



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



JOÃO PAULO ARAÚJO DE SOUSA

**SB-200, DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO COM POTENCIAL ANTI-  
TRYPANOSOMATIDAE E IMUNOMODULADOR**

PARNAÍBA - PI  
2023

JOÃO PAULO ARAÚJO DE SOUSA

**SB-200, DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO COM POTENCIAL ANTI-  
TRYPANOSOMATIDAE E IMUNOMODULADOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

PARNAÍBA - PI  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba  
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde  
Serviço de Processamento Técnico

S725s Sousa, João Paulo Araújo de  
SB-200, derivado 2-amino-tiofênico com potencial anti-  
Trypanosomatidae e imunomodulador [recurso eletrônico] João Paulo  
Araújo de Sousa. – 2023.

1 Arquivo em PDF.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do  
Delta do Parnaíba, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

1. Doenças Tropicais. 2. Doenças de Chagas. 3. Leishmaniose  
Visceral. 4. Derivado Tiofênico. 5. Alternativas Terapêuticas. 6.  
Imunomodulação. I. Título.

CDD: 616.9

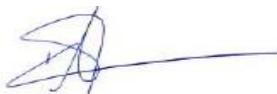
JOÃO PAULO ARAÚJO DE SOUSA

**SB-200, DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO COM POTENCIAL ANTI-  
TRYPANOSOMATIDAE E IMUNOMODULADOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

DATA DE APROVAÇÃO: 23/02/2023

**BANCA EXAMINADORA:**



**Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues**  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora



**Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente**

Examinadora

Documento assinado digitalmente

**gov.br**

FERNANDO AECIO DE AMORIM CARVALHO

Data: 23/02/2023 13:11:04-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Pro

ho

Examinador



**João Paulo Araújo de Souza**

Discente

## RESUMO

As leishmanioses e a doença de Chagas estão entre as doenças tropicais negligenciadas (DTN) mais graves e com maior número de casos no mundo. Atualmente os fármacos disponíveis no mercado apresentam diversos problemas como o alto custo, a alta toxicidade, a maioria administrados por via parenteral e muitos casos de resistência dos parasitos. Portanto, a busca por alternativas terapêuticas é urgente. O tiofeno é um composto de cinco membros que tem como heteroátomo o enxofre e duas duplas ligações (nas posições 2 e 4), formando um sistema aromático. Os derivados do tiofeno têm ocorrência em vários organismos, como fungos e plantas, além de serem de fácil síntese em laboratório, com inúmeros relatos de atividade antileishmania e anti-*Trypanosoma cruzi*. O SB-200 é um derivado 2-amino-tiofênico estudado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e que apresentou atividade antileishmania sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Diante de resultados anteriores promissores, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-Trypanosomatidae do SB-200 sobre outras espécies de *Leishmania* e sobre o parasito *Trypanosoma cruzi*. A atividade antileishmania do SB-200 foi avaliada inicialmente sobre formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, obtendo-se uma concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 4,25 µM, 4,65 µM e 3,96 µM, respectivamente. A atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do SB-200 foi realizada sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas, cepa CL. Foram obtidos valores de CI<sub>50</sub> de 2,69 µM para epimastigotas enquanto para tripomastigotas obteve-se CI<sub>50</sub> de 29,69 µM. Devido a um melhor resultado sobre a espécie *L. infantum* dentre todos os tripanosomatídeos, os estudos posteriores sobre a forma amastigota e de mecanismos de ação, foram realizados com esta espécie. A citotoxicidade do derivado tiofênico foi realizada em macrófagos J774.A1 e células VERO obtendo-se uma concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) de 42,52 µM e 39,2 µM respectivamente. O índice de seletividade (IS) para *L. infantum* foi de 10,73 em relação aos macrófagos e 9,89 em relação às células VERO. A atividade antipromastigota do SB-200 está associada a danos na membrana plasmática, pois o composto foi capaz de aumentar a permeabilidade em ensaio com *SYTOX green*, intercalante de DNA. Ensaios ultraestruturais em formas promastigotas *L. infantum* empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) comprovaram rupturas de membrana plasmática e revelaram alterações como aumento de vacúolos citoplasmáticos, descolamento da membrana nuclear e fragmentação do núcleo mediante o tratamento com SB-200. Na investigação do tipo de morte celular promovida pelo composto, foi observado aumento do tipo de morte por apoptose, com uma morte secundária por necrose. Através do ensaio de *docking*, SB-200 apresentou uma afinidade molecular com a N-myristoyl transferase enzima importante para a sobrevivência do parasito. A atividade antimastigota do SB-200 foi realizada sobre a espécie *L. infantum*, obtendo-se um CE<sub>50</sub> de 2,85 µM e IS de 14,97 em macrófagos e 13,8 em células VERO. A atividade antimastigota de SB-200 está associada a uma atividade imunomoduladora, pois aumentou os níveis de TNF-α, IL-12, IL-1β, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto diminuiu os níveis de IL-10. A toxicidade aguda do SB-200 foi investigada sobre larvas de *Zophobas morio*, com uma dose letal estimada de >3000 mg/kg, comprovando-se a segurança do composto. Assim, conclui-se que o derivado 2-amino-tiofênico SB-200 é um composto anti-Trypanosomatidae potencial, e candidato a avançar nos estudos de novos tratamentos para as leishmanioses e doença de Chagas.

**Palavras Chaves:** derivado tiofênico, leishmaniose visceral, doença de Chagas, imunomodulação

## ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease are among the most serious neglected tropical diseases (NTDs) and with the highest number of cases in the world. Currently, drugs available on the market have several problems, such as high cost, high toxicity, most are administered parenterally and many cases of parasite resistance. Therefore, the search for therapeutic alternatives is urgent. Thiophene is a five-membered compound that has sulfur as a heteroatom and two double bonds (at positions 2 and 4), forming an aromatic system. Thiophene derivatives occur in various organisms, such as fungi and plants, in addition to being easily synthesized in the laboratory, with numerous reports of antileishmania and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. SB-200 is a 2-amino-thiophene derivative previously studied by our research group and which showed antileishmania activity against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. In light of previous promising results, the aim of this study was to evaluate the anti-Trypanosomatidae activity of SB-200 on other species of *Leishmania* and on the parasite *Trypanosoma cruzi*. The antileishmania activity of SB-200 was initially evaluated on promastigotes forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) infantum*, obtaining a mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 4.25 μM, 4, 65 μM and 3.96 μM, respectively. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of SB-200 was performed on epimastigotes and trypomastigotes, strain CL. IC<sub>50</sub> values of 2.69 μM were obtained for epimastigotes while for trypomastigotes an IC<sub>50</sub> of 29.69 μM was obtained. Due to a better result on the species *L. infantum* among all trypanosomatids, further studies on the amastigote form and mechanisms of action were carried out with this species. Cytotoxicity of the thiophene derivative was carried out in J774.A1 macrophages and VERO cells, obtaining an average cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) of 42.52 μM and 39.2 μM, respectively. The selectivity index (SI) for *L. infantum* was 10.74 for macrophages and 9.89 for VERO cells. The antipromastigote activity of SB-200 is associated with damage to the plasma membrane, as the compound was able to increase permeability in an assay with SYTOX green, a DNA intercalator. Ultrastructural assays in *L. infantum* promastigotes using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) confirmed ruptures of the plasmatic membrane and revealed alterations such as an increase in cytoplasmic vacuoles, detachment of the nuclear membrane and fragmentation of the nucleus upon treatment with SB-200. In the investigation of the type of cell death promoted by the compound, an increase in the type of death by apoptosis was observed, with a secondary death by necrosis. Through the docking assay, SB-200 showed a molecular affinity with N-myristoyl transferase, important enzyme for the survival of the parasite. The antiamastigote activity of SB-200 was carried out on the *L. infantum* species, obtaining an EC<sub>50</sub> of 2.85 μM and an IS of 14.97 in macrophages and 13.8 in VERO cells. The antimastigote activity of SB-200 is associated with an immunomodulatory activity, as it increased the levels of TNF-α, IL-12, IL-1β, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), while decreasing the levels of IL-10. The acute toxicity of SB-200 was investigated on *Zophobas morio* larvae, with an estimated lethal dose of >3000 mg/kg, proving the safety of the compound. Thus, it is concluded that the 2-amino-thiophene derivative SB-200 is a potential anti-Trypanosomatidae compound, and a candidate to advance in studies of new treatments for leishmaniasis and Chagas disease.

**Keywords:** thiophene derivative, visceral leishmaniasis, Chagas disease, immunomodulation

A minha mãe, Lucélia pelo amor incondicional e por ter me ensinado a ser quem eu sou.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado o dom da vida e do amor.

À minha mãe **Lucélia**, por me amar e me apoiar em todos os meus momentos.

Ao meu padrasto **Bonfim**, por me apoiar e cuidar da minha mãe quando estou longe.

Ao **Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues** por ter me aceitado como seu aluno e confiado em mim e por sua excelente orientação, compreensão, disponibilidade e paciência que foram fundamentais para o andamento deste trabalho.

À minha amiga **Thaís**, por toda a amizade, apoio e ensinamentos, sua amizade foi essencial para suportar todo esse período longe de casa.

Às minhas tias, **Durcilene** e **Elizabeth** por sempre me apoiarem e me acolherem.

Aos **meus amigos de Teresina** por me apoiarem nessa jornada.

À toda a equipe do Laboratório de Doenças infecciosas **LADIC**, por ajudarem na realização das pesquisas e por tornar até os momentos mais tensos em momentos mais leves e descontraídos.

*"Para pequenas criaturas como nós, a vastidão é suportável somente através do amor."*

-Carl Sagan

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> .....	21
<b>Figura 2</b> – Insetos vetores das leishmanioses.....	21
<b>Figura 3</b> – Distribuição de países com notificação de leishmaniose visceral, com base em dados reportados à WHO em 2020.....	22
<b>Figura 4</b> – Distribuição de países com notificação de leishmaniose tegumentar, com base em dados reportados à WHO em 2020.....	23
<b>Figura 5</b> – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	25
<b>Figura 6</b> – Manifestações clínica das leishmanioses.....	28
<b>Figura 7</b> – Formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
<b>Figura 8</b> – Inseto vetor triatomíneo, responsáveis por transmitir Doença de Chagas.....	32
<b>Figura 9</b> – Distribuição de países com notificação de doença de Chagas, com base em dados reportados a WHO em 2018.....	33
<b>Figura 10</b> – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
<b>Figura 11</b> – Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	37
<b>Figura 12</b> – Estrutura molecular do tiofeno.....	39
<b>Figura 13</b> – Estrutura molecular da SB-200.....	42
<b>Figura 14</b> – Atividade antileishmania de SB-200 sobre formas promastigotas de <i>L.braziliensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. infantum</i> .....	53
<b>Figura 15</b> – Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> do SB-200.....	54
<b>Figura 16</b> – Atividade citotóxica do SB-200 sobre células mamíferas.....	55
<b>Figura 17</b> – Integridade da membrana de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com SB-200.....	56
<b>Figura 18</b> – Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> usando Microscopia de Varredura (MEV).....	57
<b>Figura 19</b> – Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> usando Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	58
<b>Figura 20</b> –Análise de citometria de fluxo de promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	59

<b>Figura 21</b> – Estruturas 3D do <i>docking</i> molecular da SB-200.....	60
<b>Figura 22</b> – Atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas de <i>L. infantum</i> tratadas com SB-200.....	61
<b>Figura 23</b> – Níveis de citocinas produzidas por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com SB-200.....	63
<b>Figura 24</b> – Níveis de óxido nítrico (NO) e espécies reativas a oxigênio (EROs) produzidos por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com SB-200.....	64
<b>Figura 25</b> – Toxicidade aguda sobre larvas de <i>Z. morio</i> .....	65
<b>Figura 26</b> – Perfil de sobrevivência de larvas de <i>Z. morio</i> .....	65

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Principais espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas ao homem, ocorrência e manifestação clínica.....	28
<b>Quadro 2:</b> Fármacos usados no tratamento das leishmanioses.....	31
<b>Quadro 3:</b> Fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.....	38

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atividade antipromastigota, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200, antimoniato de meglumina e anfotericina B.....53
- Tabela 2.** Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* sobre formas epimastigotas e tripromastigotas, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200 e benznidazol.....54
- Tabela 3.** Atividade antileishmania sobre formas amastigotas intramacrofágicas, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200 e antimoniato de meglumina.....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD-7–Amino-actinomicina D

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda biológica de oxigênio)

CC<sub>50</sub> – concentração de citotoxicidade média

CDC- *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de controle e prevenção de doenças)

CE<sub>50</sub> – concentração efetiva média

CH<sub>50</sub>-concentração hemolítica média

CI<sub>50</sub> – concentração inibitória média

DMEM – Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DSS - Dodecil sulfato de sódio

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA - Ensaio Imunoabsorvente Enzimático

EROs – espécies reativas de oxigênio

H<sub>2</sub>DCFDA- diclorodihidrofluoresceína

IL – interleucinas

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LCL - leishmaniose cutânea localizada

LD - leishmaniose cutânea disseminada

LDPC- leishmaniose dérmica pós-calazar

LIT- *Liver Infusion Triptose*

LMC- leishmaniose mucocutânea

LT - leishmaniose tegumentar

LV - leishmaniose visceral

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MTT – brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2y 1)-2,5-difenil tetrazolium]

NADH-nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO - óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAHO- Organização Pan-Americana da Saúde

PBS - *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada com fosfato)

Sb<sup>V</sup>– antinomial pentavalente

SFB – soro fetal bovino

SIDA-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TAU- *Triatomine Artificial Urine*

TAU3AAG -TAU enriquecido com prolina, glutamina, aspartato e glicose

Th1 – resposta T-helper 1

Th2 – resposta T-helper 2

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

WHO- *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1 Doenças tropicais negligenciadas</b> .....	19
<b>2.2 Leishmanioses</b> .....	20
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	24
2.2.2 Manifestações clínicas das leishmanioses.....	25
2.2.3 Terapêutica das leishmanioses.....	30
<b>2.3 Doença de Chagas</b> .....	31
2.3.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
2.3.2 Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	36
2.3.3 Terapêutica da doença de Chagas.....	37
<b>2.4. Derivados tiofênicos</b> .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	41
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>4.1 Local da pesquisa</b> .....	42
<b>4.2 Composto estudado e fármacos de referência</b> .....	42
<b>4.3 Manutenção dos parasitos e macrófagos</b> .....	43
<b>4.4 Cultivo de invertebrados</b> .....	44
<b>4.5 Ensaio anti-Trypanosomatidae sobre parasitos do gênero <i>Leishmania</i></b> .....	44
4.5.1 Ensaio de atividade antileishmania contra formas promastigotas.....	44
<b>4.6 Ensaio anti-Trypanosomatidae sobre parasitos da espécie <i>T. cruzi</i></b> .....	45
4.6.1 Ensaio de atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> contra formas epimastigotas.....	45
4.6.2 Ensaio de atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> contra formas tripomastigotas .....	45
<b>4.7 Ensaio de citotoxicidade com macrófagos J774.A1 e células VERO</b> .....	46

4.8 Ensaio de integridade da membrana das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	46
4.9 Ensaio ultraestrutural.....	46
4.10 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> por citometria de fluxo.....	47
4.11 Estudo de simulação por <i>docking</i> molecular .....	47
4.12 Ensaio de atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas.....	48
4.13 Avaliação do perfil imunomodulador do SB-200 sobre macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> .....	49
4.13.1 Dosagem de citocinas.....	49
4.13.2 Dosagem de NO.....	50
4.13.3 Determinação da produção de EROs.....	50
4.14 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vivo</i> com <i>Zophobas morio</i> .....	50
4.15 Análise Estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1. Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas de <i>Leishmania</i> .....	52
5.2. Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> contra formas epimastigotas e tripomastigotas.....	53
5.3. Avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos J774.A1 e Células VERO.....	55
5.4. Avaliação da integridade da membrana de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	56
5.5. Análise ultraestrutural de formas promastigotas.....	56
5.6 Avaliação do perfil apoptótico/necrótico de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com SB-200.....	59
5.7 <i>Docking</i> molecular .....	59
5.8. Avaliação da atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas de <i>L. infantum</i> .....	60
5.9. Avaliação do perfil de imunomodulador de macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com SB-200.....	62
5.10. Avaliação da produção de NO e EROs por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com SB-200.....	63

<b>5.11. Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> com <i>Z. morio</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades conhecidas como doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças que afetam países tropicais e subtropicais, sendo um grande indicador de pobreza (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017). Pelo fato de ocorrerem principalmente em países em desenvolvimento, a indústria de medicamentos não tem interesse em pesquisas de novos tratamentos. Isso porque a população afetada não é encarada como compradores em potencial de medicamentos, conseqüentemente não gerando lucro, ocasionando assim um grande número de doenças desassistidas (YAMEY, 2018; GIL; MARTINEZ, 2021).

Grande parte das DTN são causadas por protozoários, estando as leishmanioses e a doença de Chagas entre as principais doenças (PARTHASARATHY; KALESH, 2020). As leishmanioses são causadas pelo parasito *Leishmania*, que afeta bilhões de pessoas em mais de 90 países ao redor do globo. São divididas em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), apresentando cerca de 700.000 a 1,2 milhões de novos casos por ano (CDC, 2020). Endêmica em 21 países da América, a doença de Chagas, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, atinge cerca de 6 milhões de pessoas. A doença apresenta uma incidência anual de 30 mil novos casos, acarretando 14.000 mortes por ano. Em média, 70 milhões de pessoas vivem em áreas de grande risco para contrair a doença (PAHO, 2022).

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças amplamente difundidas que afetam principalmente países em desenvolvimento, com baixa eficácia dos medicamentos, surgimento de resistência dos parasitos e causando grandes sequelas nos pacientes ou até levando os mesmos a óbito. Dessa forma, é de caráter urgente pesquisas científicas e o desenvolvimento de medicamentos a fim de combater estas doenças (ANTONELLO et al., 2018; KRATZ, 2019).

Neste contexto, os tiofenos, que pertencem a um grupo de compostos heterocíclicos aromáticos, vêm despertando um grande interesse na indústria farmacêutica devido ao seu grande perfil farmacológico (SINGH; SILAKARI, 2018; PATHANIA; NARANG; RAWAL, 2019). No seu potencial terapêutico estão inclusas propriedades antimalárico, antileishmania, antimicrobiano, antibacteriano, antidepressivo, anticonvulsivante, antiviral, anticancerígeno, anti-hipertensivo, anti-inflamatório e antioxidante (MISHRA; SHARMA, 2017).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade anti-*Leishmania amazonensis* de dez derivados 2-amino-tiofênicos, sendo o SB-200 um dos mais promissores. Os estudos demonstraram que o SB-200 apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de promastigotas (CI<sub>50</sub> 3,65 µM) e amastigotas intracelulares (CI<sub>50</sub> 4,81 µM) com altos índices de seletividade ao parasito em comparação a macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos

humanos. No estudo dos prováveis mecanismos de ação, foi observado que a ação pode ocorrer pela inibição da enzima tripanotiona redutase, uma enzima-chave que regula espécies reativas de oxigênio em tripanosomatídeos, e pela imunomodulação, uma vez que o composto aumentou os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO e redução da IL-10 (RODRIGUES et al., 2015).

Tendo em vista o potencial do SB-200 em estudos anteriores, objetiva-se com esta pesquisa investigar a atividade anti-Trypanosomatidae do SB-200 sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Trypanosoma cruzi*, bem como determinar sua citotoxicidade e possíveis mecanismos de ação.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doenças tropicais negligenciadas

As DTN afetam milhares de pessoas por todo o mundo em áreas tropicais e subtropicais, principalmente populações sem acesso às condições básicas de saúde e saneamento de países em desenvolvimento, prejudicados por falta de investimentos na busca de novos tratamentos adequados e não tendo um controle efetivo de novos casos (MITRA; MAWSON, 2017; CASULLI, 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DTN provocam anualmente 534 milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2020). Infecções causadas por agentes de DTN causam incapacidade e desfiguração, com profundo impacto econômico, social e político. Os efeitos das DTN podem ser observados na saúde, educação, agricultura e economia (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

As DTN inicialmente incluíam três infecções helmínticas transmitidas pelo solo (ascaridíase, ancilostomíase e tricuriase), filariose linfática, oncocercose, dracunculíase, esquistossomose, doença de Chagas, doença do sono, leishmanioses, malária, hanseníase e tracoma. Como uma lista em expansão foram adicionadas a úlcera de buruli, dengue e chikungunya, equinococose, trematodíases, hanseníase, micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, raiva, escabiose e outras ectoparasitoses, envenenamento por picada de cobra, boubá, teníase e cisticercose, completando assim as DTN atuais (HOTEZ, 2007; WHO, 2020).

Os danos causados por estas doenças são variados, e apesar da sua grande maioria não terem uma elevada taxa de mortalidade como doença de Chagas ou doença do sono, elas não podem ser taxadas como sem importância, pois elas causam um grande impacto na qualidade de vida das pessoas e nas capacidades individuais, economias locais e sistema de saúde (UNITED NATIONS, 2020).

Apesar de não apresentarem um alta taxa de mortalidade, elas ainda continuam apresentando risco de vida em alguns casos, malária tem a taxa de mortalidade basicamente constituída por crianças, o Ebola quando não tratado é fatal para mulheres grávidas e seus recém-nascidos, leishmaniose visceral causa a morte principalmente de crianças (SAYRES; HUGHES, 2020).

O descaso da pesquisa também é elucidado pela desigualdade geográfica, onde nações de baixa renda recebem menos ajuda que nações de primeiro mundo. Além disso, prevê-se que as doenças tropicais se tornem problemas globais com as mudanças climáticas devido ao

aquecimento global. Por exemplo, a dengue se espalhou pelo mundo e a leishmaniose agora é endêmica na Itália e doença de Chagas no sul dos Estados Unidos (BOOTH, 2018; HOTEZ 2018).

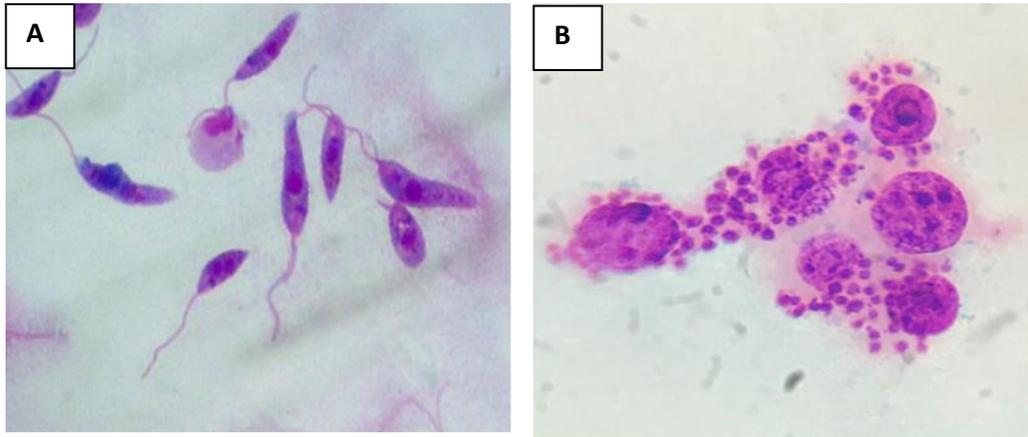
As leishmanioses e doença de Chagas estão entre as DTNs mais importantes do mundo, afetando milhões de pessoas interferindo na qualidade de vida, e causando milhares de mortes. A constante expansão destas doenças em áreas que não eram endêmicas, a problemática dos tratamentos disponíveis atualmente e a resistência dos parasitos, configuram um cenário em que a busca de novas alternativas para o combate destas DTNs é de extrema urgência. (SANGENITO et al., 2019; SANTOS, 2020; CHANDA, 2021).

Com um maior incentivo a pesquisas de terapias que sejam acessíveis, disponíveis e adaptadas a cada comunidade, pode-se proporcionar uma melhor qualidade vida para população afetada por essas enfermidades dando a elas uma chance de quebrar este ciclo de pobreza onde estas pessoas se encontram (PARTHASARATHY; KALESH, 2020; WELD et al. 2022).

## **2.2 Leishmanioses**

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, que agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos). Os parasitos do gênero *Leishmania* se encontram em duas formas, sendo elas: a forma promastigota (Figura 1A), flagelada livre encontrada no tubo digestório dos vetores invertebrados; e a forma amastigota (Figura 1B), com o flagelo internalizado, parasito intracelular obrigatório de células do sistema monocítico fagocitário dos hospedeiros mamíferos. As doenças causadas por este protozoário manifestam-se na forma visceral e tegumentar (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

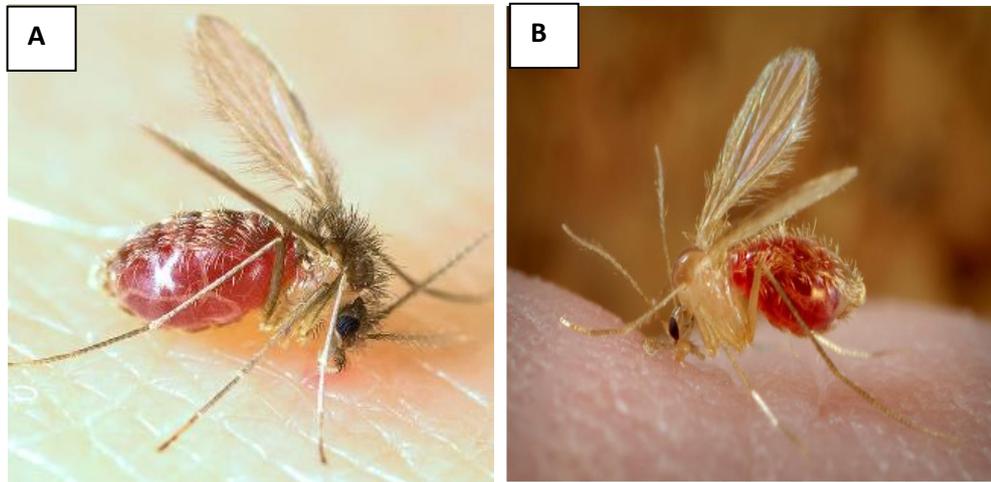
**Figura 1.** Formas morfológicas de *Leishmania*



Fonte: Bogdan (2006); Nunes et al. (2021). Formas promastigotas (A) e amastigotas internalizadas em macrófagos (B).

A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas pertencentes principalmente aos gêneros *Lutzomyia* spp. (Figura 2A) e *Phlebotomus* spp. (Figura 2B) infectados com o protozoário (CHACÓN et al., 2022).

**Figura 2.** Insetos vetores das leishmanioses.

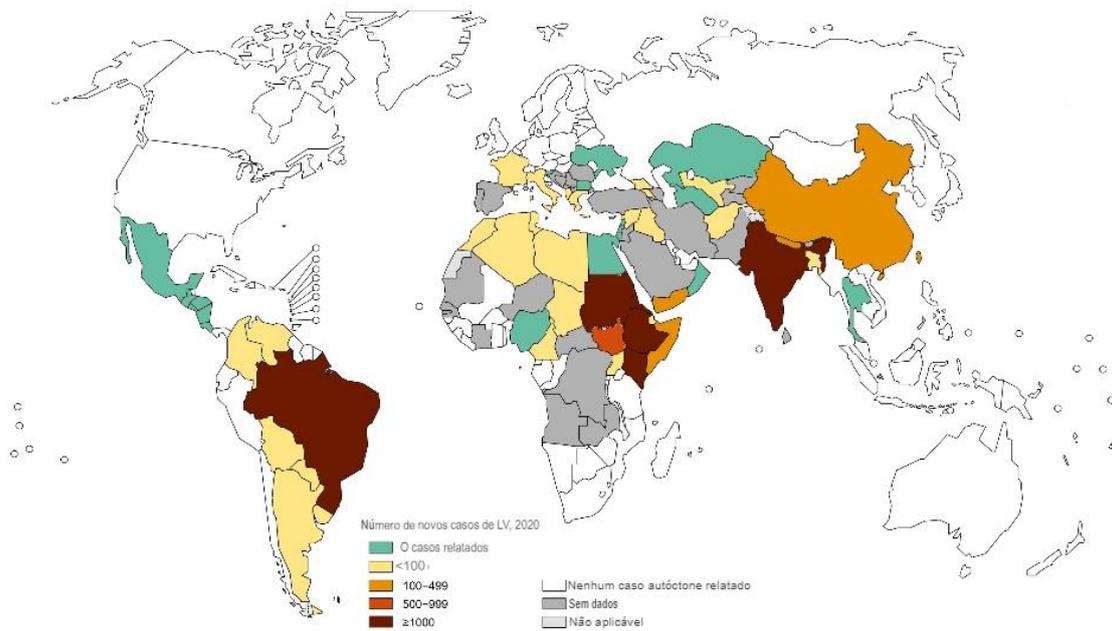


Fonte: Wilson (2009), Bilgic-Temel, et al. (2019). *Lutzomyia* spp. (A) e *Phlebotomus* spp. (B).

Este vetor é uma das principais dificuldades para o controle da enfermidade, além disso existe outros fatores estritamente ligados às condições de vida da população mais afetada que também dificultam o controle, como migração, ocupação urbana não planejada e mudanças ambientais e climáticas que interferem no ciclo do vetor, condições precárias de saneamento que leva às condições precárias de vida e destruição ambiental, promovendo condições favoráveis para a reprodução do vetor (ABRANTES et al., 2018).

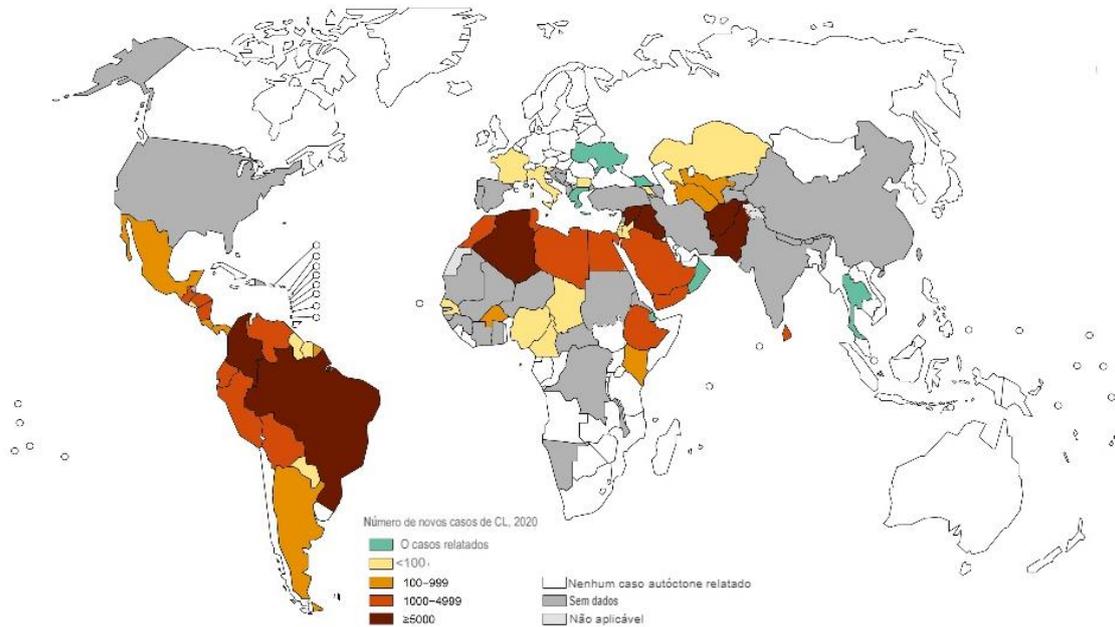
Aproximadamente 90 % dos casos globais de LV ocorrem em apenas seis países, sendo eles: Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (Figura 3), apresentando uma incidência anual de 200 mil a 400 mil casos por ano. A LT é considerada a forma mais comum da doença, onde mais de 350 milhões de pessoas estão expostas a doença, com cerca de um milhão e meio de novos casos, com incidência maior no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e Síria (Figura 4) (BRASIL, 2017; OYAMA et al. 2018; WAMAI; 2020; WHO, 2021).

**Figura 3.** Distribuição de países com notificação de leishmaniose visceral, com base em dados reportados à WHO em 2020.



Fonte: Adaptado de *World Health Organization - WHO*, (2021).

**Figura 4.** Distribuição de países com notificação de leishmaniose tegumentar, com base em dados reportados à WHO em 2020.



Fonte: Adaptado de *World Health Organization- WHO*, (2021).

No período de 2015 a 2019, houve a notificação de 84.654 casos de LT no Brasil, números que apontam um crescimento de casos em comparação a outros anos (CAMPELO; DE OLIVEIRA LIMA; VIANA 2021). Nos anos de 2013 a 2018 registrou-se 22.525 notificações de LV no Brasil, com incidência média de 1,85 a cada 100 mil habitantes (MENDES et al, 2020).

Nos anos de 2013 a 2018 o Piauí registrou 1.359 casos de LV e incidência de 5,88 a cada 100 mil habitantes, no mesmo ano, nível três vezes maior que a média nacional, de 1,85/100mil habitantes, para o mesmo ano (MENDES et al, 2020). A média de contaminação nesse período apresentou Teresina como a cidade com maior número de casos notificados de LV, com cerca de 1.683 casos (77,48 % do total), seguido de Parnaíba com 112 casos (5,15 % do total), Floriano com 65 casos (2,99 % do total) e Miguel Alves com 43 casos (1,98 % do total), sendo que 47 % resultaram em cura, todavia, 41,77 % foram ignorados, 7,30 % chegaram a óbito (SILVA et al. 2020).

Já entre o período de 2015 a 2017 o Piauí teve o registro de 170 casos de LT, sendo que 85,88 % (146 casos) dos casos foram registrados e classificados como a forma cutânea da doença assim como 14,12 % (24 casos) dos casos foram categorizados como a forma mucocutânea. Os municípios com maior quantidade de casos notificados para o período foram:

Teresina com 100 casos (58,82 %), Pedro II com 23 casos (13,5 %) e Altos com 8 casos (4,71 %) (LEMOS et al. 2019).

O Piauí destaca-se por apresentar transmissão intensa de casos de leishmanioses, principalmente se compararmos com o restante do país, sendo considerada área prioritária para as medidas de controle da doença, sendo assim um grande caso de saúde pública na região Nordeste (RODRIGUES; DE SOUSA; DE OLIVEIRA, 2020).

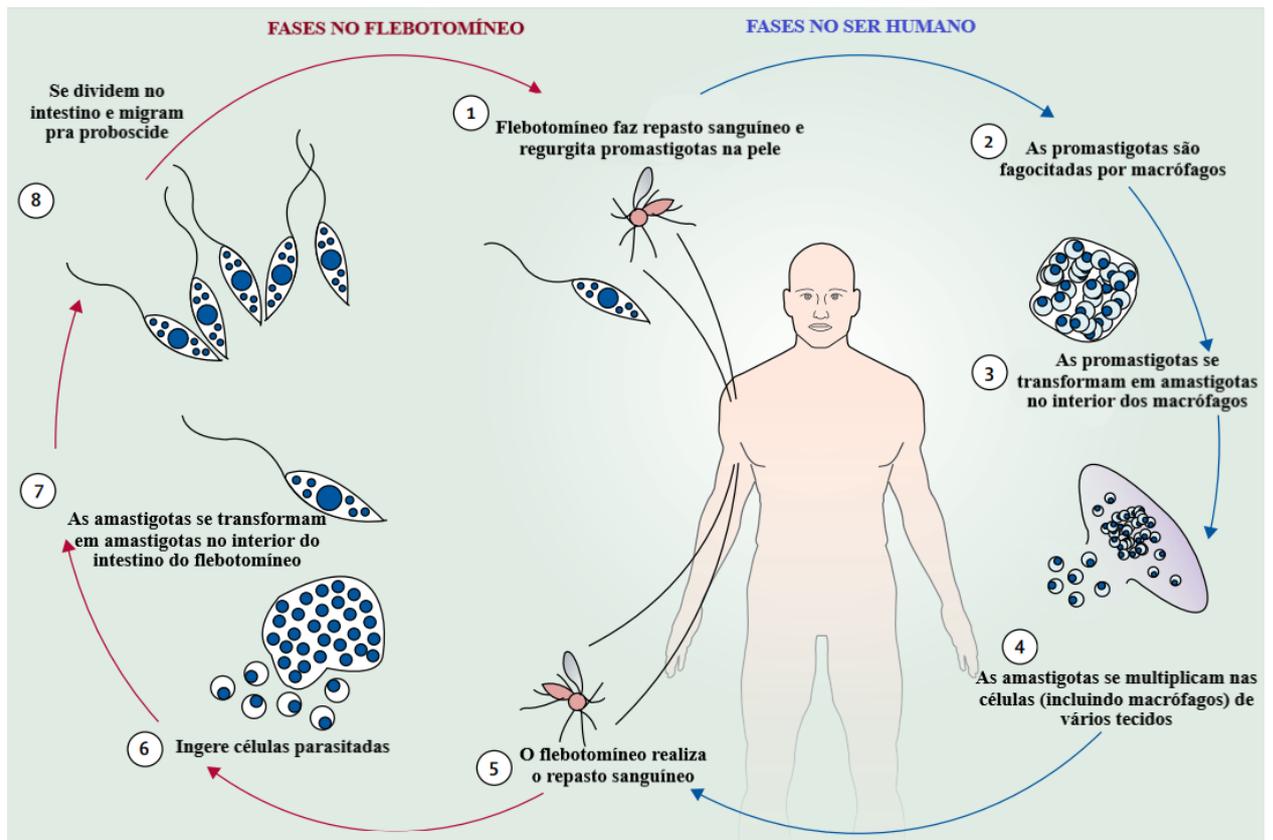
### 2.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania*

*Leishmania* apresentam um ciclo digenético que envolve tanto o hospedeiro mamífero quanto o inseto vetor, passando por mudanças morfológicas e bioquímicas para garantir a adaptação e sobrevivência, apresentando assim dois estágios morfológicos, a forma promastigota e amastigota (RODRIGUES et al., 2016).

A infecção do hospedeiro mamífero se inicia no momento do repasto sanguíneo de fêmeas do inseto vetor infectadas. Durante o processo, formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são regurgitadas na derme do hospedeiro mamífero, atingindo a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, essas formas são fagocitadas principalmente por macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam dentro do fagolisossomo. Após sucessivas multiplicações a célula rompe liberando as formas amastigotas na corrente sanguínea, ficando disponíveis para serem fagocitadas e se multiplicarem ainda mais ou serem captadas por um novo inseto vetor (LESTINOVA et al., 2017).

O ciclo no hospedeiro invertebrado tem início quando ele capta formas amastigotas no momento do seu repasto sanguíneo onde elas são liberadas dos macrófagos na extremidade posterior do intestino médio do inseto vetor. Na extremidade posterior do intestino médio começam a se diferenciar e multiplicar por divisão binária, em promastigotas, passando por diversas fases que incluem as promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas e metacíclicas sendo esta última obtida após a metaciclogênese que constitui em um processo de transformação de promastigotas pouco infecciosas em altamente infecciosas. Após isso as formas metacíclicas migram pra probóscide do inseto vetor para dar início a um novo ciclo (Figura 5) (SUNTER; GULL, 2017; ALCOLEA et al., 2019).

**Figura 5.** Ciclo biológico de *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Burza; Simon L; Marleen, (2018).

### 2.2.2 Manifestações clínicas das leishmanioses

Diversas são as manifestações clínicas causadas pelas leishmanias, que variam desde lesões benignas a formas com acentuado tropismo por órgãos internos que levam a altas taxas de mortalidade. Várias espécies de *Leishmania* são responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses (Quadro 1). Cada espécie pode ser relacionada com alguma forma clínica de apresentação específica, mas nenhuma espécie é responsável por todas as manifestações (ARONSON, 2017; BUSTAMANTE et al. 2017). As leishmanioses se dividem em duas, LT e LV, que variam pelo local que acometem. A primeira, ainda, se subdivide nas formas: leishmaniose cutânea localizada (Figura 6A) (LCL), leishmaniose cutânea difusa (Figura 6B) (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (Figura 6C) (LD), leishmaniose mucocutânea (Figura 6D) (LMC) e leishmaniose dérmica pós-calazar (Figura 6E) (LDPC) (Quadro 1) (ABADÍAS-GRANADO et al. 2021; CHACÓN et al., 2022).

A LV, é a forma mais grave, sendo uma manifestação sistêmica, podendo ser fatal em casos não diagnosticados e que não recebem tratamento adequado. Afeta principalmente crianças e pessoas imunocomprometidas. Sua manifestação clínica se dá inicialmente pela perda de apetite, palidez, aparecimento de febre alta, aumento de volume do baço, anemia e hemorragias. Esta forma se caracteriza pelo tropismo acentuado por órgãos internos como fígado, baço e medula óssea, devido a esse parasitismo nestes órgãos ocorre a hepatoesplenomegalia progressiva e supressão da medula óssea. A *L. infantum* no Brasil é o principal agente etiológico causador da forma visceral da leishmaniose (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2019; WILHELM, 2019).

A LCL pode ocorrer como lesão única ou múltipla, na mesma região da inoculação do parasito. Geralmente a manifestação ocorre com a aparição de uma lesão ulcerosa e escamosa, essas lesões podem espalhar pelos vasos linfáticos, causando adenopatias e lesões satélites . A forma cutânea demonstra uma tendência à cura espontânea e apresenta uma boa resposta ao tratamento. Diversos são os agentes etiológicos envolvidos nessa forma clínica *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (CARVALHO et al. 2017; MEIRELES et al. 2017).

A LCD consiste em uma manifestação rara e grave da LT, ocorrendo em pacientes considerados anérgicos com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. De início silencioso de lesão única não ulcerada na maioria das vezes na face se caracteriza pela aparição de múltiplas máculas, pápulas, nódulos, placas, e por infiltração difusa da pele, principalmente nas superfícies de extensão dos membros e face que não responde ao tratamento, evolui de forma arrastada. No Brasil, o agente etiológico responsável pela LCD é a *L. amazonensis* (MOKNI, 2019).

A LD é a manifestação menos frequente da LT, que se inicia a partir de focos localizados de lesões ulcerosas e por meio de disseminação hematogênica do parasito. Evolui com múltiplas lesões de caráter semelhante ao do foco inicial e de variados tamanhos, acometendo diversas regiões do corpo. A LD também se caracteriza pela baixa quantidade de parasitos circulantes no plasma, o que tende a dificultar seu diagnóstico pelos métodos parasitológicos que são considerados padrão-ouro no diagnóstico de leishmanioses. As principais espécies envolvidas nessa forma clínica são *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

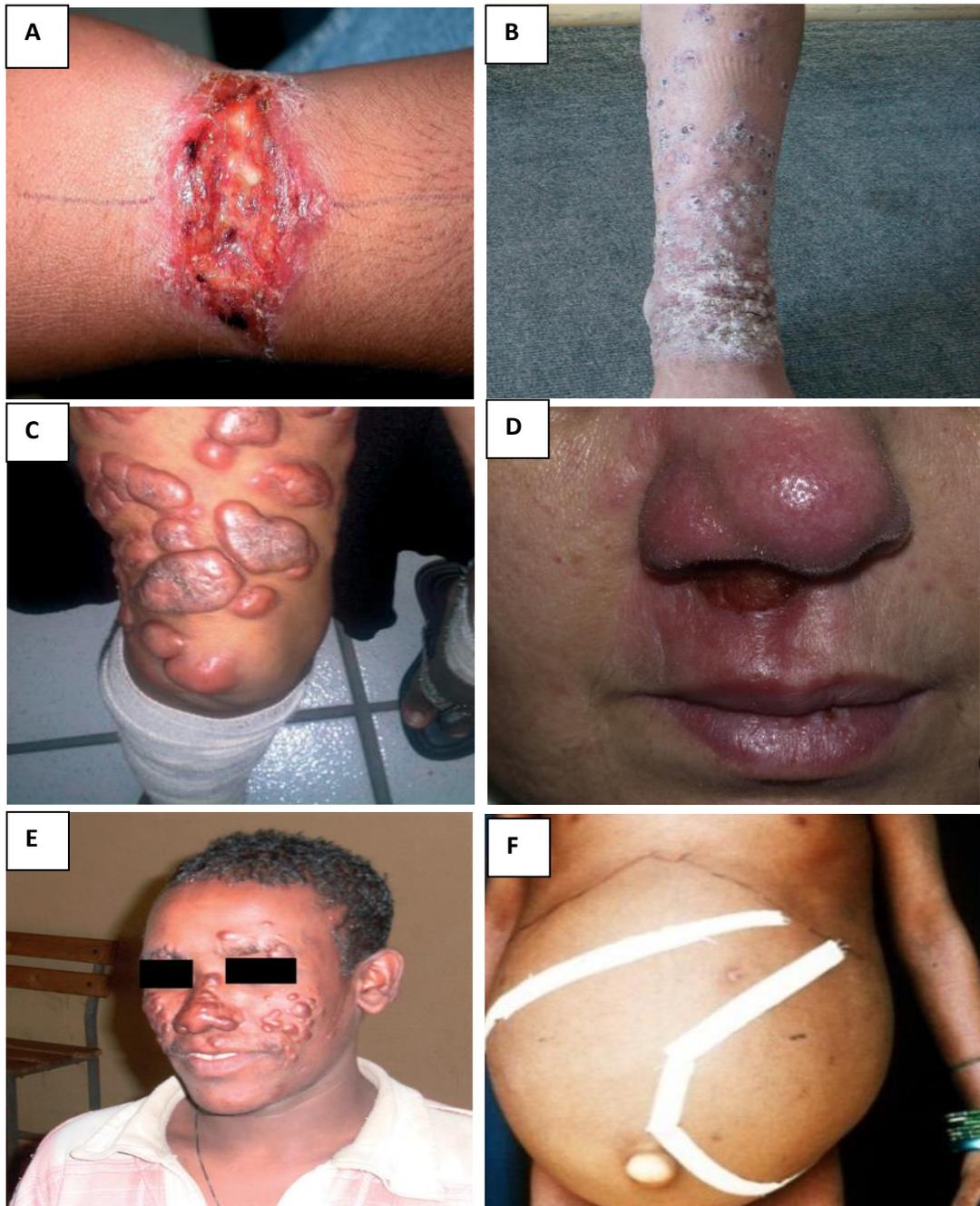
A LMC se apresenta em duas etapas. Com a cicatrização espontâneas das lesões cutâneas no local da punção no período de 7 a 12 meses, posteriormente ocorre um período de latência que pode durar meses ou anos. Após isso 25 % a 30 % apresentam lesões na mucosa da face, aparecendo a partir da parte anterior do septo nasal, podendo se estender para as

mucosas orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e incomumente, traquéia e árvore respiratória superior causando a destruição total das partes afetadas, representando assim um risco de vida aos pacientes afetados. *L. braziliensis* é a principal causadora de LMC embora também possa ser causada pela *L. amazonensis* ou pela *L. guyanensis* (MOKNI, 2019; GUREL; TEKIN; UZUN, 2020).

Já a LDPC é uma seqüela da LV afetando principalmente pacientes imunodeprimidos. As manifestações podem ocorrer geralmente de seis meses a um ano após o tratamento, mas pode ocorrer após 20 anos também. Se caracteriza pela aparição de como máculas hipopigmentadas, nódulos da cor da pele e/ou pápulas verrucosas, acometendo predominantemente a face, podendo se espalhar para o restante do corpo, em pacientes imunossuprimidos é mais frequente e mais grave, a forma de apresentação pode ser atípica, com lesões nodulares que nem sempre acometem a face, e maior abundância do parasito nas lesões. Ela é causada por *L. donovani* ou *L. infantum* (SAFAVI; ESHAGHI; HAJIHASSANI, 2021; ABADÍAS-GRANADO et al. 2021).

Apesar do baixo risco de morte das formas cutâneas da doença, elas deixam cicatrizes bastante características, que acabam criando bastante estigma sobre as pessoas afetadas, aumentando o preconceito sobre elas e impossibilitando as mesmas de conseguirem emprego ou até mesmo socializarem normalmente, aumentando ainda mais o ciclo de pobreza da população afetada por esta doença (BAILEY et al. 2017).

**Figura 6.** Manifestações clínica das leishmanioses



Fonte: *World Health Organization- WHO* (2015); Mokni (2019); Abadías-Granado et al. (2021).  
Leishmaniose cutânea localizada (A), leishmaniose cutânea difusa (B), leishmaniose cutânea disseminada (C), leishmaniose mucocutânea (D), leishmaniose dérmica pós-calazar (E) e leishmaniose visceral (F).

**Quadro 1.** Principais espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem, ocorrência e manifestação clínica

<b>Espécies</b>	<b>Distribuição Geográfica Principal</b>	<b>Padrões Clínicos Mais Comuns e Suas Principais Características</b>
<i>Leishmania donovani</i>	Índia, Bangladesh, Etiópia, Sudão	LV: febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, anemia LDPC: lesões maculares, papulares ou nodulares
<i>Leishmania infantum</i>	Bacia do Mediterrâneo, China, América Central e do Sul	LC: nódulos solitários levemente inflamatórios LV: mais comum em crianças e imunossuprimidos
<i>Leishmania tropica</i>	Mediterrâneo Oriental, Oriente Médio, Índia	LC: <3 úlceras secas, principalmente na cabeça; curso crônico recorrente
<i>Leishmania major</i>	África, Oriente Médio, Ásia Central, Índia, China	LC: múltiplas úlceras inflamatórias úmidas, a maioria das quais progride rapidamente
<i>Leishmania aethiopica</i>	Etiópia, Quênia	LC: nódulos ou úlceras localizadas; pode resultar em envolvimento difuso
<i>Leishmania mexicana</i>	México, América Central e do Sul, Texas	LC: lesões ulceradas solitárias ou múltiplas, às vezes com acometimento difuso; responsável por lesão ulcerada característica em coletores de gengiva
<i>Leishmania amazonensis</i>	América do Sul	LC: lesões ulceradas, muitas vezes com envolvimento difuso Pode progredir para LCM
<i>Leishmania braziliensis</i>	América Central e do Sul	LC: lesões ulceradas LMC: causada principalmente por <i>L. braziliensis</i> ; lesões ulceradas na mucosa oral e nasal; pode se estender para orofaringe e laringe
<i>Leishmania panamensis</i>	Panama, Costa Rica, Colômbia	LC: úlceras superficiais, muitas vezes com disseminação linfática LMC: envolvimento nasofaríngeo
<i>Leishmania guyanensis</i>	América do Sul	LC: úlceras múltiplas que podem se espalhar pelo sistema linfático, resultando em uma distribuição esporotricóide LMC: envolvimento cutâneo que pode progredir para envolvimento mucocutâneo

Fonte: Adaptado de Abadías-granado, I. et al., (2021). LC, leishmaniose cutânea; LMC, leishmaniose mucocutânea; LDPC, leishmaniose dérmica pós-calazar; LV, leishmaniose visceral.

### 2.2.3 Terapêutica das leishmanioses

Até o momento não existe terapêutica ideal para as leishmanioses, pois os fármacos atualmente disponíveis são insatisfatórios em termo de eficácia, custo, facilidade de administração e/ou segurança. O tratamento de primeira linha está baseado em antimoniais pentavalentes e os de segunda escolha baseados em anfotericina B, miltefosina e pentamidina (Quadro 2) (HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019).

O tratamento de primeira linha feito com antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ) consiste em uma injeção intramuscular na forma de estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; TIWARI et al., 2018). Apesar deste tratamento ser eficaz, possui alguns problemas cruciais como o alto custo do tratamento, muitos efeitos adversos como dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, além de excluir certos pacientes que são impossibilitados ou apresentam um tratamento mais difícil como: gestantes, pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e hipersensibilidade aos componentes da medicação (ROJAS, 2019; HERNÁNDEZ-BOJORGE, 2020).

Os fármacos de segunda escolha, como a anfotericina B (Anf B), são utilizados somente na falha terapêutica dos antimoniais ou em casos de pacientes idosos, mulheres grávidas, de imunodeficiências e co-infecções com doenças como: tuberculose, SIDA, criptosporidiose (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; HERNÁNDEZ-BOJORGE, 2020). Esse fármaco está associado a efeitos adversos graves, tais como náuseas, vômitos, febre, hipocalemia, insuficiência renal, anemia e problemas cardíacos (MENDONÇA, 2018).

A pentamidina é o fármaco de primeira escolha somente para o tratamento da espécie *L. guyanensis*. No entanto, na infecção de outras espécies é uma terapia secundária devido aos seus grandes efeitos colaterais que consistem em indução de diabetes mellitus insulino-dependente, hipotensão, efeitos gastrointestinais, hipoglicemia grave, choque, miocardite, cardiotoxicidade e toxicidade renal (JARAMILLO-ANTILLÓN et al. 2018; ARONSON; JOYA, 2019;)

A miltefosina se apresenta como único tratamento oral para as leishmanioses. Ela é utilizada principalmente devido ao grande aumento das falhas terapêuticas e ao surgimento de resistência do parasito ao fármaco. As desvantagens e restrições do seu uso incluem risco de hepatotoxicidade e teratogenicidade gastrointestinal grave, o que dificulta o seu emprego em mulheres grávidas e crianças (HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019).

**Quadro 2:** Fármacos usados no tratamento das leishmanioses.

<b>Fármacos</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Efeitos adversos</b>
Antimoniais pentavalentes	IM, IV ou IL	Cardiotoxicidade grave, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade
Anfotericina B	IV	Nefrotoxicidade grave, reações relacionadas à infusão, hipocalcemia, febre alta
Anfotericina B lipossomal	IV	Arrepios leves e calafrios durante a infusão Nefrotoxicidade leve (pouco frequente e leve)
Miltefosina	Oral	Vômito e diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade
Pentamidina	IM	Alta taxa de hiperglicemia, como resultado de dano pancreático; hipotensão, taquicardia e alterações eletrocardiográficas

Fonte: modificada de Menezes et al., (2015). IV: administração intravenosa; IM: administração intramuscular; IL: administração intralinfática.

### 2.3 Doença de Chagas

Assim como protozoários do gênero *Leishmania*, os do gênero *Trypanosoma* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Os parasitos da espécie *T. cruzi* são hemoparasitas identificados pela presença de flagelo e cinetoplasto, com um ciclo heteroxênico, apresentando três formas evolutivas: epimastigotas (Figura 7A), amastigotas (Figura 7B) e tripomastigotas (Figura 7C). As formas epimastigotas e amastigotas são as formas reprodutivas do protozoário elas se replicam por fissão binária e se encontram no trato digestivo do inseto vetor e interior das células do hospedeiro, respectivamente. As tripomastigotas, formas infectivas não reprodutivas, são encontradas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e na porção intestinal do vetor. Este protozoário é responsável pela doença de Chagas, que contém duas fases, aguda e crônica, sendo a aguda a primeira fase, apesar desta fase passar desapercibida na maioria dos casos ela pode causar febre, mal estar, falta de apetite e edemas, podendo se agravar em crianças e causar a morte, a fase crônica se caracteriza pela sua

manifestação depois de anos de contágio e alto grau de mortalidade, podendo ocasionar problemas como cardite chagásica (aumento do coração), megacólon e megaesôfago (SANTOS et al., 2016; LEWIS et al. 2018; PITA et al., 2018).

**Figura 7.** Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention- CDC*, (2020). Epimastigota (A), amastigota (B) e tripomastigota (C) de *T. cruzi*.

A forma clássica de transmissão é a vetorial, que durante o repasto sanguíneo do triatomíneo (Figura 8), que defeca na pele do indivíduo próximo ao local da picada, depositando formas tripomastigotas metacíclicas, que por reação do indivíduo em coçar o local da picada acaba proporcionando a entrada do protozoário na corrente sanguínea. Apesar da transmissão vetorial ser a forma clássica de contágio, a transmissão via oral acaba sendo a principal forma de transmissão atualmente, que se caracteriza pela ingestão de alimentos contaminados com a fezes do inseto vetor. Além dessas duas formas principais de transmissão, a infecção ainda pode ocorrer por: transfusão sanguínea, transferências congênitas e acidentes laboratoriais (DE NOYA et al., 2016; DIAS et al., 2016; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

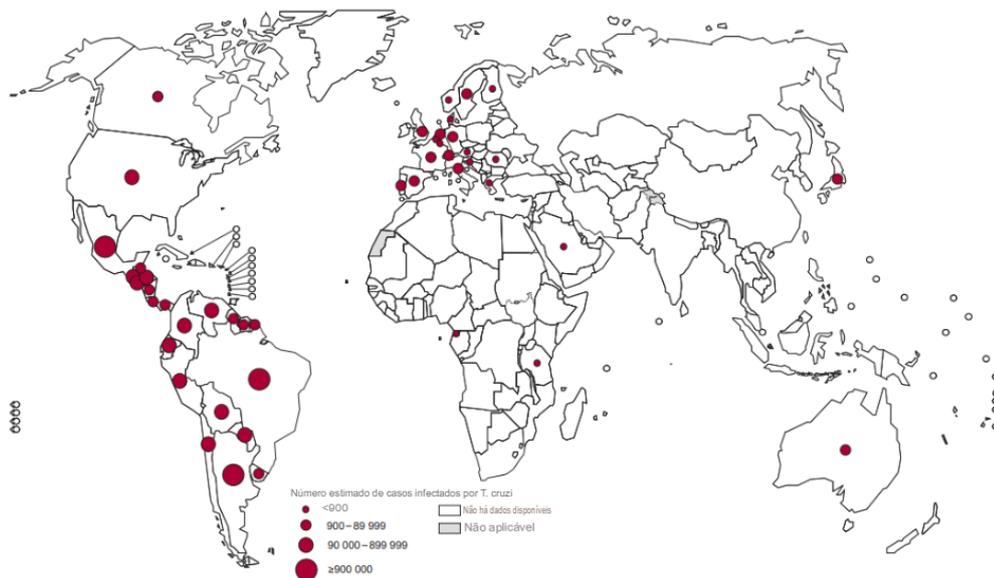
**Figura 8.** Inseto vetor triatomíneo, responsáveis por transmitir Doença de Chagas.



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention- CDC*, (2020).

A doença de Chagas afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas, principalmente na América Latina e estima-se que 10 mil pessoas morram anualmente por complicações da doença, onde mais de 75 milhões correm o risco de serem infectadas. A doença de Chagas alcançou uma globalização importante, como América Central e atualmente América do Norte e outros continentes sendo relatado casos nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália, onde eram países não endêmicos. Essa propagação tem causado grandes problemas sociais, econômicos e de saúde (Figura 9) (MÜLLER KRATZ, 2018; WHO, 2022).

**Figura 9.** Distribuição de países com notificação de doença de Chagas, com base em dados reportados a WHO em 2018.



Fonte: Adaptado de *World Health Organization- WHO*, (2020).

No Brasil entre os anos de 2007 a 2019, 3.060 casos de doença de Chagas na sua fase aguda, com uma média anual de 222 casos, com a região Norte apresentando a maior incidência de casos, seguida da região Nordeste. No período de 2007 a 2017, foram registradas 51.293 mortes pela doença de Chagas, uma média de 4.663 por ano, superando a média anual de óbitos atribuídos a outras doenças como à tuberculose e às hepatites virais no mesmo período (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020).

A doença de Chagas na sua fase crônica apresenta uma limitação para reconhecimento e definição de áreas endêmicas pois os pacientes foram infectados há muito tempo, e devido a constante migração que ocorreu nas últimas décadas ficou inviável delimitar a sua

endemicidade no país, para melhorar o controle de notificações desta fase da doença, no ano de 2020 foi definida como uma doença de notificação compulsória nacionalmente de acordo com a Portaria nº 264, de 2020 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2022).

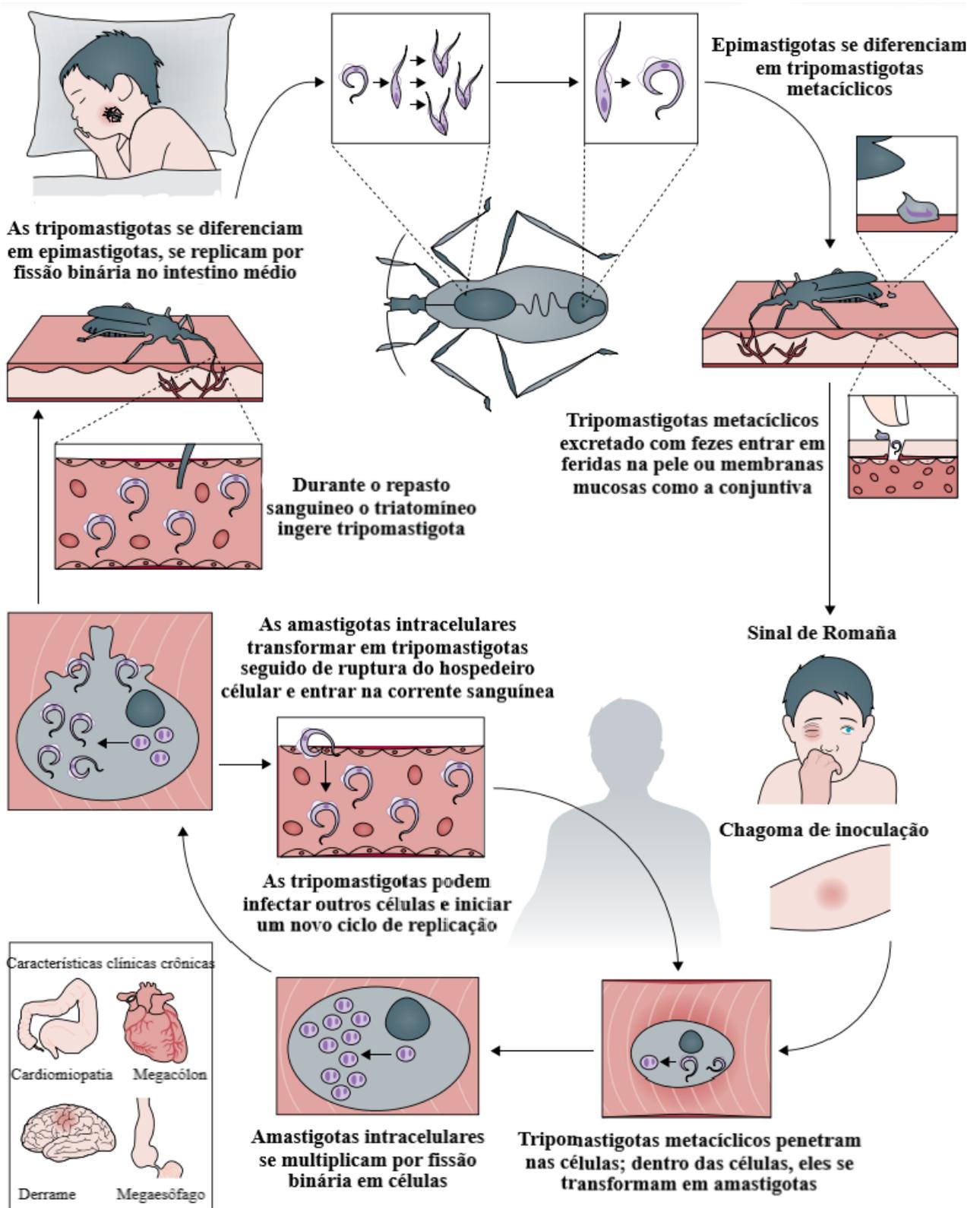
Somente no estado do Piauí entre os anos de 2010 a 2019 foram notificados 517 casos suspeitos de doença de Chagas, com 70 (13,5%) de casos confirmados, distribuídos em 23 municípios. A maioria se encontra na área central do estado (região caatinga e cerrado), com a maioria dos casos relatados em São João do Piauí com 18 casos, com a grande incidência na área rural devido a grande propagação do inseto vetor, mostrando uma urgência em programas de vigilância sanitária (DOS SANTOS, 2020; DE SOUZA, 2021; DE AQUINO SANTANA, 2022).

### 2.3.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia quando o vetor triatomíneo (fêmea hematófaga) durante seu repasto sanguíneo ingere formas tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea de um hospedeiro mamífero infectado. Dentro do inseto vetor as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas onde se replicam intensamente por fissão binária no intestino médio do vetor. As epimastigotas migram para intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (infectiosas), que são excretadas durante um novo repasto sanguíneo com as fezes do vetor (Figura 10) (PITA et al., 2018).

No hospedeiro vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto vetor adentram através de uma lesão na pele no momento do repasto sanguíneo e infectam células nucleadas, nessa fase todas as células nucleadas do hospedeiro são alvos potenciais do parasito. Durante o primeiro contato com a célula, onde estimulam a formação de pseudópodes, ocasionando internalização do parasito em um vacúolo parasitóforo. No citoplasma, as tripomastigotas se diferenciam na forma amastigota intracelular, que se replicam por fissão binária. Ao final desse processo, as amastigotas se transformam em tripomastigotas e rompem a célula infectada, liberando as formas tripomastigotas na circulação, infectando assim novos tecidos, órgãos e reiniciando o ciclo (LOZANO et al., 2017; ZINGALES, 2018).

**Figura 10.** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado Pérez-Molina; Molina, (2018).

### 2.3.2 Manifestações clínicas da doença de Chagas

O curso clínico da doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Após a fase inicial de infecção e período de incubação, a alta parasitemia indica a fase aguda, onde a forma tripomastigota invade os órgãos, principalmente fígado, baço e tecidos cardíacos. Apesar da alta parasitemia na corrente sanguínea microscopicamente detectável, esta fase passa geralmente despercebida, pois na maioria dos casos não apresenta sintomas ou apresenta sintomas leves inespecíficos, como febre, inflamação no local da inoculação (Chagoma) (Figura 11A). Quando a conjuntiva é a porta de entrada do parasito neste local forma é formado um sinal de Romana (Figura 11B). Os sintomas mais comuns apresentados na fase aguda desta doença na maioria dos casos são confundidos com uma simples infecção viral, devido ao fato de serem sintomas poucos específicos, eles acabam passando despercebidos pelo paciente dificultando assim o diagnóstico (DIAS et al., 2016; SOUZA et al., 2016; SIMÕES et al., 2018)

A fase aguda tende a se resolver espontaneamente depois de um período, mas o hospedeiro desenvolve a fase crônica se não for tratado. Esta fase tende a apresenta sintomas expressivos depois de anos do contato inicial, com os parasitos já infectando os órgãos que gera uma reação inflamatória local, causando danos aos órgãos alvos (KIRCHHOFF, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O envolvimento do miocárdio é a manifestação mais comum desta fase, seguido pelo sistema gastrointestinal e a forma mista (cardíaca e digestiva) sendo está a forma mais rara (ECHAVARRÍA et al., 2021). Quando o parasito invade o tecido cardíaco ele desencadeia uma grande resposta imune e inflamatória. Esta resposta inflamatória aliada ao longo tempo no qual esta fase passa despercebida devido a sua ausência de sintomas, permite a aparição de lesões irreversíveis do sistema de condução e das células neurais cardíacas (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). Os danos cardíacos persistentes, que causam perda de miocardiócitos e interferem na transmissão de impulso elétrico, culminam com reação de compensação funcional do coração, causando assim o megacardio (Figura 11C). Uma reação semelhante pode ser observada na manifestação digestiva, onde a infecção de neurônios do trato gastrointestinal desencadeia resposta inflamatória que culmina com perda neuronal, conseqüentemente afetando o controle peristáltico de esôfago e intestino, desencadeando a hipertrofia destes órgãos (mega colón e megaesôfago) (BERN, 2015; BRASIL, 2016; BOCCHI et al., 2017).

**Figura 11.** Manifestações clínicas da doença de Chagas.



Fonte: Munoz-Saravia et al., (2012); Umezawa et al., (2001); Rossi; Ramos; Bestetti, (2003); Munoz-Saravia et al., (2012). Chagoma (A), sinal de Romanã (B) e megacardio (C) de *T. cruzi*.

### 2.3.3 Terapêutica da doença de Chagas

Apesar de ser uma doença milenar, a doença de Chagas possui os mesmos fármacos disponíveis para o tratamento a mais de um século. Sendo os fármacos de primeira e segunda linha Benznidazol e Nifurtimox (Quadro 3) respectivamente, ambos apresentam grandes limitações para o uso. Possuem diversos efeitos adversos, não garantem a eliminação total do parasito e podem levar à resistência. No Brasil, o único fármaco antichagásico utilizado é o Benznidazol devido sua maior tolerabilidade (ALPERN; LOPEZVELEZ; STAUFFER, 2017). O tratamento indicado é prologado, de 60-90 dias, que depende da fase clínica da doença. Estes fármacos apresentam uma eficácia considerável na fase aguda, mas na fase crônica foram observadas uma baixa atividade, não sendo o tratamento ideal nesta fase. Devido a esses fatores eles passaram a não ser recomendados na fase crônica da doença, sendo usados somente na reativação da infecção devido a supressão imunológica (MORILLO et al., 2015; KRATZ, 2019; LLAGUNO et al., 2019; LLAGUNO et al., 2021).

Os efeitos adversos graves destes medicamentos são uma das principais razões da grande evasão dos pacientes ao tratamento. O benznidazol geralmente apresenta efeitos ligados a dermatites por hipersensibilidade, seguidas de distúrbios gastrointestinais, depressão de medula óssea, aumento de chances de insuficiência cardíaca e disfunção simultânea de vários nervos periféricos (polineuropatia). Nos casos de resistência ao benznidazol a opção alternativa passa a ser o Nifurtimox, que apresenta efeitos adversos como irritabilidade, sonolência, vômito, dor abdominal exantema, anorexia, neuropatias, convulsões e depressão (OLIVEIRA et al., 2017; TORRICO et al., 2018; MANSOLDO et al, 2020; LASCANO; BOURNISSEN; ALTCHER, 2022).

Na fase aguda os fármacos apresentam uma relativa eficácia no tratamento. Apesar disso, diversos fatores como a ineficiência na fase crônica onde boa parte dos casos são diagnosticados, períodos longos de tratamento, efeitos adversos graves e resistência do parasito causam um grande êxodo de pacientes durante o tratamento. Devido a todos esse fato a busca por novos compostos para o tratamento é de extrema importância e urgência. (PINHEIRO et al., 2017; ZREIN et al., 2018).

**Quadro 3:** Fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.

<b>Fármacos</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Efeitos adversos</b>
Benznidazol	Oral	Dermatite por hipersensibilidade, distúrbios gastrointestinais e disfunção simultânea de vários nervos periféricos (polineuropatia).
Nifurtimox	Oral	Irritabilidade, sonolência, vômito, dor abdominal exantema, anorexia, neuropatias, convulsões e depressão

Fonte: Elaboração própria

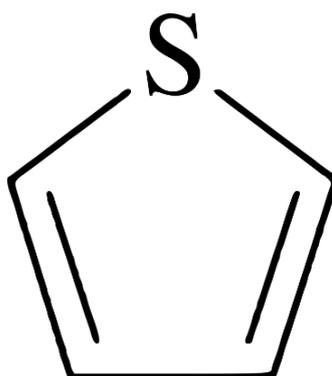
## 2.4. Derivados tiofênicos

Diversas pesquisas são realizadas com o intuito de se obter novas substâncias com potencial terapêutico, menos tóxicos e custo de produção menor que os dos atuais fármacos utilizados (SUNDAR; CHAKRAVATY, 2015; BEZERRA-SOUZA, 2019). Devido ao avanço da química orgânica teórica e experimental, se tornou possível a síntese em laboratório que permitiu promover alterações estruturais em moléculas e obtenção de novas moléculas com propriedades terapêuticas. O mercado farmacêutico atual é composto por uma parcela significativa de fármacos de origem sintética, como: ivermectina, cloroquina, remdesivir e favipiravir (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FAROOQ; NGAINI, 2021).

Dentre as classes de compostos sintéticos de destaque na investigação farmacológica, encontram-se os derivados do tiofeno. O tiofeno (Figura 12), descoberto e isolado por Meyer em 1882, é um composto de anel aromático heterocíclico pentagonal no qual um carbono de

seu anel é substituído por um átomo de enxofre, formando um sistema aromático, sendo uma estrutura importante no planejamento de novos fármacos (KERI, 2017). Os derivados tiofênicos vem despertando bastante interesse na indústria farmacêutica, pois apresentam estabilidade química, simplicidade estrutural, síntese simples e baixo custo (AGUIAR et al., 2016; IBRAHIM et al., 2016; BOZOROV et al., 2017).

**Figura 12.** Estrutura molecular do tiofeno.



Fonte: Elaboração Própria.

Os derivados 2-amino-tiofênicos foram sintetizados pela primeira vez pelo químico alemão Karl Gewald, em 1961, e correspondem aos tiofênicos que apresentam pelo menos um grupamento amino em sua molécula. Sua síntese consiste em uma reação entre compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas), nitrilas ativadas e enxofre em presença de aminas secundárias (GEWALD, 1965; GEWALD et al., 1966).

Os compostos de tiofeno também são encontrados em seres vivos e sua ocorrência se dá em vários organismos, como fungos e plantas superiores, plantas como a *Tagetes patula* L. e *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), nas quais vários derivados tiofênicos já foram identificados como metabólitos secundários (MARGL et al., 2001).

As propriedades terapêuticas dos derivados tiofênicos são amplamente descritas na literatura, a exemplo: antifúngica (NEVES, 2020), antibacteriana (BARAVKAR, 2019), antileishmania (RODRIGUES et al., 2015; FÉLIX et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018) e anti-*Trypanosoma cruzi* (MAJUMDER; KIERSZENBAUM, 1993), sendo assim candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos anti-Trypanosomatidae.

Considerando o cenário atual das leishmanioses e da doença de Chagas, que são doenças que provocam altos índices de mortalidade e com alternativas terapêuticas limitadas e de graves efeitos adversos e uma vez que os derivados tiofênicos são moléculas com potencialidades

terapêuticas promissoras inclusive no campo das duas doenças citadas, este trabalho se propôs a estudar a atividade anti- Trypanosomatidae do derivado 2-amino-tiofênico SB-200 em ensaios *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a ação anti-Trypanosomatidae do derivado 2-amino-tiofênico SB-200 sobre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antipromastigota do SB-200 sobre as espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*;
- Estudar a atividade antiepimastigota e antitripomastigota do SB-200 sobre *T. cruzi*;
- Estabelecer a citotoxicidade do SB-200 em macrófagos J774.A1 e Células VERO;
- Verificar a integridade da membrana em formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com o SB-200;
- Verificar a integridades das ultraestruturas da *L. infantum* por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Verificar o tipo de morte celular induzida pela SB-200 em formas promastigotas de *L. infantum*;
- Analisar a interação do SB-200 com a enzima N-miristoil transferase *docking* molecular;
- Analisar a atividade antiamastigota do SB-200 sobre macrófagos infectados com *L. infantum*;
- Averiguar a modulação da síntese de citocinas por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200;
- Avaliar a modulação da síntese de NO e EROs por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200;
- Estabelecer a toxicidade aguda do SB-200 em larvas de *Zophobas morio*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

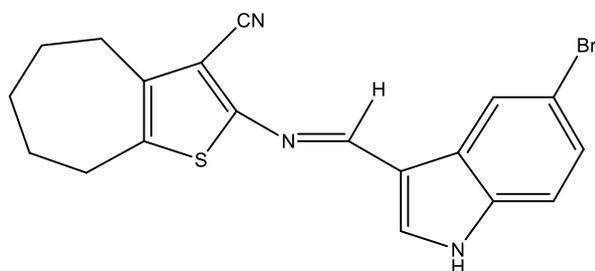
### 4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC) do Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

### 4.2 Composto estudado e fármacos de referência

O derivado tiofênico 5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-(5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina (chamado simplesmente de SB-200 neste trabalho) (Figura 13), foi sintetizado e fornecido pelo Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

**Figura 13.** Estrutura molecular da SB-200.



Fonte: Elaboração própria.

O composto foi sintetizado via uma reação de duas etapas. A reação se inicia com uma reação *one pot* entre malonitrila com uma cetona cíclica e enxofre elementar na presença de morfolina, seguida pelo procedimento de Gewald (HUANG; DÖMLING, 2011). O tratamento de adutos de Gewald com aldeídos aromáticos em meio etanólico e refluxo produziu o composto de interesse SB-200. O composto foi sintetizado e descrito anteriormente (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

Antimoniato de meglumina (Glucantime® – Sanofi-Aventis Farmacêutica, São Paulo, BRA) e anfotericina B (Anforicin B® – Cristália, São Paulo, BRA), fármacos de primeira e segunda escolha, respectivamente, foram utilizados como controles positivos nos experimentos antileishmania. Benznidazol (LAFEPE), fármaco de primeira linha no tratamento da Doença de Chagas, foi utilizada como controle positivo nos testes anti-*Trypanosoma cruzi*.

### 4.3 Manutenção dos parasitos e macrófagos

Para os diferentes ensaios realizados foram utilizados parasitos das espécies *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/BR/1976/JOF), *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e *Leishmania (Leishmania) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). Formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 1 % de penicilina-estreptomicina 100 UI/100 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (denominado de Schneider completo neste trabalho) e 2 % de urina humana para da *L. infantum*, mantidas a 26 °C em incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD, do inglês *Biochemical oxygen demand*) (COSTA et al., 2021).

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) foram mantidas em meio *Liver Infusion Triptose* (LIT) suplementado com 10 % de SFB e 1 % de penicilina-estreptomicina 100 UI/100 mg (denominado de LIT completo neste trabalho), mantidas em BOD a 28 °C.

Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado a 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (denominado DMEM completo neste trabalho) e incubados a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Os repiques foram realizados sempre que as células atingissem 80 % de confluência, em torno de 48 h a 72 h após o acondicionamento. Para isso, o meio foi retirado e as garrafas passavam por duas lavagens com salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para o descarte de células mortas e desaderidas. A seguir, foi adicionado o meio DMEM completo e era realizado a raspagem das células aderidas com auxílio de um cell scraper (Corning Glass Workers – New York – USA). As células foram então centrifugadas a 1000 rpm por 10 min, diluídas em corante vital Azul de Tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e contadas em Câmara de Neubauer para análise da viabilidade celular e contagem para a

distribuição correta de unidades por garrafa, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/garrafa (ALONSO et al., 2019).

#### 4.4 Cultivo de invertebrados

Para os ensaios de toxicidade *in vivo* foram utilizadas de larvas de *Zophobas morio*. As larvas foram mantidas em caixas plásticas (60 cm x 40 cm x 80 cm) com água e substrato de crescimento (farinha de trigo) *ad libidum*, em temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C (RIBEIRO et al, 2023). As larvas pesando entre 100 a 200 mg, sem lesões evidentes, melanização e da mesma proporção foram as escolhidas para o experimento.

#### 4.5 Ensaio anti-Trypanosomatidae sobre parasitos do gênero *Leishmania*

##### 4.5.1 Ensaio de atividade antileishmania contra formas promastigotas

O composto SB-200 foi adicionado à placas de cultura de células de 96 poços contendo meio Schneider completo, atingindo as concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM e 1,56 µM feitas de forma seriada. Logo após, formas promastigotas das espécies *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, na fase de crescimento logarítmico, foram adicionadas na quantidade de  $1 \times 10^6$  leishmanias por poço. A placa foi mantida a 26 °C em uma incubadora BOD por 72 h. Após o período de tratamento, 10 µL de brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2y 1)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para avaliação colorimétrica da inibição do crescimento. A placa foi incubada novamente por mais 4 h, e então recebeu uma adição de 50 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10 % em água destilada para solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 540 nm (AYROM et al., 2021). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e em valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), sendo o grupo controle, realizado com meio Schneider completo a 0,5 % de DMSO, considerado como 0 % de inibição do crescimento dos parasitos. O controle positivo foi realizado com antimoniato de meglumina e anfotericina B.

## 4.6 Ensaio anti-Trypanosomatidae sobre parasitos da espécie *T. cruzi*

### 4.6.1 Ensaio de atividade anti-*Trypanosoma cruzi* contra formas epimastigotas

Para a atividade antiepimastigota foi adicionado à placas de cultura de 96 poços, a substância SB-200 nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM e 6,25 µM em meio LIT completo. Em seguida foram adicionadas formas epimastigotas na fase de crescimento logarítmico na quantidade de  $1 \times 10^6$  por poço. A placa foi mantida a 28 °C em uma incubadora BOD por 72 h. Ao final deste período foram retiradas alíquotas e diluídas em solução de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formaldeído em 1 L de água destilada) e quantificadas em Câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento e em valores de  $CI_{50}$  de formas epimastigotas, sendo o grupo controle, realizado com meio LIT completo a 0,5 % de DMSO, considerado como 0 % de inibição do crescimento dos parasitos. O controle positivo foi realizado com benznidazol (AZEREDO et al., 2014).

### 4.6.2 Ensaio de atividade anti-*Trypanosoma cruzi* contra formas tripomastigotas

Para a obtenção das formas tripomastigotas, formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT até atingirem sua fase logarítmica de crescimento (entre 7 a 9 dias de cultivo). Após esse período foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min e logo após foram submetidas a um estresse nutricional por 2 h a 28 °C com adição de 8 mL de meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU). Após este período as formas estressadas foram centrifugadas e ressuspendidas em meio TAU enriquecido com prolina, glutamina, aspartato e glicose (meio TAU3AAG) e incubadas a 28 °C por 96 h. Após esse período as formas tripomastigotas metacíclicas foram coletadas no sobrenadante das culturas, diferenciando-se das formas epimastigotas que aderem-se ao substrato no fundo das garrafas (CONTRERAS et al., 1985).

Formas tripomastigotas foram adicionadas à placas de cultura de células de 96 poços contendo a substância SB-200 em meio DMEM completo nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM e 6,25 µM. Em seguida foram adicionadas formas tripomastigotas na fase de crescimento logarítmico na quantidade de  $1 \times 10^6$  por poço. A placa foi mantida a 28 °C em uma incubadora BOD por 72 h. Ao final deste período foram retiradas alíquotas e diluídas em solução de isoton e quantificadas em Câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento e em valores de  $CI_{50}$

de formas tripomastigotas, sendo o grupo controle, realizado com meio DMEM completo a 0,5 % de DMSO, considerado como 0 % de inibição do crescimento dos parasitos. O controle positivo foi realizado com benznidazol (AZEREDO et al., 2014).

#### **4.7 Ensaio de citotoxicidade com macrófagos J774.A1 e células VERO**

Em placas de 96 poços foram cultivados  $1 \times 10^5$  células por poço em meio DMEM completo e incubados por 3 h em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> para adesão celular. Após este tempo o sobrenadante foi retirado e substituído por um novo meio contendo as concentrações de SB-200 de 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM e 1,56 µM feitas de forma seriada. A placa foi mantida a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> por 72 h. Após o período de tratamento, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para avaliação colorimétrica da viabilidade celular. A placa foi incubada novamente por mais 4 h, e então foi retirado o sobrenadante e realizada a adição de 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) para diluição dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 540 nm (modelo Molecular Devices Spectramax 190) (ILAGHI et al., 2021). Os resultados foram expressos em porcentagem e em termos de concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>), sendo o grupo controle, realizado com meio DMEM completo a 0,5 % de DMSO, considerado como 100 % de viabilidade celular. O controle positivo foi realizado com antimoniato de meglumina, anfotericina B e benznidazol.

#### **4.8 Ensaio de integridade da membrana das formas promastigotas de *L. infantum***

Formas promastigotas de *L. infantum* na sua fase logarítmica foram semeadas em placa de 96 poços ( $2 \times 10^6$ /por poço) contendo meio Schneider completo junto com as concentrações equivalentes a CI<sub>50</sub>, 2 x CI<sub>50</sub> e 4 x CI<sub>50</sub> do SB-200. Após 72 h de incubação em BOD, foi adicionado o corante SYTOX green (5 µM) e a placa foi incubada por mais 7 h. Ao final do período a leitura foi realizada em um leitor de fluorescência com filtro de emissão de 523 nm e excitação em 488 nm. O controle positivo foi realizado com Triton X-100 (MENDONÇA et al., 2018).

#### **4.9 Ensaio ultraestrutural**

Formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento ( $1 \times 10^6$ ) foram tratadas com a  $CI_{50}$  de SB-200 e incubadas por 24 h em BOD à 26 °C. Após este período, as amostras foram lavadas três vezes com PBS, fixadas com Karnovsky (2 % de paraformaldeído e 2 % de glutaraldeído) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) por 4 h e pós-fixadas por 1 h em uma solução contendo 1% de  $OsO_4$ , 0,8 % de ferricianeto de potássio e 5 mM de  $CaCl_2$  em tampão cacodilato de sódio de (0,1 M, pH 7,2). A seguir as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 a 100 %). Para análise em microscopia eletrônica de transmissão, após a desidratação, o material foi incluído em resina Spurr. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (Leica EM, Alemanha), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (Jeol, Japão). Para análise na microscopia eletrônica de varredura, após a desidratação, o material foi submetido a secagem com o ponto crítico (Balzers CPD 030, Alemanha) com  $CO_2$  e metalizado (Leica EM SCD 550, Alemanha) com ouro. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-7001F (Jeol, Japão) (PAIVA; RADICCHI; BÁO, 2022; FREITAS et al., 2022).

#### **4.10 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. infantum* por citometria de fluxo**

Formas promastigotas em fase logarítmica de *L. infantum* ( $1 \times 10^6$ ) foram tratadas e incubadas durante 4 h com as concentrações equivalentes a  $CI_{50}$ ,  $2 \times CI_{50}$  e  $4 \times CI_{50}$  do SB-200. Após o tratamento, foram feitas três lavagens com PBS e as células foram ressuspensas em tampão de ligação à anexina (NaCl 140 mM, HEPES 10 mM, e  $CaCl_2$  2,5 mM, pH 7,4) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A seguir foram marcadas com o kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC/7-amino-actinomicina D (7-AAD) e analisadas através de um citômetro de fluxo (BD FACSCanto® II BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Ao todo, 30.000 células foram investigadas e os dados foram analisados através do software FlowJo 10.0.7 TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA (RODRIGUES et al., 2021).

#### **4.11 Estudo de simulação por *docking* molecular**

As estruturas 3D do alvo molecular N-myristoyl transferase (4A30) foram obtidos do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN, et al., 2000). O pacote Autodock 4.2. foi usado para os procedimentos de dockagem molecular, enquanto o AutoDock Tools (ADT) versão 1.5.6.60.

foi utilizado para as simulações das proteínas e seus ligantes (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; SANNER, 1999; MORRIS; HUEY; OLSON, 2008; GOODSELL, 2009). Para as análises das simulações foi definido o receptor como rígido e cada ligante como flexível. As cargas parciais de Gasteiger foi realizado após o acréscimo dos hidrogênios de queda (GASTEIGER; MARSILI, 1980). Os átomos de hidrogênio não polares da proteína e do ligante foram subsequentemente fundidos. Uma caixa cúbica nas proporções de  $60 \times 60 \times 60$  pontos com um espaçamento de  $0,35 \text{ \AA}$  entre os pontos da grade foi gerada para o alvo de proteína de furo. Os centros de grade de afinidade foram definidos. Na procura do *docking*, foram usados os métodos do algoritmo genético Lamarckiano de investigação global (LGA) e os métodos pseudo-Solis e Wets de rastreamento local (LS) (SOLIS; WETS, 1981; MORRIS, et al., 1998). Foram realizadas 100 execuções de simulações de *docking* independentes para ligante (ROCHA, et al., 2018). Outras medidas de *docking* foram estabelecidas como valores padrões. As conformações ancoradas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o RMSD. Para obter uma melhor análise, as coordenadas dos complexos selecionados foram eleitas pelo critério de menor conformação *docking* do cluster com menor energia em combinação com uma inspeção visual.

#### **4.12 Ensaio de atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas**

A infecção foi realizada em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 13 mm. Os macrófagos foram plaqueados na concentração  $1 \times 10^5$  em 500  $\mu\text{L}$  de meio DMEM e incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$  por 4 h para a adesão celular. Após esse tempo os poços foram lavados com PBS para retirada de macrófagos que não aderiram e um novo meio contendo formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* na proporção de 10 promastigotas/macrófago em cada poço foi adicionado. O período de infecção foi de 4 h e após este tempo o meio foi aspirado para remover as promastigotas que não infectaram os macrófagos e um novo meio contendo as concentrações seriadas de 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$  e 3,12  $\mu\text{M}$  de SB-200 foi adicionado. Após a incubação de 72 h, as lamínulas foram removidas e coradas com panóptico rápido. Para cada lamínula, 300 macrófagos foram avaliados quanto ao número de células infectadas e o número de parasitos por cada macrófago. Os valores foram utilizados para o cálculo da concentração efetiva média ( $\text{CE}_{50}$ ) (TAVARES et al., 2018). O controle negativo foi realizado com meio DMEM completo a 0,5 % de DMSO. O controle positivo foi realizado com antimoniato de meglumina os sobrenadantes dos ensaios

de tratamento de macrófagos infectados foram reservados e mantidos em freezer à -20 °C para futuras dosagens de produção de citocinas e NO.

#### **4.13 Avaliação do perfil imunomodulador do SB-200 sobre macrófagos infectados com *L. infantum***

##### 4.13.1. Dosagem de citocinas

Para investigar o padrão de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-12) induzidas pelo tratamento com SB-200, foram utilizados os sobrenadantes dos ensaios de infecção de macrófagos por *L. infantum*. A dosagem foi realizada pelo método de ELISA sanduíche, conforme metodologia descrita pelo fabricante do Kit (eBioscience).

Placas ELISA (NUNC-Immuno™ - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura e incubadas a 4 °C por 18 h para a quantificação de citocinas. Em seguida as placas foram lavadas com PBS a 0,05 % de Tween 20 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de bloqueio (PBS a 10 % de SFB) e incubados durante 1 h. Após este período, foram feitas novas lavagens com PBS, e então os sobrenadantes do ensaio de infecção foram adicionados aos poços assim como diferentes concentrações de citocinas recombinantes para realizar a curva padrão. A seguir, as placas foram novamente incubadas a 4 °C por 18 h.

Após a incubação, as placas foram lavadas novamente e um complexo detector (formado pelo anticorpo de detecção biotilado) foi adicionado às placas, sendo essas, incubadas novamente por 1 h. Posteriormente, as placas foram lavadas e acrescentou-se o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP), e em seguida incubou-se por 30 min à temperatura ambiente. Após lavagem adicional, a reação foi revelada pela adição de uma solução de substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. Após 15 min esta reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 1 N. Em seguida as placas foram lidas a 450 nm em espectrofotômetro para a quantificação de citocinas por interpolação de curva padrão.

#### 4.13.2 Dosagem de NO

A produção indireta de NO foi avaliada em sobrenadantes dos ensaios de infecção pelo método de Griess. Para este ensaio, 100 µL dos sobrenadantes do ensaio de infecção de macrófagos foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess em placa de 96 poços. A placa permaneceu incubada durante 10 min em temperatura ambiente e logo após foi lida em um espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva-padrão com concentrações determinadas de NaNO<sub>2</sub> (2 a 125 µM de NaNO<sub>2</sub>) (GARCIA et al, 2021).

#### 4.13.3 Determinação da produção de EROs

Para a determinar os níveis de EROs em macrófagos J774A.1 infectados com *L. infantum* e tratados com o SB-200, foi utilizado o teste de H<sub>2</sub>DCFDA (diclorodihidrofluoresceína). A princípio, foram semeados macrófagos ( $1 \times 10^6$  por poço) em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo, em seguida incubados por 3 h a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, realizando assim a adesão celular. Após a adesão, estes macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* na proporção de 10:1 leishmania/macrófago. Após 4 h de incubação os macrófagos infectados foram tratados com SB-200 nas concentrações CI<sub>50</sub>; 2xCI<sub>50</sub> e 4xCI<sub>50</sub> por 72 h. Em seguida 10 µL de corante H<sub>2</sub>DCFDA foram adicionados, atingindo uma concentração final de 20 µM. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min (no escuro), e a intensidade da fluorescência foi medida usando um espectrofluorômetro (FLx800) com 485 nm de excitação e 528 nm de emissão (SHIO et al., 2015).

#### 4.14 Ensaio de toxicidade aguda *in vivo* com *Zophobas morio*

Para o ensaio de toxicidade aguda, larvas de *Z. morio* foram tratadas com 10 µL de SB-200 nas doses de 3, 30 e 300 mg/kg de SB-200 diluídas em salina (cloreto de sódio a 0,9%) a 2 % de DMSO. A aplicação foi realizada na região da hemocele, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas, na porção ventral, com auxílio de uma seringa do tipo Hamilton (8 x 0,30 mm). As larvas foram acomodadas em placas de Petri contendo substrato de crescimento (farinha de trigo), por 48 h em temperatura ambiente. Após o período, os indivíduos com

extensa melanização do corpo, encolhimento da sua forma normal e que não apresentaram sinais de sensibilidade, foram definidos como mortos.

Para mensurar a melanização, as larvas foram homogeneizadas com auxílio de um macerador em 2 mL de tampão PBS, centrifugadas e cerca de 100  $\mu$ L do sobrenadante foram semeados em placa de 96 poços. A leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 540 nm. Os controles positivos e negativos foram realizados com DMSO puro e com salina a 2 % de DMSO, respectivamente (RIBEIRO, 2023).

#### **4.15 Análise Estatística**

As diferentes concentrações médias sobre  $CI_{50}$ ,  $CE_{50}$  e  $CC_{50}$  foram calculadas por regressão não linear. Para comparações entre grupos foram realizadas as análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey, tomando-se o valor de  $p < 0,05$  como nível máximo de significância estatística.

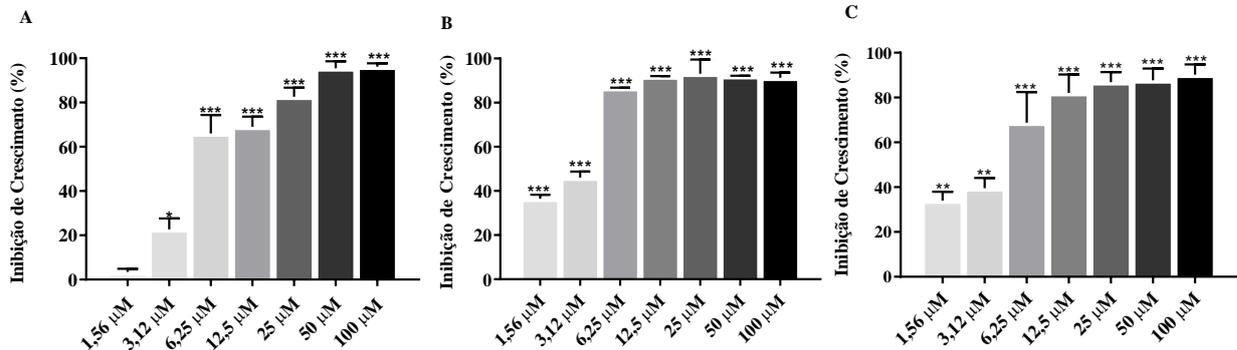
## 5 RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas de *Leishmania*

A avaliação do perfil inibitório do SB-200 sobre formas promastigotas foi realizada em ensaios *in vitro* contra as espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum* pelo ensaio do MTT. Foi verificado que o composto possui eficácia em inibir o crescimento das três espécies testadas (Figura 14). As taxas de inibição para *L. braziliensis* foram de 1,29 %, 22,63 %, 64,95 %, 69,63 %, 82,1 %, 95,37 % e 96,1 % nas concentrações de 1,56  $\mu$ M, 3,12  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M respectivamente (Figura 14A) apresentando um  $CI_{50}$  de 4,25  $\mu$ M (Tabela 1). Nas mesmas concentrações, SB-200 inibiu o crescimento de promastigotas de *L. major* em 37,14 %, 42,39 %, 90,14 %, 92,33 %, 95,4 %, 92,72 % e 91,21 % (Figura 14B) com um  $CI_{50}$  de 4,65  $\mu$ M (Tabela 1) e de *L. infantum* em 34,9 %, 39,76 %, 63,18 %, 82,6 %, 92,83 % e 97,91 % (Figura 14C) que demonstrou um  $CI_{50}$  de 3,96  $\mu$ M (Tabela 1).

SB-200 apresentou um índice de seletividade em macrófagos de 10; 9,2; e 10,73 e 9,2; 8,4; 9,89 para VERO para promastigotas de *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum* respectivamente, superior aos fármacos de referência. A anfotericina B apresentou índice de seletividade de 0,75; 0,64 e 0,85 (macrófagos) e 1; 0,86; 1,14 (VERO) para *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, respectivamente, enquanto para as mesmas espécies, o antimoniato de meglumina apresentou índice de seletividade de 0,29, 0,025 e 0,03 (macrófagos) e 0,007; 0,006 ;0,007 (VERO) (Tabela 1). Os valores abaixo de 1 observados para os fármacos de referência indicam que são mais tóxicos para as células do que para os parasitos.

**Figura 14.** Atividade antileishmaniana de SB-200 sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*



Fonte: Elaboração própria. As formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (A), *Leishmania major* (B) e *Leishmania infantum* (C) foram cultivadas em meio Schneider completo e incubadas na presença de diferentes concentrações do SB-200. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada pelo ensaio do MTT após 72 h de tratamento. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle (DMSO 0,5 % em meio Schneider completo) como 0 % de inibição. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

**Tabela 1.** Atividade antipromastigota, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200, antimoníato de meglumina e anfotericina B.

Compostos	Macrófagos J774.A1	VERO	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. major</i>		<i>L. infantum</i>				
	CC <sub>50</sub> µM	CC <sub>50</sub> µM	CI <sub>50</sub> µM	IS J774.A1	IS VERO	CI <sub>50</sub> µM	IS J774.A1	IS VERO	CI <sub>50</sub> µM	IS J774.A1	IS VERO
<b>SB-200</b>	42,52	39,2	4,25	10	9,2	4,62	9,2	8,4	3,96	10,73	9,89
<b>Anfotericina B</b>	0,24	0,32	0,32	0,75	1	0,37	0,64	0,86	0,28	0,85	1,14
<b>Antimoníato de meglumina</b>	658,7	173,63	22395	0,29	0,007	26284	0,025	0,006	21731	0,03	0,007

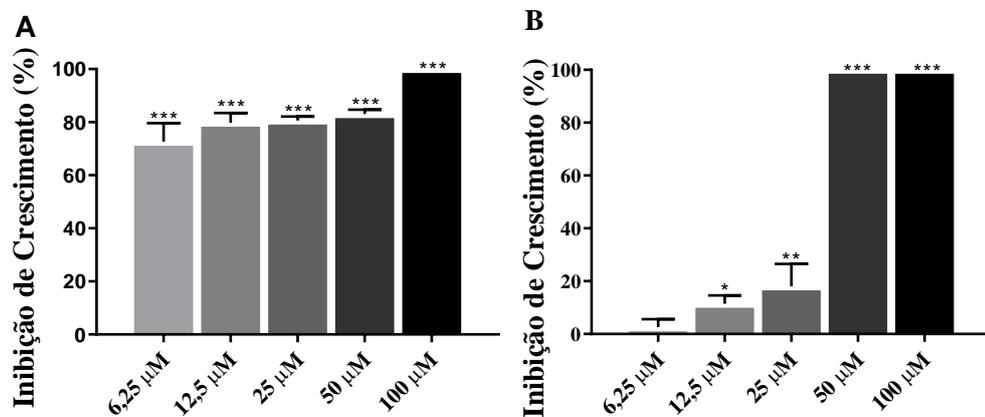
IS (índice de seletividade) =  $CC_{50}/CI_{50}$

## 5.2. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* contra formas epimastigotas e tripomastigotas

Os ensaios anti-*Trypanosoma cruzi* sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas foram realizados após 72 h de tratamento com o SB-200. As formas epimastigotas apresentaram diversas alterações morfológicas nas maiores concentrações (100 µM, 50 µM) tais como ausência de flagelo e alteração de formato típico. O tratamento causou ainda taxas de inibição de 72,4 %, 79,19 %, 80,07 %, 83,43 % e 100 % nas respectivas concentrações de 6,25 µM, 12,5

$\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  (Figura 15A) com  $\text{CI}_{50}$  de 2,69  $\mu\text{M}$ , e um índice de seletividade de 15,8 (macrófagos) e 14,5 (VERO) (Tabela 2). Nas formas tripomastigotas observou-se ausência de movimento e deformação por completo da forma morfológica dos parasitos nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , caracterizando assim uma inibição de 100 % nestas concentrações, e apresentaram taxas de inibição de 2,9 %, 11,28 % e 18 % nas respectivas concentrações 6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  (Figura 15B) com  $\text{CI}_{50}$  de 29,69  $\mu\text{M}$ , e índice de seletividade de 1,44 (macrófagos) e 1,3 (VERO) (Tabela 2).

**Figura 15.** Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do SB-200.



Fonte: Elaboração própria. As formas epimastigotas (A) foram cultivadas em meio LIT completo e as tripomastigotas (B) em meio DMEM completo e ambas foram incubadas na presença de diferentes concentrações do SB-200. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer após 72 h de tratamento. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio LIT ou DMEM completo) como 0% de inibição. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

**Tabela 2.** Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* sobre formas epimastigotas e tripomastigotas, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200 e benznidazol.

Compostos	Macrófagos	VERO	Epimastigota		Tripomastigota			
	J774.A1		$\text{CI}_{50}$	IS	IS	$\text{CI}_{50}$	IS	IS
	$\text{CC}_{50}$	$\text{CC}_{50}$	$\mu\text{M}$	J774.A1	VERO	$\mu\text{M}$	J774.A1	VERO
<b>SB-200</b>	42,52	39,2	2,69	15,8	14,5	29,69	1,44	1,3
<b>Benznidazol</b>	79,23	147,37	111,8	0,7	1,3	21,11	3,75	6,9

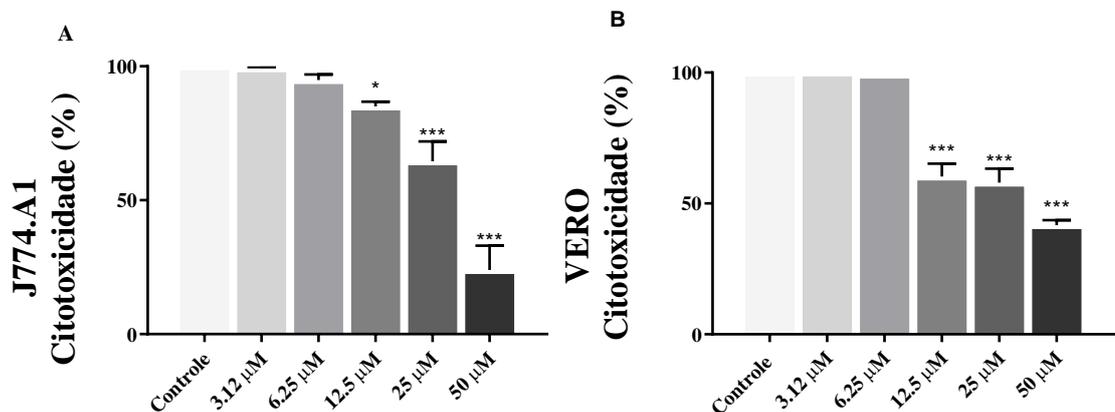
IS (índice de seletividade) =  $\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$

### 5.3. Avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos J774.A1 e células VERO

A segurança do SB-200 foi avaliada *in vitro* através de ensaios de citotoxicidade sobre macrófagos e células VERO. Conforme apresentado na Figura 16A, os resultados da citotoxicidade da SB-200 sobre macrófagos J774.A1 demonstraram que somente na concentração de 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M causaram uma citotoxicidade, apresentando respectivamente nestas concentrações, uma viabilidade de 85 %, 64,5% e 23,9 %. Através destes resultados foi possível calcular a CC<sub>50</sub> de SB-200, demonstrando um valor de 42,52  $\mu$ M (Tabela 1). Em células VERO o SB-200 se apresentou citotóxica na concentração de 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M (Figura 16B), com uma viabilidade de 60,3 %, 57,9 % e 41,7 % respectivamente, apresentando um CC<sub>50</sub> de 39,2  $\mu$ M.

SB-200 apresentou um índice de seletividade para *L. infantum* (IS) de 10,73 aos fármacos de referência. A anfotericina B apresentou IS de 0,85, enquanto o antimoniato de meglumina apresentou um IS de 0,03 (Tabela 1). Os valores abaixo de 1 observados para os fármacos de referência indicam que são mais tóxicos para os macrófagos do que para os parasitos.

**Figura 16.** Atividade citotóxica do SB-200 sobre células mamíferas.

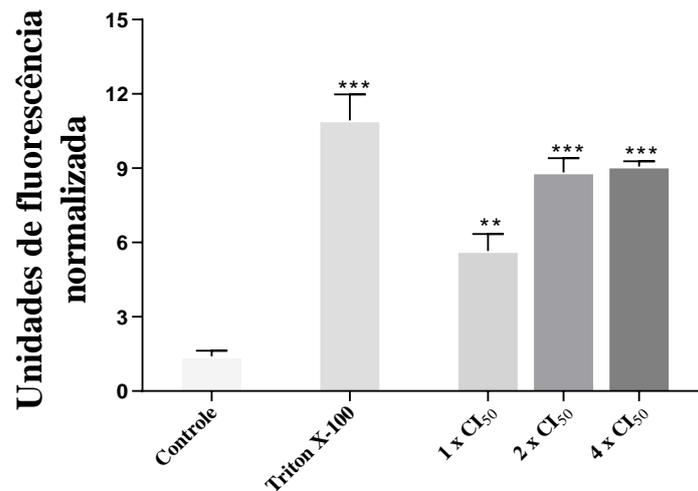


Fonte: Elaboração própria. Para determinação da citotoxicidade sobre macrófagos J774.A1 (A) e células VERO (B), as células foram semeadas em meio DMEM completo e expostas à diferentes concentrações de SB-200 por 72 h. MTT foi aplicado para mensurar a viabilidade celular. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle (DMSO 0,5 % em DMEM completo) como 100% de viabilidade. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

#### 5.4. Avaliação da integridade da membrana de formas promastigotas de *L. infantum*

A integridade da membrana plasmática de formas promastigotas tratadas com SB-200 foi averiguada pelo teste do *SYTOX green*. Os resultados demonstram um aumento significativo de 52,6 %, 81,52 % e 83,6 % na permeabilidade da membrana das promastigotas tratadas com SB-200 nas concentrações de 1 x CI<sub>50</sub>, 2 x CI<sub>50</sub>, e 4 x CI<sub>50</sub>, respectivamente (Figura 17).

**Figura 17.** Integridade da membrana de formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com SB-200.

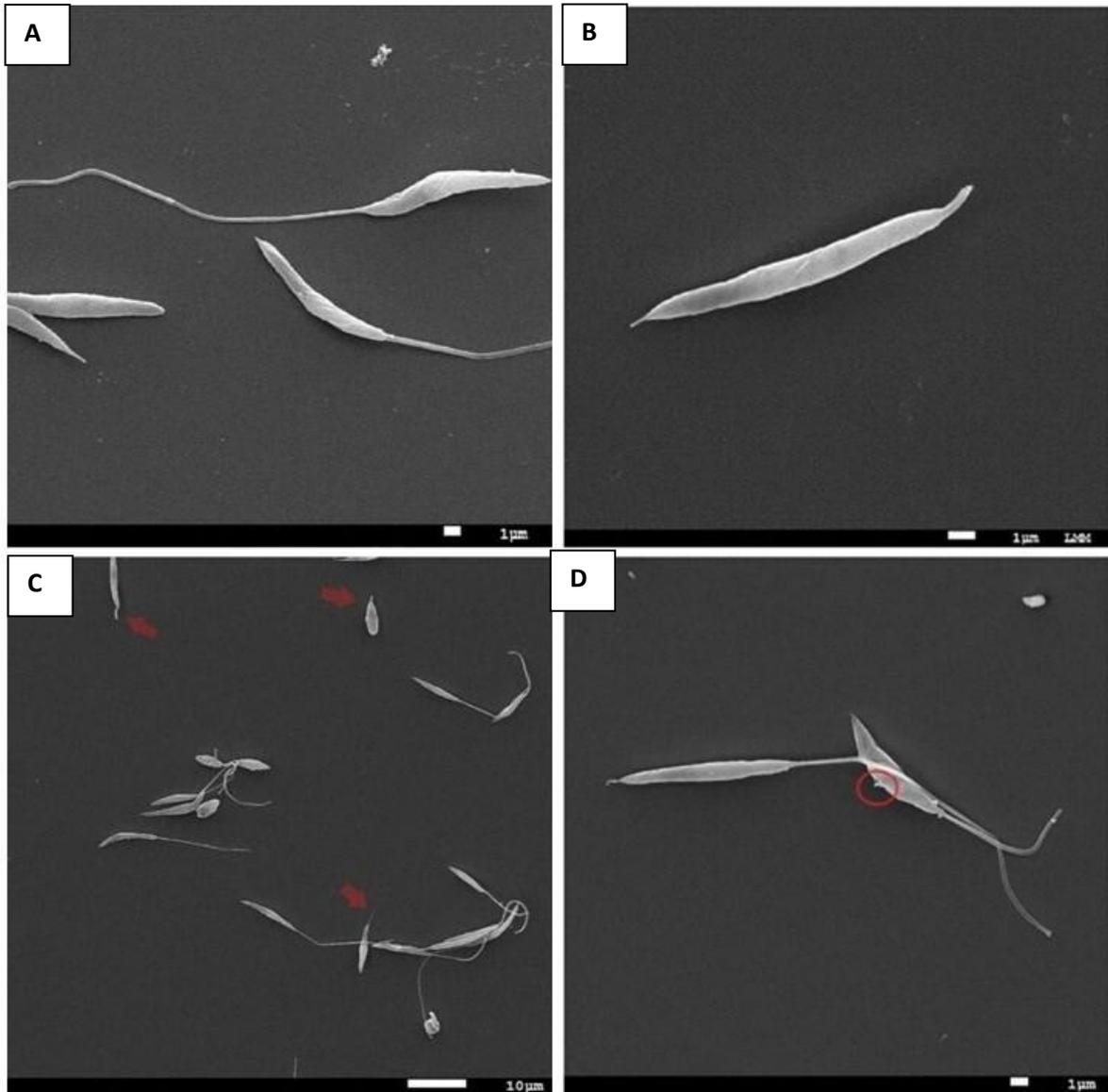


Fonte: Elaboração própria. As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Schneider completo e incubados na presença de diferentes concentrações do SB-200. A integridade da membrana foi avaliada pela sonda *SYTOX green* após 72 h de tratamento. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle (DMSO 0,5 % em meio Schneider completo) como 0 % de permeabilidade. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA se-guido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

### 5.5. Análise ultraestrutural de formas promastigotas

No intuito de investigar as alterações causadas em formas promastigotas pelo tratamento com SB-200, foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As Figuras 18B, 18C e 18D apresentam a análise morfológica das promastigotas de *L. infantum* tratadas com a IC<sub>50</sub> do SB-200, avaliados por MEV. Células não tratadas, com morfologia fusiforme alongada, membrana plasmática intacta e flagelos mais longos que o corpo celular é apresentado na Figura 18A. Após o tratamento, foram observados o aparecimento de flagelos curtos (Figura 18B, 18C) e danos à membrana plasmática como a formação de poros e fissuras (Figura 18D).

**Figura 18.** Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de *L. infantum* usando Microscopia de Varredura (MEV).

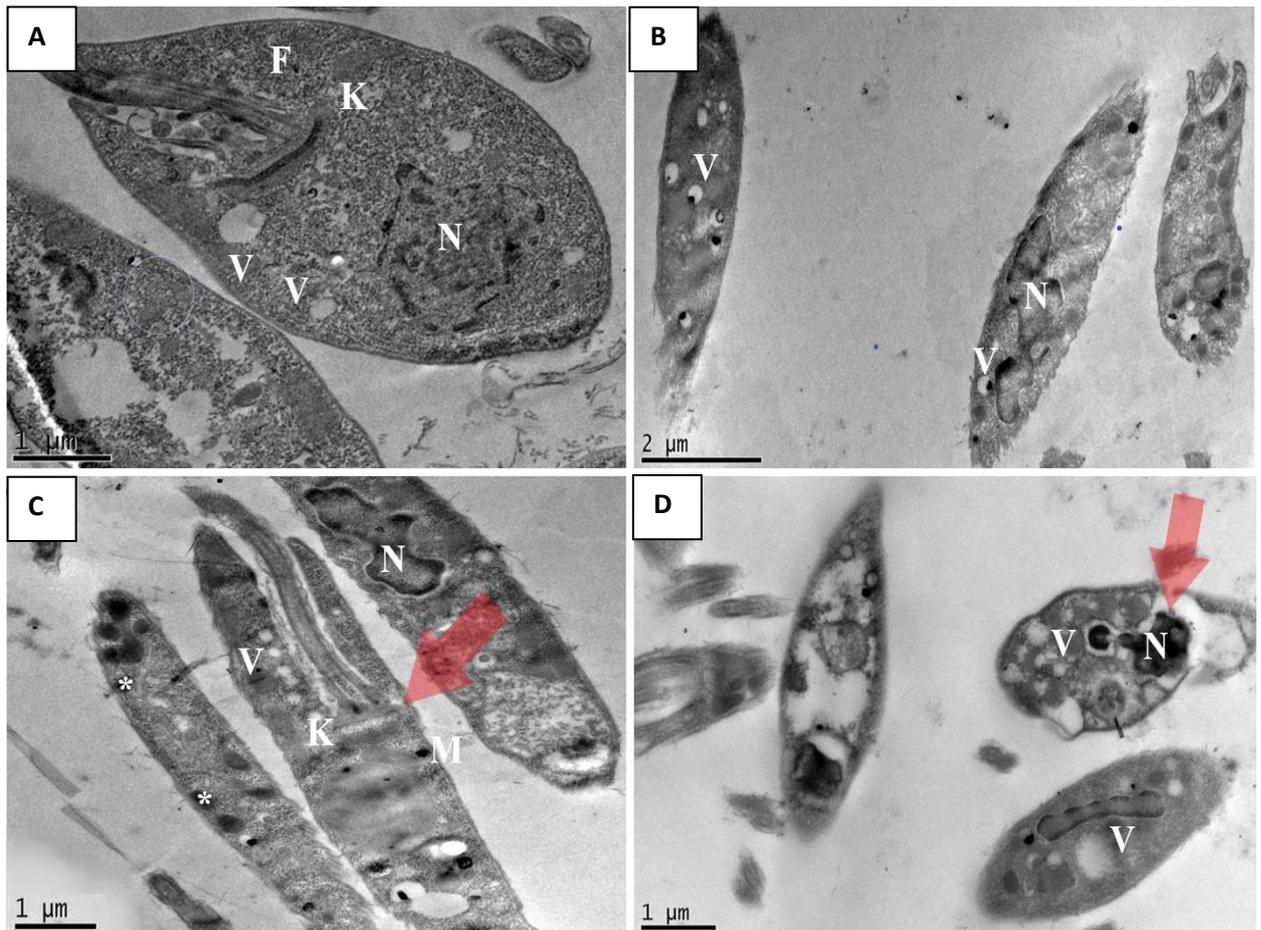


Fonte: Elaboração própria. Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de *L. infantum* usando MEV. Formas promastigotas foram semeadas em meio Schneider completo, tratadas com a  $IC_{50}$  de SB-200 por 24 h e analisadas pela MET. A – controle negativo. B, C e D – tratamento com a  $CI_{50}$  de SB-200. Setas indicam alterações estruturais nos flagelos e círculo indicam alterações de membrana plasmática.

Uma análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum* tratadas com SB-200 também foi realizada por MET. As células não-tratadas apresentaram um núcleo arredondado, citoplasma homogêneo, mitocôndria alongada contendo cristas, morfologia regular do cinetoplasto e bolsa flagelar (Figura 19A). As células tratadas com SB-200 a concentração correspondente a  $CI_{50}$  apresentaram aumento do número de vacúolos citoplasmáticos (Figura

19B, 19C, 19D), surgimento de corpos lipídicos (Figura 19C), descolamento da membrana nuclear e fragmentação do núcleo (Figura 19D) e inchaço do cinetoplasto e da mitocôndria com perda no conteúdo da matriz (Figura 19C).

**Figura 19.** Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de *L. infantum* usando Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

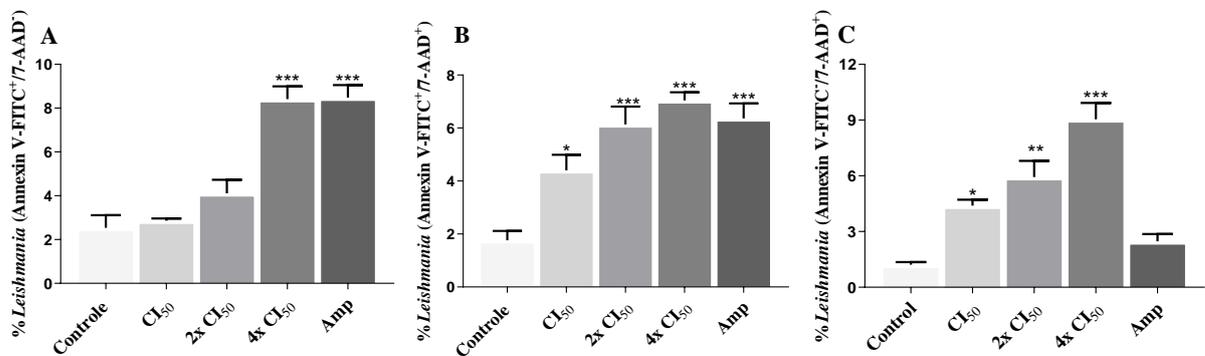


Fonte: Elaboração própria. Efeitos do SB-200 sobre a morfologia de formas promastigotas de *L. infantum* usando MET. Formas promastigotas foram semeadas em meio Schneider completo, tratadas com 12,5  $\mu\text{M}$  de SB-200 por 24 h e analisadas pelo MET. A – controle negativo. B, C e D – tratamento com 12,5  $\mu\text{M}$  de SB-200. Várias alterações foram observadas, tais como descolamento da membrana nuclear e fragmentação do núcleo (D); acúmulo de vacúolos e corpos lipídicos (B, C e D); inchaço mitocondrial com perda no conteúdo da matriz (C). m = mitocôndria, n = núcleo, f = flagelo, K= cinetoplasto, v= vacúolo, \*= corpo lipídico. Setas indicam alterações estruturais.

## 5.6 Avaliação do perfil apoptótico/necrótico de promastigotas de *L. infantum* tratadas com SB-200

Para determinar o mecanismo de morte celular de promastigotas de *L. infantum* expostas ao SB-200, foram realizados ensaios de citometria de fluxo usando dupla marcação com Anexina V-FITC e 7AAD. As células com apoptose inicial, com marcação +Anexina V-FITC/7AAD- apresentaram um aumento significativo de 236,4 % na concentração de 4 x CI<sub>50</sub> quando comparado ao controle (Figura 20A). Já as células em apoptose tardia, com marcação +Anexina V-FITC/7AAD+, apresentaram aumento de 150 % (1 x CI<sub>50</sub>), 248,2% (2 x CI<sub>50</sub>) e 297,7 % (4 x CI<sub>50</sub>) mediante o tratamento com SB-200 (Figura 20B). As células necróticas, representadas pela marcação -Anexina V-FITC/7AAD+, aumentaram após o tratamento com SB-200 em 262,8 % (1 x CI<sub>50</sub>), 390 % (2 x CI<sub>50</sub>) e 643,8 % (4 x CI<sub>50</sub>) quando comparados ao controle (Figura 20C).

**Figura 20.** Análise de citometria de fluxo de promastigotas de *L. infantum*.



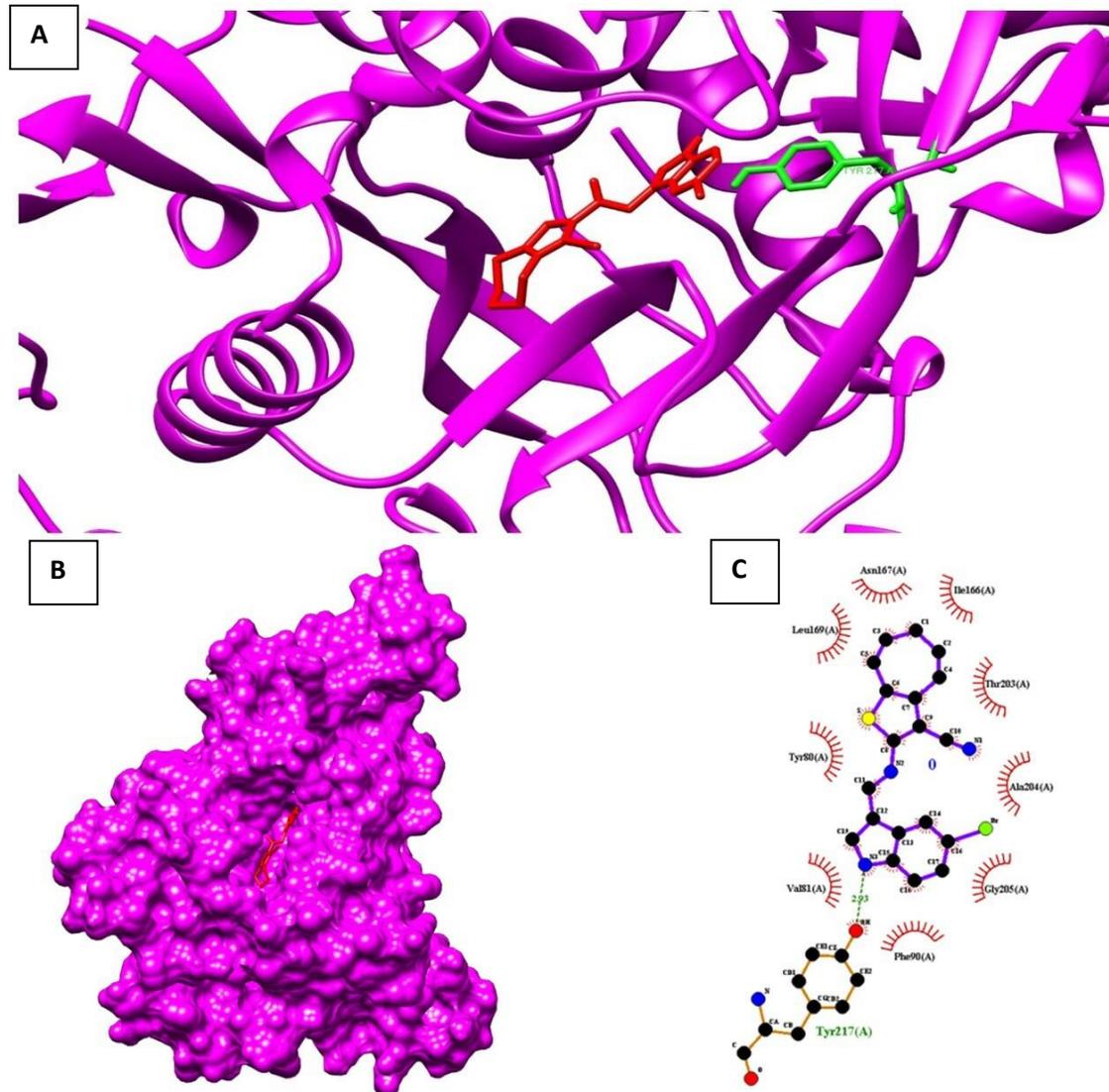
Fonte: Elaboração própria. Formas promastigotas de *L. infantum* foram incubadas com SB-200 nas concentrações de CI<sub>50</sub>, 2 x CI<sub>50</sub> e 4 x CI<sub>50</sub>. Foi realizada uma dupla marcação com Anexina V/7AAD e avaliadas por citometria de fluxo. Dados representam a média ± erro. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em comparação ao controle.

## 5.7. Docking molecular

Os resultados do encaixe do SB-200 no sítio catalítico das enzima apresentando as energias de ligação (Edock), demonstram boa afinidade molecular entre SB-200 e a proteína N-myristoyl transferase, apresentando uma energia de ligação igual a -9.1 kcal.mol<sup>-1</sup>. O ligante apresentou interação com os aminoácidos (por interações hidrofóbicas) Asn167; Ile166;

Thr203; Ala204; Gly205; Phe90; Val81; Tyr80; Leu169 (Figura 21C) e com o principal sítio ativo, o aminoácido Tyr217 (Figura 21A e 21B).

**Figura 21:** Estruturas 3D do *docking* molecular da SB-200



Fonte: Elaboração própria. Estruturas 3D do *docking* molecular da SB-200 (Figura A), temos o local de interação da SB-200 com os aminoácidos. Figura B temos o sítio ativo da interação entre o ligante SB-200 com a proteína 4A30. Figura C ligações hidrofóbicas e por pontes de hidrogênio da SB-200.

### 5.8. Avaliação da atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas de *L. infantum*

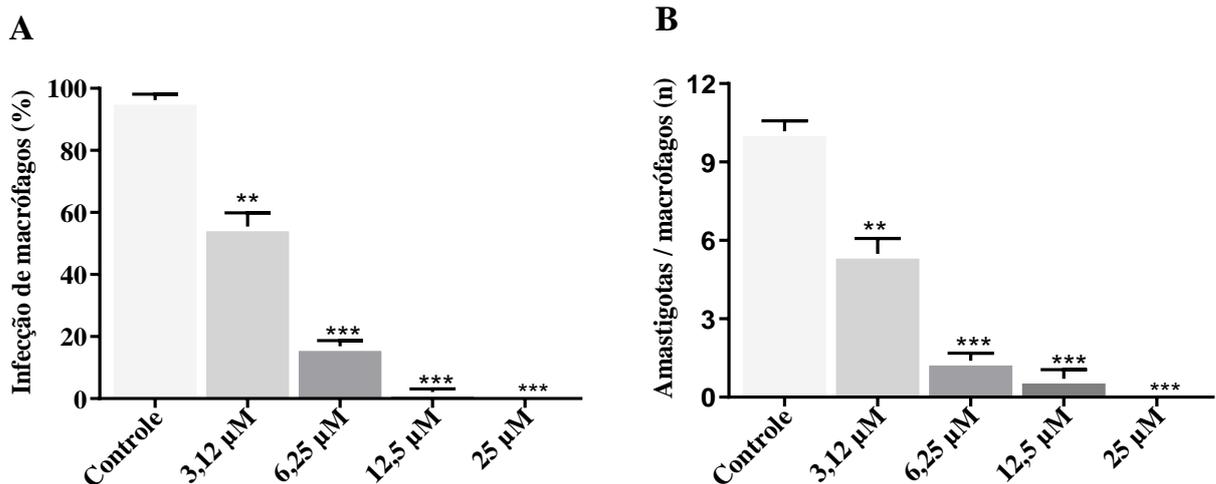
Os resultados referentes aos macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200 foram apresentados através de dois parâmetros: porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas/macrófagos que se encontram na Figura 22.

Em se tratando da porcentagem de macrófagos infectados, o tratamento com SB-200 por 72 h levou à redução de 45,6 %, 84,2 %, 98,15 % e 100 % de macrófagos infectados nas concentrações de 3,12  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Figura 22A).

No segundo critério avaliado, número de amastigotas por macrófago infectado, o tratamento com SB-200 causou redução de 46,11 %, 86,23 %, 93,12 % e 100 % de formas amastigotas presente no interior de macrófagos infectados, nas concentrações de 3,12  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, respectivamente, em relação ao controle negativo (Figura 22B).

Os ensaios resultaram em um CE<sub>50</sub> de 2,84  $\mu$ M com índice de seletividade de 14,97 (macrófagos) 13,8 (VERO) e para a SB-200, enquanto o antimoniato de meglumina apresentou um CE<sub>50</sub> de 176,93  $\mu$ M com SI de 3,72 (macrófagos) e 0,98 (VERO) (Tabela 3).

**Figura 22.** Atividade antileishmania contra formas amastigotas intramacrofágicas de *L. infantum* tratadas com SB-200.



Fonte: Elaboração própria. (A) porcentagem de infecção; (B) número de amastigotas por macrófagos. Células J774.A1 foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* na proporção de 10:1 macrófagos/parasito e tratadas com SB-200 por 72 h. Após o tratamento foram avaliadas por contagem das lamínulas circulares. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle (DMSO 0,5 % em DMEM completo) como 0% de inibição. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

**Tabela 3.** Atividade antileishmania sobre formas amastigotas intramacrofágicas, efeito citotóxico sobre células mamíferas e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o SB-200 e antimoniato de meglumina

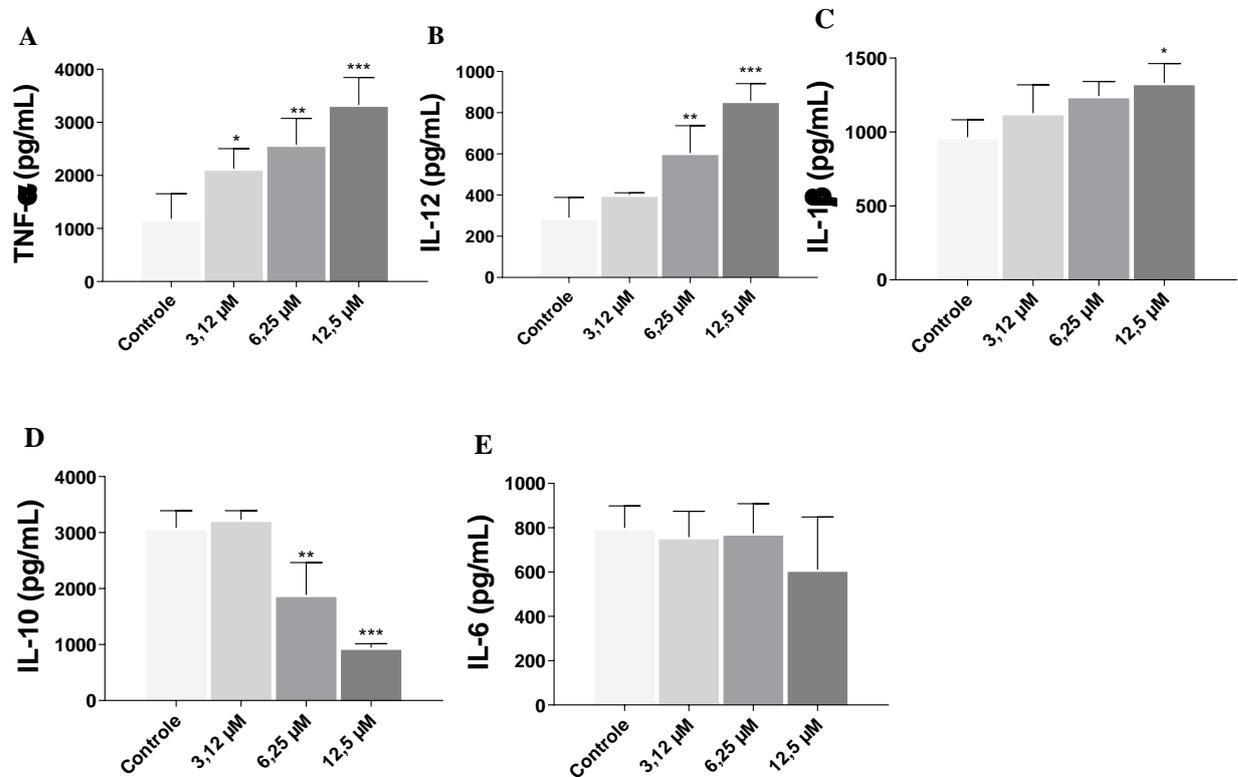
Compostos	RAW J774.A1	VERO	Amastigotas Intramacrofágicas		
	CC <sub>50</sub> μM	CC <sub>50</sub> μM	CE <sub>50</sub> μM	IS <sub>RAW</sub> J774.A1	IS <sub>VERO</sub>
<b>SB-200</b>	42,52	39,2	2,84	14,97	13,8
<b>Antimoniato de meglumina</b>	658,7	173,63	176,93	3,7	0,98

IS (índice de seletividade) =  $CC_{50}/CE_{50}$

### 5.9. Avaliação do perfil de imunomodulador de macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200

Devido a atividade antiamastigota demonstrada pelo SB-200, foi investigado o perfil imunomodulador desta molécula no sobrenadante dos ensaios de infecção. SB-200 aumentou a produção de citocinas importantes para defesa do hospedeiro contra *Leishmania*, com aumentos de 80,7 % (3,12 μM), 118,7 % (6,24 μM) 182,6 % (12,5 μM) para TNF-α (Figura 23A), aumento de 108,6 % (6,24 μM) e 194,4 % (12,5 μM) para IL-12 (Figura 23B) e aumento de 37,9 % (12,5 μM) para IL-1β (Figura 23C), todos em relação ao controle negativo. O composto também reduziu os níveis de IL-10 nas maiores concentrações, com uma redução de 38,8 % na concentração de 6,24 μM e 69,4 % em 12,5 μM (Figura 23D), citocina que está envolvida na susceptibilidade à infecção. O tratamento com SB-200 não alterou os níveis de IL-6 (Figura 23E) nas condições testadas.

**Figura 23.** Níveis de citocinas produzidas por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200.



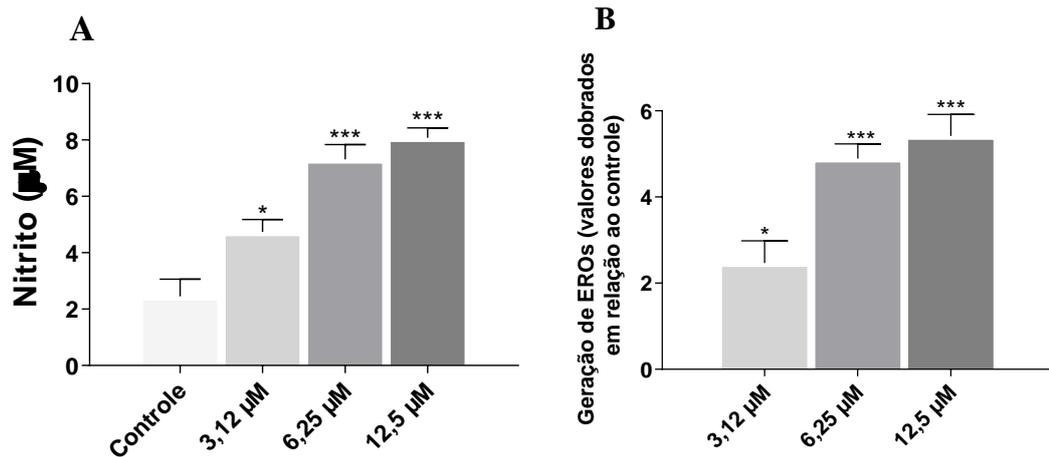
Fonte: Elaboração própria. Perfil imunomodulador do SB-200 em macrófagos infectados com *L. infantum*. (A) TNF- $\alpha$ ; (B) IL-12; (C) IL-1 $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

### 5.10. Avaliação da produção de NO e EROs por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200

No sobrenadante dos ensaios de infecção também foi investigada a produção de NO através da dosagem indireta de nitritos. Foi possível observar um aumento significativo de NO todos os grupos tratados com o SB-200, sendo capaz de amplificar a produção em 92,6 % (3,12  $\mu$ M), 196,7 %, (6,24  $\mu$ M), 225,2% (12,5  $\mu$ M) quando comparado ao controle (Figura 24A).

No ensaio de produção de EROs por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com o SB-200 por 72 h, também foi constatado um aumento de 41,15%, 81,56%, 90,25% nas concentrações 3,12  $\mu$ M, 6,24  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M respectivamente (Figura 24B).

**Figura 24.** Níveis de óxido nítrico (NO) e espécies reativas a oxigênio (EROs) produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200.

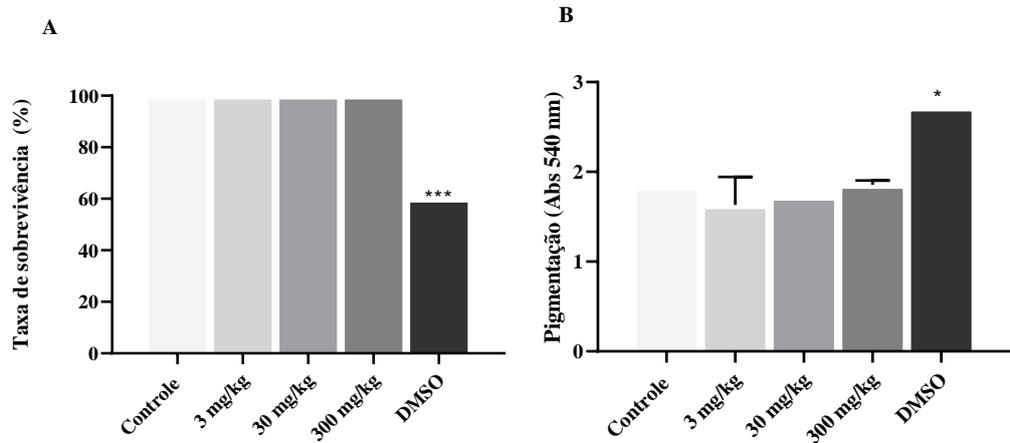


Fonte: Elaboração própria. Produção de NO (A) e EROs (B) em macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com o SB-200. A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess e a produção de EROs através do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A comparação entre os grupos foi realizada por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

### 5.11. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* com *Z. morio*

Para a avaliação da toxicidade aguda, um ensaio com larvas de *Z. morio* foi realizado. Não foram observadas mortes em nenhuma das doses testadas de SB-200 (Figura 25A) em 48 h de tratamento, resultando em uma dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) de  $> 3000$  mg/kg. O tratamento com controle positivo resultou em uma taxa de morte de 40 %. Na avaliação da produção de melanina, o tratamento com SB-200 não alterou o nível de melanização (Figura 25B), em comparação ao controle negativo. Por outro lado, o controle positivo, realizado com DMSO puro, aumentou a pigmentação em 48,4 % (Figura 25B).

**Figura 25.** Toxicidade aguda sobre larvas de *Z. morio*.



Fonte: Elaboração própria. Porcentagem de sobrevivência (A) e taxa de melanização (B) de larvas de *Z. morio*. As larvas foram incubadas por 48 h com diferentes concentrações de SB-200. A taxa de sobrevivência foi avaliada de acordo com a sensibilidade, melanização e morfologia das larvas. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o controle negativo (Salina com 2% de DMSO) como 100% de viabilidade. A comparação entre os grupos foi realizada por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao controle.

**Figura 26.** Perfil de sobrevivência de larvas de *Z. morio*.



Fonte: Elaboração própria. Sobrevivência das larvas de *Z. morio*. Controle negativo (A). DMSO a 100% (B). Larvas tratadas com SB-200 nas concentrações 3 mg/Kg (C), 30 mg/Kg (D) e 300 mg/Kg (E). As setas vermelhas apontam larvas mortas apresentando encolhimento do corpo, melanização e falta de sensibilidade.

## 6. DISCUSSÃO

As leishmanioses e a doença de Chagas estão entre as principais DTN que mais incapacitam e causam maior número de mortes nas populações mais carentes do mundo (MAHAJAN et al., 2018; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). Apesar dessas doenças possuírem terapia, os fármacos disponíveis no mercado apresentam diversos problemas como: alto custo, alta toxicidade, a maioria são administrados por via parenteral e muitos casos de resistência dos parasitos (PONTE-SUCRE, 2017).

Diante desta realidade preocupante, é necessário o desenvolvimento urgente de melhores opções para o tratamento, como a pesquisa de compostos naturais e sintéticos com atividade antileishmania e anti-*Trypanosoma cruzi*. Na busca de novos fármacos, o grupo dos derivados tiofênicos têm ganhado destaque por revelarem muitos compostos com atividade antiparasitária (SILVA-JÚNIOR et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

Nesse contexto, considerando o cenário atual das leishmanioses e da doença de Chagas e tendo em vista os promissores resultados com derivados tiofênicos em trabalhos anteriores, este trabalho se propôs a investigar os efeitos do derivado 2-amino-tiofênico (SB-200) sobre parasitos do gênero *Leishmania* e a espécie *T. cruzi*, como contribuição ao estudo do potencial anti-Trypanosomatidae dos derivados tiofênicos.

Os estudos de atividade antileishmania do SB-200 iniciaram com a determinação da inibição de crescimento das espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, sendo efetivo em todas as três espécies testadas. Corroborando com os resultados antipromastigotas apresentados neste trabalho, os derivados tiofênicos são considerados uma classe promissora em inibir parasitos do gênero *Leishmania*. Poorrajab et al. (2009) realizaram ensaios antipromastigotas com derivados tiofênicos contra as espécies *L. major*, em que seu derivado N-(5-cloro-tiofen-2-il) carbonil apresentou um  $CI_{50}$  de  $9,35 \pm 0,67 \mu M$ . Takahashi et al. (2011), após isolarem dois compostos tiofênicos, o 5-metil-2,2':5',2"-tertiofeno (composto A) e o 5'-metil- [5-(4-acetoxi-1-butinil)]-2,2'-bitiofeno (composto B), demonstraram potencial anti-*Leishmania amazonensis*, com uma  $CI_{50}$  de  $7,7 \mu M$  para o composto A e  $21,3 \mu M$  para o composto B. Estes resultados reforçam a potencialidade dos derivados tiofênicos na busca de novos agentes leishmanicidas.

Em comparação aos fármacos de referência, SB-200 apresentou atividade antipromastigota superior ao antimoniato de meglumina, apresentando uma menor  $CI_{50}$  para todas as espécies de *Leishmania*. A anfotericina B demonstrou ser o fármaco de referência com maior efetividade contra promastigotas, apresentando um  $CI_{50}$  mais baixos que SB-200. Apesar

da sua alta atividade sobre promastigotas, anfotericina B possui alta citotoxicidade para macrófagos, conforme observado no presente estudo. A falta de seletividade de anfotericina B é confirmada em diferentes estudos utilizando diferentes células mamíferas (NÉRIS, et al., 2013; NUNES et al., 2021). Além disso, possui vários fatores limitantes, como os seus já reconhecidos efeitos adversos, tratamento longo, alto custo, difícil adesão ao tratamento e resistência do parasito (KATSUNO et al., 2015; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Além dos ensaios feitos com *Leishmania*, nosso estudo contou com experimentos anti-*Trypanosoma cruzi* contra as formas epimastigotas e tripomastigotas. Apesar de serem formas não infectantes, as epimastigotas são as melhores formas para se realizar a triagem de uma substância, pois são formas de fácil cultivo com baixo custo de manutenção. Corroborando com os resultados positivos encontrados em nosso trabalho, Gerpe et al. (2009) testaram o 5-nitrotiofeno contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2), em que foi encontrada uma  $CI_{50}$  de 4,2  $\mu$ M.

Após a realização de ensaios anti-epimastigotas que comprovavam o possível potencial anti-*Trypanosoma cruzi* da substância, ensaios contra as formas tripomastigotas foram realizados. Estas são as formas infectivas do parasito, presente no interior de células ou na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, sendo essa forma mais resistente a fármacos (DE CASTRO et al., 1993). Por exemplo, Silva Júnior et al. (2016) em seu estudo envolvendo 20 derivados de tiofeno-2- iminotiazolidina, apenas o composto (Z)-isopropil 2-((3-alil-4-oxotiazolidin-2-ilideno) amino)-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo[b]tio-feno-3-carboxilato apresentou resultado tripanocida relevante, demonstrando um  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ M contra as formas tripomastigotas do parasito. Recentemente, De Brito et al. (2022) ao testarem o (E)-1-(4-aminofenil) -3-(benzo [b] tiofen-2-il) prop-2-en-1-ona encontraram atividade antitripomastigota mediana contra cepas Y, apresentando um  $CI_{50}$  de  $37,7 \pm 6,5 \mu$ M.

Quando comparada ao benznidazol, o SB-200 apresentou um  $CI_{50}$  melhor e um IS 22,7 vezes mais seletivo para macrófagos e 11,1 vezes mais seletivo para células VERO nos testes contra a forma epimastigota. Nos ensaios contra formas tripomastigota, o benznidazol apresentou uma atividade melhor, com IS superior ao composto testado. Apesar de apresentar resultados melhores nestas formas, o benznidazol já é um fármaco com mais de três décadas de existência, e além da sua alta toxicidade, só é efetivo na forma aguda da doença e os parasitos têm demonstrado resistência contra ele (MONTEÓN et al., 2009; PINTO et al., 2009; CRESPILO-ANDÚJAR et al., 2018).

Os ensaios de citotoxicidade são um importante critério na procura por compostos ativos

com atividade antileishmania e anti-*Trypanosoma cruzi*, pois a alta toxicidade dos fármacos de referência é um dos principais problemas do tratamento e, para que uma substância seja promissora, ela deve apresentar níveis citotóxicos baixos, sendo capaz de eliminar o parasito sem danificar a célula infectada (SOUSA, 2019).

Em geral, modelos citotóxicos que envolvem linhagens celulares como os macrófagos murinos J774.A1 e célula VERO são ótimos para estudos *in vitro* que avaliam a atividade antileishmania e anti-*Trypanosoma cruzi*. Isso porque os macrófagos são as principais células-alvo de *Leishmania* e uma das principais células de defesas do corpo, sendo uma das primeiras a serem parasitadas pelo *T. cruzi* no seu ciclo, enquanto as células VERO são as células com maior tropismo com o *T. cruzi* (JAIN et al., 2012; TEIXEIRA; 2012; ANAND et al., 2017).

O SB-200 demonstrou uma melhor preservação de viabilidade de macrófagos e células VERO, sendo mais tóxico para as diferentes formas dos parasitos do que para as células. Os baixos valores dos índices de seletividade dos fármacos de referência antileishmania elucidam o alto nível de toxicidade apresentado por estes medicamentos, sendo assim mais tóxicos para a célula hospedeira que para o parasito (NAGLE al., 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; DON; IOSET, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

A segurança do SB-200 foi investigada anteriormente. Em um estudo realizado por Rodrigues et al. (2015), a citotoxicidade de SB-200 foi averiguada sobre macrófagos peritoneais murinos de camundongos *Swiss*, obtendo-se um  $CC_{50}$  de 32,02  $\mu$ M. A diferença de toxicidade para o presente estudo pode estar associada aos diferentes tipos de células utilizadas nos estudos. Apesar da citotoxicidade, SB-200 obteve um índice de seletividade para *L. amazonensis* de 3,65 para promastigotas, 20,09 para amastigotas axênicas e 43,5 para amastigotas intramacrofágicas, sendo 35,22 vezes mais seletivo que o fármaco de referência antimoniatado de meglumina, corroborando com os resultados encontrados (RODRIGUES et al., 2015). No mesmo estudo, foi ainda investigada a citotoxicidade de SB-200 sobre eritrócitos humanos e não foi observada citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, obtendo uma concentração hemolítica média ( $CH_{50}$ ) de  $>800 \mu$ M, confirmando-se assim, a segurança para este composto (RODRIGUES et al., 2015).

Após a investigação da atividade anti-Trypanosomatidae e da citotoxicidade, foi encontrado que a espécie *L. infantum* apresentou maior sensibilidade ao SB-200 e a que gerou melhores índices de seletividade, sendo a espécie escolhida para continuidade do estudo. A seguir foram realizados ensaios de integridade da membrana plasmática, MEV, MET, perfil de morte celular, ensaio de *docking* molecular, atividade anti-amastigota e capacidade

imunomoduladora.

Inicialmente, foi investigada a integridade da membrana plasmática de formas promastigotas tratadas com SB-200, com a utilização da sonda fluorescente *SYTOX green*. Esta sonda consegue penetrar membranas plasmáticas que não estão íntegras e se ligam ao DNA da célula, apresentando um alto grau de fluorescência em células não viáveis (THAKUR; CATTONI; NÖLLMANN, 2015). Os resultados demonstraram que SB-200 foi capaz de promover alterações na membrana do parasito, confirmando atuar por esse mecanismo. A membrana plasmática exerce um papel fundamentalna sobrevida de todos os seres vivos, sendo essencial em processos celulares como condutividade iônica e sinalização celular. Essa estrutura é de extrema importância para a defesados parasitos. Sua modificação pode inibir a síntese de ATP e a expressão de proteínas, resultandoem morte do protozoário. Sendo assim, é de extrema importância o estudo da interação de fármacos com a membrana desses microrganismos (SCHNEIDER, 1992; DEY; 1996; FIDALGO; GILLE, 2011; VENTUROLI, et al., 2006; SCHUMANN, 2012).

Com a constatação de alterações estruturais através do ensaio de integridade da membrana, foi realizado análises utilizando o MET e MEV com intuito de visualizar os danos causados pela SB-200 nas células tratadas. Utilizando o MEV foi possível elucidar os danos na membrana causados pelo tratamento com SB-200, corroborando com os resultados de integridade de membrana achados no presente trabalho. Além disso, a indução de alterações morfológicas como perca de flagelo e danos a membrana pode ser um indicativo de morte por apoptose (SHADAB et al., 2017; ALI et al., 2021). Ensaio envolvendo MET são padrão ouro para confirmação de uma morte celular por apoptose, pois é possível observar alterações no interior do parasito. As formas tratadas com SB-200 apresentaram características de uma célula apoptótica, como desorganização do núcleo, alterações na mitocôndria e no cinetoplasto aumento de corpos lipídicos e formação de vacúolos. (ELMORE, 2007; ANTINARELLI, et al., 2018; MONDÊGO-OLIVEIRA et al., 2021; ROCHA et al., 2022)

Uma vez observadas características de morte celular por apoptose, um ensaio com dupla marcação com Anexina V-FITC/7AAD foram realizadas com formas promastigotas de *L. infantum* e analisadas por citometria de fluxo. A Anexina V-FITC é amplamente utilizada na marcação de células em estado de morte programada (apoptose). Neste estado, as células sofrem uma translocação da fosfatidilserina da parte interna da membrana plasmática para superfície da célula, possibilitando a ligação com o marcador (MIL et al, 2021). Por outro lado, o 7AAD é um intercalador de DNA utilizado para corar as células que apresentaram morte celular por necrose, pois só consegue penetrar em células que já perderam a sua integridade de membrana,

e assim se ligando ao DNA (WANG, et al., 2020). Assim, a dupla marcação com Anexina V-FITC/7AAD permite diferenciar células apoptóticas de necróticas. Os resultados de citometria de fluxo confirmaram a morte celular por apoptose promovida pelo SB-200, com secundária morte por necrose.

Na investigação dos mecanismos de ação do SB-200, foi analisado ainda a interação do SB-200 com a enzima NMT pela metodologia do *docking* molecular. Este método computacional é bastante difundido em estudos para o desenvolvimento de novas drogas, pois ele é capaz de realizar uma simulação que prevê interação entre moléculas como ligantes e proteínas, e seus modelos de ligação, além de esclarecer potenciais alvos para os fármacos. Sua utilização vem sendo bastante difundida no meio científico, sendo uma metodologia eficiente, rápida e capaz de reduzir custos da pesquisa (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2019; FAN; FU; ZHANG, 2019; TAO et al, 2020).

As baixas energias de ligação obtidas com as simulações com a NMT sugerem que esta proteína pode estar envolvida na promissora atividade antileishmania do SB-200. A enzima N-miristoiltransferase (NMT; pdb id:4a30) é um alvo promissor de drogas antileishmania, uma vez que é responsável por catalisar um processo chamado de miristoilação, processo que consiste na transferência do ácido mirístico, um ácido graxo saturado de 14 carbonos para a porção N-terminal dos resíduos de glicina. A miristoilação é um processo biológico essencial ao parasito, responsável pela ancoragem de proteínas na membrana plasmática e proteína-proteína, envolvida em vários processos de sinalização celular e regulações (SCOTTI et al., 2015, RAJASEKARAN; CHEN, 2015; GALLO et al., 2018).

Uma vez constatada atividade antipromastigota efetiva e seletiva do SB-200, ensaios anti-amastigotas foram realizados, pois as formas amastigotas são as formas presentes nos hospedeiros vertebrados durante a fase clínica das leishmanioses, e modelos experimentais envolvendo amastigotas são o que mais se assemelham a uma infecção *in vivo* por *Leishmania* (DE RYCKER et al., 2013). Esses modelos possuem a capacidade de simular melhor as condições que um fármaco deve enfrentar para atingir parasitos intracelulares, como: adentrar as membranas dos macrófagos e enfrentar alterações de pH para alcançar a forma amastigota (LAMOTTE et al., 2017; CROFT, 2017).

Na investigação da atividade do SB-200 sobre a infecção de macrófagos J774.A1 por *L. infantum* observou-se uma atividade antileishmania ainda mais efetiva e seletiva do que para formas promastigotas. A atividade anti-amastigota de derivados tiofênicos também foi investigada em trabalhos anteriores, revelando compostos promissores. A atividade anti-amastigota de derivados tiofênicos também foi investigada em trabalhos anteriores,

revelando compostos promissores. Corroborando com o presente trabalho, um estudo *in vitro* de atividade antileishmania de derivados tiofênicos que foi realizado contra formas amastigotas de *L. donovani* em macrófagos J774.A1, no qual seu seu melhor composto, Etil-2-(((1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il) (4-metoxifenil)metil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato apresentou um  $CI_{50}$  de 2,48  $\mu M$ , respectivamente (PATHAN; SINGH, 2021). Em outro estudo descrito por Jacomini et al. (2016), ensaios antiamastigota com híbridos de tiofeno realizados com amastigotas de *L. amazonensis* apresentaram três substâncias em potencial, sendo elas a 4-[(2E)-N'-(2-tienilmetileno)hidrazinacarbonil]-1,6-difenil-1H-pirazolo[3,4-d]piridazin-7-ona e 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinacarbonil]-1,6-difenil-1H-pirazolo[3,4-d]piridazin-7-ona, com  $CI_{50}$  de 32,71 e 2,32  $\mu M$ , respectivamente.

Segundo a literatura, o antimoniato de meglumina apresentam uma maior atividade contra formas amastigotas intracelulares, quando comparados a formas promastigotas (WYLLIE et al., 2004). Porém, mesmo neste cenário, o SB-200 apresentou uma atividade superior em relação ao antimoniato de meglumina, apresentando melhores valores de  $CI_{50}$  e um índice de seletividade 4 vezes mais seletivo em relação ao do fármaco de referência, sendo mais tóxico para as formas amastigotas que para os macrófagos.

Na investigação da atividade do SB-200 sobre a infecção de macrófagos J774.A1 por *L. infantum* observou-se uma atividade antileishmania ainda mais efetiva e seletiva do que para formas promastigotas. A maior efetividade do SB-200 nas formas amastigotas pode ser um possível indicativo de atividade indireta, pois a substância pode estar ativando propriedades defensivas dos macrófagos infectados (RODRIGUES et al., 2015), sendo assim necessária uma investigação da atividade imunomoduladora. Dessa forma, a produção de citocinas, NO e EROs foi investigada em cultura de macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com SB-200, observou-se um aumento de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, NO e EROs e diminuição de IL-10.

Os macrófagos são uma das principais células de defesa do organismo, desempenhando um importante papel no processo de suscetibilidade ou resistência à leishmaniose, uma vez que os parasitas se multiplicam dentro deles. Apresentam vários mecanismos de defesa contra invasores intracelulares, como alterações no seu perfil estrutural (fagocitose e aumento do volume lisossomal) e celular (alterações nos níveis de citocinas, EROs e NO) sendo o NO, o principal mecanismo de defesa contra *Leishmania*. As principais citocinas que estão incluídas no processo de eliminação do parasito são as citocinas expressadas na resposta imune Th1 como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, as quais induzem os macrófagos a produzirem NO, molécula altamente tóxica para o parasito (CHOI, et al., 2005; MIRANDA-VERASTEGUI et al., 2009; VORONOV et al., 2010; SCOTT; NOVAIS, 2016). Por outro lado, citocinas expressadas na

resposta imune Th2, como a IL-4, IL-6 e IL-10 estão ligadas à susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). No presente estudo foi demonstrado que o SB-200 promove seus efeitos anti-mastigota induzindo ao aumento de citocinas protetivas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, e diminuindo os níveis de citocinas de perfil Th2 como IL-6.

SB-200 também induziu um incremento na produção de NO e EROs produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum*. A ativação dos macrófagos por interleucinas pró-inflamatórias tem o poder de aumentar a produção da molécula gasosa NO, sendo gerado a partir do aminoácido L-arginina, através da atividade da enzima iNOS. Esta molécula possui propriedade leishmanicida *in vivo*, sendo capaz de interferir em enzimas importantes de defesa do parasito contra o sistema imune do hospedeiro, como a superóxido dismutase (SOD) (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; NATHAN; SHILOH, 2000; NATHAN, 1992). Outro mecanismo de defesa dos macrófagos contra patógenos intracelulares é a produção de EROs, moléculas formadas a partir do oxigênio molecular durante o ciclo redox. Agem principalmente nos componentes celulares, podendo causar mudanças na membrana do parasito e inativação de enzimas (HOLZMULLER et al., 2006; MILLER et al., 2000; DAS et al, 2008).

Considerando as potencialidades revelados pelo SB-200 em ensaios *in vitro*, foi realizado um ensaio com larvas de *Z. morio*, como forma de avaliação de toxicidade para futuros ensaios *in vivo*. Apesar dos modelos murinos serem o padrão ouro para este tipo de ensaio, modelos alternativos utilizando invertebrados estão ganhando bastante destaque no cenário atual, devido seu baixo custo, fácil manutenção, pelo fato de não precisarem enfrentar questões éticas e por apresentarem um sistema imunológico bem preservado, se tornando um modelo alternativo promissor para ensaios toxicológicos (VAN DER VALK; VAN DER MEIJDEN, 2014; CANTERI DE SOUZA et al., 2018; VARGAS-MACÍAS et al., 2022).

SB-200 não apresentou toxicidade contra larvas de *Z. morio* nas condições avaliadas de sobrevivência e melanização. A melanização é um dos principais elementos de defesas dos invertebrados, sendo um componente importante do sistema imune. Sua produção aumenta quando o sistema imune é invadido por algum corpo estranho ou substâncias tóxicas (SÖDERHÄL et al, 2009; KRAMS et al. 2013).

Estudos anteriores também revelaram baixa toxicidade *in vivo* para derivados tiofênicos, o que coloca esta classe em evidência na pesquisa de novos agentes antileishmania. Em um estudo realizado por Rodrigues et al. (2018), foram demonstrados ensaios de toxicidade pré-clínica envolvendo camundongos Swiss tratados com o derivado tiofeno 2-[(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4H-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile (SB-

83), com uma DL<sub>50</sub> de 2500 mg/kg e ausência de toxicidade.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que o derivado 2-amino-tiofênico SB-200 é um composto anti- Trypanosomatidae promissor e candidato a ser melhor investigado em futuros experimentos *in vivo* de atividade antileishmania e anti-*Trypanosoma cruzi*.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos para o composto SB-200 confirmaram sua atividade anti-Trypanosomatidae, apresentando atividade direta sobre promastigotas das espécies *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Observou-se que o SB-200 possui níveis seguros de toxicidade para os macrófagos e células VERO, apresentando um índice de seletividade superior aos dos fármacos de referência testados.

Verificou-se que este composto é capaz de diminuir a integridade da membrana plasmática de *L. infantum*.

Através de análises por MET e MEV, foi possível constatar que o SB-200 foi capaz de alterar a estrutura de formas promastigotas de *L. infantum*.

Formas promastigotas de *L. infantum* foram induzidas à morte celular por apoptose, com secundária morte por necrose, quando tratadas com SB-200.

O SB-200 apresentou afinidade molecular com a enzima NMT, sendo um potencial alvo antileishmania.

O SB-200 apresentou maior efetividade contra amastigotas intracelulares do que promastigotas, atividade detectada através da redução da porcentagem de macrófagos infectados e da redução do número de amastigotas por macrófago infectado.

A atividade do composto sobre amastigota intracelular tem correlação com uma atividade imunomoduladora, uma vez que induziu aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, NO e EROs, e diminuiu os níveis de IL-10.

O SB-200 apresentou uma baixa toxicidade aguda em testes *in vivo* com larvas de *Zophobas morio*.

Assim, pode-se concluir que o SB-200 possui atividade anti-Trypanosomatidae efetiva e seletiva, com efeitos diretos sobre os parasitos e indiretos através de atividade imunomoduladora sobre macrófagos, sendo um composto candidato a avançar em estudos de atividade anti-Trypanosomatidae para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para as leishmanioses e para a doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.
- ABRANTES, T. R ; et al. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00021117, 2018.
- ACQUATELLA, H. et al. Recommendations for multimodality cardiac imaging in patients with Chagas disease: a report from the American Society of Echocardiography in Collaboration with the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology (DIC-SBC). **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 31, n. 1, p. 3-25, 2018.
- AGUIAR, A. C. V. et al. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 403-414, 2016.
- ALCOLEA, P. J. et al. Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007288, 2019.
- ALI, R. et al. *Embilica officinalis* L. inhibits the growth and proliferation of *Leishmania donovani* through the induction of ultrastructural changes, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis-like cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112156, 2021.
- ALONSO, L. et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, p. 110421, 2019.
- ALPERN, J. D.; LOPEZ-V., R; STAUFFER, W. M. Access to benznidazole for Chagas disease in the United States—Cautious optimism?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005794, 2017.
- ÁLVAREZ-HERNANDEZ., D. A. et al. Chagas disease: current perspectives on a forgotten disease. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, n. 3, p. 154-164, 2018.
- ANAND, D. et al. Antileishmanial activity of pyrazolopyridine derivatives and their potential as an adjunct therapy with miltefosine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 1041-1059, 2017.
- ANTINARELLI, L. M. R. ; et al. Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 195, p. 78-86, 2018.
- ANTONELLO, A. M.; et al. Entomopathogenic bacteria *Photobacterium luminescens* as drug source against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1065-1074, 2018.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.

ARONSON, N. Cutaneous leishmaniasis: Clinical manifestations and diagnosis. **Revista Up To Date. USA**, 2017.

ASSIS, T. M. de; RABELLO, A.; COTA, G. Economic evaluations addressing diagnosis and treatment strategies for neglected tropical diseases: an overview. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, 2021.

AYROM, F.; RASOULI, S.; SHEMSHADI, B. In vitro antileishmanial activity of Achillea santolina essential oil against Leishmania infantum promastigote by methylthiazole tetrazolium (MTT) and trypan blue colorimetric methods. **Archives of Razi Institute**, v. 76, n. 3, p. 529, 2021.

AZEREDO, C. M. O. et al. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against Trypanosoma cruzi, with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BAILEY, F. et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005739, 2017.

BARAVKAR, S. B. et al. Design and Synthesis of 2-Amino-thiophene-proline-conjugates and Their Anti-tubercular Activity against Mycobacterium Tuberculosis H37Ra. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 9, p. 2851-2857, 2019.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERN, C. C. disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BEZERRA-SOUZA. et al. Repurposing Butenafine as An Oral Nanom Local Skin Inflammation in Cutaneous Leishmaniasis as a Source of Variable, **Pharmaceutics**, 14p, 2019.

BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: a neglected disfiguring disease for women. **International journal of women's dermatology**, v. 5, n. 3, p. 158-165, 2019.

- BOCCHI, E. A. et al. Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 12, p. 1510-1524, 2017.
- BOGDAN, C. Leishmaniosis in children. **MONATSSCHRIFT KINDERHEILKUNDE**, v. 154, n. 3, p. 221-228, 2006.
- BOGDAN, C; RÖLLINGHOFF, M; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000.
- BOOTH, M. Climate change and the neglected tropical diseases. **Advances in parasitology**, v. 100, p. 39-126, 2018.
- BOZOROV, K. et al. 2-Aminothiophene scaffolds: Diverse biological and pharmacological attributes in medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 140, p. 465-493, 2017.
- BRASIL, P. E. A. A. do; CASTRO, R; CASTRO, L, de. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 1-19, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília. 2017. Disponível em:  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf). Acesso em: 10/03/2022
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet. Leishmaniasis. Lancet**, v. 392, n. 10151, 2018.
- BUSTAMANTE, M. L. P. et al. Dermatoscopic signs in cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, p. 844-846, 2017.
- CAMPELO, E. H. L. S; DE OLIVEIRA LIMA, C. C; VIANA, Y. Y. A. C. Aspectos epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil: Epidemiological aspects of American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. **Archives of Health**, v. 2, n. 4, p. 729-733, 2021.
- CANTERI DE SOUZA, P. et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.
- CARNEIRO, S. MP. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological research**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 2012.
- CARVALHO, L. M. V. de et al. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

CASULLI, A. New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021–2030. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009373, 2021.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniosis**.2020.

Disponível:<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html#:~:text=Leishmaniasis%20is%20found%20in%20people,the%20outskirts%20of%20some%20cities>. Acesso em: 20/04/2022

CHACÓN, A. C. et al. Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. **Revista Médica Sinergia**, v. 7, n. 4, p. e781-e781, 2022.

CHANDA, K. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases— Leishmaniasis and Chagas diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 622286, 2021.

CHOI, P. et al. Linkage analysis of the genetic determinants of T-cell IL-4 secretion, and identification of Flj20274 as a putative candidate gene. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 290-297, 2005.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

COSTA, A. S. A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memorias do instituto oswaldo cruz**, v. 107, p. 735-739, 2012.

COSTA, R. R. et al. Acarbose presents in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania infantum* and is a promising therapeutic candidate against visceral leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, p. 133-147, 2021.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C. et al. Safety profile of benznidazole in the treatment of chronic Chagas disease: experience of a referral centre and systematic literature review with meta-analysis. **Drug Safety**, v. 41, n. 11, p. 1035-1048, 2018.

CROFT, S. Design of treatments for cutaneous and visceral leishmaniasis. **Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 149, n. 5, p. 220-224, 2017.

RODRIGUES, K. A. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

RODRIGUES, K. A. et al. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670-1678, 2018.

DAS, R. et al. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Apoptosis**, v. 13, n. 7, p. 867-882, 2008.

DE AQUINO SANTANA, M. et al. Epidemiological aspects of Chagas disease in the state of Piauí (Northeast Brazil) in the period 2010–2019. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106338, 2022.

- DE BRITO, D. H. A. et al. Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo [b] thiophen-2-yl) prop-2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, p. 132197, 2022.
- GALLO, J. C. et al. Virtual screening to identify *Leishmania braziliensis* N-myristoyltransferase inhibitors: pharmacophore models, docking, and molecular dynamics. **Journal of molecular modeling**, v. 24, p. 1-10, 2018.
- DE CASTRO, S. L. et al. Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas**, v. 26, n. 11, p. 1219-1229, 1993.
- DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- DE NOYA, Belkisyolé Alarcón et al. Orally-transmitted Chagas disease: epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. **Parasite epidemiology and control**, v. 1, n. 2, p. 188-198, 2016.
- DE RYCKER, M. et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2913-2922, 2013.
- DE SOUZA, S. B. et al. Perfil epidemiológico da doença de Chagas aguda na região norte do Brasil no ano de 2015-2019. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 7, p. e8200-e8200, 2021.
- DEY, S. et al. An ATP-dependent As (III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 5, p. 2192-2197, 1996.
- DIAS, J. C. P. et al. Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. SPE, p. 7-86, 2016.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Digestive diseases and sciences**, v. 33, n. 3, p. 25S-35S, 1988.
- DON, R. O. B.; IOSET, J-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.
- DOS SANTOS, J. P. et al. Assessing the entomo-epidemiological situation of Chagas disease in rural communities in the state of Piauí, Brazilian semi-arid region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 11, p. 820-829, 2020.
- EATON, P.; et al. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 10, 2, p. 483-90, 2014.

ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy. **Current problems in cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, 2021.

ECHEVERRÍA, L. E.; MORILLO, C. A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2019.

ELEAMEN, G. RA et al. Improvement of solubility and antifungal activity of a new aminothiophene derivative by complexation with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 116-125, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FALEIRO, R. J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.

FAROOQ, S.; NGAINI, Z. Natural and synthetic drugs as potential treatment for coronavirus disease 2019 (COVID-2019). **Chemistry Africa**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2021.

FÉLIX, M. B. et al. Antileishmanial activity of new thiophene–indole hybrids: Design, synthesis, biological and cytotoxic evaluation, and chemometric studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 3972-3977, 2016.

FERRERO-MILIANI, L. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

FLORES-CHAVEZ, M. D. et al. Evaluation of the Elecsys Chagas assay for detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in a multicenter study in Europe and Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01446-17, 2018.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of natural products**, v. 76, n. 8, p. 1505-1508, 2013.

FREITAS, V. M. et al. Morphological and morphometric characterization of the preputial ostium, internal preputial leaflet, and free part of the penises of Aberdeen Angus and Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 1-10, 2022.

GARCIA, A. R. et al. Identification of chalcone derivatives as inhibitors of *Leishmania infantum* arginase and promising antileishmanial agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 624678, 2021.

GASTEIGER, J; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GERPE, A. et al. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 21, p. 7500-7509, 2009.

GEWALD, K. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VII. 2-Amino-thiophene aus  $\alpha$ -Oxo-mercaptanen und methylenaktiven Nitrilen. **Chemische Berichte**, v. 98, n. 11, p. 3571-3577, 1965.

GEWALD, K; SCHINKE, E; BÖTTCHER, H. Heterocyclen aus CH-aciden nitrilen, VIII. 2-amino-thiophene aus methylenaktiven nitrilen, carbonylverbindungen und Schwefel. **Chemische Berichte**, v. 99, n. 1, p. 94-100, 1966.

GIL, C.; MARTINEZ, A. Is drug repurposing really the future of drug discovery or is new innovation truly the way forward?. **Expert opinion on drug discovery**, v. 16, n. 8, p. 829-831, 2021.

GOODSELL, D. S. Computational docking of biomolecular complexes with AutoDock. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2009, n. 5, p. pdb. prot5200, 2009.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **Journal of molecular recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUPTA, S. et al. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 518-527, 2015.

GUREL, M. S; TEKIN, B; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in dermatology**, v. 38, n. 2, p. 140-151, 2020.

HERNÁNDEZ-BOJORGE, S. E. et al. Epidemiology of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Nicaragua. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 11, p. e00192, 2020.

ILAGHI, M. et al. The potential role and apoptotic profile of three medicinal plant extracts on Leishmania tropica by MTT assay, macrophage model and flow cytometry analysis. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 12, p. e00201, 2021.

HENDRICKX, S; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology research**, v. 118, p. 2743-2752, 2019.

HOLZMULLER, P; SERENO, D; LEMESRE, J.-L. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of Leishmania infantum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4406-4409, 2005.

HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England journal of medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HOTEZ, P. J. The rise of neglected tropical diseases in the "new Texas". **PLOS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0005581, 2018.

HUANG, Y; DÖMLING, A. The Gewald multicomponent reaction. **Molecular diversity**, v. 15, n. 1, p. 3-33, 2011.

IBRAHIM, S. RM et al. Naturally occurring thiophenes: isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. **Phytochemistry reviews**, v. 15, n. 2, p. 197-220, 2016.

JACOMINI, A. P. et al. Synthesis and evaluation against *Leishmania amazonensis* of novel pyrazolo [3, 4-d] pyridazinone-N-acylhydrazone-(bi) thiophene hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 340-349, 2016.

JAIN, S. K. et al. A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 70, p. e4054, 2012.

JANSEN, A. M; XAVIER, S. C. das C; ROQUE, A. L. R. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-25, 2018.

JARAMILLO-ANTILLÓN, O. et al. La leishmaniosis cutánea en Costa Rica: prevención, diagnóstico y tratamiento. **Acta Médica Costarricense**, v. 60, n. 3, p. 103-114, 2018.

JUNIOR, FJB M. et al. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 1492-1499, 2011.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KERI, R. S. et al. An overview of benzo [b] thiophene-based medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 138, p. 1002-1033, 2017.

KIRCHHOFF, L. V. Trypanosoma species (American trypanosomiasis, Chagas' disease): biology of trypanosomes. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. WB Saunders. p. 3108-3115. e2, 2015.

KRAMS, I. et al. Trade-off between cellular immunity and life span in mealworm beetles *Tenebrio molitor*. **Current Zoology**, v. 59, n. 3, p. 340-346, 2013.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta tropica**, v. 198, p. 105107, 2019.

LAGE, P. S. et al. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 12, p. 4625-4635, 2015.

- LAMOTTE, S. et al. The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005480, 2017.
- LASCANO, F; GARCÍA BOURNISSEN, F; ALTCHÉH, J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 383-402, 2022.
- LEMOS, M. H. S. et al. Epidemiologia das leishmanioses no estado do Piauí. **Braz J Surg Clin Res**, v. 25, n. 2, p. 53-7, 2019.
- LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005600, 2017.
- LEWIS, M. D. et al. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.
- LIEW, F. Y.; WEI, X–Q; PROUDFOOT, Lorna. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311-1315, 1997.
- LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide–mediated resistance to Leishmania. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.
- LINDOSO, J. N. L.; LINDOSO, A. A. BP. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.
- LLAGUNO, M. et al. IgG Subclass Analysis in Patients with Chagas Disease 4 Years After Benznidazole Treatment. **Acta Parasitologica**, p. 1-11, 2021.
- LLAGUNO, M. et al. T-cell immunophenotyping and cytokine production analysis in patients with Chagas disease 4 years after Benznidazole treatment. **Infection and immunity**, v. 87, n. 8, p. e00103-19, 2019.
- LOZANO, I. M. et al. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from Trypanosoma cruzi carrying the conserved MASP N-terminal region. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
- LÜ, L. et al. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in vitro**, v. 26, n. 4, p. 636-644, 2012.
- MACHADO, G. U; PRATES, F. V; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 94, p. 09-16, 2019.
- MAHAJAN, S. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 7-arylbenzo [c] acridine-5, 6-diones as Potential Anti-Leishmanial and anti-trypanosomal Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 563-572, 2018.

MAJUMDER, S; KIERSZENBAUM, F. N, N'-Thiophene-substituted polyamine analogs inhibit mammalian host cell invasion and intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 60, n. 2, p. 231-239, 1993.

MANSOLDO, F. R. P. et al. Chagas disease: perspectives on the past and present and challenges in drug discovery. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5483, 2020.

MARGL, L. et al. Biosynthesis of thiophenes in *Tagetes patula*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 6, p. 875-881, 2001.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F.. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MCGWIRE, B. S; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MEIRELES, C. B. et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 240-254, 2017.

MENDES, J. R. et al. O Piauí como coadjuvante da leishmaniose Visceral brasileira/Piauí as an adjunct of brazilian Visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 11210-11219, 2020.

MENDONÇA, D. V. C. et al. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology research**, v. 117, p. 391-403, 2018.

MENDONÇA, D. V.C et al. Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 186, p. 24-35, 2018.

MENDONÇA JUNIOR et al. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 1492-1499, 2011.

MIL, E. M. et al. Exposition of Phosphatidylserine in Lewis Carcinoma Cells under the Action of Anphen Sodium and Hydrogen Peroxide. **Cell and Tissue Biology**, v. 15, n. 1, p. 61-66, 2021.

MILANO, S. et al. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 127, n. 2, p. 360-365, 2002.

MILLER, M. A. et al. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33883-33889, 2000.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 7, p. e491, 2009.

MISHRA, R; SHARMA, P. k. A review on synthesis and medicinal importance of thiophene. **International Journal of Engineering and Allied Sciences**, v. 2, n. 02, 2017.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. In: **Annales de Dermatologie et de Venereologie**. p. 232-246, 2019.

MOLINARI, B. L. et al. Kinetics of MTT-formazan exocytosis in phagocytic and non-phagocytic cells. **Micron**, v. 36, n. 2, p. 177-183, 2005.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2017.

MONDÊGO-OLIVEIRA, R. et al. Vernonia brasiliensis (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of Leishmania infantum promastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111025, 2021.

MONTEÓN, V. et al. Caracterización biológica de aislados mexicanos de Trypanosoma cruzi: metacicloogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. **Revista Biomédica**, v. 20, n. 3, p. 206-214, 2009.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R; OLSON, A. J. Using autodock for ligand-receptor docking. **Current protocols in bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 8.14. 1-8.14. 40, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of murine macrophages. **Current protocols in immunology**, v. 83, n. 1, p. 14.2. 1-14.2. 8, 2008.

MOTA, C. AX et al. A study of the antinociceptive, anti-inflammatory, and toxicological activity of a promising thiophene derivative. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 37, n. 3, p. 579-87, 2018.

MÜLLER KRATZ, J. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

MUNOZ-SARAVIA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart failure reviews**, v. 17, p. 45-64, 2012.

NAGLE, A. S. et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.

NATHAN, C; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.

NÉRIS, P. L.N et al. Neolignan Licarin A presents effect against Leishmania (Leishmania) major associated with immunomodulation in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 307-313, 2013.

NEVES, W. W. et al. Incorporation of 2-amino-thiophene derivative in nanoparticles: enhancement of antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 647-655, 2020.

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

NUNES, T. A. et al. Curzerene antileishmania activity: Effects on Leishmania amazonensis and possible action mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 100, p. 108130, 2021.

OLIVEIRA, J. et al. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. **Acta tropica**, v. 170, p. 140-148, 2017.

OYAMA, J. et al. American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

PAIVA, K. LR; RADICCHI, M. A.; BÁO, S. N. In Vitro Evaluation of NLS-DTX Activity in Triple-Negative Breast Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4920, 2022.

Pan American Health Organization. **Chagas disease (american trypanosomiasis)**.2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 18/04/2022.

PARTHASARATHY, A; KALESH, K. Defeating the trypanosomatid trio: proteomics of the protozoan parasites causing neglected tropical diseases. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 625-645, 2020.

PATHAN, S; SINGH, G. P. Synthesis of novel tetrazole tetrahydrobenzo [b] thiophene via Ugi-MCR: As new antileishmanial prototype. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 25, n. 8, p. 101295, 2021.

PATHANIA, S; NARANG, R. K; RAWAL, R. K. Role of sulphur-heterocycles in medicinal chemistry: An update. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 486-508, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PINHEIRO, E. et al. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017.

PINTO, A. Y. das N. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista panamericana de salud pública**, v. 25, n. 1, p. 77-83, 2009.

PITA, S. et al. Comparative analysis of repetitive DNA between the main vectors of Chagas disease: *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1277, 2018.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

POORRAJAB, F. et al. Nitroimidazolyl-1, 3, 4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: Synthesis and in vitro biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1758-1762, 2009.

PORTELA, Á. SB et al. Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 223, n. 3, p. 303-309, 2018.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M; MEDINA-FRANCO, J. L. Acoplamiento molecular: Avances recientes y retos. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, n. S1, p. 65-87, 2019.

RAJASEKARAN, R; CHEN, Y-P P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug discovery today**, v. 20, n. 8, p. 958-968, 2015.

REIS, L. L. dos et al. Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, 2019.

REIS, T. A.R et al. Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 221, p. 108059, 2021.

RIBEIRO, I. M. M. et al. Antileishmania and immunomodulatory potential of cashew nut shell liquid and cardanol. **Toxicology in Vitro**, v. 87, p. 105524, 2023.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

ROCHA, J. A. et al. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198476, 2018.

ROCHA, S. M. et al. In vitro anti-*Leishmania* activity of new isomeric cobalt (II) complexes

and in silico insights: Mitochondria impairment and apoptosis-like cell death of the parasite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 112088, 2022.

RODRIGUES, F. R.; DE SOUSA, V. C; DE OLIVEIRA, E. H. Análise do perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose visceral no estado do Piauí no período de 2009 a 2018. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e489119170-e489119170, 2020.

RODRIGUES, K. A. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

RODRIGUES, K. A. et al. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670-1678, 2018.

RODRIGUES, R. R. L. et al. Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **International Immunopharmacology**, v. 90, p. 107124, 2021.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2016.

RODRIGUEZ, F. et al. Development of thiophene compounds as potent chemotherapies for the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1626, 2018.

ROJAS MADRIZ, B. Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 36, n. 2, p. 82-94, 2019.

SAFAVI, M; ESHAGHI, H; HAJIHASSANI, Z. Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. **Diagnostic Cytopathology**, v. 49, n. 3, p. 446-448, 2021.

SAKIB, B. C. S. L, B. M." Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

SANGENITO, L. S. et al. Leishmaniasis and Chagas disease—neglected tropical diseases: treatment updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174-177, 2019.

SANTOS, F. L. N. et al. Chronic Chagas disease diagnosis: a comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1034, 2016.

SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020

SAYRES, L; HUGHES, B. L. Contemporary understanding of Ebola and Zika Virus in pregnancy. **Clinics in Perinatology**, v. 47, n. 4, p. 835-846, 2020.

SCHNEIDER, P; BORDIER, C; ETGES, R. Membrane proteins and enzymes of *Leishmania*. **Intracellular Parasites**, p. 39-72, 1992.

- SCHUMANN, J. The impact of macrophage membrane lipid composition on innate immune response mechanisms. **Inflammation, Chronic Diseases and Cancer. Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases**, p. 31-52, 2012.
- SCOTT, P; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.
- SCOTTI, L. et al. In-silico analyses of natural products on leishmania enzyme targets. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 253-269, 2015.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – **Ministério da saúde**. 2020. Boletim Epidemiológico – Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/arquivos/be-numero-especial-doenca-de-chagas-14-de-abril-dia-mundial-2020.pdf>. Acesso em: 22/04/2022
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – **Ministério da saúde**. 2022. Boletim Epidemiológico – Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022>. Acesso em: 20/04/2022
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E; OLIVEIRA, F. Leishmania infantum. **Trends in parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80-81, 2020.
- SHADAB, M. et al. Apoptosis-like cell death in Leishmania donovani treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171306, 2017.
- SHIO, M. T. et al. PKC/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by Leishmania zinc-metalloprotease during infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003868, 2015.
- SILVA, K. C. B. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em Teresina-PI, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 52, p. e744-e744, 2020.
- SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4228-4240, 2016.
- SIMÕES, M. V. et al. Cardiomiopatia da doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, p. 173-189, 2018.
- SINGH, P. K; SILAKARI, Om. The current status of O-heterocycles: A synthetic and medicinal overview. **ChemMedChem**, v. 13, n. 11, p. 1071-1087, 2018.
- SÖDERHÄLL, I. et al. A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 10, p. 6301-6310, 2009.
- SOLIS, F. J.; WETS, R. J.-B. Minimization by random search techniques. **Mathematics of operations research**, v. 6, n. 1, p. 19-30, 1981.

SOUSA, J. K.T. et al. A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against Leishmania species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 73, p. 101966, 2019.

SOUZA, B. C.C et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl [b] thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 2, p. 221-236, 2012.

SOUZA, D. D. S. M. et al. Atualização em Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*, v. 26, n. 4, p. 222–229, 2016.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNTER, J; GULL, K. S., form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

TAKAHASHI, H. T. et al. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3469-3478, 2011.

TAO, Q. et al. Network pharmacology and molecular docking analysis on molecular targets and mechanisms of Huashi Baidu formula in the treatment of COVID-19. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 46, n. 8, p. 1345-1353, 2020.

TAVARES, G. de S. V. et al. Antileishmanial activity, cytotoxicity and mechanism of action of clioquinol against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 123, n. 3, p. 236-246, 2018.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. 2012.

TIWARI, N. et al. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018.

THAKUR, S; CATTONI, D. I; NÖLLMANN, M. The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. **European Biophysics Journal**, v. 44, p. 337-348, 2015.

TORRICO, F. et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

ULIANA, S. R.B; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

UNITED NATIONS. Human Development Report 2020—the Next Frontier: Human Development and the Anthropocene. 2020.

VALDERRAMA, J. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of thiophene ring-containing quinones. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 47, n. 9, p. 1221-1226, 1999.

VAN DER VALK, T; VAN DER MEIJDEN, A. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VARGAS-MACÍAS, A. P. et al. Current Models to Study the Sporothrix-Host Interaction. **Frontiers in Fungal Biology**, p. 4, 2022.

VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. **PVPE**, v. 1, p. 1-7, 2017.

VENTUROLI, M. et al. Mesoscopic models of biological membranes. **Physics Reports**, v. 437, n. 1-2, p. 1-54, 2006.

VORONOV, E. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *International Immunology*, v. 22, n. 4, p. 245–257, fev. 2010.

WAMAI, R. G. et al. Visceral leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 2020.

WANG, M. et al. Aseptic technology for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa by direct dropping into clean liquid air: apoptosis, necrosis, motility, and viability. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020

WELD, E. D. et al. Twice neglected? Neglected diseases in neglected populations. **British journal of clinical pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 367-373, 2022.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**, v. 90, n. 10, p. 833-837, 2019.

WILSON, R. Blood-fed Lutzomyia longipalpis sandfly. **PLoS Pathogens Issue Image**, v. 5, n. 8, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>. Acesso 24/08/2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>. Acesso 24/08/2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1). Acesso 24/08/2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniosis**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniosis>. Acesso em: 20/04/2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease: American Trypanosomiasis**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins->. Acesso em: 20/04/2022

WYLLIE, S; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

YAMEY, G. et al. Funding innovation in neglected diseases. **Bmj**, v. 360, 2018.

ZHANG, L. et al. Thiophene acetylenes and furanosesquiterpenes from *Xanthopappus subacaulis* and their antibacterial activities. **Phytochemistry**, v. 106, p. 134-140, 2014.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018.

ZREIN, M. et al. A novel antibody surrogate biomarker to monitor parasite persistence in *Trypanosoma cruzi*-infected patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006226, 2018.