de não ter sido registrado óbitos durante o tratamento. Os animais não apresentaram perda ou ganho de peso considerável em relação aos controles.

As lesões cutâneas em camundongos Balb/c, causadas pela infecção por *L. (L.) amazonensis*, evoluíram para um maior volume no final do tratamento, apontando a ineficiência de todos os tratamentos administrados (Figura 17). Diante dos resultados foi realizada nova aplicação das três séries proposta no experimento, sendo verificado nos 15 dias seguintes o agravamento das lesões em todos os tratamentos. Após 45 dias de observação os grupos com *L. (L.) amazonensis* foram encerrados pela ausência de resposta terapêutica desejada para todos os tratamentos realizados, onde foi verificado o aumento das lesões no 1º dia de tratamento de $0,050 \pm 0,008$ para $0,685 \pm 0,248\text{mm}^3$ no GCNS, de $0,078 \pm 0,068$ para $0,830 \pm 0,236 \text{mm}^3$ no GCPP, de $0,078 \pm 0,047$ para $1,040 \pm 0,292 \text{mm}^3$ no GE5A2F e de

$0,056 \pm 0,027$ para $0,922 \pm 0,500 \text{ mm}^3$ no GE5A6F, não havendo diferença significativa entre eles (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

A evolução das lesões observadas nos grupos partiu de lesões nodulares, localizadas e não ulceradas (Figura 18 A.1, B.1, C.1 e D.1), para lesões extensas, ocupando quase todo o dorso da pata, onde é possível observar ulcerações (Figura 18 B.4 e D.4), ao final do tratamento, com evolução acelerada a partir do 15º dia de tratamento.

Figura 17: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm^3) em camundongos Balb/c (*Mus musculus*), infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F

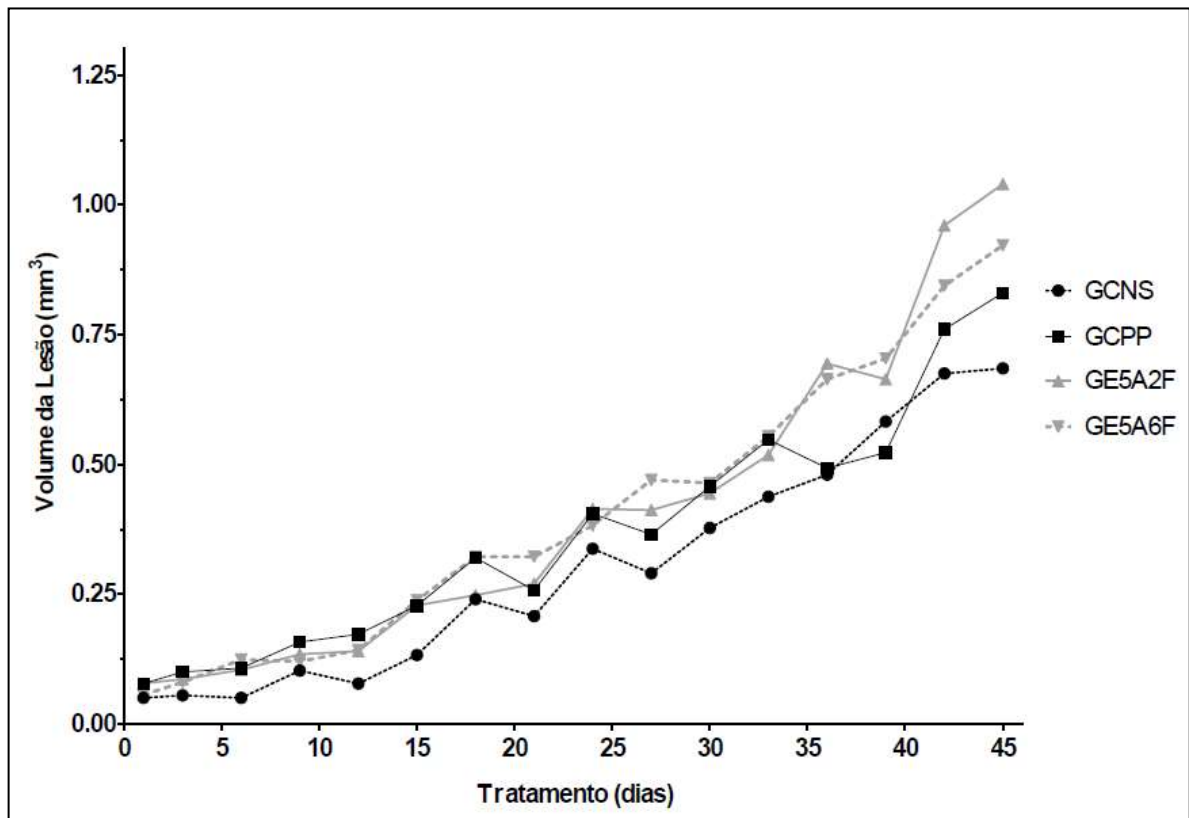
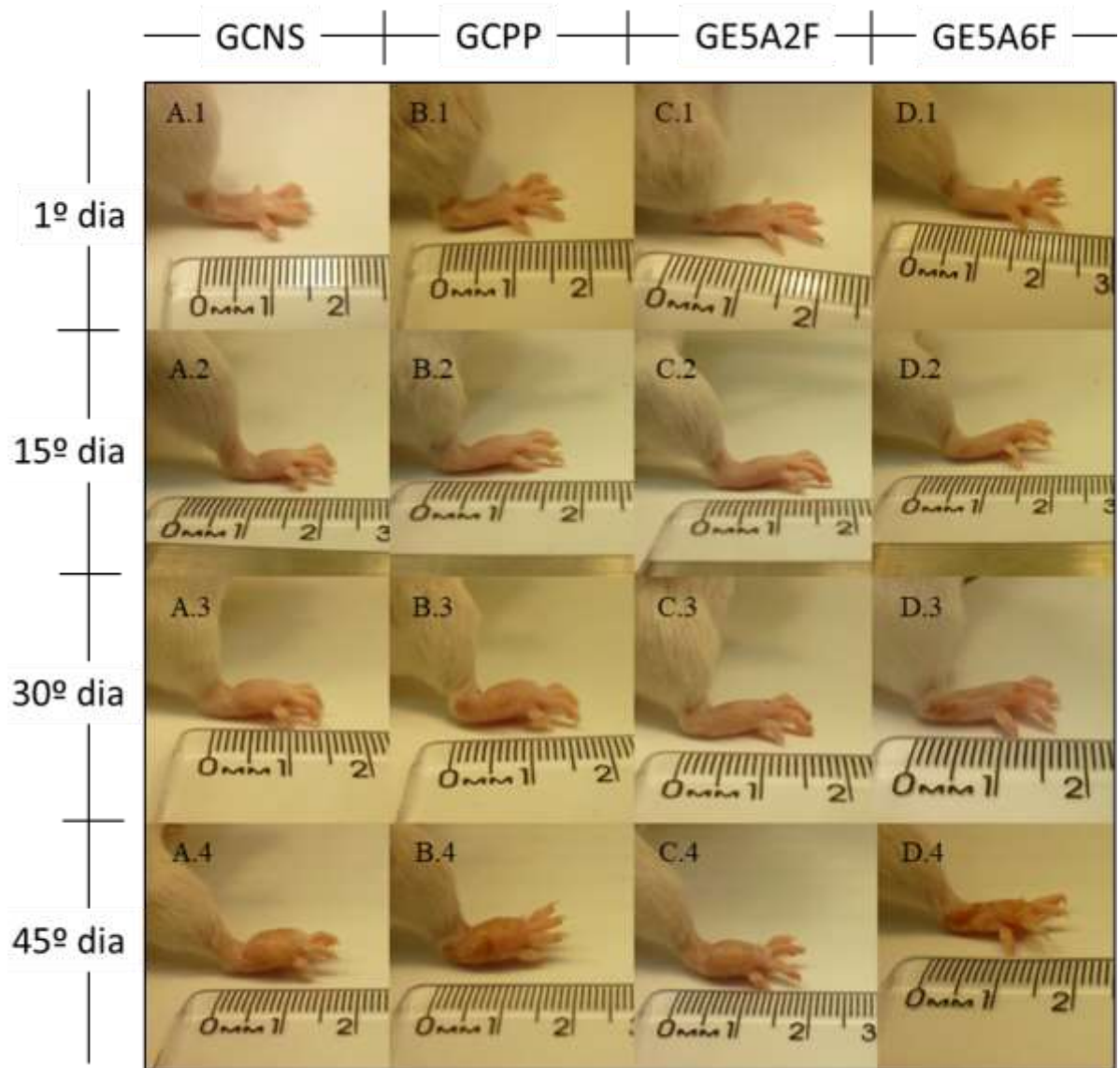
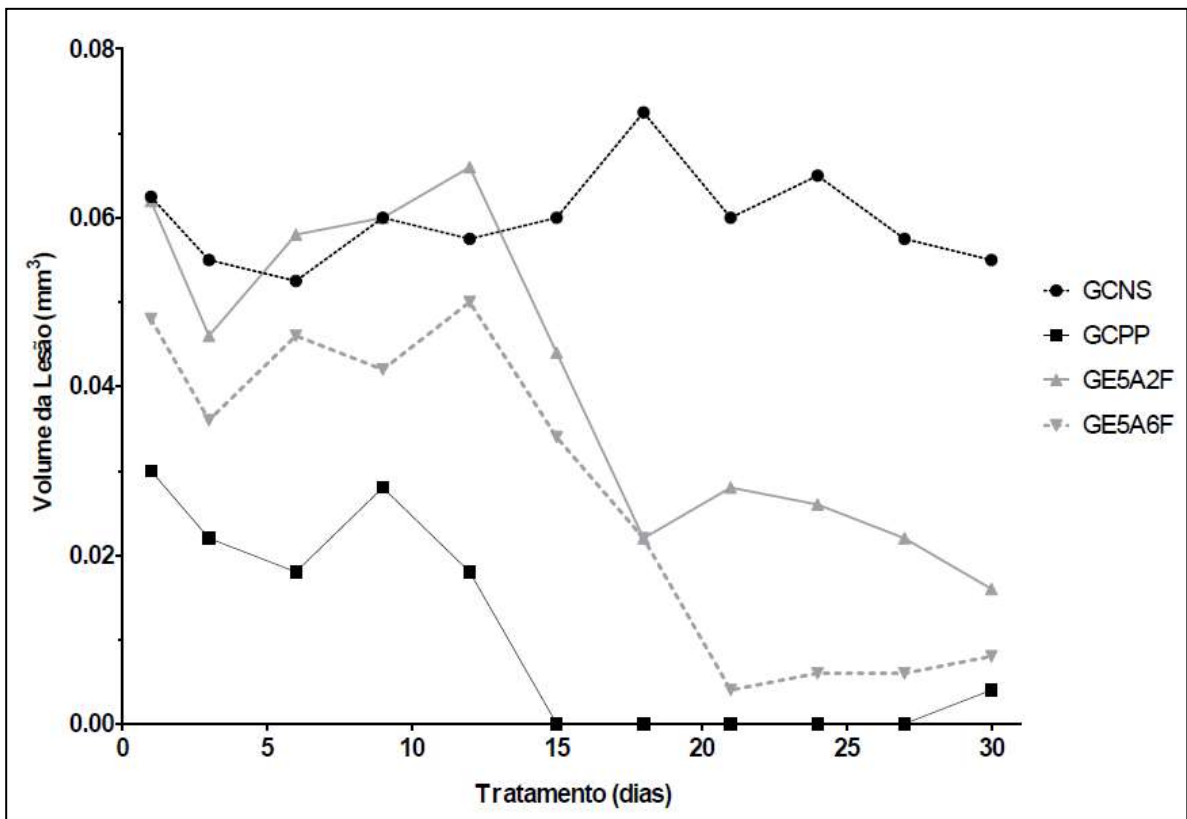


Figura 18: Evolução clínica de lesões em patas de camundongos (*Mus musculus*), inoculados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, após tratamento experimental com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F. As imagens foram obtidas no 1º, 15º, 30º e 45º dia de tratamento.



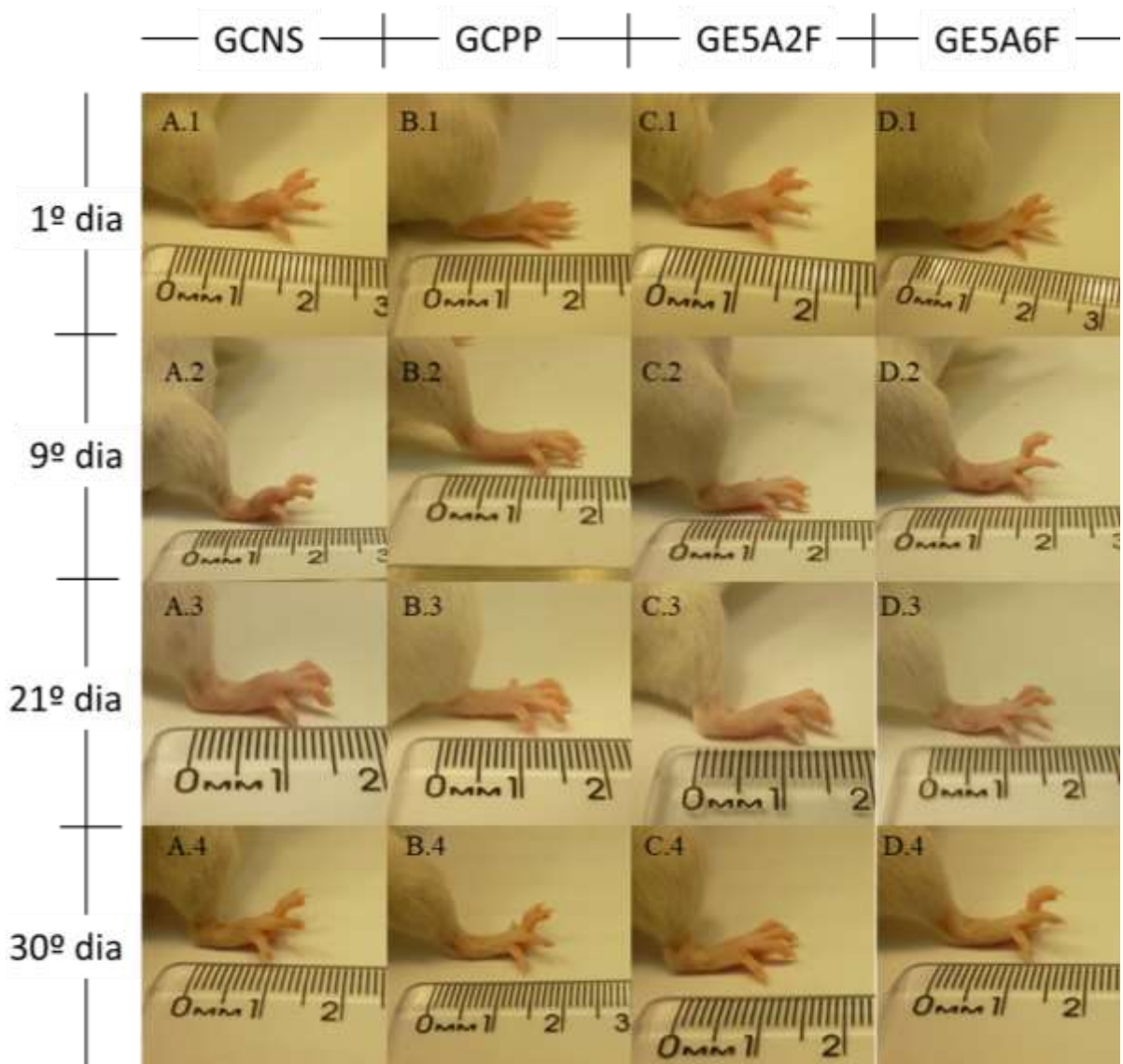
As lesões cutâneas por *L. (V.) guyanensis* tiveram evolução distinta da descrita para *L. (L.) amazonensis*, onde houve uma evolução no volume da lesão até o 12º dia, em todos os tratamentos e controles, havendo uma progressiva redução a partir do 15º dia em todos os tratamentos, com destaque para o GCPP, apresentando 100% de resolução da lesão (Figura 19). Os tratamentos com as pentamidinas fluoradas também reduziram o tamanho da lesão, com destaque para o GE5A6F que apresentou redução média de $0,048 \pm 0,027$ para $0,008 \pm 0,008 \text{ mm}^3$, enquanto a redução promovida no GE5A2F foi de $0,062 \pm 0,040$ para $0,016 \pm 0,022 \text{ mm}^3$, mas não havendo diferença significativa entre eles nem entre eles e o GCPP (teste de Tukey, $p < 0,05$) [Figura 19].

Figura 19: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm^3) em camundongos Balb/c (*Mus musculus*), infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, tratados com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F.



A Figura 20 exemplifica a evolução das lesões observadas nos grupos, partindo de lesões nodulares sem ulceração e localizadas nos pontos de inoculação (Figura 20 A.1, B.1, C.1 e D.1) para lesões menores, concentrando-se no ponto de inoculação e, às vezes, perceptível apenas pelo diâmetro aumentado da pata (Figura 20 A.4, B.4, C.4 e D.4).

Figura 20: Evolução clínica de lesões em focinhos de camundongos (*Mus musculus*), inoculados com *Leishmania (Viannia) guyanensis*, após tratamento experimental com diamidínicos fluorados. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F. As imagens foram obtidas no 1º, 9º, 21º e 30º dia de tratamento.

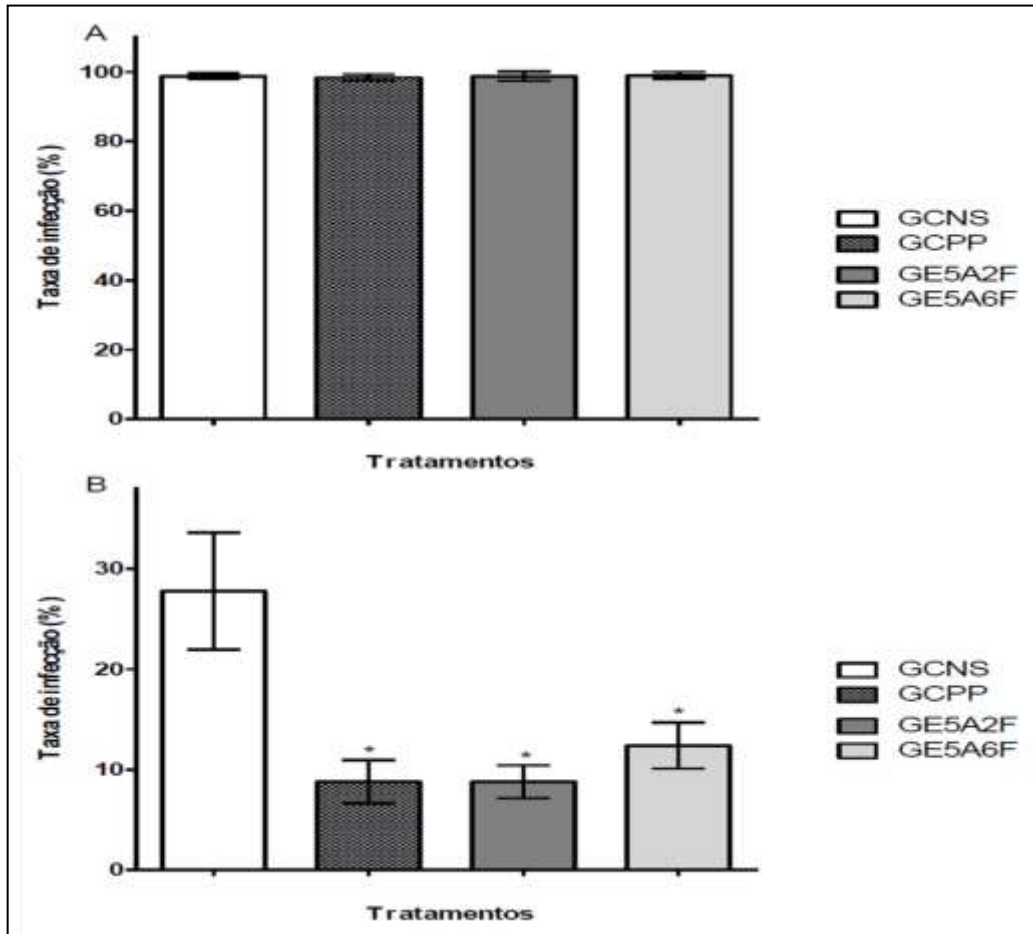


b) Avaliação parasitológica:

A partir da análise das lâminas preparadas por impressão foi possível verificar a diferença de sensibilidade aos diamidínicos entre as duas espécies. Não houve diferença significativa (teste de *Tukey*, $p < 0,05$) entre os grupos experimentais e os controles, sendo observado TI de $98,80 \pm 0,08$ % no GCNS, $98,40 \pm 0,08$ % no GCPP, $98,8 \pm 1,30$ % no GE5A2F e $99,00 \pm 1,00$ % no GE5A6F (Figura 21 A).

A *L. (V.) guyanensis* se mostrou mais sensível aos diamidínicos, sendo verificado TI inferior nos grupos experimentais, GE5A2F com TI de $8,80 \pm 1,64$ % e GE5A6F com $12,4 \pm 2,30$ %, assim como no GCPP, onde a TI foi de $8,8 \pm 2,16$ %, em relação GCNS, com TI de $27,80 \pm 5,81$ % (Figura 21 B). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e o GCPP (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), enquanto todos os tratamentos apresentaram redução significativa em relação ao GCNS (teste de *Tukey*, $p < 0,001$).

Figura 21: Taxa de infecção (TI) em macrófagos obtidos a partir de impressão em lâmina de lesões cutâneas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B), observados em microscopia óptica, 400-1000x. GCNS = controle negativo; GCPP = controle positivo; GE5A2F = tratamento experimental com 5A2F; GE5A6F = tratamento experimental com 5A6F; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCNS ($p < 0,001$)



As culturas também evidenciaram a viabilidade parasitária das duas espécies em todos os tratamentos para *L. (L.) amazonensis*, onde foram contados mais de 100 promastigotas/campo, valores idênticos ao GCNS. As culturas para *L. (V.) guyanensis* tiveram contagem de promastigotas de 51 ± 3 por campo no GCNS, enquanto nos grupos GCPP, GE5A2F e GE5A6F foram de 2 ± 1 promastigotas/campo, 2 ± 1 promastigotas/campo e 1 ± 1 promastigota/campo, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais e o GCPP (teste de Tukey, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A pesquisa por análogos da pentamidina é realizada a muito tempo por se acreditar na possibilidade de obtenção de um novo medicamento que mantenha a eficácia no tratamento da Leishmaniose, mas com propriedade farmacológicas melhores, como uma melhor biodisponibilidade, menor toxicidade e, conseqüentemente, menos efeitos adversos (BELL et al., 1990a; TIDWELL et al., 1990; LINDSAY et al., 1991; JAHNKE et al., 2003; BAKUNOVA et al., 2009). Estudos atuais, como o publicado por Comandolli-Wyrepkowski et al. (2017), revelam que além da atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*, a pentamidina apresenta grande versatilidade quanto a formas de administração, como a tópica descrita pelos autores, fato que pode ser melhor explorado utilizando novos análogos.

A investigação de novos análogos pode conferir ao tratamento com os diamidínicos mais segurança e a possibilidade de tratamentos experimentais não invasivos para a LC, como a via oral, já descrito para a Leishmaniose Visceral (LV) [WANG et al., 2010; ZHU et al., 2016] e para o *Trypanosoma brucei rhodesiense* (PATRICK et al., 2013), e a via tópica (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). A maioria dos trabalhos voltados a pesquisa de novos diamidínicos se concentram na triagem contra *Leishmania* em modelos de experimentação *in vitro*, onde avaliam o efeito contra promastigotas e/ou amastigota, além de toxicidade celular (BELL et al., 1990; HUANG et al., 2006; BAKUNOVA et al., 2009; VERMA; BHANDARI; NEMA, 2010; TYAGI et al., 2013). A avaliação de análogos de pentamidina em modelos *in vivo* para LC não foram encontrados, havendo apenas a escassa literatura voltada, principalmente, à pesquisa de LV.

Zhu et al. (2016) avaliaram o efeito de diversos mono-arilimidamidas, um análogo de diamidinas aromáticas também conhecido como amidinas reversas, em camundongos infectados por *L. (L.) donovani*, espécie utilizada para como modelo para LV, apontando redução de 46% na carga parasitária após administração oral, por cinco dias, de 100 mg/kg/dia de metanossulfonato de picolinimidamida N-(3-isopropoxy-4-(5-fenilfuran-2-il)fenil), um dos análogos de maior eficácia verificado no experimento. No mesmo estudo foi destacada a eficácia *in vitro* de alguns desse e de outros análogos contra amastigotas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) amazonensis*. Wang et al. (2010), também avaliando derivados de arilimidamidas, observou redução da carga parasitária em órgãos internos de hamsters e

camundongos infectados com *L. (L.) donovani* variando de 71 a 92%, dependendo do órgão, em um protocolo de tratamento oral de 100 mg/kg/dia por cinco dias.

Ensaio terapêuticos com a pentamidina no tratamento em animais experimentais infectados com outros tripanossomatídeos também são mais comuns do que aquelas que demonstram a atividade sobre leishmânias. Mathis et al. (2006), avaliando o efeito da furamidina, um análogo diamidínico, verificaram que em aplicação única, por via intravenosa, de 10 µM/kg de alguns desses diamidínicos levaram a cura (sobrevida sem parasitemia por 60 dias após o tratamento) camundongos infectados com *T. b. brucei* em tratamentos experimentais, fato que o isetionato de pentamidina não conseguiu, utilizando a mesma dose e via.

Patrick et al. (2013) verificaram a atividade de derivados da pentamidina no tratamento experimental de camundongos infectados por *T. b. rhodesiense*, tratados oralmente por quatro dias com 25 mg/kg e intraperitonealmente por quatro dias com 5 mg/kg, obtendo cura em 100 e 75% dos casos, respectivamente. No mesmo estudo foi destacado a eficácia de alguns dos análogos em modelos *in vitro* para amastigotas axênicos de *L. (L.) donovani*, além de *Plasmodium falciparum*. Batista et al. (2010), avaliando o efeito de 100mg/kg/dia, por 5 dias, de arilimidamidas DB766 sobre *Trypanosoma cruzi*, também verificou redução na taxa de parasitemia nos animais infectados.

Os resultados aqui apresentados apontam para a eficácia do tratamento contra a espécie *L. (V.) guyanensis*, corroborando com resultados já publicados que indicam uma maior sensibilidade dessa espécie à pentamidina (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Vale destacar que a ineficácia do tratamento com o isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) contra espécies de *L. (L.) amazonensis*, já foi descrita na literatura (BASSELIN et al., 2002; COELHO et al., 2007, 2008), o que poderia justificar os resultados negativos de todos os tratamentos propostos para essa espécie, inclusive o controle positivo.

Todos os estudos descritos avaliaram análogos diamidínicos que apresentam cadeia alicíclica entre os benzenos, além de não haver referências à avaliação de análogos com flúor em sua composição. O Flúor, como revisa Swinson (2005) e Wang et al. (2014), confere várias vantagens estruturais, graças a características físico-químicas próprias desse elemento, a estruturas de compostos com potencial terapêutico, e ficou demonstrado nessa avaliação experimental contra a espécie *L. (V.) guyanensis* que ambos análogos fluorados, com destaque

para o 5A2F, apresentaram eficácia semelhante ao do tratamento com o isetionato de pentamidina (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), o medicamento indicado para o tratamento de LCA por essa espécie.

O presente estudo é o primeiro relato de aplicação em modelo *in vivo* de análogo diamidínico com cadeia alifática contra diferentes espécies de *Leishmania* com importância epidemiológica para LCA, além de ser primeira descrição da aplicação terapêutica experimental de análogos fluorados nessas mesmas condições. Todos esses protocolos para outras espécies e a ausência de estudos *in vivo*, sobretudo para as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, enfatizam a importância do presente estudo, que além de evidenciar a eficácia de dois análogos fluorados no tratamento experimental da LCA, é o primeiro relato desse tipo de análise *in vivo*, envolvendo duas espécies de *Leishmania* de subgêneros distintos.

REFERÊNCIAS

BAKUNOVA, S. M.; BAKUNOV, S. A.; PATRICK, D. A.; KUMAR, E. V. K. S.; OHMENG, K. A.; BRIDGES, A. S.; WENZLER, T.; BARSZCZ, T.; JONES, S. K.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R. Structure-activity study of pentamidine analogues as antiprotozoal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 2016–2035, 2009.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3731–8, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435669>>.

BATISTA, D. da G. J.; BATISTA, M. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; DO AMARAL, P. B.; LANNES-VIEIRA, J.; BRITTO, C. C.; JUNQUEIRA, A.; LIMA, M. M.; ROMANHA, A. J.; SALES JUNIOR, P. A.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. D. N. C. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2940–52, 1 jul. 2010. Disponível

em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01617-09>>.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 7, p. 1381–1386, 1 jul. 1990. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.34.7.1381>>.

BRASIL, M. da saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 1a. ed. [s.l: s.n.], 2017a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>.

CAMARA COELHO, L. I.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. das G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO FILHO, S. P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 12 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072540>>.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010. Disponível em: <<http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/167/62887>>.

COELHO, A. C.; GENTIL, L. G.; DA SILVEIRA, J. F.; COTRIM, P. C. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 98–102, set. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448940800091X>>.

COELHO, A. C.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M.; COTRIM, P. C. Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in *Leishmania* Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3030–3032, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00404-07>>.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; GRAFOVA, I.; NAIFF, M. de F.; AVELLA, M.; GENTILE, G.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **ACTA AMAZONICA**, v. 47, n. 1, p. 39–46, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201601333>>.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205002539>>.

HUANG, T. L.; VANDEN EYNDE, J. J.; MAYENCE, A.; DONKOR, I. O.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L. Anti-plasmodial and anti-leishmanial activity of conformationally restricted pentamidine congeners. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1033–1042, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.58.8.0003>>.

JAHNKE, W.; FLÖRSHEIMER, A.; BLOMMERS, M. J. J.; PARIS, C. G.; HEIM, J.; NALIN, C. M.; PEREZ, L. B. Second-site NMR screening and linker design. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 1, p. 69–80, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570778>>.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. Activity of pentamidine and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 9, p. 1914–1916, 1991.

MACIEJEWSKA, D.; ŻABINSKI, J.; KAŻMIERCZAK, P.; REZLER, M.; KRASSOWSKA-ŚWIEBOCKA, B.; COLLINS, M. S.; CUSHION, M. T. Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 164–173, fev. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523411008737>>.

MATHIS, A. M.; HOLMAN, J. L.; STURK, L. M.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E. Accumulation and Intracellular Distribution of Antitrypanosomal Diamidine Compounds DB75 and DB820 in African Trypanosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2185–2191, 1 jun. 2006. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00192-06>>.

MOREIRA, E. S.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. de L. Glucantime resistant *Leishmania* promastigotes are sensitive to pentostam. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 4, p. 247–50, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340539>>.

NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; DA SILVA, R. M.;

GUERRA, J. A. de O.; FERREIRA, L. C. de L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Infectious Diseases List**. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en>. Acesso em: 1 maio. 2018.

PATRICK, D. A.; BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M.; JONES, S. K.; WENZLER, T.; BARSZCZ, T.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R. Synthesis and antiprotozoal activities of benzyl phenyl ether diamidine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 310–324, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.033>>.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, nov. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108004480>>.

SOEIRO, M. N. C.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; WANG, M. Z.; HEMPHILL, A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. **Parasitology**, v. 140, n. 08, p. 929–951, 8 jul. 2013. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182013000292>.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 22 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346016>>.

SWINSON, J. Fluorine – A vital element in the medicine chest. **Pharma Chem. Pharmaceutical Chemistry.**, v. 1, p. 26–30, 2005. Disponível em: <www.b5srl.com>.

TIDWELL, R. R.; JONES, K. S.; GERATZ, J. D.; OHEMENG, K. A.; CORY, M.; HALL, J. E. Analogues of 1,5-Bis(4-amidinophenoxy)pentane (Pentamidine) in the Treatment of Experimental Pneumocystis carinii Pneumonia. **J. Med. Chem.**, v. 33, n. 4, p. 1252–1257, 1990.

TYAGI, V.; KHAN, S.; SHIVAHARE, R.; SRIVASTAVA, K.; GUPTA, S.; KIDWAI, S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; CHAUHAN, P. M. S. A natural product inspired hybrid approach towards the synthesis of novel pentamidine based scaffolds as potential anti-parasitic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 1, p. 291–296, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.101>>.

VERMA, M.; BHANDARI, A.; NEMA, R. K. QSAR Studies of 1,5-di(4-amidinophenoxy)pentane and its analogues for their anti-leishmanial activity. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 2, n. 2, p. 387–391, 2010.

WANG, J.; SÁNCHEZ-ROSELLÓ, M.; ACEÑA, J. L.; DEL POZO, C.; SOROCHINSKY, A. E.; FUSTERO, S.; SOLOSHONOK, V. A.; LIU, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). **Chemical Reviews**, v. 114, n. 4, p. 2432–2506, 26 fev. 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr4002879>>.

WANG, M. Z.; ZHU, X.; SRIVASTAVA, A.; LIU, Q.; SWEAT, J. M.; PANDHARKAR, T.; STEPHENS, C. E.; RICCIO, E.; PARMAN, T.; MUNDE, M.; MANDAL, S.; MADHUBALA, R.; TIDWELL, R. R.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; WERBOVETZ, K. A. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2507–2516, 2010.

ZHOU, Y.; WANG, J.; GU, Z.; WANG, S.; ZHU, W.; ACENÃ, J. L.; SOLOSHONOK, V. A.; IZAWA, K.; LIU, H. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 2, p. 422–518, 2016.

ZHU, X.; FARAHAT, A. A.; MATTAMANA, M.; JOICE, A.; PANDHARKAR, T.; HOLT, E.; BANERJEE, M.; GRAGG, J. L.; HU, L.; KUMAR, A.; YANG, S.; WANG, M. Z.; BOYKIN, D. W.; WERBOVETZ, K. A. Synthesis and pharmacological evaluation of mono-arylimidamides as antileishmanial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 10, p. 2551–2556, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.082>>.

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade leishmanicida de Nanomatrizs Inorgânicas Bioativas (NIB) à base de óxidos de Nióbio e Tântalo.

(Patente Solicitada – ANEXO-C)

Pedro Rael Cândido Domingos, Iryna Grafova, Andriy Grafov, Antonia Maria Ramos Franco.

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

^bLaboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil;

^cDepartamento de Química, Universidade de Helsinque, Helsinque, Finlândia.

RESUMO

A Leishmaniose Cutânea Americana (LCA) é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que se caracteriza por lesões cutâneas ou mucosas de gravidade variável. A terapêutica da LCA vem sofrendo com a emergência de casos resistentes e problemas relacionados a efeitos adversos e toxicidade dos medicamentos utilizados. A nanotecnologia possibilita a inovação terapêutica possibilitando produtos mais eficazes, com efeito prolongado e utilizando menores concentrações de princípios ativos, o que, consequentemente, diminui a produção de metabólitos secundários. Nesse estudo foram sintetizados e caracterizados Nanomatrizs Inorgânicas Bioativas (NIB) de nióbio (Nb) e de tântalo (Ta), utilizando metodologia “verde”, os quais foram avaliados em modelos *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e por *L. (Viannia) guyanensis*, além de macrófagos peritoneais murinos, para verificação de toxicidade celular. Foram obtidos nanomateriais estáveis em hidrosóis, apresentando a NIB-Nb tamanho médio de 76,53 nm e a NIB-Ta 19,22 nm, medidos por DSL. A NIB-Ta se destacou em todos os tratamentos contra promastigotas e amastigotas, apresentando eficácia maior que o Glucantime[®] na maioria das situações avaliadas, enquanto a NIB-Nb teve eficácia maior contra *L. (V.) guyanensis*. As duas NIB aumentaram a atividade celular, demonstrando não serem tóxicas para macrófagos murinos, obtendo resultados superiores aos do Glucantime[®]. Os resultados são promissores e apontam para dois novos materiais com potencial aplicação na terapêutica da LCA, mas estudos complementares que envolvam atividade pró-inflamatória e que sejam executados em modelos *in vivo* são necessários para confirmar essa eficácia.

Palavras-chave: Leishmaniose, Nanotecnologia, NP, NIB, Nb, Ta, Doença Negligenciada.

INTRODUÇÃO

Os antimoniais pentavalentes foram a principal indicação terapêutica nas últimas nove décadas (RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010), para o tratamento da Leishmaniose Cutânea Americana (LCA), doença parasitária promovida pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (SANTOS et al., 2008). Com incidência média anual de mais de 50 mil (OPAS/OMS, 2016) a situação epidemiológica se agrava em decorrência do aumento de casos de resistência, principalmente em decorrência de falhas terapêuticas (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; AMATO et al., 2007; DUTHIE et al., 2012).

Os antimoniais, assim como as opções ao seu tratamento, como o isetionato de pentamidina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal ou mitelfosina, (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017), apresentam alta toxicidade, diversidade de efeitos colaterais e eficácia limitada a algumas espécies, fatores que impulsionam as falhas terapêuticas (MOREIRA; GUERRA; PETRILLO-PEIXOTO, 1992; RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; BRASIL, 2017).

Inovações farmacêuticas são possibilitadas pela nanotecnologia, podem possibilitar o desenvolvimento de novas terapias a base de drogas já existentes ou de novos princípios ativos, que por algum motivo, geralmente a toxicidade, inviabilizam as suas administrações. A grande vantagem nesse tipo de abordagem é a possibilidade de controle na liberação e de direcionamento dos fármacos, o que poderia aumentar a eficácia dos tratamentos, os quais poderiam ser realizados com concentrações menores de princípio ativo, diminuído a toxicidade, a produção de metabólitos secundários indesejados e, conseqüentemente, os efeitos adversos (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; SINGH et al., 2012).

A escolha dos princípios ativos é o ponto de partida no desenvolvimento desses novos produtos em escala nanométrica. O Antimônio (Sb), princípio ativo do Glucantime[®], antimonial pentavalente utilizado no tratamento de LCA, já foi utilizado em sistemas nanométricos e nanopartículas, sendo evidenciada atividade leishmanicida, entre outros protozoários (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; ALLAHVERDIYEV et al., 2011; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012;

RAMEZANI; JEBALI; KAZEMI, 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; FRANCO et al., 2016). Partindo do princípio de que a atividade do Sb sobre os protozoários é decorrente de suas propriedades físico-químicas, assim como de outros metais já descritos na literatura em sistemas nanométricos, existe uma grande chance de sucesso em se explorar novos metais e semimetais como princípios ativos, assim como novas matrizes que possam ser associadas a eles (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016). Diante disso, elementos como o Nióbio (Nb) e o Tântalo (Ta), pouco explorados quanto ao potencial terapêutico e com grandes reservas no Brasil, podem apresentar atividade leishmanicida explorável pela indústria farmacêutica, não havendo apenas trabalhos que evidenciam alguns efeitos celulares promovidos por eles (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016), mas sem referências quanto a atividade deles no tratamento da LCA, assim como sobre protozoários do gênero *Leishmania*.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi sintetizar, caracterizar e avaliar a eficácia de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) à base de óxidos de Nióbio e de Tântalo contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) à Base de Óxidos de Nióbio e Tântalo [Patente solicitada: INPA n^o de Registro]:

As NIB foram sintetizadas por uma abordagem “*bottom-up*” (tradução livre: de baixo para cima; i.e. da molécula à nanopartícula), utilizando metodologia “*one-pot*”, em meio aquoso, podendo ser realizado à temperatura ambiente e ao ar livre. O processo de síntese e detalhes técnicos está em processo de patenteamento (solicitação de patente – ANEXO-B), mas de maneira geral consistiu na obtenção dos óxidos metálicos, com a posterior formação da nanomatriz inorgânica.

Caracterização físico-química das Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) à Base de Óxidos de Nióbio e Tântalo:

As NIB de Nb e Ta foram caracterizadas quanto ao tamanho da partícula, por dispersão dinâmica de luz laser (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), e quanto a sua carga elétrica, a partir da aferição do potencial Zeta (ζ -Potential). O DLS e o Potencial Zeta foram aferidos no equipamento *Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Filadélfia, PA)*, enquanto as microfotografias foram obtidas a partir de microscópio eletrônico de transmissão *FEI TECNAI G12 Spirit-Twin*, equipado com um fundo montado com câmera *FEI CCD Eagle-4k (Eindhoven, Holanda)*.

Avaliação da eficácia leishmanicida:

A eficácia antiprotozoária das NIB de Nb e Ta foram avaliadas em bioensaios utilizando promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Os protozoários foram cultivados em garrafas para cultivo celular contendo meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)*, suplementado com soro fetal bovino inativado (SFBi) e 50 µg/mL de gentamicina. A replicação parasitária foi avaliada depois de incubação à 24 °C, em intervalos de oito horas, com a finalidade de obter parasitas na fase estacionária 2 (platô) da curva de crescimento, parâmetro utilizado para a escolha dos parasitos que foram utilizados nos bioensaios. Os bioensaios foram divididos em três etapas: atividade contra promastigotas (Bioensaio I); Citotoxicidade em macrófagos murinos (Bioensaio II); e atividade contra amastigotas (Bioensaio III).

Bioensaio I - atividade contra promastigotas de *Leishmania*:

Meio RPMI-1640 foi suplementado com diferentes concentrações das NIB propostas, NIB-Nb e NIB-Ta, do controle positivo (Glucantime[®]), além de um controle negativo com solução salina 0.8%, os quais foram distribuídos em placas de 96 poços. Todos os tratamentos foram realizados seguindo modelo de diluição seriada, com concentração inicial de 15 µM/mL e final de 0,12 µM/mL. Suspensões parasitárias, ajustadas à 2×10^5 parasitos/mL, foram preparadas para cada espécie de *Leishmania* proposta, sendo adicionadas as placas contendo os tratamentos. As placas foram incubadas à 24-26 °C, e analisadas após 24 e 48 horas quanto a viabilidade parasitária, utilizando como parâmetros a motilidade flagelar e dano a membrana plasmática, evidenciados em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica em 400x, após coloração com Azul de Trypan (Trypan Blue 0.5% - EUROCLONE, Pero, MI, ITA).

Bioensaio II - Citotoxicidade em macrófagos murinos:

Macrófagos obtidos de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) por lavagem peritoneal com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SBFi, foram utilizados na preparação de suspensão celular, ajustada à 1×10^4 macrófagos/mL, e depois distribuídos em placas de 96 poços. As células foram incubadas à 37 °C / 5% de CO₂ durante 24 horas, para adesão das células à superfície da placa de poliestireno. Após a incubação, o volume dos poços foi descartado, permanecendo apenas os macrófagos aderidos, e foram adicionadas as NIB e controles (positivo e negativo), conforme descrito para o Bioensaio I, obedecendo ao gradiente de concentração de 15,00 µM/mL (concentração inicial) até 0,12 µM/mL (menor concentração), em RPMI-1640 suplementado com 10% de SBFi. As placas foram então incubadas (37 °C / 5% de CO₂) e analisadas após 24 e 48 horas de tratamento. A citotoxicidade foi avaliada após a adição de 10 µL de resazurina (3 mM), reagente Alamar Blue[®] (Alamar Blue Cell Viability Reagent - Invitrogen[™], Eugene, OR, USA) a cada poço, e incubação (37 °C / 5% CO₂) por 4 h. Após este período, a absorbância de cada tratamento foi medida em um

leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm, os valores observados nos tratamentos foram comparando com os da curva de controle, estabelecidos a partir das medidas do controle negativo para viabilidade celular (poços sem células) e controle positivo para viabilidade celular (poços contendo células não tratadas) para determinar a porcentagem de atividade celular (RODRIGUES, 2009).

Bioensaio III - atividade contra amastigotas de *Leishmania*:

Macrófagos obtidos de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) por lavagem peritoneal com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SBFi, foram utilizados na preparação de suspensão celular, ajustada à 1×10^4 macrófagos/mL, e depois distribuídos em uma placa de 24 poços, contendo lamínulas de vidro em seu interior, em volume total de 1 mL/poço. Após incubação por 24 horas à 37 °C / 5% CO₂, o volume dos poços foi descartado, mantendo apenas as lamínulas onde os macrófagos estavam aderidos, e adicionado a cada poço 1 mL de suspensão parasitária [promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) guyanensis*] em RPMI (+10% SBFi), ajustado à 1×10^5 parasitos/mL, para promover a infecção dos macrófagos e o conseqüente desenvolvimento das formas amastigotas após nova incubação (34 °C / 5% CO₂). Após o período de infecção, o volume dos poços foram descartados e, após sucessivas lavagens com solução salina (0,8%), foi adicionado 1 mL de solução dos compostos (NIB-Nb e NIB-Ta), do controle positivo (Glucantime[®]) e do controle negativo (solução salina 0,8%), em RPMI, ajustados às concentrações de 6,00 a 0,38 µM/mL, a cada poço. As placas foram incubadas à 37 °C / 5% CO₂ por 24 e 48 horas, e após cada período de incubação, os volumes eram descartados, as lamínulas lavadas com solução salina (0,8%) e o material celular aderido a lamínula fixada e corada utilizando kit de coloração Panótica (Panótico Rápido – Laborclin[®] produtos para laboratórios Ltda, Pinhais, PR, BRA). As lamínulas foram fixadas em lâminas de vidro e analisadas sob microscopia óptica, em aumento de 400-1000x, onde a porcentagem de células parasitadas e o número médio de parasitas por célula infectada foram observados para determinar a taxa de infecção (TI).

Percentual de Eficácia (%E) Leishmanicida:

Os resultados do Bioensaio III foram utilizados para calcular o %E, de acordo com a fórmula a seguir, onde \bar{X}_{NCG} e \bar{X}_{TG} são as médias aritméticas da viabilidade parasitária (%) no controle negativo (NCG) e nos grupos tratados (TG), respectivamente (COLES et al., 1992):

$$\%E = \frac{\bar{X}_{NCG} - \bar{X}_{TG}}{\bar{X}_{NCG}} \times 100$$

Análise Estatística:

A partir dos resultados do Bioensaio I foram determinadas as Concentrações Inibitórias para 50% (CI₅₀) por regressão linear. Todos os resultados observados foram submetidos a Análise de Variância – ANOVA (p < 0,05), utilizado para identificar variação entre os diferentes tratamentos propostos. Também foi realizado teste de *Tukey* (p < 0,05) para apontar diferenças significativas entre os tratamentos e os controles, positivo e negativo. As avaliações estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 6.0*.

RESULTADOS

Os resultados descrevem a obtenção de dois produtos a base de óxido de Níobio e de óxido de Tântalo em escala nanométrica, conforme caracterização descrita a seguir, os quais foram utilizados para se estimar a eficácia de suas ações contra diferentes formas evolutivas de espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*. Todos os resultados da atividade leishmanicida foram comparados aos obtidos com o tratamento com antimoniato de

meglumina (Glucantime[®]), droga de escolha para o tratamento de LCA no Brasil e outros países da América. Os resultados apontaram para uma atividade leishmanicida maior do Ta, em relação ao Nb, assim como a não citotoxicidade dos produtos contra macrófagos peritoneais murinos.

Síntese e caracterização das Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB):

As NIB obtidas ficaram dentro da escala nanométrica desejada para os fins propostos (NIB < 100 nm), contendo de 99-100% das NIB-Nb tamanho médio de $76,53 \pm 1,00$ nm e 73-84% das NIB-Ta tamanho médio de $19,22 \pm 0,24$ nm (Figura 22). Os potenciais Zeta médios foram de $19,63 \pm 0,65$ para a NIB-Nb e de $22,57 \pm 1,10$ mV para a NIB-Ta.

As imagens obtidas a partir de MET evidenciam NIB-Ta bem formadas, com uniformidade estrutural e de tamanho, enquanto as NIB-Nb apresentaram variação nesses parâmetros. A média de tamanho contrastou com a obtida por DSL, como podemos observar na Figura 23, tendo as NIB-Nb tamanho médio de $47,75 \pm 7,26$ nm, enquanto as NIB-Ta apresentaram tamanho médio de $35,33 \pm 1,83$ nm.

Figura 22: Tamanho de partícula estimada por dispersão de luz (DSL). A = NIB-Nb; B = NIB-Ta. As curvas em cores diferentes representam as réplicas usadas na leitura. Size = Tamanho; Intensity = Intensidade; d.nm = diâmetro em nanômetros. Gráfico gerado no *Zetasizer software 7.11*.

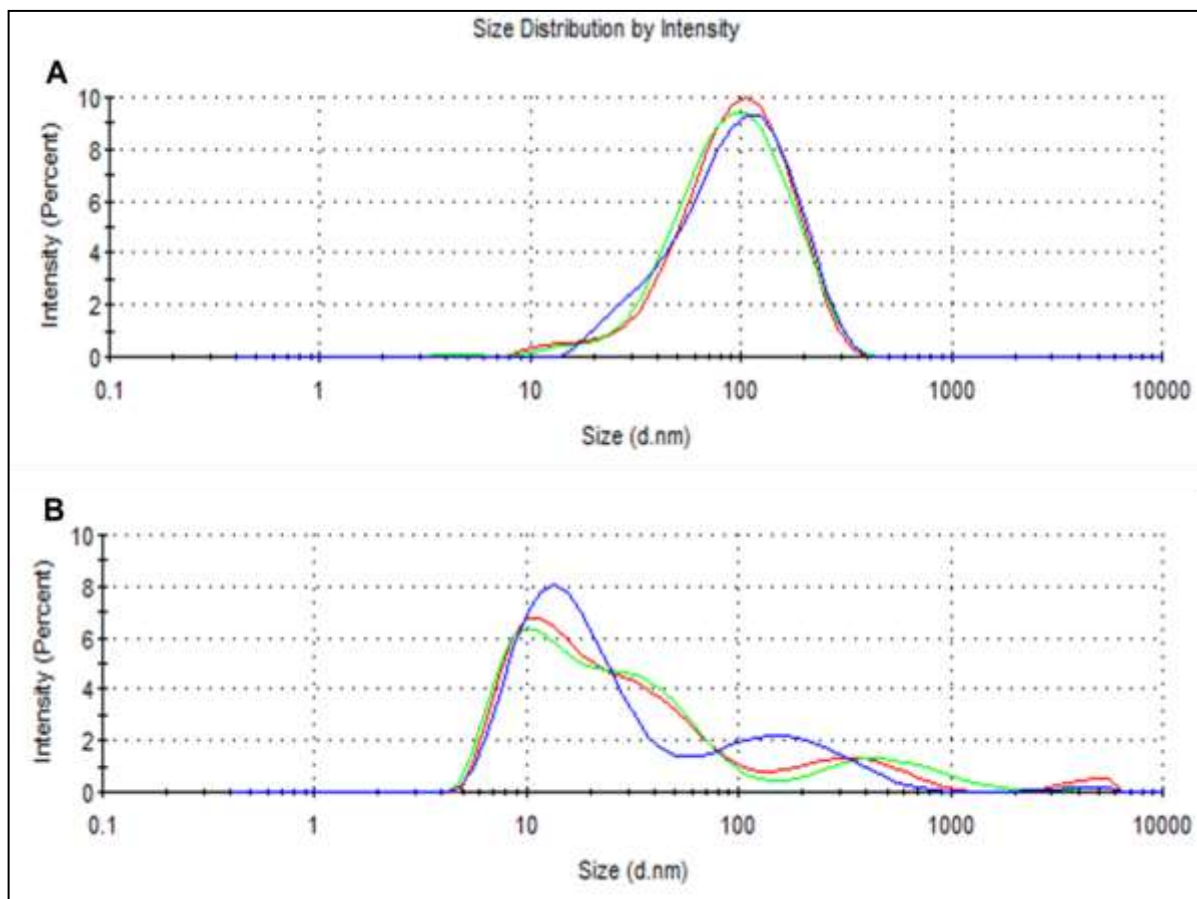
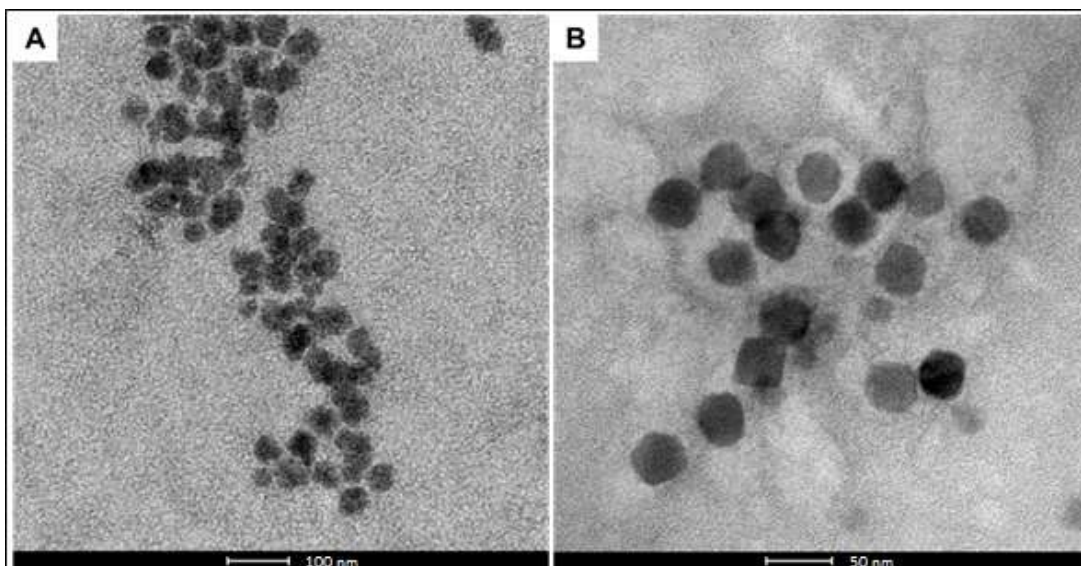


Figura 23: Fotomicrografias das NIB-Nb (A) e NIB-Ta (B) obtidos a partir de microscopia eletrônica de transmissão. NIB = Nanomatriz Inorgânica Bioativa. Escala (A) = 100 nm; Escala (B) = 50 nm.



Atividade Leishmanicida – ensaio contra promastigotas:

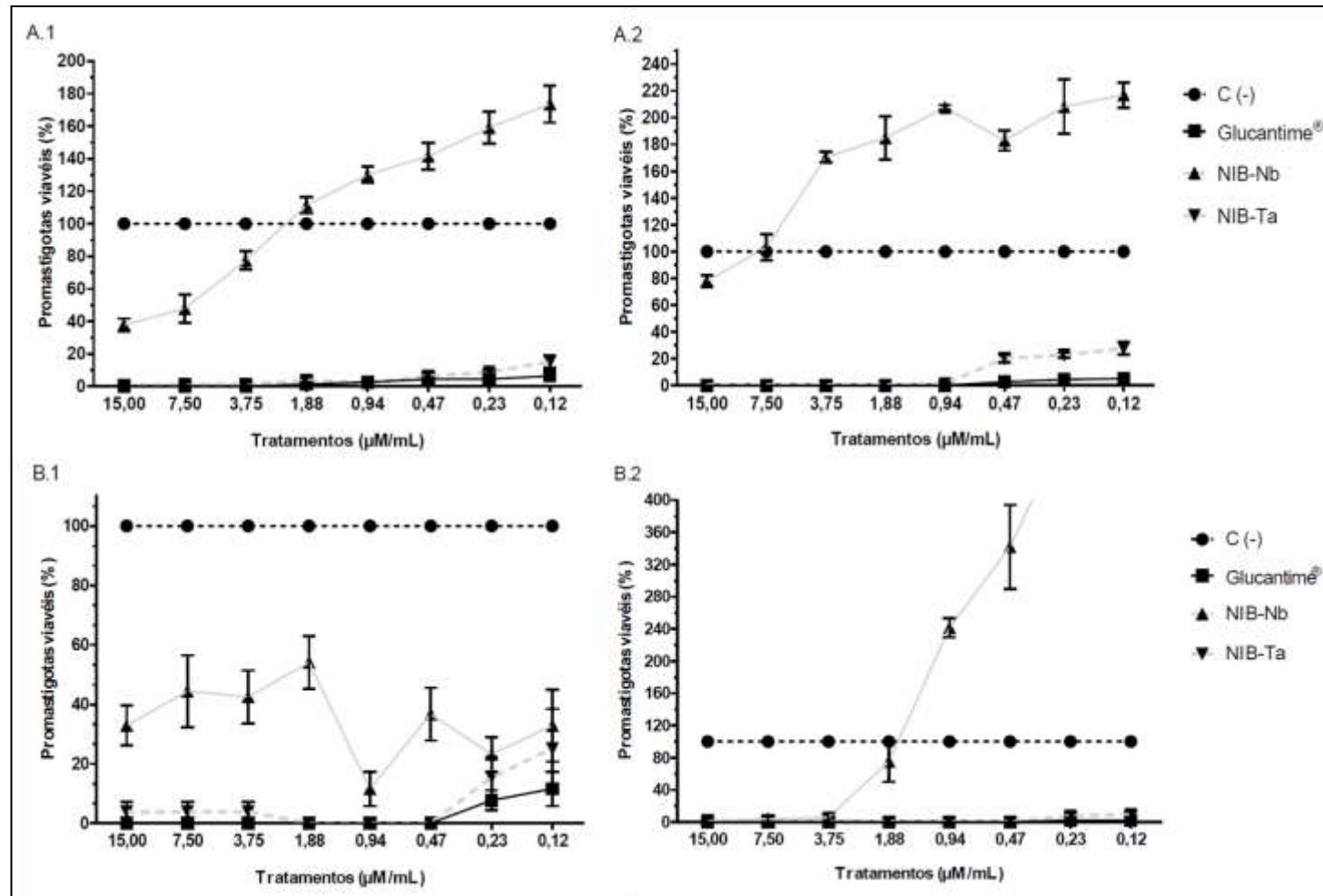
A susceptibilidade das duas espécies, na forma promastigotas, foi maior para a NIB-Ta, quando comparado a NIB-Nb (Figura 24). A NIB-Nb estimulou a replicação dos protozoários das duas espécies desde as maiores concentrações, tendo efeito estimulante aumentado quando a concentração era reduzida.

A atividade da NIB-Ta foi semelhante ao do Glucantime[®] em todas as concentrações contra *L. (L.) amazonensis* em 24 horas exposição e em concentrações superiores a 0,94 $\mu\text{M}/\text{mL}$ após 48 horas de exposição dessa mesma espécie. Quando comparado o efeito da NIB-Ta com o do Glucantime[®] sobre *L. (V) guyanensis*, não é possível verificar diferença significativa (teste de *Tukey*, $p < 0,05$) entre os tratamentos após 24-48 horas.

A NIB-Nb provocou aumento da replicação parasitária de *L. (L.) amazonensis*, se destacando em relação ao controle negativo em concentrações inferiores a 3,75 $\mu\text{M}/\text{mL}$, após 24 horas de exposição, e em concentrações menores que 7,50 $\mu\text{M}/\text{mL}$, após 48 horas (Figura 24 A.1 e A.2).

O efeito da NIB-Ta também foi melhor contra a espécie *L. (V) guyanensis*, quando comparada a NIB-Nb, mas diferente do efeito estimulatório que a NIB-Nb teve sobre a *L. (L.) amazonensis*, com contagem de protozoários maior que o controle negativo (Figura 24 A.1 e A.2), esta apresentou efeito inibitório sobre a *L. (V) guyanensis* após 24 horas de exposição, em todas as concentrações, quando comparado ao controle negativo (Figura 24 B.1), mantendo o efeito inibitório após 48 horas de exposição apenas nas concentrações superiores a 1,97 μ M (Figura 24 B.2).

Figura 24: Atividade leishmanicida de NIB contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A.2 e B.2 - 48 horas. C(-) = Controle negativo (solução salina); NIB = Nanomatriz inorgânica bioativa; Nb = Nióbio; Ta = Tântalo.

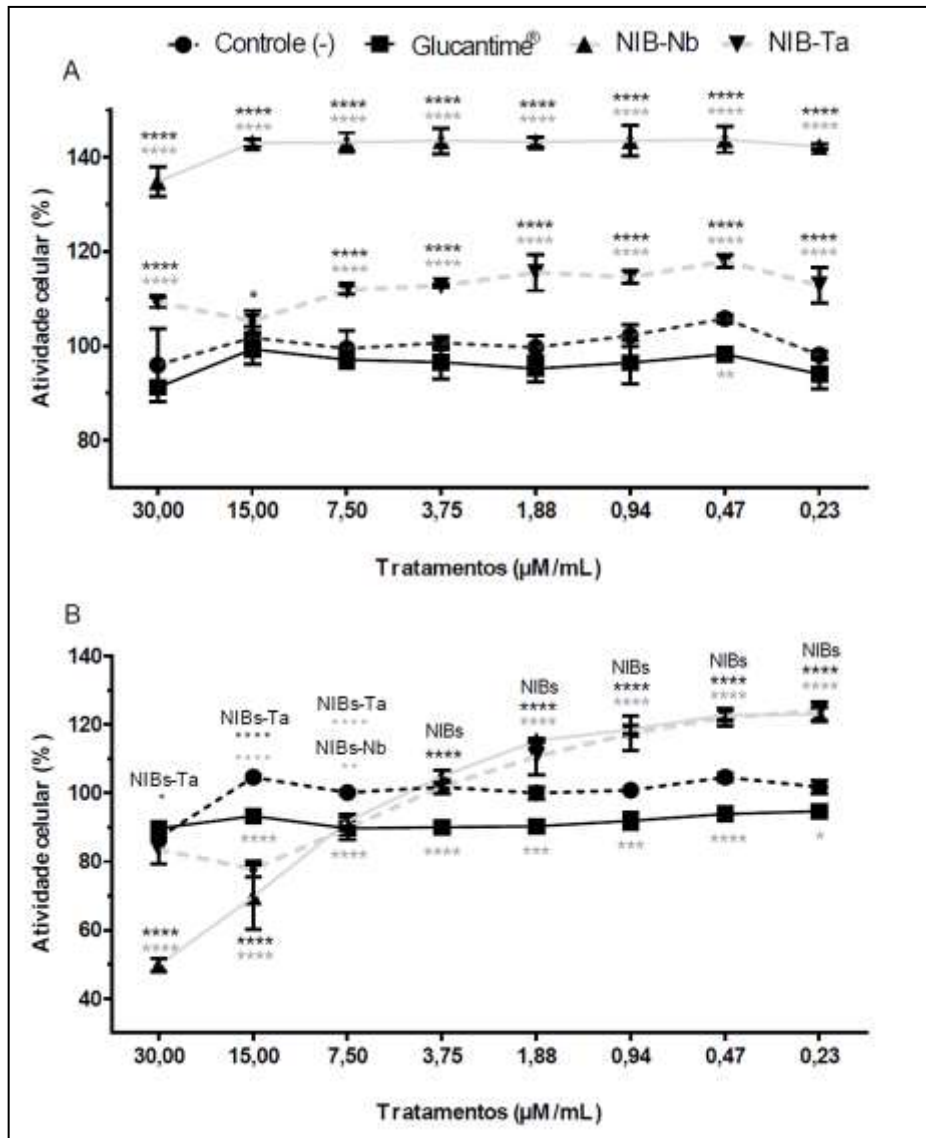


Citotoxicidade:

As NIB de Nb e Ta estimularam a atividade celular, mantendo-se superiores ao observado no controle negativo após 24 horas de exposição (teste de *Tukey*, $p < 0,001$) [Figura 25 A]. A NIB-Nb apresentou, em média, 40% de atividade celular superior ao controle negativo em todas as concentrações após 24 horas. Apenas o Glucantime® apresentou atividade celular menor que o observado no controle negativo, mas essa redução não foi significativa em relação ao controle negativo na grande maioria das concentrações após 24 horas.

Após 48 horas de exposição às concentrações a partir de 7,50 $\mu\text{M/mL}$ da NIB-Nb ocorreu redução na atividade celular em relação ao controle negativo, mas em concentrações inferiores a 7,50 $\mu\text{M/mL}$ essa NIB estimulou a atividade celular em relação ao mesmo controles (teste de *Tukey*, $p < 0,001$). A NIB-Ta não apresentou redução de atividade celular significativa em relação ao controle negativo na maioria das concentrações avaliadas, com exceção de 15,00 e 7,50 $\mu\text{M/mL}$ (teste de *Tukey*, $p < 0,001$), enquanto o Glucantime® reduziu a atividade celular, em relação ao controle negativo em todas as concentrações testada (teste de *Tukey*, $p < 0,05-0,001$) [Figura 25 B].

Figura 25: Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos após exposição as nanomatrizes (NIB) por 24 (A) e 48 horas (B). “*” = diferença significativa entre o tratamento e o controle negativo; “***” = diferença significativa entre o tratamento e o controle positivo (Glucantime®). *, **, *** e **** = $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ e $p < 0,001$, respectivamente (teste de Tukey).



Atividade Leishmanicida – ensaio contra amastigotas:

As NIB se destacaram quanto à redução da taxa de infecção (TI) em relação ao Glucantime[®] em todos os tratamentos propostos para as duas espécies de *Leishmania*. Contra *L. (L.) amazonensis* a NIB-Ta apresentou menor TI em todas as concentrações em relação ao Glucantime[®] após 24-48 horas de exposição (teste de *Tukey*, $p < 0,001$), enquanto a NIB-Nb apenas na concentração de 1,50 $\mu\text{M/mL}$, após 24 horas de exposição, e em 3,00 e 1,50 $\mu\text{M/mL}$, após 48 horas de exposição (Figura 26 A.1 e A.2).

A redução na taxa de infecção por *L. (V.) guyanensis* foi maior em todas as concentrações utilizadas das duas NIB (Nb e Ta) em relação ao Glucantime[®] (teste de *Tukey*, $p < 0,001$), não havendo diferença significativa entre a NIB-Nb e NIB-Ta, nas exposições por 24 e 48 horas (Figura 26 B.1 e B.2)

O número de amastigotas por macrófago parasitado variou entre 1 a 3 amastigotas por macrófagos, nas duas espécies e nos dois períodos de exposição propostos, não havendo diferença significativa entre os valores observados nos tratamentos e nos controles negativos (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

A redução das TI dos macrófagos pelas duas espécies propostas, após o tratamento com as NIB de Nb e Ta evidenciaram a maior eficácia dessas NIB em relação ao Glucantime[®] (Figura 27). Apesar das NIB se destacarem em relação ao Glucantime[®] em todos os tratamentos e após 24-48 horas de exposição do *L. (V.) guyanensis* (teste de *Tukey*, $p < 0,001$) [Figura 27 B.1 e B.2], o NIB-Ta apresentou maior eficácia contra a espécie *L. (L.) amazonensis*, onde teve eficácia maior em todos os tratamentos, em relação ao Glucantime[®] e a NIB-Nb, após 24 horas de exposição (teste de *Tukey*, $p < 0,001$), e melhor eficácia que o Glucantime[®] em todos os tratamentos após 48 horas de exposição, comparável nesse cenário apenas a eficácia da NIB-Nb (teste de *Tukey*, $p < 0,001$) [Figura 27 A.1 e A.2].

Figura 26: Taxa de infecção (TI) de macrófagos por amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A.2 e B.2 = 48 horas. "*" = diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle positivo (Glucantime®).

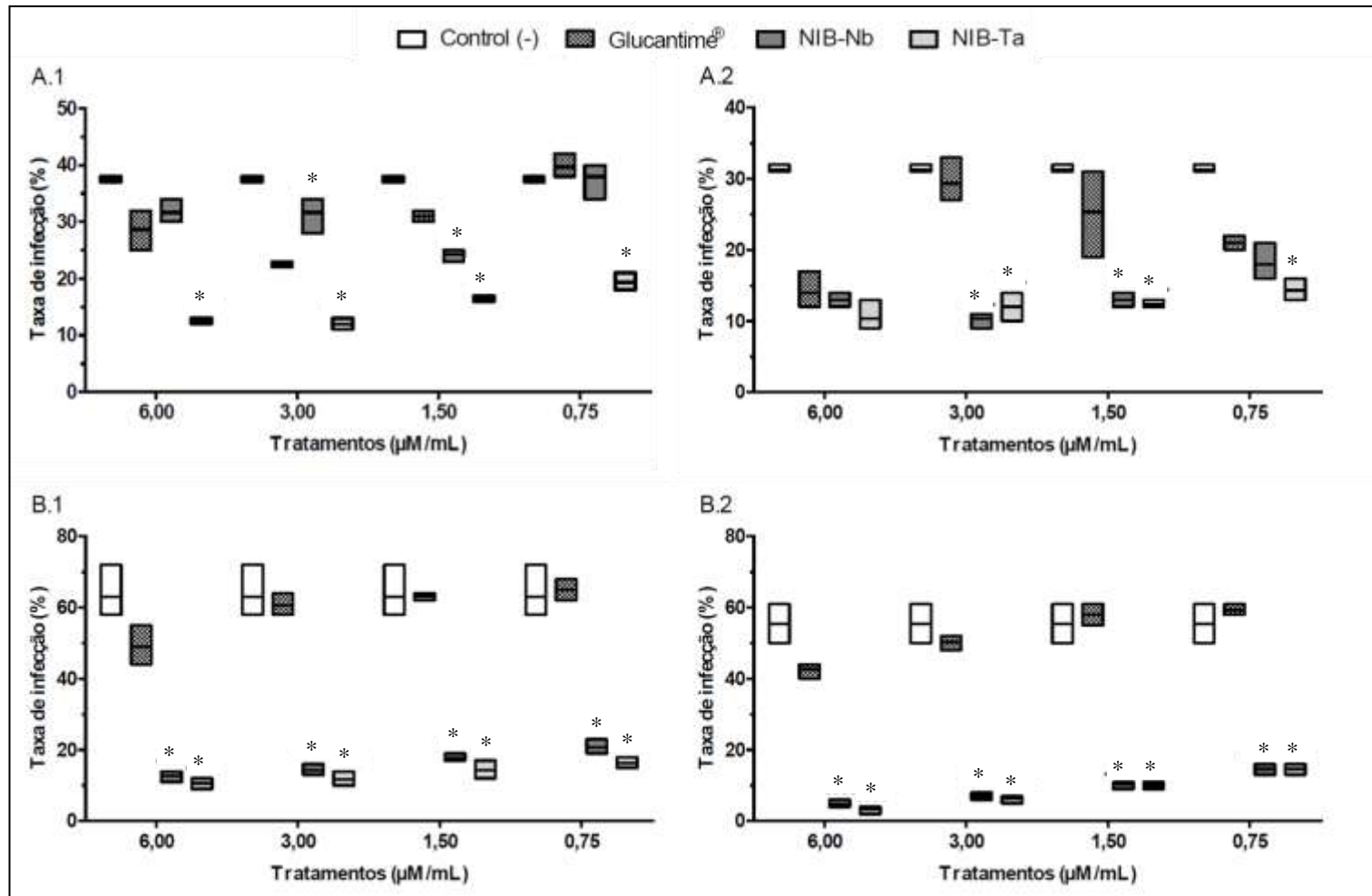
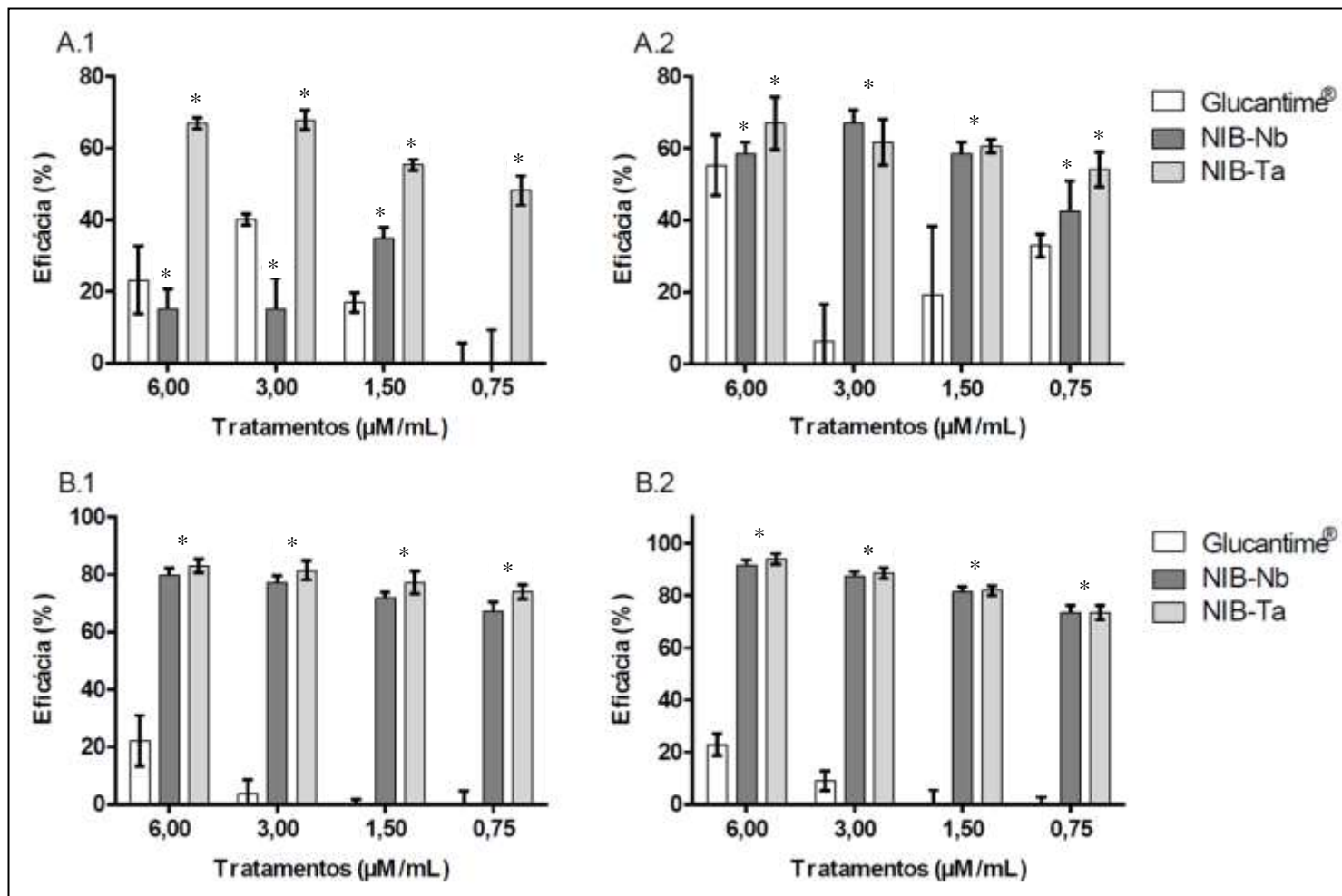


Figura 27: Percentual de Eficácia (%E) das NIB sobre macrófagos parasitados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). A.1 e B.1 = 24 horas; A.2 e B.2 = 48 horas. "*" diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$) entre tratamentos e o controle positivo (Glucantime®).



DISCUSSÃO

A literatura já descreveu inúmeros processos de obtenção de nanomateriais de nióbio e de tântalo, mas a maioria deles sem uma potencial aplicação terapêutica. Rani et al. (2014) revisou vários métodos de preparação de nanopartículas de óxido de nióbio (Nb_2O_5), mas os materiais não são hidrossolúveis, o que restringe a sua atividade biológica e consequente biodisponibilidade em possíveis aplicações terapêuticas. As nanomatrizes bioativas descritas no presente estudo foram preparadas e estabilizadas em hidrosóis e, consequentemente, hidrossolúveis, apresentando assim as características necessárias a aplicações e usos terapêuticos, apresentando, conforme descrito nos resultados, potencial para aplicação na LCA. Uekawa et al. (2003) descreveu processo de preparação de nanopartículas de óxido de nióbio (Nb_2O_5) por precipitação, separação e purificação do precipitado, seguidos por peptização com o peróxido de hidrogênio à temperaturas de 75 – 95 °C. Além de consistir em um processo complicado que envolve várias etapas, inclusive a separação e purificação de fases diferentes, a metodologia proposta no artigo utiliza reagentes nocivos e até explosivos à temperaturas elevadas, o que pode provocar grandes riscos para trabalhadores e meio ambiente, não sendo destacada no trabalho nenhuma atividade potencial dos produtos contra qualquer protozoário.

Oh et al. (2011) descreve procedimento da síntese em microemulsão, modificação superficial “one-pot” e aplicação do material à base de nanopartículas do óxido do tântalo (TaO_x) bioinerte para tomografia e visualização por raio X, não sendo descrito atividade terapêutica que possa ser associada a essas partículas. Bonitatibus, Jr. et al. (2010) também dedicou uma publicação a descrição da obtenção e caracterização de nanopartículas do óxido de tântalo (V), mas também como agente de contraste para tomografia por raio X, sem aplicação terapêutica definida. As nanopartículas, nesse relato, são obtidas a partir de um precursor organometálico em meio misto de solventes orgânicos e aquosos, sob uma atmosfera controlada. Kominami et al. (2001) descreve a obtenção de material sólido nanoparticulado, obtido por tratamento térmico da solução orgânica do precursor organotântálico, consistindo em NP de Ta_2O_5 nanoparticuladas, não hidrossolúvel e sem nenhuma atividade biológica.

As nanomatrizes propostas nesse estudo diferem dos outros exemplos dados para obtenção de nanomateriais à base de óxidos de Nb e de Ta, principalmente, por serem obtidos por uma abordagem “*bottom-up*” (tradução livre: de baixo para cima; i.e. da molécula à nanopartícula), num procedimento “*one-pot*”, em meio aquoso, que pode ser realizado à temperatura ambiente e ao ar livre. Além disso, a tecnologia para a produção das NIB pode ser considerada “verde”, em relação às citadas, porque permite a economia considerável de materiais e energia, não produzem produtos colaterais e rejeitos que contaminam o meio ambiente, além de terem demonstrado aplicabilidade terapêutica e potencial leishmanicida.

Relatos de atividade leishmanicida de NP ou outros nanomateriais a base de óxidos de Nb ou de Ta contra espécies envolvidas na LCA não foram encontrados na literatura até o presente momento. O nióbio vem sendo estudado quanto ao potencial de promoção de angiogênese, mobilização de resposta celular e indução de inflamação (SAGHIRI et al., 2016), além de ser relacionado como um potencial princípio ativo na produção de antivirais (CHELLAN; SADLER, 2015), mas não tem aplicações descritas no controle de parasitos, como os da *Leishmania*. Já Tântalo, o qual também não tem relatos de atividade terapêutica antiparasitária descrita, vem sendo pesquisado para cânceres, como marcador para diagnóstico e para ação local nas células de replicação acelerada (JIN et al., 2015). Caballero; Salas; Sánchez-Moreno, (2014) destacou em extensa revisão sobre aplicabilidade bem sucedida de complexos metálicos no controle da *Leishmania* em modelos *in vitro*, mantendo índices de citotoxicidade baixíssimas, que produtos que apresentam potencial anticancerígeno podem demonstrar potencial contra leishmânias, principalmente pelo seu acelerado processo replicativo (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014).

Resultados *in vitro* contra duas espécies de subgêneros distintos e em formas evolutivas também distintas não foram encontrados para traçar uma comparação mais adequada. Entretanto, outras nanopartículas metálicas foram testadas contra *L. (L.) amazonensis* e demonstraram efeito leishmanicida satisfatório, em relação ao controle utilizado. Franco et al. (2016) demonstraram o efeito até três vezes maior das NP de óxido de antimônio sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em relação ao Glucantime[®], droga utilizada como controle. Fanti et al. (2018) descreveu efeito leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com NP de prata obtidas por biossíntese do *Fusarium oxysporium*, destacando que além do efeitos contra as diferentes

formas do protozoário, não observaram aumento da síntese de imunomoduladores que poderiam induzir inflamação, efeito indesejado no tratamento da LCA.

Jebali; Kazemi (2013) demonstraram o efeito de NP dos óxidos metálicos de titânio (NP-TiO₂), de zinco (NP-ZnO) e de magnésio (NP-MgO) sobre *L. (L.) major* em modelos *in vitro*, onde foi evidenciado uma menor viabilidade celular, proliferação parasitária, infectividade e índice de infecção, quando os protozoários eram expostos as NP, com eficácia maior do que as observadas no controle. No mesmo estudo foi demonstrada a mesma ação de NP de prata (NP-Ag) de ouro (NP-Au), as quais foram apontadas com as mais eficazes dentre todas as avaliadas. Os pesquisadores apontaram uma alta toxicidade celular sobre macrófagos quando expostos a essas NP (NP-TiO₂, NP-ZnO, NP-MgO, NP-Ag e NP-Au), fato pelo qual fizeram ressalvas quanto à possibilidade de aplicação. Em nosso estudo observamos a alta eficácia das NIB de Nb e de Ta, associadas à baixa toxicidade celular, o que nos garante uma segurança maior em ensaios futuros em modelos *in vivo*.

Outros exemplos de nanomateriais também já foram descritos, como o relato de Sharifi et al. (2018), que destacaram o efeito de nanopartículas de sulfeto de zinco (ZnS), obtido por biossíntese a partir de *Phoenix dactylifera*, sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) major*, onde visualizaram uma atividade duas vezes maior do Glucantime[®] em relação as NP-ZnS, não sendo considerado citotóxico, de acordo com os resultados colorimétricos obtidos para macrófagos murinos. No presente estudo também foi verificado a falta de toxicidade celular mensurável pelas mesmas técnicas colorimétricas, mas destacamos que o efeito das NIB de Nb e Ta, principalmente contra os amastigotas, foi mais eficaz do que o Glucantime[®], principalmente contra a *L. (V.) guyanensis* (Figura 26).

A revisão da literatura deixa evidente que os dados obtidos no presente estudo foram satisfatórios, visto que teve alta eficácia em comparação ao controle positivo e teve baixa ou nula toxicidade celular, principais objetivos de outros trabalhos já discutidos. O que destaca a importância dos nossos resultados é a possibilidade de ação de um mesmo produto contra espécies diferentes e com sensibilidades diferentes, dado não observado nas fontes consultadas até o momento. Destacamos que pela possibilidade de resposta inflamatória, que esses materiais possam promover, dado já descrito para o Nb, modelos e aplicações em cobaias devem ser planejadas com cautela, a fim de se observar o efeito leishmanicida explicitado nos resultados dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO(2) and Ag(2)O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933–940, ago. 2011. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.11.78>>.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–74, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690398>>.

BHARDWAJ, R.; SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Nanobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. **Special Issue: Our endless war with microbes.**, v. 4, n. 3, p. 97–103, 2012. Disponível em: <<http://mcpharmacol.com/index.php/Journals/article/viewFile/182/173>>.

BONITATIBUS, JR., P. J.; TORRES, A. S.; GODDARD, G. D.; FITZGERALD, P. F.; KULKARNI, A. M. Synthesis, characterization, and computed tomography imaging of a tantalum oxide nanoparticle imaging agent. **Chemical Communications**, v. 46, n. 47, p. 8956, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0cc03302b>>.

BRASIL, M. da saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 1a. ed. [s.l.: s.n.], 2017a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] InTech, 2014. p. 465–493.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010. Disponível em: <<http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/167/62887>>.

CHELLAN, P.; SADLER, P. J. The elements of life and medicines. **Philosophical**

transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences, v. 373, n. 2037, p. 20140182–20140182, 13 mar. 2015. Disponível em: <<http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2014.0182>>.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 44, n. 1–2, p. 35–44, set. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1441190>>.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205002539>>.

DUTHIE, M. S.; RAMAN, V. S.; PIAZZA, F. M.; REED, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11017592>>.

FANTI, J. R.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; CATANEO, A. H. D.; ANDRADE, C. G. T. de J.; PANIS, C.; RODRIGUES, H. da S.; WOWK, P. F.; KUCZERA, D.; COSTA, I. N.; NAKAMURA, C. V.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta Tropica**, v. 178, p. 46–54, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>>.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A.; SARGENTINI JR, E.; CARFAGNA, C.; LESKELÄ, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 6771–6780, dez. 2016. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/nanoscaled-hydrated-antimony-v-oxide-as-new-approach-to-the-first-line-peer-reviewed-article-IJN>>.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, set. 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233313001537>>.

JIN, Y.; MA, X.; FENG, S.; LIANG, X.; DAI, Z.; TIAN, J.; YUE, X. Hyaluronic Acid Modified Tantalum Oxide Nanoparticles Conjugating Doxorubicin for Targeted Cancer Theranostics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2530–2541, 16 dez. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.5b00551>>.

KOMINAMI, H.; MIYAKAWA, M.; MURAKAMI, S.; YASUDA, T.; KOHNO, M.; ONOUE, S.; KERA, Y.; OHTANI, B. Solvothermal synthesis of tantalum(V) oxide nanoparticles and their photocatalytic activities in aqueous suspension systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, n. 13, p. 2697–2703, 2001. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b101313k>>.

MOREIRA, E. S.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. de L. Glucantime resistant Leishmania promastigotes are sensitive to pentostam. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 4, p. 247–50, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340539>>.

OH, M. H.; LEE, N.; KIM, H.; PARK, S. P.; PIAO, Y.; LEE, J.; JUN, S. W.; MOON, W. K.; CHOI, S. H.; HYEON, T. Large-Scale Synthesis of Bioinert Tantalum Oxide Nanoparticles for X-ray Computed Tomography Imaging and Bimodal Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 14, p. 5508–5515, 2011.

OPAS/OMS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas Informe Leishmanioses.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=35857&lang=en>.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, out. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764604000652>>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Infectious Diseases List.** Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=

40250&lang=en>. Acesso em: 1 maio. 2018.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

RAMEZANI, F.; JEBALI, A.; KAZEMI, B. A Green Approach for Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Leishmania* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1549–1555, 3 nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-012-9877-3>>.

RANI, R. A.; ZOOLFAKAR, A. S.; O’MULLANE, A. P.; AUSTIN, M. W.; KALANTAR-ZADEH, K. Thin films and nanostructures of niobium pentoxide: fundamental properties, synthesis methods and applications. **J. Mater. Chem. A**, v. 2, n. 38, p. 15683–15703, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TA02561J>>.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

RODRIGUES, K. C. **Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas**. 2009. Universidade de São Paulo - USP/Ribeirão Preto, 2009.

SAGHIRI, M. A.; ORANGI, J.; ASATOURIAN, A.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 290–301, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.004>>.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, nov. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108004480>>.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 560–575, mar. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09003652>>.

SHARIFI, F.; SHARIFIFAR, F.; SHARIFI, I.; ALIJANI, H. Q.; KHATAMI, M. Cytotoxicity, leishmanicidal, and antioxidant activity of biosynthesised zinc sulphide nanoparticles using *Phoenix dactylifera*. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 3, p. 264–269, 1 abr. 2018. Disponível em: <<http://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/iet-nbt.2017.0204>>.

SINGH, S. K.; GOSWAMI, K.; SHARMA, R. D.; REDDY, M. V. R.; DASH, D. Novel microfilaricidal activity of nanosilver. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 1023–1030, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/novel-microfilaricidal-activity-of-nanosilver-peer-reviewed-article-IJN>>.

UEKAWA, N.; KUDO, T.; MORI, F.; WU, Y. J.; KAKEGAWA, K. Low-temperature synthesis of niobium oxide nanoparticles from peroxo niobic acid sol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 264, n. 2, p. 378–384, 2003.

CAPÍTULO 4

Ensaio pré-clínicos de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) à base de óxidos de Nióbio e Tântalo na Leishmaniose Cutânea experimental.

Pedro Rael Cândido Domingos,^{a;b} Andrey Grafov;^c Antonia Maria Ramos Franco^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

^bLaboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil;

^cDepartamento de Química, Universidade de Helsinque, Helsinque, Finlândia.

RESUMO

A Leishmaniose Cutânea Americana (LCA) é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que se caracteriza por lesões cutâneas ou mucosas de gravidade variável. A terapêutica da LCA vem sofrendo com a emergência de casos resistentes e problemas antigos relacionadas aos medicamentos utilizados no tratamento, como a elevada toxicidade e número de efeitos adversos. A nanotecnologia possibilita a inovação terapêutica, uma vez que pode produzir efeitos mais eficazes e prolongados utilizando novos produtos, ou aqueles que apresentam toxicidade alta, em concentrações bem inferiores as usuais. Nesse estudo foram avaliadas Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIBs) de nióbio e de tântalo quanto ao efeito no tratamento experimental de Hamster (*Mesocricetus auratus*) com lesão cutânea no focinho induzida por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e por *L. (Viannia) guyanensis*. As NIBs foram administradas em intervalos de três dias, em um total de 10 aplicações intralesionais. Após o tratamento, que durou 30 dias, os animais foram eutanasiados para avaliação parasitológica [Taxa de Infecção (TI) de macrófagos e Viabilidade Parasitária (VP) em cultura], enquanto a avaliação clínica foi realizada a cada aplicação, consistindo na medição do volume de lesão. As NIB induziram ao crescimento e ulceração precoce das lesões, ultrapassando, inclusive o controle negativo. A avaliação parasitológica apontou para uma diferença de susceptibilidade entre as espécies para a NIB-Ta, mas as Taxas de Infecção (TI) de macrófagos foram de 10 a 15 vezes maiores do que a do controle positivo (Glucantime[®]). Os resultados não corroboraram com os observados nos ensaios *in vitro* provavelmente pela forte atividade pró-inflamatória induzida pelas NIB no tecido afetado.

Palavras-chave: Leishmaniose, Nanotecnologia, NP, NIB, Nb, Ta, Doença Negligenciada.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Cutânea Americana (LCA), doença parasitária promovida pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, caracteriza-se por manifestação cutânea e/ou mucosa (SANTOS et al., 2008), de incidência média anual de mais de 50 mil casos, sendo o Brasil o país que concentra o maior número de casos (OPAS/OMS, 2016). O principal problema associado a essa patologia, além do caráter negligenciado da parasitose, é a dificuldade de tratamento, que vem sofrendo com o crescente número de casos de resistência, principalmente em decorrência da seleção de cepas resistentes após falha terapêutica, escolha errada do fármaco ou abandono do tratamento (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; AMATO et al., 2007; DUTHIE et al., 2012).

Os antimoniais pentavalentes foram a principal indicação terapêutica nas últimas nove décadas (RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010), sendo substituída pelo isetionato de pentamidina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal ou mitelfosina nos casos de baixa eficiência terapêutica dos antimoniais (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os principais fatores que impulsionam as falhas terapêuticas estão relacionados a alta toxicidade, diversidade de efeitos colaterais e eficácia limitada que esses medicamentos podem apresentar (MOREIRA; GUERRA; PETRILLO-PEIXOTO, 1992; RATH et al., 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; BRASIL, 2017).

O relato de problemas no tratamento de parasitoses é comum também a outros protozoários, o que impulsionou a pesquisa por inovações farmacêuticas na área da nanotecnologia, uma vez que possibilitariam a utilização de drogas pré-existentes em menores concentrações e com maior eficácia terapêutica, ou ainda poderiam fomentar o desenvolvimento de novas drogas. Para se enquadrar nos parâmetros necessários a essa tecnologia, o material produzido deve ter tamanho entre 1-100 nanômetros (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008; ALAGARASI, 2013). A grande vantagem nesse tipo de abordagem é, além do aumento da superfície dos materiais e consequente atividade química elementar do produto, obtida a partir de dimensões tão reduzidas (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004), a possibilidade de controle na liberação e de

direcionamento dos fármacos, o que poderia aumentar a eficácia dos tratamentos, os quais poderiam ser realizados com concentrações menores de princípio ativo, o que poderia diminuir a toxicidade, a produção de metabólitos secundários indesejados e, conseqüentemente, os efeitos adversos (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; SINGH et al., 2012).

O Antimônio (Sb), semimetal princípio ativo do Glucantime[®], um dos principais tratamentos recomendados para a LCA, já foi utilizado em sistemas nanométricos para tratamento experimental da Leishmaniose, assim como de outros protozoários (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; ALLAHVERDIYEV et al., 2011; BHARDWAJ; SAUDAGAR; DUBEY, 2012; RAMEZANI; JEBALI; KAZEMI, 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; FRANCO et al., 2016). Outros semimetais também já foram descritos na literatura em sistemas nanométricos, existindo uma grande chance de que elementos com propriedades físico-químicas semelhantes possam ser bem sucedidos como princípios ativos a serem aplicados contra diferentes espécies de *Leishmania* (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016). Elementos como o Nióbio (Nb) e o Tântalo (Ta), podem apresentar potencial terapêutico contra a Leishmaniose (CHELLAN; SADLER, 2015; SAGHIRI et al., 2016), mas até o momento não há relatos relacionados a atividade desses elementos no tratamento da LCA, assim como sobre protozoários do gênero *Leishmania*.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo avaliar a eficácia de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) de óxidos de Nióbio e de Tântalo no tratamento experimental da Leishmaniose Cutânea em Hamster infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

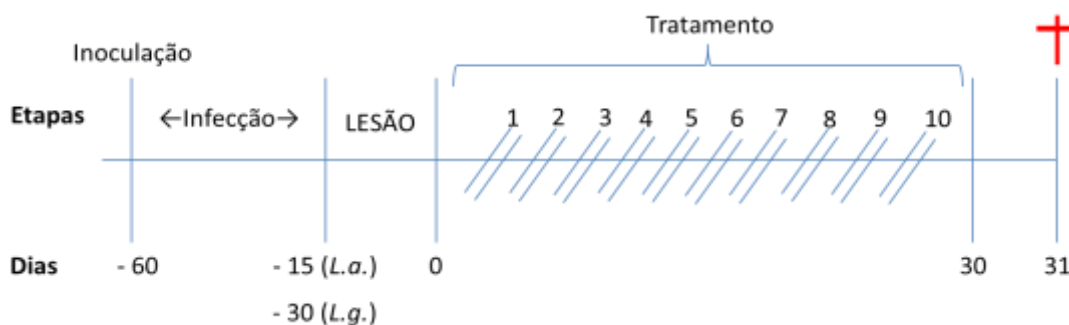
Os ensaios pré-clínicos seguiram as normas do Guia para cuidado e uso de animais de laboratório (<http://www.cobea.org.br>) do Conselho Nacional de Experimentação Animal, com parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA aprovando os experimentos (nº do parecer 008/2015 – ANEXO-B). O Biotério Central do INPA além de fornecer os animais necessários a experimentação, também disponibilizou a estrutura para manutenção, infecção e tratamento dos animais durante o experimento.

Foram utilizados gold hamsters com idade de 60 dias e peso médio de 155,2 g, acondicionados em gaiolas contendo três animais, que receberam alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos, com seis animais cada, na seguinte disposição: Controle negativo – GCNS (Grupo Controle Negativo com Salina); Controle positivo – GCPG (Grupo Controle Positivo com Glucantime®); Grupo experimental 1 – GENIB-Nb (Grupo Experimental com NIB de óxido de Nióbio); Grupo experimental 2 – GENIB-Ta (Grupo Experimental com NIB de óxido de Tântalo).

Infecção experimental em Hamster (*Mesocricetus auratus*):

Os animais foram submetidos a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e por *L. (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) a partir de inoculação subcutânea no focinho, utilizando seringa estéril, de 0,10 mL de suspensão de amastigotas, ajustada à 10^5 amastigotas/mL. Os animais infectados foram mantidos nas gaiolas, conforme a divisão em grupos, sob os cuidados do biotério central e acompanhamento diário para verificação de surgimento de lesões. O tempo médio para surgimento das lesões difere entre as espécies avaliadas, sendo verificados após 15 dias de inoculação nos animais com *L. (L.) amazonensis*, e após 30 dias nos animais com *L. (V.) guyanensis*, sendo iniciado o tratamento dos grupos conforme cronograma a seguir (Figura 28).

Figura 28: Cronograma esquemático da experimentação animal. Dez séries de tratamento, com intervalo de dois dias entre cada uma das séries, com aplicação intralesional diária de 20 mg SbV/Kg/dia do controle positivo e 3,00 μ M/dia dos tratamentos experimentais, e posterior avaliação clínica até completos 30 dias de tratamento



Tratamento experimental:

Os animais incluídos no experimento foram tratados a partir de injeção intralesional, utilizando seringas estéreis, de 50 μ L das suspensões das NIB contendo 3,00 μ M do metal princípio ativo, Nb ou Ta, em dez séries aplicações (Figura 26), com intervalo de dois dias entre cada série. Ao grupo GCNS foi administrado solução salina, enquanto aos grupos GCPG, GENIB-Nb e GENIB-Ta foram administrados Glucantime[®], NIB-Nb e NIB-Ta, respectivamente. A dose aplicada do Glucantime[®] foi ajustada de acordo com a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017a) para o uso desse medicamento no tratamento de Leishmaniose Cutânea (LC) em humanos (20 mg SbV/Kg/dia) e, posteriormente, convertidas para concentração molar para facilitar futuras comparações.

Após a 1ª aplicação os animais foram acompanhados por 30 dias, a fim de se avaliar a evolução clínica da LC nos hamsters, conforme descrito no tópico a seguir. Ao final do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para uso de animais de experimentação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA (ANEXO-B), e, após necropsia, amostras das lesões foram obtidas para realização de avaliação parasitológica.

Hamsters não inoculados, com mesma idade, peso e divididos nos mesmos grupos experimentais propostos (GCNS, GCPG, GENIB-Nb e GENIB-Ta), foram submetidos ao mesmo tratamento, com dez séries de aplicações de 50 µL das suspensões das NIB, contendo 3,00 µM do metal princípio ativo, Nb ou Ta, subcutânea no focinho, para avaliação de citotoxicidade promovida a partir do tratamento.

Avaliação clínica:

Realizou-se acompanhamento clínico, com aferição dos volumes das lesões nos mesmos intervalos, a partir da medida do comprimento, largura e altura da lesão (comprimento X largura X altura), utilizando paquímetro digital (*Zaas Precision/ Amatoools*). O registro fotográfico era realizado após a medida para acompanhar a evolução do aspecto morfológico a cada três dias por período de 30 dias após início do tratamento. O efeito terapêutico foi classificado por critérios clínicos de cura, melhora e falha avaliados após um período de 30 dias, depois de finalizado o tratamento. A cura foi caracterizada como cicatrização completa e ausência de eritema, edema e descamação; a melhora foi definida como epitelização completa caso a presença de úlceras com persistência dos demais sinais flogísticos; a falha caracterizou-se pela ausência de epitelização completa das lesões, piora dos sinais inflamatórios, aumento do tamanho da lesão ou aparecimento de lesões satélites em relação às lesões primárias. Também foi avaliado o estado geral dos animais (desidratação, diarreia, resposta a estímulos, entre outros), além dos pesos corporais, a fim de se detectar alguma característica que indicasse debilidade nos indivíduos.

Eutanásia dos animais:

Ao final dos tratamentos os animais foram anestesiados (Ketamina e Xylazina) e em seguida eutanasiados (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoína sódica), de acordo com a

legislação para uso de animais de experimentação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA.

Avaliação parasitológica:

Após a eutanásia dos animais, ao final do tratamento, foram obtidos fragmentos dos locais de inoculação, mesmo nos casos de ausência de lesão. Esses fragmentos foram utilizados para confecção de lâminas por método de impressão em lâmina (duplicata), com o objetivo de se estabelecer a Taxa de Infecção (TI) de macrófagos, e para cultivo em meio bifásico NNN (duplicata), a fim de se determinar a Viabilidade Parasitária (VB).

As lâminas, após impressão, foram fixadas e coradas com kit Panótico rápido (Laborclin[®], Pinhais, PR, BRA), e então avaliadas sob microscopia óptica, em aumento de 400-1.000x, onde se determinou o percentual médio de macrófagos parasitados (%MO) como indicador da TI. A partir do cultivo em NNN, após incubação por sete dias à 24-26 °C, foram confeccionadas lâminas para observação a fresco, onde se quantificou o número médio de parasitos viáveis por campo, em um total de 100 campos, para a determinação da VB. Todos os valores foram expressos em médias com os respectivos desvios padrões.

Análise estatística:

Foi utilizada a Análise de Variância – ANOVA ($p < 0,05$), a fim de se verificar se havia diferença significativa entre os tratamentos propostos, incluindo os controles. Os resultados para os tratamentos com as pentamidinas fluoradas foram comparados com os controles do ensaio (GCNS e GCPG), utilizando teste de *Tukey* ($p < 0,05$), a fim de se verificar diferenças significativas entre cada tratamento e o respectivo controle. Os testes estatísticos e os gráficos foram obtidos a partir do *Software GraphPad Prism 6.0*.

RESULTADOS

Os resultados quanto à evolução clínica para a LC é considerada tão importante quanto a cura parasitológica, consistindo na reepitelização das lesões ulceradas e a regressão total da infiltração e eritema (BRASIL, 2017). Os resultados obtidos apontaram para diferença de sensibilidade entre as espécies avaliadas, assim como para a importância do acompanhamento tanto da cura clínica como a parasitológica.

Respostas ao tratamento experimental:

a) Avaliação clínica:

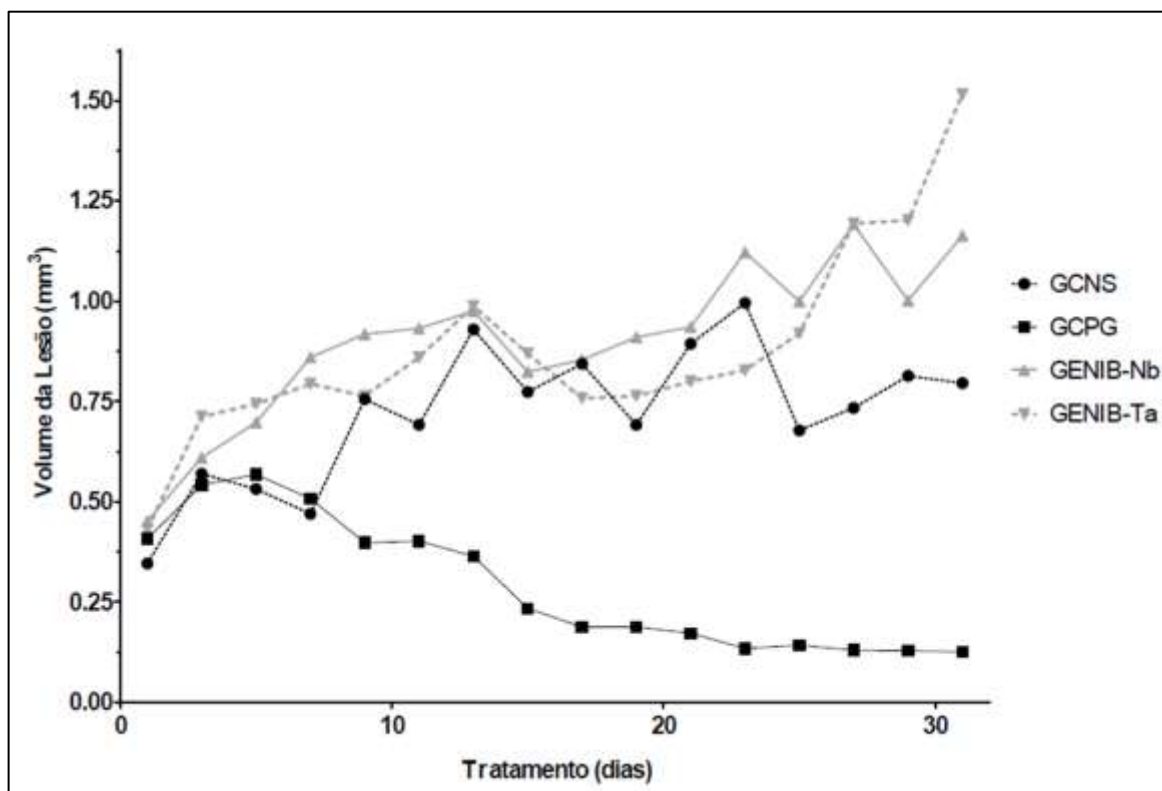
Os animais mantiveram o aspecto saudável, como vitalidade e resposta a estímulos, durante todo o período de experimentação, além de não ter sido registrado óbitos durante o tratamento. Além disso, não foi verificada perda ou ganho de peso considerável em relação aos controles.

As lesões cutâneas em hamster, causadas pela infecção por *L. (L.) amazonensis*, evoluíram para um maior volume, apontando uma ineficácia das NIB, após 30 dias de tratamento (Figura 29 e 30). A aplicação intercalada, com intervalos de 2 dias a cada aplicação, apresentou eficácia apenas no GCPG, com redução da lesão de $0,408 \pm 0,055 \text{ mm}^3$ (1º dia de tratamento) para $0,126 \pm 0,018 \text{ mm}^3$, após 30 dias de tratamento, em uma aparente cura clínica.

As lesões no controle negativo evoluíram de $0,346 \pm 0,075 \text{ mm}^3$ para $0,796 \pm 0,117 \text{ mm}^3$ após 30 dias de tratamento. As NIB aumentaram as lesões de $0,452 \pm 0,213$ (NIB-Nb) e $0,432 \pm 0,096$ (NIB-Ta) mm^3 , medidos no 1º dia de tratamento, para $1,164 \pm 0,513$ (NIB-Nb) e $1,516 \pm 0,787$ (NIB-Ta) mm^3 após 30 dias de tratamento (Figura 29). Os volumes médios das lesões no início do tratamento não apresentavam diferença significativa, mas após 30 dias

de tratamento com a NIB-Ta ficaram maiores que as do controle negativo (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), enquanto não houve diferença significativa entre os tratamentos com NIB-Nb e o solução salina (controle negativo). Considerando apenas os resultados das NIB não houve diferença significativa entre elas (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

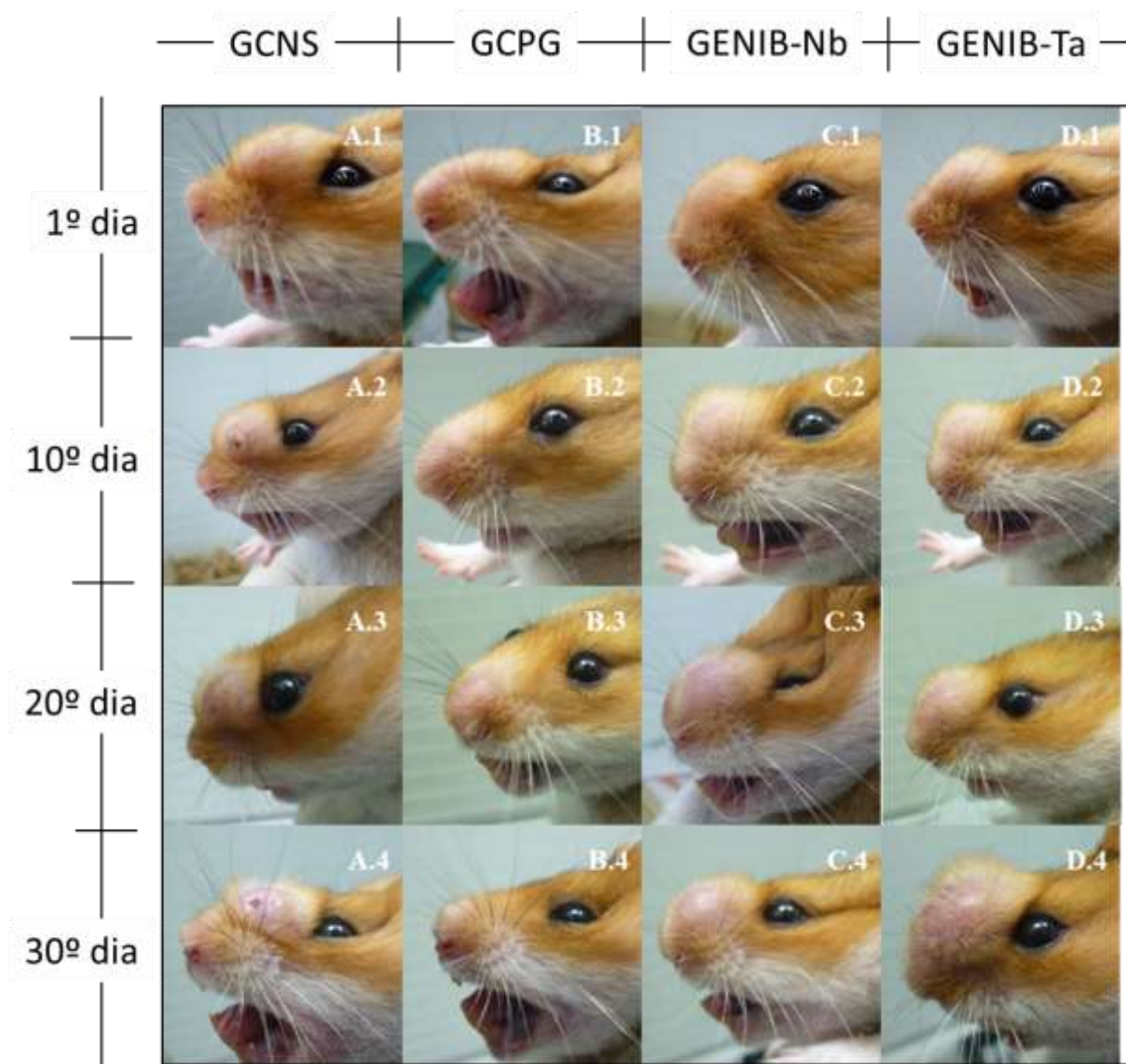
Figura 29: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm^3) em Hamster (*Mesocricetus auratus*), infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta.



As lesões por *L. (L.) amazonensis* eram nodulares, com aspecto volumoso e diâmetro uniforme no início do tratamento (Figura 30 A.1, B.1, C.1 e D.1), sendo verificado o agravamento das lesões a partir do 6º dia de tratamento, nos grupos controle negativo, NIB-Nb e NIB-Ta. Até o 23º dia de tratamento não houve diferença significativa entre os grupos tratados com NIB e o controle negativo, mas a partir do 25º dia as NIB apresentaram evolução

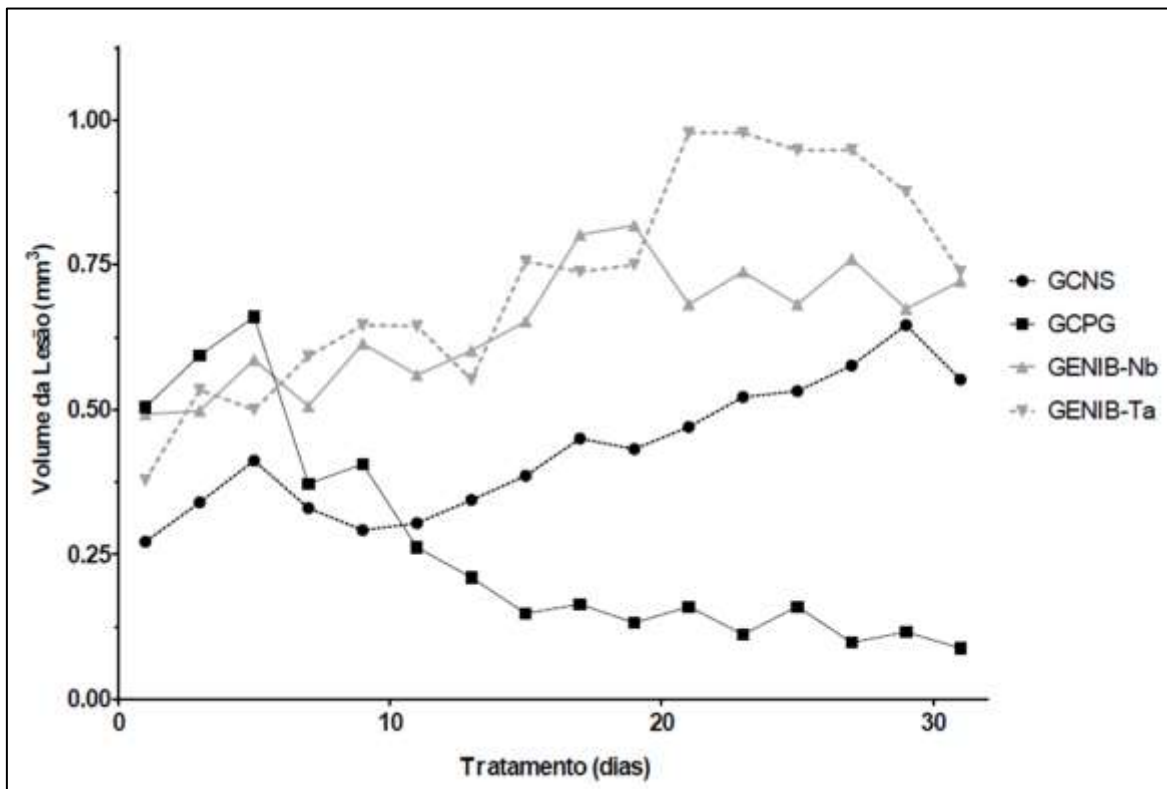
de lesão mais significativa (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), com visível edema, eritema e/ou descamação, mas sem infecção secundária perceptível macroscopicamente (Figura 30 A.4, C.4 e D.4).

Figura 30: Evolução clínica de lesões em focinhos de hamster (*Mesocricetus auratus*), inoculados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, após tratamento experimental com tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.



As lesões por *L. (V.) guyanensis* também evoluíram de maneira gradual em todos os tratamentos com NIB, apontando uma ineficiência das NIB também contra essa espécie, após 30 dias de tratamento (Figura 31 e 32). As lesões observadas no controle negativo evoluíram de $0,272 \pm 0,020 \text{ mm}^3$ para $0,552 \pm 0,109 \text{ mm}^3$, após 30 dias de tratamento, enquanto o grupo tratado com NIB-Nb foi de $0,492 \pm 0,219 \text{ mm}^3$ para $0,722 \pm 0,170 \text{ mm}^3$, e com NIB-Ta de $0,378 \pm 0,171$ para $0,738 \pm 0,234 \text{ mm}^3$, no mesmo período. Apenas no controle positivo (Glucantime[®]) as lesões regrediram, partindo de $0,504 \pm 0,145 \text{ mm}^3$ para $0,088 \pm 0,039 \text{ mm}^3$, após mesmo período de tratamento.

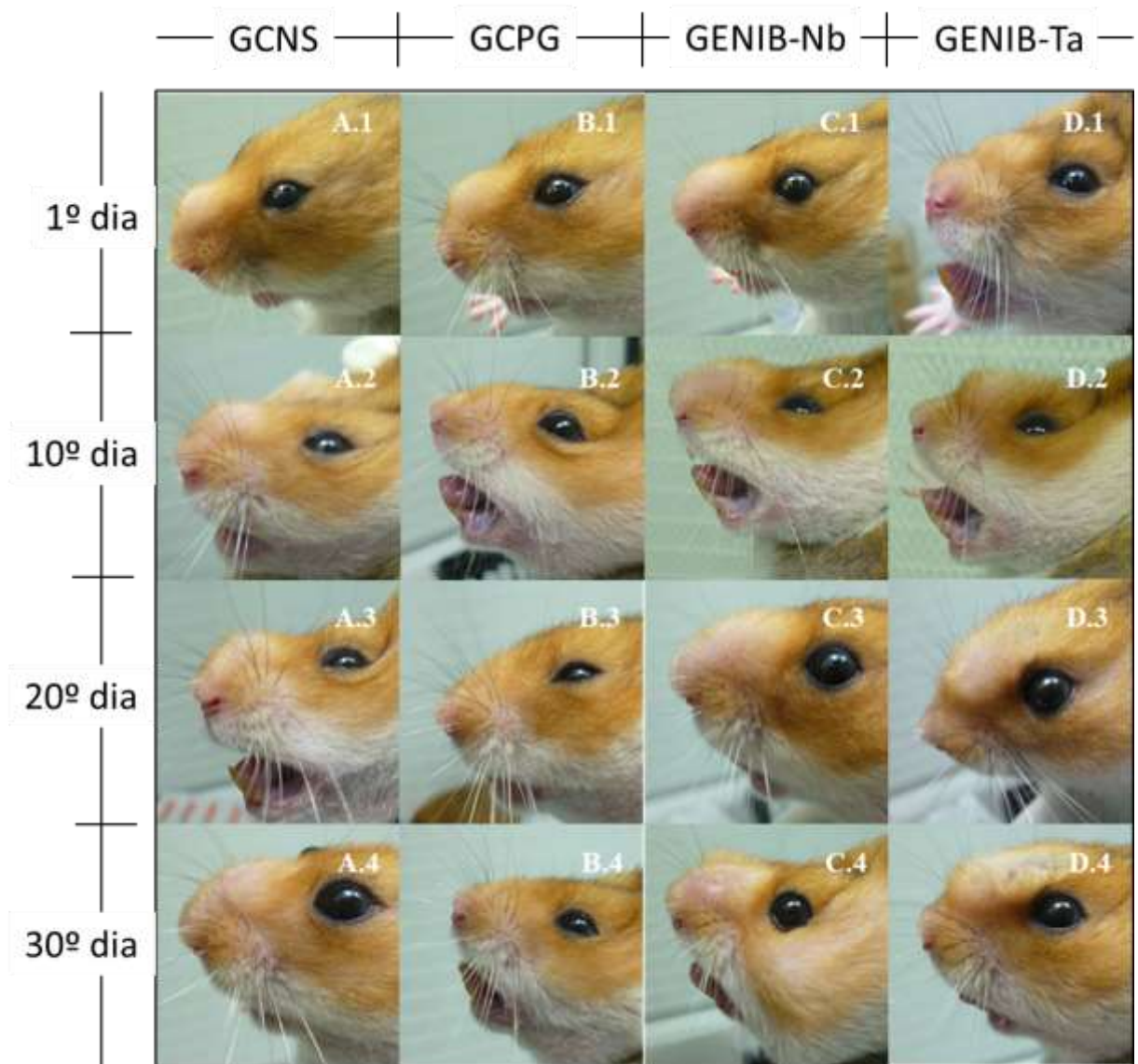
Figura 31: Evolução clínica de lesões cutâneas (mm^3) em Hamster (*Mesocricetus auratus*), infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta



Não foi observada, a partir de avaliação macroscópica, infecção secundária nas lesões durante o período de tratamento. Os volumes médios das lesões no início do tratamento não apresentavam diferença significativa, assim como após 30 dias de tratamento com as NIB, com exceção do controle positivo, o qual reduziu a lesão de maneira significativa em relação a todos os outros grupos (teste de *Tukey*, $p < 0,001$).

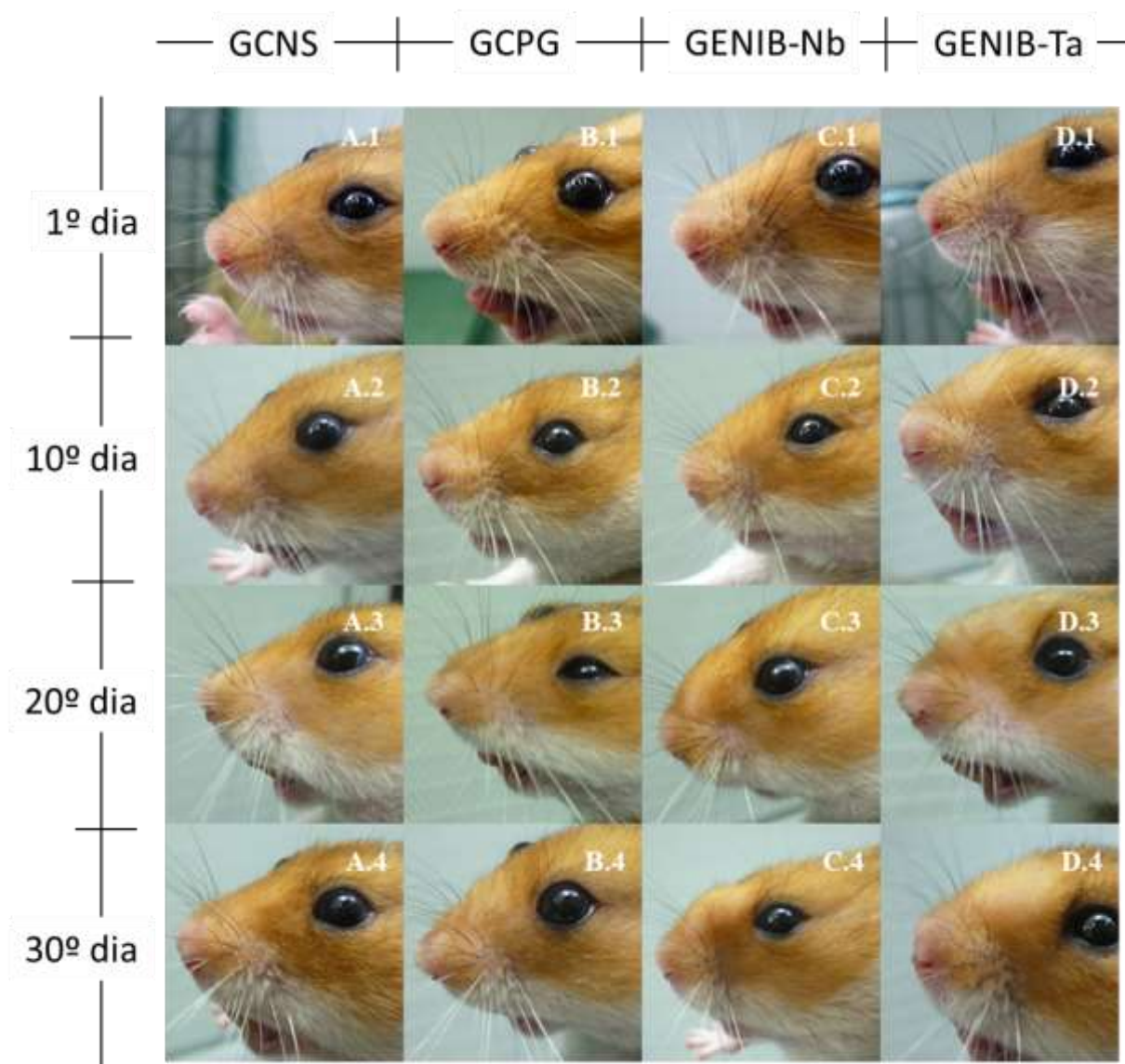
As lesões por *L. (V.) guyanensis* eram nodulares, com aspecto volumoso e diâmetro uniforme no início do tratamento (Figura 32 A.1, B.1, C.1 e D.1), sendo verificado o agravamento das lesões a partir da primeira aplicação em todos os tratamentos, mas com redução gradual do volume de lesão no grupo tratado com Glucantime[®] a partir do sexto dia de tratamento [Figura 32 B.2]. Os grupos tratados com NIB-Nb e NIB-Ta apresentaram a maior evolução no volume das lesões, com resultados superiores aos observados no controle negativo a partir do sexto dia de tratamento (Figura 32 C.2 e D.2). Após 30 dias de experimento os animais tratados com as NIB-Nb e NIB-Ta apresentavam os maiores volume de lesão em comparação aos demais grupos, mas sem diferença significativa em relação ao controle negativo (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), podendo ser visível edema, eritema e/ou descamação (Figura 32 A.4, C.4 e D.4), enquanto os animais do controle positivo apresentavam cura clínica.

Figura 32: Evolução clínica de lesões em focinhos de Hamster (*Mesocricetus auratus*), inoculados com *Leishmania (Viannia) guyanensis*, após tratamento experimental com tratados com Nanomatrizes inorgânicas bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.



Os animais utilizados na avaliação citotóxica, da aplicação subcutânea, apresentaram aumento de volume no tecido, provavelmente por processo inflamatório induzido pela presença das NIB no tecido dos animais (Figura 33 C e D). A aplicação cumulativa das NIB produziu ao final do tratamento edema, eritema e descamação local, além de rigidez ao toque, características semelhantes às observadas nos animais infectados submetido aos mesmos tratamentos. Esse dado demonstra que o agravamento das lesões nos grupos tratados com NIB provavelmente não está relacionado apenas a presença dos parasitos, nem a forma de administração do tratamento, mas também é resultado das NIB utilizadas nesse estudo.

Figura 33: Evolução clínica de Hamster (*Mesocricetus auratus*) submetidos a avaliação citotóxica após administração subcutânea de Nanomatrizes Inorgânicas Bioativas (NIB) de óxidos de nióbio (Nb) e tântalo (Ta). GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta. As imagens foram obtidas no 1º, 10º, 20º e 30º dia de tratamento.



b) Avaliação parasitológica:

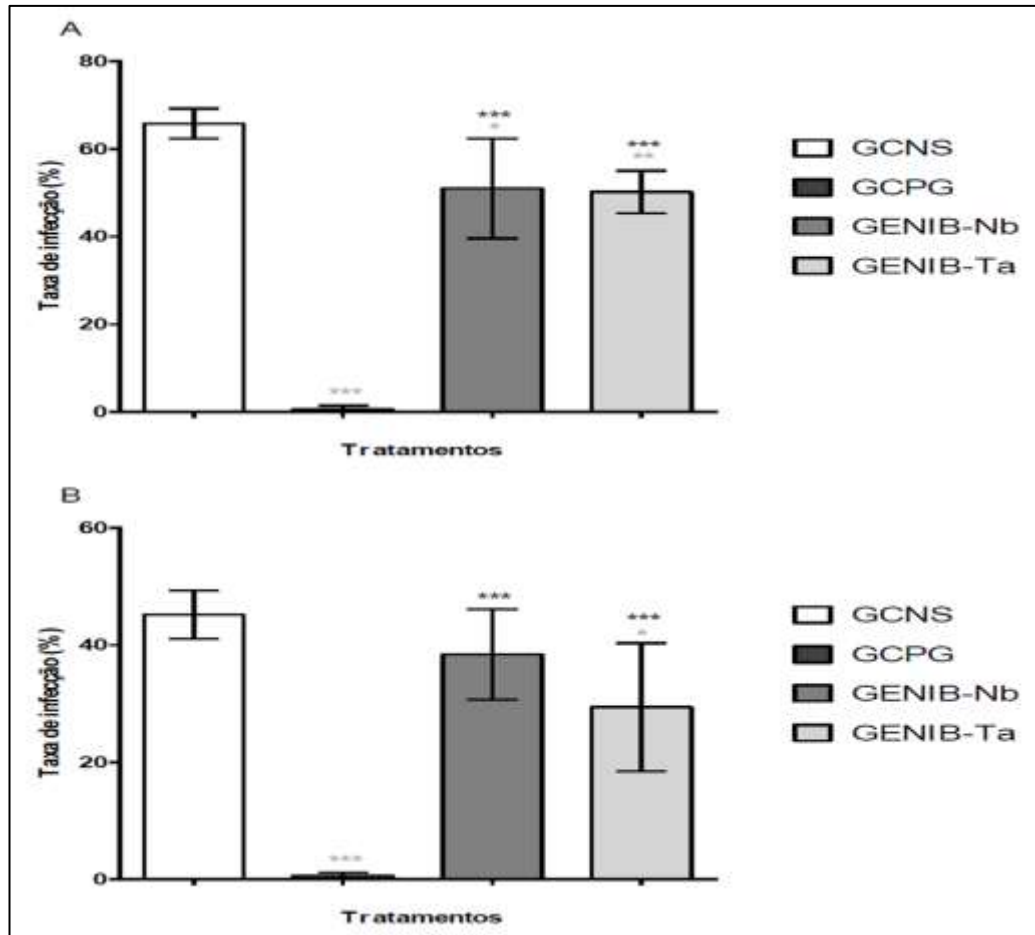
Os tratamentos com as NIB apresentaram baixa eficácia em relação ao Glucantime[®] sobre as duas espécies estudadas (Figura 32). As taxas de infecção (TI) por *L. (L.) amazonensis* foram de $51,00 \pm 11,38\%$ após tratamento com NIB-Nb e $50,20 \pm 4,82\%$ com NIB-Ta, enquanto com o Glucantime[®] (controle positivo) foi de apenas $0,60 \pm 0,89\%$ (Figura 32 A). Os resultados das NIB foram menores apenas em relação ao controle negativo, com TI de $65,80 \pm 3,42\%$ (Teste de *Tukey*, $p < 0,05-0,01$). Não houve diferença significativa entre o efeito da NIB-Nb e da NIB-Ta sobre a TI avaliada (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

A TI por *L. (V.) guyanensis* foi menor, em comparação ao *L. (L.) amazonensis*, tendo TI no controle negativo de $45,20 \pm 4,15\%$, enquanto as TI para NIB-Nb e NIB-Ta foram de $38,40 \pm 7,73\%$ e $29,40 \pm 10,95\%$, respectivamente (Figura 32 B). O melhor resultados observado contra *L. (V.) guyanensis* foi do Glucantime[®], o qual teve TI de apenas $0,60 \pm 0,55\%$, enquanto os outros tratamentos tiveram eficácia bem menor (teste de *Tukey*, $p < 0,001$). Apesar desse resultado, a NIB-Ta apresentou redução significativa em relação ao controle negativo (teste de *Tukey*, $p < 0,05$), enquanto a NIB-Nb, apesar de ter TI menor em relação ao mesmo controle, não apresentou diferença (teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

As culturas revelaram que a sensibilidade parasitária às NIB era diferente, se destacando a NIB-Ta na avaliação contra as duas espécies. Nos tratamentos para *L. (L.) amazonensis* foram contados 37 ± 2 promastigotas/campo para o controle negativo, enquanto que para o Glucantime[®] e para NIB-Ta foram contados 8 ± 7 promastigotas/campo e 19 ± 10 promastigotas/campo, respectivamente, enquanto a contagem para o tratamento com NIB-Nb ultrapassou os 100 promastigotas/campo.

Nos tratamentos contra *L. (V.) guyanensis* foram observados 21 ± 6 promastigotas/campo no controle negativo e mais de 100 promastigotas/campo no tratamento com NIB-Nb, enquanto nos tratamentos com Glucantime[®] e com NIB-Ta não foram observados protozoários viáveis nos campos avaliados.

Figura 34: Taxa de infecção (TI) em macrófagos obtidos a partir de impressão em lâmina de lesões cutâneas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B) em Hamster (*Mesocricetus auratus*), observados em microscopia óptica, 400-1000x. GCNS = controle negativo; GCPG = controle positivo; GENIB-Nb = tratamento experimental com NIB-Nb; GENIB-Ta = tratamento experimental com NIB-Ta; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCNS; * = diferença significativa entre o tratamento e o GCPG; *, ** e *** = $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,005$, respectivamente.



DISCUSSÃO

A literatura descreve o sucesso da utilização das nanopartículas contra células tumorais (ALEXIS et al., 2010; JAGANATHAN et al., 2016), geralmente atuando com mais precisão sobre essas formas celulares pelas características replicativas diferenciadas. Complexos de metais de transição são constantemente relacionados na literatura pela sua potencial aplicabilidade como agente terapêutico, uma vez que características desses elementos favorecem a interação com proteínas nucleares, principalmente naquelas em acelerado ciclo replicativo, impedindo processos de síntese proteica e replicação de ácidos nucleicos, mas também na inibição da produção de metabólitos essenciais e danos a membrana plasmática (RAFIQUE et al., 2010).

Caballero, Salas e Sánchez-Moreno (2014) destacaram, em revisão onde explicitam a importância das nanopartículas, principalmente as metálicas, no futuro tratamento de parasitoses, com destaque para as provocadas pelo gênero *Leishmania*, que produtos que apresentavam potencial anticâncer poderiam apresentar potencial no tratamento de infecções parasitárias, justamente pelo padrão de replicação acelerada que apresentam em relação às células do hospedeiro.

Os nossos resultados para evolução de volume de lesão evidenciaram que as NIB de Nb e Ta apresentaram características pró-inflamatórias que repercutiram de maneira direta no tratamento das lesões. Características pró-inflamatórias já haviam sido associadas ao Nb por Saghiri et al. (2016), mas essa característica ainda não tinha sido associada ao Ta.

Utilizando o antimônio pentavalente, metal base da composição do Glucantime[®], Franco et al. (2016) obtiveram sucesso na síntese de NP, assim como na sua atividade leishmanicida, verificada em modelo *in vitro* e também *in vivo*, onde evidenciaram eficácia maior das NP em relação ao Glucantime[®]. No trabalho de Franco et al. (2016), assim como no presente estudo, foi utilizada a forma de aplicação intralésional, ficando demonstrado que a aplicação local sozinha não interfere significativamente na evolução da lesão, fato visível a partir da avaliação dos animais saudáveis submetidos aos mesmos tratamentos.

De Carvalho et al. (2013) avaliou a ação da Anfotericina B encapsulada no tratamento de lesões cutâneas induzidas em camundongos C57BL/6, verificando redução da

lesão nas patas dos camundongos, além de redução do número de parasitas e da sua viabilidade, em relação ao controle negativo, a partir de aplicações intraperitoneais. Vale destacar que a Anfotericina B já é indicada para o tratamento da LCA, inclusive em formulação lipossomal. Também há relatos de sucesso em tratamentos experimentais utilizando NP no tratamento de outras formas de Leishmaniose (KUMAR et al., 2015; WANT et al., 2015), o que indica a versatilidade desse tipo de abordagem terapêutica. Outro medicamento com atividade comprovada contra parasitos envolvidos na LCA, a Pentamidina, também foi avaliado *in vivo*, em camundongos infectados por *L. (L.) major*, sendo demonstrado o maior efeito desse medicamento quando nanoencapsulado, em relação a sua atividade em doses iguais ou até 13 vezes maior quando não encapsulado (FUSAI et al., 1994).

A utilização de NP metálicas no tratamento de outras parasitoses, o que expande as expectativas de aplicação das NIB produzidas para esse estudo. Gaafar et al. (2014) avaliou o efeito de NP de Ag e de Ag associada a NP de quitosana, e apontaram esses materiais como potenciais antitoxoplasmáticos, destacando que as NP conseguiram reduzir o número de parasitas no fígado e baço de camundongos infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. Jaganathan et al. (2016) apontou o efeito de NP de Ag biossintetizadas sobre *Plasmodium falciparum*, um dos principais agentes etiológicos da Malária, além de ter demonstrado efeito sobre células tumorais hepáticas e sobre larvas de *Anopheles stephensi*.

Apesar de não ter atuado de maneira satisfatória sobre a evolução da lesão, a presença das NIB no tecido afetado reduziram de maneira significativa a TI em relação ao controle negativo, mas quando comparado ao Glucantime[®] as TI dos tratamentos propostos ficaram entre 10 e 15 vezes maiores. Esse dado não comprova o efeito nas NIB no controle parasitário, uma vez que o intenso processo inflamatório pode ter atuado no controle da replicação parasitária. Mas mesmo nesse cenário foi possível verificar uma sensibilidade diferente entre as espécies utilizadas no estudo, onde a *L. (V.) guyanensis* mostrou-se mais sensível a NIB-Ta, enquanto não houve diferença de sensibilidade em relação ao *L. (L.) amazonensis*.

A cura parasitológica é um importante marcador de sucesso na terapêutica, uma vez que existem casos de cura clínica e permanência da presença de parasitos por anos no tecido cicatricial (SCHUBACH et al., 1998a, 1998b; MENDONÇA et al., 2004).

Um dado também muito importante foi a observação de cura clínica e parasitológica nas lesões provocadas pelas duas espécies após a aplicação intralesional do Glucantime[®], não sendo verificado diferença de susceptibilidade entre as espécies. A literatura destaca a menor susceptibilidade da *L. (V.) guyanensis* em relação ao *L. (L.) amazonensis* (ROMERO et al., 2001; CAMARA COELHO et al., 2011; DNDI, 2016), mas utilizando o protocolo de aplicação proposto não foi observado diferença entre eles.

Diante dos resultados obtidos ficou evidente que a aplicação intralesional das NIB de Nb e Ta não promoveram cura clínica nem parasitológica, ao contrário, aumentaram a velocidade do agravamento das lesões e mantiveram TI em macrófagos próximos aos valores do controle negativo. Novos estudos que visem a obtenção de novas formulação e/ou apresentações dessas NIB podem corrigir ou diminuir a influência desses materiais no processo inflamatório, assim como possibilitar a visualização dos excelentes resultados observados para essas NIB em modelos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALAGARASI, A. Introduction to Nanomaterials. In: **Introduction to Nanomaterials**. [s.l: s.n.]p. 1–32.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. In: SCHÄFER-KORTING, M. (Ed.). **Drug Delivery**. [s.l: s.n.]p. 55–86.

ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933–940, ago. 2011. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.11.78>>.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–74, ago. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690398>>.

BHARDWAJ, R.; SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Nanobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. **Special Issue: Our endless war with microbes.**, v. 4, n. 3, p. 97–103, 2012. Disponível em: <<http://mcpharmacol.com/index.php/Journals/article/viewFile/182/173>>.

BRASIL, M. da saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 1a. ed. [s.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] InTech, 2014. p. 465–493.

CAMARA COELHO, L. I.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. das G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO FILHO, S. P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 12 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072540>>.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010. Disponível em: <<http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/167/62887>>.

CHELLAN, P.; SADLER, P. J. The elements of life and medicines. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 373, n. 2037, p. 20140182–20140182, 13 mar. 2015. Disponível em: <<http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2014.0182>>.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205002539>>.

DE CARVALHO, R. F.; RIBEIRO, I. F.; MIRANDA-VILELA, A. L.; DE SOUZA FILHO, J.; MARTINS, O. P.; DE OLIVEIRA CINTRA E SILVA, D.; TEDESCO, A. C.; LACAVALHO, Z. G. M.; BÁO, S. N.; SAMPAIO, R. N. R. Leishmanicidal activity of

amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 217–222, out. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448941300194X>>.

DNDI. **InfoLEISHBoletim informativo da redeLEISH**. [s.l: s.n.].

DUTHIE, M. S.; RAMAN, V. S.; PIAZZA, F. M.; REED, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11017592>>.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A.; SARGENTINI JR, E.; CARFAGNA, C.; LESKELÄ, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 6771–6780, dez. 2016. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/nanoscaled-hydrated-antimony-v-oxide-as-new-approach-to-the-first-line-peer-reviewed-article-IJN>>.

FUSAI, T.; DENIAU, M.; DURAND, R.; BORIES, C.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; ASTIER, A.; HOUIN, R. Action of pentamidine-bound nanoparticles against Leishmania on an in vivo model. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 319–324, 29 dez. 1994. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/1994014319>>.

GAAFAR, M. R.; MADY, R. F.; DIAB, R. G.; SHALABY, T. I. Chitosan and silver nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 30–38, ago. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489414001192>>.

JAGANATHAN, A.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; MADHIYAZHAGAN, P.; DINESH, D.; VADIVALAGAN, C.; AZIZ, A. T.; CHANDRAMOHAN, B.; SURESH, U.; RAJAGANESH, R.; SUBRAMANIAM, J.; NICOLETTI, M.; HIGUCHI, A.; ALARFAJ, A. A.; MUNUSAMY, M. A.; KUMAR, S.; BENELLI, G. Earthworm-mediated synthesis of silver nanoparticles: A potent tool against hepatocellular carcinoma, Plasmodium falciparum parasites and malaria mosquitoes. **Parasitology International**, v. 65, n. 3, p. 276–284, jun. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357691630006X>>.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, set. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233313001537>>.

KUMAR, R.; SAHOO, G. C.; PANDEY, K.; DAS, V.; DAS, P. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. **Drug Delivery**, v. 22, n. 3, p. 383–388, 3 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2014.891271>>.

MENDONÇA, M. G.; DE BRITO, M. E. F.; RODRIGUES, E. H. G.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 15 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999605>>.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 3, p. 507–517, 3 mar. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-007-9275-x>>.

MOREIRA, E. S.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. de L. Glucantime resistant *Leishmania* promastigotes are sensitive to pentostam. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 4, p. 247–50, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340539>>.

OPAS/OMS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas Informe Leishmanioses.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=35857&lang=en>.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, out. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764604000652>>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Infectious Diseases**

List. Disponível em:
<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en>. Acesso em: 1 maio. 2018.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

RAFIQUE, S.; IDREES, M.; NASIM, A.; AKBAR, H.; ATHAR, A. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 38–45, 2010. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/BMBR>>.

RAMEZANI, F.; JEBALI, A.; KAZEMI, B. A Green Approach for Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Leishmania* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1549–1555, 3 nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-012-9877-3>>.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–465, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716098>>.

SAGHIRI, M. A.; ORANGI, J.; ASATOURIAN, A.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 290–301,

fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.004>>.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, nov. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108004480>>.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 560–575, mar. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09003652>>.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, G.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 3, p. 911–914, set. 1998a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728572>>.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M. C.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; ARAUJO, M. L.; OLIVEIRA, A. L.; PACHECO, R. S.; MOMEN, H.; CONCEICAO-SILVA, F.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, K. B. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 824–827, jun. 1998b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660473>>.

SINGH, S. K.; GOSWAMI, K.; SHARMA, R. D.; REDDY, M. V. R.; DASH, D. Novel microfilaricidal activity of nanosilver. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 1023–1030, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/novel-microfilaricidal-activity-of-nanosilver-peer-reviewed-article-IJN>>.

THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties**. 1a. ed. London: Royal Society, 2004.

WANT, M. Y.; ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; OZBAK, H. A.; HEMEG, H. A.; DASGUPTA, A. K.; CHATTOPADHYAY, A. P.; AFRIN, F. Therapeutic efficacy of

artemisinin-loaded nanoparticles in experimental visceral leishmaniasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 215–221, jun. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515002209>>.

4. DISCUSSÃO GERAL

Os análogos fluorados da pentamidina avaliados neste estudo demonstraram efeito tão satisfatório quanto o do Pentacarinat[®] nos ensaios *in vitro* e na toxicidade celular, evidenciando que o efeito celular dos compostos, após receber diferentes quantidades de Flúor na sua estrutura, foi mantido. Vale destacar que o incremento do F no designer de novos medicamentos visa, na maioria das vezes ganhos quanto à estabilidade química e o aumento da biodisponibilidade, mas esses parâmetros não puderam ser avaliados utilizando as técnicas desenvolvidas nesse estudo, que dedicando-se a avaliação da eficácia e citotoxicidade das substâncias testadas.

No modelo *in vivo* foi verificou-se maior sensibilidade de *L. (V.) guyanensis* a todos os diamidínicos, isetionato de pentamidina e os análogos fluorados, fato já relatado para tratamentos experimentais e clínicos com o isetionato de pentamidina. A ausência de resposta ao tratamento, observado pelo acompanhamento clínico da evolução das lesões cutâneas produzidas por *L. (L.) amazonensis* também pode esta relacionada a cepa utilizada no estudo, sendo necessário o teste com outras cepas desta espécie para verificar se é um padrão de resistência da espécie ou apenas de algumas cepas. Estudos *in vitro* avaliando o mecanismo da possível resistência a ação leishmanicida em cepas desta espécie do subgênero *Leishmania* também seriam interessantes.

As NIB apresentaram excelentes resultados em todos os modelos propostos para avaliação *in vitro*, com destaque para a NIB-Ta que apresentou maior eficácia contra promastigotas e amastigotas de ambas as espécies, e que manteve atividade celular ligeiramente mais alta que o controle negativo. A NIB-Nb parece estimular a replicação dos promastigotas, assim como estimular a atividade celular em macrófagos, mas demonstrou eficácia comparável a NIB-Ta contra *L. (V.) guyanensis*, a partir de 24 horas de exposição, e contra *L. (L.) amazonensis*, a partir de 48 horas. Mas o fato que merece destaque é que, com exceção da ação contra promastigotas, onde NIB-Ta apresentou eficácia semelhante ao Glucantime[®], as NIB apresentaram maior eficácia e menor toxicidade celular do que o antimonial utilizado como controle.

O problema na aplicação das NIB no modelo *in vivo* proposto foi a atividade pró-inflamatória que as nanomatrizes produziram no tecido afetado, o que pode ter sido

potencializado pela aplicação intralesional no esquema terapêutico utilizado. Processos inflamatórios exacerbados atrapalham o processo de cura clínica, uma vez que há uma progressão mais rápida das lesões, e a parasitológica. A possibilidade de aplicações diferentes, como a tópica, poderia explorar melhor as características positivas observadas para as NIB nos ensaios *in vitro*, uma vez que a ausência de trauma local, provocado pela administração intralesional, minimizaria o processo inflamatório e, conseqüentemente, os efeitos indesejados decorrentes dele.

Quando comparados os dois grupos de substâncias testadas nessa tese, os análogos parecem mais atrativos por terem um mecanismo de ação pré-estabelecido para as pentamidinas, assim como eficácia nos ensaios *in vivo*. As NIB precisariam de maiores estudos de toxicidade e de compatibilidade com outras formas de apresentação, uma vez que, apesar de não terem demonstrado resultado *in vivo* satisfatórios, ficou evidente a alta eficácia desses materiais nos ensaios *in vitro*.

5. CONCLUSÕES FINAIS

- Os análogos fluorados da pentamidina mantiveram a eficácia leishmanicida, além de citotoxicidade semelhante ao Pentacarinat®, nos modelos *in vitro* e *in vivo*, com destaque para a ação contra *L. (V.) guyanensis*;
 - Efeitos citotóxicos *in vivo* deverão ser avaliados para se apontar como uma opção ao Pentacarinat®
- As NIB-Nb e NIB-Ta apresentaram eficácia leishmanicida maior que o Glucantime®, além de não apresentarem citotoxicidade, nos modelos *in vitro* utilizados, mas a presença das NIB no tecido dos animais promoveu um agravamento na evolução das lesões cutâneas, fato confirmado na avaliação citotóxica *in vivo*.
 - Os possíveis efeitos pró-inflamatórios deverão ser investigado para se estabelecer a viabilidade de outros testes
 - O efeito indesejado na avaliação clínica não pode ser considerado, completamente, falta de atividade leishmanicida, uma vez que a inflamação atrapalhou a análise do efeito das NIB sobre os parasitos
- A falha clínica observada em todos os tratamentos (análogos e NIB) contra *L. (L.) amazonensis* podem ser em decorrência da cepa utilizada dessa espécie, sendo necessário avaliar outras cepas para confirmar a ineficácia;
- Formas de administração menos invasivas, como a oral ou a tópica podem ser exploradas para sanar alguns dos problemas visualizados no presente estudo e possibilitar um tratamento menos traumático.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar testes toxicológicos para todos os produtos propostos nesse estudo, por meio de dosagens bioquímicas e estudo histológico de órgãos como fígado, baço e rins, para verificar a segurança da sua administração;
- Utilizar outras formas de aplicação (intralesional, tópica e oral) dos diamidínicos fluorados, para possibilitar abordagens terapêuticas menos invasivas;
- Avaliar as NIB em dose menor e com aplicação única, ou em intervalos maiores, para verificar o efeito desses produtos *in vivo*;
- Avaliar a eficácia dos produtos estudados contra outras espécies de *Leishmania*, assim como outras cepas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

REFERÊNCIAS

ALAGARASI, A. Introduction to Nanomaterials. In: **Introduction to Nanomaterials**. [s.l: s.n.]p. 1–32.

ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933–940, ago. 2011. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.11.78>>.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–74, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690398>>.

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 3, p. 279–286, set. 1981. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761981000300005&lng=en&tlng=en>.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3731–8, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435669>>.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517415>>.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659–1667, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819514>>.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against

Plasmodium falciparum and Leishmania mexicana amazonensis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 7, p. 1381–1386, 1 jul. 1990a. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.34.7.1381>>.

BHARDWAJ, R.; SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Nanobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. **Special Issue: Our endless war with microbes.**, v. 4, n. 3, p. 97–103, 2012. Disponível em: <<http://mcpharmacol.com/index.php/Journals/article/viewFile/182/173>>.

BRASIL, M. da saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 1a. ed. [s.l: s.n.], 2017a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>.

BRASIL, M. da saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015**. [s.l: s.n.]. 2017b. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] InTech, 2014. p. 465–493.

CAMARA COELHO, L. I.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. das G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO FILHO, S. P. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 12 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072540>>.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de; KATZ, G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 63–64, 1999.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de; RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; GOMES, A. de C. Feeding habit of Lutzomyia longipalpis in Araçatuba county, State São Paulo, Brasil. **Entomología y Vectores**, v. 9, n. 1, p. 63, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites Home: Leishmaniasis - Biology**. Last updated: 10/01/2013. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso: 03/01/2017

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010. Disponível em: <<http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/167/62887>>.

CHELLAN, P.; SADLER, P. J. The elements of life and medicines. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 373, n. 2037, p. 20140182–20140182, 13 mar. 2015. Disponível em: <<http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2014.0182>>.

CHOUDHURY, K.; ZANDER, D.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; CLOS, J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to ‘ and SbIII. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1411–1423, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457839>>.

COELHO, A. C. Miltefosine Susceptibility and Resistance in *Leishmania*: From the Laboratory to the Field. **Journal of Tropical Diseases**, v. 04, n. 02, p. 2–6, 2016. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/miltefosine-susceptibility-and-resistance-in-leishmania-from-the-laboratory-to-the-field-2329-891X-1000203.php?aid=69770>>.

COELHO, A. C.; GENTIL, L. G.; DA SILVEIRA, J. F.; COTRIM, P. C. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 98–102, set. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448940800091X>>.

COELHO, A. C.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M.; COTRIM, P. C. Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in *Leishmania* Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3030–3032, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00404-07>>.

COSTA FILHO, A. V. da; LUCAS, Í. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424–427, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000400022&lng=pt&tlng=pt>.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205002539>>.

CUNHA, M. A.; DE CASSIA SOLER, R.; LEÃO, A. C. Q.; LINDOSO, J. A. L. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1214–1218, 9 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483120>>.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/2155-9597/2155-9597-4-166.digital/2155-9597-4-166.html>>.

DNDI. **InfoLEISHBoletim informativo da redeLEISH**. 1a edição, p. 1-12, maio 2016,

DUTHIE, M. S.; RAMAN, V. S.; PIAZZA, F. M.; REED, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11017592>>.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 1, p. 71–80, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009450>>.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373–1384, 7 out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652011000400024&lng=en&tlng=en>.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A.; SARGENTINI JR, E.; CARFAGNA, C.; LESKELÄ, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to

first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 6771–6780, dez. 2016. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/nanoscaled-hydrated-antimony-v-oxide-as-new-approach-to-the-first-line-peer-reviewed-article-IJN>>.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; MANZANO, J. I.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. e1974, 20 dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001974>>.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. de L. R. Leishmanose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 10 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.10.19>>.

GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 6, p. 645–661, jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1858968>>.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300006&lng=pt&tlng=pt>.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, set. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233313001537>>.

JIN, Y.; MA, X.; FENG, S.; LIANG, X.; DAI, Z.; TIAN, J.; YUE, X. Hyaluronic Acid Modified Tantalum Oxide Nanoparticles Conjugating Doxorubicin for Targeted Cancer Theranostics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2530–2541, 16 dez. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.5b00551>>.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863515000315>>.

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 4 jan. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv951>>.

LAI A FAT, E. J. S. K.; VREDE, M. A.; SOETOSENOJO, R. M.; LAI A FAT, R. F. M. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam. **International journal of dermatology**, v. 41, n. 11, p. 796–800, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453009>>.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution, The leishmaniasis in biology and medicine. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **Biology and Epidemiology**. 1. ed. London: Academic Press, 1987. p. 1–120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. 2. ed. London: Academic Press, 1979. p. 1–116.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 31 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836985>>.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. Activity of pentamidine and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 9, p. 1914–1916, 1991.

MACIEJEWSKA, D.; ŻABINSKI, J.; KAŻMIERCZAK, P.; REZLER, M.; KRASSOWSKA-ŚWIEBOCKA, B.; COLLINS, M. S.; CUSHION, M. T. Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 164–173, fev. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523411008737>>.

MARSHALL, W. C.; WESTON, H. J.; BODIAN, M. Pneumocystis Carinii

Pneumonia and Congenital Hypogammaglobulinaemia. **Archives of Disease in Childhood**, v. 39, n. 203, p. 18–25, 1 fev. 1964. Disponível em: <<http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.39.203.18>>.

MENDONÇA, M. G.; DE BRITO, M. E. F.; RODRIGUES, E. H. G.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Persistence of Leishmania Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 15 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999605>>.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 3, p. 507–517, 3 mar. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-007-9275-x>>.

MOREIRA, E. S.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. de L. Glucantime resistant Leishmania promastigotes are sensitive to pentostam. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 4, p. 247–50, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340539>>.

NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; DA SILVA, R. M.; GUERRA, J. A. de O.; FERREIRA, L. C. de L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

OPAS/OMS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas Informe Leishmanioses**. [s.l.: s.n.]. 2016. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=35857&lang=en>.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, out. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764604000652>>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Infectious Diseases**

List. Last Updated on Tuesday, 12 December. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en>. Acesso em: 1 maio. 2018.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

PURKAIT, B.; KUMAR, A.; NANDI, N.; SARDAR, A. H.; DAS, S.; KUMAR, S.; PANDEY, K.; RAVIDAS, V.; KUMAR, M.; DE, T.; SINGH, D.; DAS, P. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, fev. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00030-11>>.

RAMEZANI, F.; JEBALI, A.; KAZEMI, B. A Green Approach for Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Leishmania* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1549–1555, 3 nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-012-9877-3>>.

RANGEL, E.; LAINSON, R. **FLEBOTOMÍNEOS DO BRASIL**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309907702098>>.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future

Leishmaniasis. **BMJ**, v. 321, n. September, p. 801–804, 2000.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–465, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716098>>.

RUSSELL, J. G. B. Pneumocystis pneumonia associated with agammaglobulinaemia. **Archives of Disease in Childhood**, v. 34, n. 176, p. 338–341, 1959. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L281037256%5Cnhttp://sfx.hul.harvard.edu/sfx_local?sid=EMBASE&issn=00039888&id=doi:&atitle=Pneumocystis+pneumonia+associated+with+agammaglobulinaemia&stitle=Arch.+Dis.+Childh.&title=>>.

SAGHIRI, M. A.; ORANGI, J.; ASATOURIAN, A.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 290–301, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.004>>.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, nov. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108004480>>.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 560–575, mar. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09003652>>.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, G.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 3, p. 911–914, set. 1998a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728572>>.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M. C.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; ARAUJO, M. L.; OLIVEIRA, A. L.; PACHECO, R. S.; MOMEN, H.; CONCEICAO-SILVA, F.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, K. B. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 824–827, jun. 1998b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660473>>.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; DE SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43–50, 1 mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11938695>>.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762004000300001&lng=en&tlng=en>.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A. A. de; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre patogenia da Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) brasiliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. ja, p. 9–20, 2008.

SINGH, S. K.; GOSWAMI, K.; SHARMA, R. D.; REDDY, M. V. R.; DASH, D. Novel microfilaricidal activity of nanosilver. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 1023–1030, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/novel-microfilaricidal-activity-of-nanosilver-peer-reviewed-article-IJN>>.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15614453>>.

SOEIRO, M. N. C.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.;

WANG, M. Z.; HEMPHILL, A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. **Parasitology**, v. 140, n. 08, p. 929–951, 8 jul. 2013. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182013000292>.

STEPHENS, C. E.; TANIOUS, F.; KIM, S.; WILSON, W. D.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; FRANZBLAU, S. G.; BOYKIN, D. W. Diguanidino and “Reversed” Diamidino 2,5-Diarylfurans as Antimicrobial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 1741–1748, maio 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm000413a>>.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 22 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346016>>.

SWINSON, J. Fluorine – A vital element in the medicine chest. **Pharma Chem. Pharmaceutical Chemistry.**, v. 1, p. 26–30, 2005. Disponível em: <www.b5srl.com>.

THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties**. 1a. ed. London: Royal Society, 2004.

TYAGI, V.; KHAN, S.; SHIVAHARE, R.; SRIVASTAVA, K.; GUPTA, S.; KIDWAI, S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; CHAUHAN, P. M. S. A natural product inspired hybrid approach towards the synthesis of novel pentamidine based scaffolds as potential anti-parasitic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 1, p. 291–296, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.101>>.

USGS, M. C. S. **Niobium (Columbium) and Tantalum Statistics and Information**. Disponível em: <<https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/niobium/#links>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

WANG, J.; SÁNCHEZ-ROSELLÓ, M.; ACEÑA, J. L.; DEL POZO, C.; SOROCHINSKY, A. E.; FUSTERO, S.; SOLOSHONOK, V. A.; LIU, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). **Chemical Reviews**, v. 114, n. 4, p. 2432–2506, 26 fev. 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr4002879>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series N°949. ISBN: 978 92 4 129496.** [s.l.: s.n.]. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>.

ANEXO – A

14/06/2018

AAC01078-18



PUBLICATIONS EVENTS SCIENCE SKILLS CAREERS MEMBERSHIP PUBLIC POLICY

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy[†]

Manuscript Submission
and Peer Review System

Home Help for Authors Help for Reviewers Contact Us Logout

Manuscript #	AAC01078-18
Current Revision #	0
Submission Date	2018-05-25 17:09:29
Current Stage	Under Review
Title	Comparative Leishmanicidal Activity of Fluorinated Analogs of Pentamidine Hydrochloride and Pentamidine Isethionate (Pentacarinat [®])
Running Title	Analogs of Pentamidine against Leishmania spp.
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Susceptibility
Corresponding Author	Prof. Pedro Raul Cándido Domingos (National Institute of Amazonian Research)
Contributing Authors	Prof. Pedro Raul Cándido Domingos (corr-auth) , Dr. Fabiane Veloso Soares , Dr. Iryna Grafova , Dr. Yuri Pustovit , Dr. Anatoliy Alekseenko , Dr. Andriy Bezdudnyy , Dr. Antonia Maria Ramos Franco Pereira , Andriy Grafov The use of substances containing fluorine may provide therapeutic advantages in the administration of such analogues of pentamidine. The results herein presented indicate the efficacy of the analogues against two distinct subgenus and species of Leishmania, in both evolutionary stages of the parasite, when compared to the treatment using pentamidine isethionate (Pentacarinat [®]) and pentamidine hydrochloride (SAHC), as well as variations regarding cellular toxicity when compared to pentamidine in experimental models <i>In vitro</i> . Based on the <i>in vitro</i> results, the most promising was the analogues SA6F, but also with good results the use of SA2F, since the results showed little difference between the analogues and Pentacarinat [®] and that success in applying any treatment depends on how it will behave in <i>in vivo</i> models.
Abstract	
Editor	Dr. Wilbur K. Milhous
Suggested Reviewers to Include	Arnold Bayer (University of California Los Angeles), Jonathan Berman (Fast Track Research LLC), Roberlo Docampo (University of Georgia)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	Leishmaniasis, Pentamidine, Fluorinated Analogs, Neglected disease
Research Areas	Antimicrobial Chemotherapy, Biotechnology, Parasitology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Preprint Server	No
BioRxiv Preprint	No
	Magnus Ehrnroothin 88880 (Magnus Ehrnrooth Foundation) ✓ : Iryna Grafova
	Academy of Finland (Suomen Akatemia) ✓ : Andriy Grafov
	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) ✓ : Pedro Raul Cándido Domingos, Fabiane Veloso Soares, Antonia Maria Ramos Franco Pereira
Funding Sources	Horizon 2020 Framework Programme (H2020) ✓ : Pedro Raul Cándido Domingos, Fabiane Veloso Soares, Iryna Grafova, Yuri Pustovit, Andriy Bezdudnyy, Antonia Maria Ramos Franco Pereira, Andriy Grafov H2020-MSCA-RISE-2016-734759 FP7 People: Marie-Curie Actions (PEOPLE) ✓ : Pedro Raul Cándido Domingos, Fabiane Veloso Soares, Iryna Grafova, Yuri Pustovit, Andriy Bezdudnyy, Antonia Maria Ramos Franco Pereira, Andriy Grafov FP7-PEOPLE-IRGEB-2011-295262
Data Citation	Are the data sets and/or code used in the experiments and studies described in this submission identified and cited in the manuscript and reference list in accord with ASM's Data Citation Policy ? Not Applicable (Datasets and code were not used in these experiments or studies)
Electronic Forms	1 of 1 forms complete - View Electronic Forms Status

Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 05/25/2018 17:06:19) [PDF \(9KB\)](#) [Source File \(PDF\) 9KB](#)
2. Manuscript Text File (last updated: 05/25/2018 17:06:19) [PDF \(287KB\)](#) [Source File \(PDF\) 287KB](#)
3. Merged File containing manuscript text and 1 Figure file. (last updated: 05/25/2018 17:06:28) [PDF \(847KB\)](#)
 - a. Manuscript Text File (last updated: 05/25/2018 17:06:19) [PDF \(287KB\)](#) [Source File \(PDF\) 287KB](#)
 - b. All figures (last updated: 05/25/2018 17:06:19) [PDF \(422KB\)](#) [Source File \(PDF\) 422KB](#)

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)

HELP FOR AUTHORS

Submission Instructions
Instructions to Authors
Ethics Portal
Contact Staff

HELP FOR REVIEWERS

Review Process
Reviewer Guidelines
Contact an Editor

ASM PRESS

MEETINGS
Microbe
Bioethics
Clinical Virology Symposium
ASM/CUE
ABRCMS
ASM Conferences

MANAGE YOUR PROFILE

COURSES & PROGRAMS

Biology Scholars
Hospital Infections Course
Young Ambassadors
Careers in Microbial Sciences Program
Distinguished Lectures
Culture of Responsibility

BLOGS

CONNECT WITH ASM

Facebook
Twitter
Instagram
LinkedIn
International Groups
YouTube

CONTACT ASM

Staff Directory
Find a local branch
Find a BioResource Center
Find your Country
Ambassador

https://aac.msubmit.net/cgi-bin/main.plx?form_type=view_ms&_id=318&ms_id=173557&ms_rev_no=0&ms_id_key=fdJMMUo87qrAUnBsA5cSQ 1/2

ANEXO – B



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

Número do Protocolo: 008/2015	Data de Entrada: 23/03/2015
Pesquisador Responsável: PEDRO RAUEL CÂNDIDO DOMINGOS	
Título do Projeto: "Síntese, caracterização e aplicação de nanohíbridos a base de calixareno e seus derivados para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana."	
Instituição Responsável: INPA	

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

8.1. Espécie (nome vulgar, se existir): hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongo (*Mus musculus*)

Organismo/ Grupo Animal	Linagem/ espécie	Idade	Peso (g)	n° animais/	n° grupos	n° total de animais	Sexo		
							M	F	M+F
Camundongo	Balb/c	> 12 sem	> 15 g	6	24	144	x		
Camundongo	C57BL/6	> 12 sem	> 15 g	6	24	144	x		
Hamster	Golden	> 12 sem	> 100 g	6	24	144	x		
TOTAL:									432

USO DE FÁRMACOS

13. USO DE AGENTES QUÍMICOS/FÁRMACOS

13.1. Anestésicos

Agente químico*	Cloridrato de ketamina
Dose (UI ou mg/kg)	60 - 90 mg/kg
Via de administração	Intramuscular
Frequência	1 vez
Finalidade	Induzir efeito anestésico pra posterior realização da eutanásia por via intracardiaca (Euthanyl® (Pentobarbital sódico - Difenhidantoina sódica) ou cloreto de suxametonas)



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

Agente químico*	Clordrato de xylazina
Dose (UI ou mg/kg)	5 - 10 mg/kg
Via de administração	Intramuscular
Frequência	1 vez
Finalidade	Induzir efeito anestésico pra posterior realização da eutanásia por via intracardíaca (Euthanyl® (Pentobarbital sódico - Difenhidantoína

	sódica) ou cloreto de suxametonas)
--	------------------------------------

13.2. Outros fármacos

Agente químico*	Pentobarbital sódico
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/kg
Via de administração	Intravenosa
Frequência	1 vez
Finalidade	Eutanásia

Agente químico*	Cloreto de suxametonas
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/kg
Via de administração	Intravenosa
Frequência	1 vez
Finalidade	Eutanásia



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

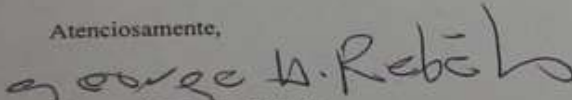
Número do Protocolo: 008/2015	Data de Entrada: 23/03/2015
Pesquisador Responsável: PEDRO RAUEL CÂNDIDO DOMINGOS	
Título do Projeto: "Síntese, caracterização e aplicação de nanohíbridos a base de calixareno e seus derivados para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana."	
Instituição Responsável: INPA	

RECOMENDAÇÃO FINAL

INDICAÇÃO: Aprovado

DATA DE LIBERAÇÃO DO PARECER: 10.09.2015

Atenciosamente,


George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015

ANEXO – C

A

Coordenação de Extensão Tecnológica e Inovação – COETI
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
Av. André Araujo, 2936, Petrópolis, CEP 69067-375 – Manaus – AM

Senhora Coordenadora,

Eu, ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO PEREIRA, brasileira, portador do RG 05433746-4 e do CPF 831.000.167-34, residente e domiciliada a Rua Miguel Ângelo, quadra M, Casa 21, Adrianópolis, Manaus – Amazonas, CEP: 69.057-083, DECLARO que são verdadeiras e exatas as informações descritas no Relatório de Invenção sob o título “NANOMATERIAIS INORGÂNICAS BIOATIVAS À BASE DE ÓXIDOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO POLIVALENTES HIDRATADOS: PROCESSO DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES”.

Dessa forma, SOLICITO a Coordenação de Extensão Tecnológica e Inovação (COETI) a verificação dos requisitos de proteção ao produto/processo supracitado no referido relatório, bem como os devidos processos legais para assegurar seu registro/depósito.

Relação de documentos anexos:

	MATERIAL	Nº de pág.
(X)	Relatório de Invenção	20
()	Desenhos, se necessário	
(X)	Publicações relacionadas ao presente invento	9
()	Cópia de material de divulgação e/ou atestado de participação em eventos e/ou cópia de anais, onde o invento tenha sido divulgado/apresentado.	
()	Cópia de contrato/acordo com órgão de fomento, caso haja essa participação	
()	Cópia do contrato de Direitos de Propriedade Industrial firmado entre o INPA e Empresa(s) participante(s), quando for o caso.	
(*)	Outros documentos julgados pertinentes: - artigos completos e resumos e/ou - e-mail do COETI	

1. Nacional de Pesquisas da Amazônia
Unidade: COETI

Recibido

29/03/18

Ass: [Assinatura]

Por: [Assinatura]

Manaus 29/03/2018

Antônia Maria Ramos Franco Pereira