

## **Avaliação antileishmanial in vitro de compostos 1,2,3-triazólicos alquilados derivados de éster salicílico**

Raissa Guedes Matosinhos Ribeiro<sup>1</sup>, Ana Luíza Ribeiro de Freitas<sup>2</sup>, João Pedro Reis Costa Bastos<sup>2</sup>, Ari Sérgio de Oliveira Lemos<sup>3</sup>, Bruno Assis de Oliveira<sup>4</sup>, Adilson David da Silva<sup>5</sup>, Elaine Soares Coimbra<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Veterinária. [raissa.mattosinhos@estudante.ufjf.com.br](mailto:raissa.mattosinhos@estudante.ufjf.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de parasitologia, microbiologia e imunologia. [analuiza.freitas@estudante.ufjf.br](mailto:analuiza.freitas@estudante.ufjf.br) e [joaopedro.reis@estudante.ufjf.br](mailto:joaopedro.reis@estudante.ufjf.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Programa de pós graduação em Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de parasitologia, microbiologia e imunologia. Núcleo de Pesquisa e Extensão em Parasitologia (NUPEP). [arisergiolemos@hotmail.com](mailto:arisergiolemos@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Programa de Pós graduação em Química, Departamento de Química- ICE - UFJF. [brunoliveira\\_@live.com](mailto:brunoliveira_@live.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Química - ICE - UFJF. [david.silva@ufjf.br](mailto:david.silva@ufjf.br)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de parasitologia, microbiologia e imunologia. Núcleo de Pesquisa e Extensão em Parasitologia (NUPEP), [elaine.coimbra@ufjf.br](mailto:elaine.coimbra@ufjf.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

A leishmaniose está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas (DTNs) no mundo, afetando mais de 12 milhões de pessoas, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) <sup>(9)</sup>. Além disso, trata-se de uma doença infecciosa provocada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos a animais e seres humanos pela picada de flebotomíneos, que são os insetos vetores da doença<sup>(7)</sup>

As leishmanioses são doenças podem se manifestar de diferentes formas, sendo as mais comuns a leishmaniose cutânea, que causa feridas cutâneas, mas que pode evoluir para manifestações clínicas graves como a forma cutâneo mucosa, e a leishmaniose visceral, que compromete órgãos internos como o fígado, baço e medula óssea, e que pode ser letal se não tratada <sup>(1)</sup>. As deformidades graves

causadas pela doença ainda podem conduzir a um estigma social associado a ela, devido a seu caráter desfigurante <sup>(5)</sup>

A *Leishmania amazonensis* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, cuja infecção pode resultar em lesões cutâneas ulcerativas que podem variar de localizadas a formas mais difusas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro<sup>(6)</sup>. Ela é endêmica em áreas tropicais e subtropicais e está ligada a fatores ambientais e socioeconômicos, como desmatamento, urbanização e pobreza <sup>(15)</sup>. O diagnóstico e tratamento precoces são essenciais para controlar a doença <sup>(8)</sup>.

O tratamento da leishmaniose é complicado e varia conforme a forma clínica, a espécie de *Leishmania* envolvida e a região onde ocorre <sup>(14)</sup>. As terapias disponíveis incluem antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, paromomicina e pentamidina, além dos desafios que surgem no manejo da doença <sup>(13)</sup>. Além disso, devido aos efeitos colaterais, ao alto custo e desconforto no tratamento, o desenvolvimento e avaliação de novos compostos como potenciais alternativas no combate a essa parasitose se torna atrativo <sup>(3)</sup>.

## 2. METODOLOGIA

Para garantir a infectividade das cepas de *L. amazonensis* utilizadas no estudo, foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c com idades entre 4 e 6 semanas. As formas promastigotas em fase estacionária foram contadas e ajustadas em PBS para uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, 10  $\mu$ L da solução foram inoculados no coxim plantar dos membros pélvicos dos camundongos. Após cerca de 40 dias, os parasitos foram isolados das lesões e cultivados em meio adequado, contendo 20% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, sendo convertidos em promastigotas. Todos os protocolos que serão citados ao longo do texto, incluindo esse acima, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 019/2023).

Após esse procedimento, foram testados quatro compostos derivados de 1,2,3-triazólicos alquilados derivados de éster salicílico em testes anti – promastigota e anti - amastigota de *L. amazonensis* PH8 e foi realizado o ensaio de citotoxicidade em macrófagos intraperitoneais. Para os testes em formas promastigotas e na citotoxicidade em macrófagos utilizou-se o método colorimétrico

MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazólio) (Sigma Chemical Co-St. Louis, MO, USA) (MOSMANN, 1983) para a investigação da viabilidade celular após tratamento com os compostos.

Este método avalia a conversão do tetrazólio em cristais de formazan por enzimas presentes nas células. No experimento, promastigotas de *L. amazonensis* foram ajustadas a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL e distribuídas em placas de 96 poços com diferentes concentrações de compostos. A miltefosina foi utilizada como substância de referência. Após 72 horas de incubação a  $35^\circ\text{C}$ , 30  $\mu\text{L}$  de MTT foram adicionados, seguidos de mais 4 horas de incubação. A reação foi finalizada com isopropanol acidificado, e as placas foram lidas em um espectrofotômetro. Os resultados mediram a inibição do crescimento celular, e o  $\text{CI}_{50}$  (Concentração Inibitória 50%) foi calculado usando o software GraFit 5. Os experimentos foram realizados em triplicata

Já para os testes de amastigota, em que os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e ajustados para uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640. As células foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas por 16 horas a  $33^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a remoção das células não aderidas, promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionadas a uma concentração de  $20 \times 10^6$  células/mL, resultando em uma proporção de 10 parasitos por macrófago. A interação ocorreu por 4 horas, e poços foram lavados para eliminar parasitos não fagocitados. Diferentes concentrações dos compostos foram testadas, e as placas foram incubadas por mais 72 horas. A leitura foi feita após contagem das lâminas coradas por Giemsa. A miltefosina foi utilizada como substância de referência. Os experimentos foram realizados em triplicata

No caso de avaliação de citotoxicidade, o potencial citotóxico de compostos sintéticos foi avaliado em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, que tiveram seus macrófagos coletados após estímulo com 2 mL de tioglicolato. Depois de 72 horas, os camundongos foram submetidos a anestesia profunda com solução contendo cetamina + xilazina + PBS, seguida da eutanásia por deslocamento cervical. O peritônio foi lavado com solução de Hanks para obter as células, que foram centrifugadas e ajustadas para uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. As células foram incubadas em placas de 96 poços a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas, depois

tratadas com diferentes concentrações dos compostos e incubadas por mais 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pela adição de MTT, seguida de análise em um espectrofotômetro.

A Concentração Citolóxica capaz de matar 50% dos macrófagos ( $CC_{50}$ ) foi calculada usando o software GraFit 5, com a miltefosina utilizada como substância de referência. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Diante dos resultados obtidos, também foi calculado o Índice de Seletividade (IS), que mostra o quão eficaz um composto pode ser contra as formas amastigotas sem causar danos às células hospedeiras (macrófagos). O cálculo desse valor é dado, dividindo o valor da  $CC_{50}$  pelo  $CI_{50}$  das formas amastigotas, que são as responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção dos resultados obtidos para os 4 compostos testados, foi montado o quadro 1 abaixo, mostrando que o composto 4 foi o mais promissor dentre eles, com promissor potencial antileishmanial ( $CI_{50}$  de 1,25 e 6,23 $\mu$ M para as formas promastigotas e amastigotas respectivamente) e alto índice de seletividade (IS=17,81), indicando que mesmo matando o parasito, ele não é tóxico para os macrófagos<sup>(11)</sup>. Já o composto 3, apesar de ser promissor, com menores índices de  $CI_{50}$ , ele possui baixos de  $CC_{50}$ , o que indica que ele pode levar a problemas de toxicidade para células hospedeiras, pois precisa de poucas concentrações dele para matar os macrófagos, dificultando sua aplicação para testes e criação de novos fármacos<sup>(12)</sup>.

Diversos fatores dificultam o uso de medicamentos no tratamento de infecções por protozoários<sup>(2)</sup>. Entre eles, destacam-se o elevado custo, a baixa adesão dos pacientes, o surgimento de resistência, a eficácia limitada e a segurança insuficiente<sup>(4)</sup>. Por isso, há uma necessidade urgente de novos fármacos que sejam seguros, não tóxicos e que ofereçam um bom custo-benefício<sup>(10)</sup>. Logo, os resultados encontrados neste estudo são promissores.

**Quadro 1:** Resultado dos cálculos de  $CI_{50}$  para promastigota e amastigota,  $CC_{50}$  e IS dos quatro compostos utilizados.

Compostos	Promastigota IC50	Amastigota IC50	Citotoxicidade CC50	IS
Composto 1	>100	>100	70,16 +- 14,15	-
Composto 2	>100	>100	>150	-
Composto 3	1,0843 ± 0,18	2,49 ± 0,50	0,31 ± 0,22	0,12
Composto 4	1,2572 ± 0,27	6,23 ± 0,35	111,01 ± 34,52	17,81
Miltefosina	8,96 ± 0,5	5,10 ± 1,79	67,93 ± 4,29	13,31

<sup>1</sup> Dos autores, 2024. Dados expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este estudo, que o composto 4 apresentou baixos índices de  $\text{CI}_{50}$  para promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis* e também baixa toxicidade em macrófagos, o que encoraja a realização de estudos futuros para essa molecular a fim de investigar seu modo de ação. Logo, o estudo realizado tem o potencial de contribuir para a descoberta de novos compostos contra as Leishmanioses e deve ser continuado

**Palavras-chave:** Leishmanioses; compostos 1,2,3-triazólicos alquilados derivados de éster salicílico ; anti - promastigota; Teste citotoxicidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, Gesiael., *et al.* Investigação Preliminar da Fauna de Flebotomíneos e Seu Potencial Vetorial em Ambientes Urbanos de Volta Redonda. Congresso Brasileiro de Ciências e Saberes Multidisciplinares , [S. l.], p. 1-6, 20 dez. 2023.
2. BARCELOS VIANA, M. T., & Marinho dos Santos, V. (2024). Desafios da terapêutica da Leishmaniose: limitações atuais e perspectivas futuras. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 6(9), 3501–3518.
3. BRANCO JUNIOR, A.G.,*et.al.* The use of Artesunato and Cloroquina as a therapeutic alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis: a review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 8, p. e38811830995, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i8.30995.
4. CARLOTO, Amanda Cristina Machado. Atividade in vitro da beta-glucana botriosferana sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Dissertação de mestrado em ciências da saúde. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2020.
5. CARNEIRO, L.C.,*et.al.* Impactos psicossociais associados à estigmatização em indivíduos com leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. *Anais do 9º Congresso Mineiro de Medicina de Família e Comunidade*. V.1. Campinas, Galoá. 2023.
6. CONCEIÇÃO, M.L. *et.al.* Toxicologia celular de compostos naturais aquosos contra *Leishmania amazonensis*. *Anais do XIV congresso fluminense de iniciação científica e tecnológica/ VII congresso fluminense de pós graduação*, 2022. Campos de goytacazes
7. GOMES, Ricardo da Silva. Protocolos de tratamento de leishmaniose visceral canina(LVC): Uma revisão de literatura. Repositório Institucional da UFPB, [S. l.], p. 1-39, 17 nov. 2023.
8. JESUS, Taynara *et al.* Leishmaniose Tegumentar: Atuação do Enfermeiro no Diagnóstico Precoce e Tratamento. Faculdade Laboro, MA, [S. l.], p. 1-3, 14 jun. 2022.
9. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS lança plano de 10 anos para acabar com sofrimento causado por doenças tropicais negligenciadas. 2021.

10. PEREIRA, Maricley Ferreira. et.al., Efeitos de novos compostos metalocômplexo contra promastigota de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/ BR/ 75/Josefa) in vitro., Anais do XV Congresso Fluminense de Iniciação científica e Tecnológica / VIII Congresso Fluminense de pós graduação, 2023. Campos dos Goytacazes. 2023.
11. OLIVEIRA, V.R.B. Avaliação da atividade anti-leishmania sp. de extratos de fruto seco coletados no Mato Grosso do Sul. Trabalho de conclusão de curso (TCC) em Farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, alimentos e nutrição. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2023.
12. PEREZ, A.R., Disruptores heterocíclicos de la dimerización de la TryR de "L. infantum" como herramientas terapéuticas innovadoras. Tese (Doutorado). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2019.
13. SANTIAGO, Alexandre Silva *et al.* Tratamento da leishmaniose, limitações terapêuticas atuais e novas exigências alternativas: uma revisão narrativa. Research, Society and Development, [S. l.], p. 1-11, 22 jun. 2021.
14. SOARES, Dara da costa *et al.* Atividade e expressão da metaloprotease GP63 nas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. 2021. 61 f. Dissertação de mestrado (Instituto de Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, [S. l.], 2021.
15. VARGAS, A.M., et.al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil em 2022. Peer Review, 5(11), 294–305.