



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOICE CASTELO BRANCO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS
SINTÉTICOS À BASE DE BISFOSFONATOS EM *Leishmania amazonensis***

NATAL - RN

2020

JOICE CASTELO BRANCO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS
SINTÉTICOS À BASE DE BISFOSFONATOS EM *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Sousa Silva

Coorientador (a): Prof. Dra. Sandra B. Gabelli

NATAL - RN
2020

Joice Castelo Branco Santos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS À BASE DE
BISFOSFONATOS EM *Leishmania amazonensis***

Banca examinadora:

Dr. Marcelo de Sousa da Silva
Presidente – UFRN

Dra. Aline Rimoldi Ribeiro
Examinador Externo – UNICAMP

Dr. Arnóbio Antonio da Silva Junior
Examinador Interno – UFRN

Natal, 30 de outubro de 2020



Emitido em 30/10/2020

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº 282/2020 - PPGCF/CCS (15.27)
(Nº do Documento: 3)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 03/11/2020 08:49)

ARNOBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DFARM/CCS (15.13)

Matricula: 1639820

(Assinado digitalmente em 01/11/2020 19:49)

MARCELO DE SOUSA DA SILVA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DACT/CCS (15.09)

Matricula: 2275890

(Assinado digitalmente em 03/11/2020 00:02)

ALINE RIMOLDI RIBEIRO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 222.461.988-01

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: 3,
ano: 2020, tipo: **DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO**, data de emissão: 01/11/2020 e o código de verificação:
cfb4a4d2c3

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Santos, Joice Castelo Branco.

Avaliação da atividade antiparasitária de compostos sintéticos à base de bisfosfonatos em *Leishmania amazonensis* / Joice Castelo Branco Santos. - 2020.

68f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2020.

Orientador: Marcelo de Sousa da Silva.

1. Leishmaniose - Dissertação. 2. *Leishmania amazonensis* - Dissertação. 3. Bisfosfonatos - Dissertação. 4. Farnesil difosfato sintase - Dissertação. 5. Fármacos antiparasitários - Dissertação. I. Silva, Marcelo de Sousa da. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 616.993.161

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, minha família, em especial à minha mãe, Jocely Castelo Branco Santos, aos meus amigos e a todos que acreditaram e ajudaram-me nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu força e sabedoria para trilhar essa nova jornada.

Aos meus pais pela minha formação, em especial a minha mãe, Jocely Castelo Branco Santos, por todo apoio, amor, compreensão e motivação.

Ao meu irmão por toda ajuda, força e apoio em todos os momentos difíceis e na participação no redigir desse trabalho.

Aos amigos pela companhia, força, risadas, conselhos, por tudo que me ensinaram. Que me receberam e doaram um pouco de si, contribuindo para o meu aprendizado.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunoparasitologia que de forma direta ou indireta me ajudaram e me acompanharam durante essa jornada, em especial ao Johny, Wendy e Cláudia, obrigada pela ajuda imprescindível nos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo pela oportunidade e por todo o conhecimento compartilhado.

A Profa. Sandra da Universidade Johns Hopkins Baltimore e à Profa. Dra. Maria das Graças responsável pelo laboratório multiusuário (Labmulti) da UFRN, pela disponibilidade e por toda ajuda prestada ao projeto.

A todos os professores pelos ensinamentos repassados em sala de aula.

Aos funcionários da UFRN pelo apoio, disposição e ótimo trabalho prestado.

A UFRN pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do programa de concessão de bolsa e a Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT-Portugal), projetos IHMT-UID/multi/04413/2013 e PTDC/CVT CVT/28908/2017).

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa conquista, muito obrigada!

“No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultado da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia”.

Goethe

RESUMO

A leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas causada por várias espécies de parasito do gênero *Leishmania* responsável por pelo menos doze milhões de casos de infecções em todo o mundo. Apesar de sua importância em termos de saúde pública, o tratamento dos pacientes é limitado e apresenta principalmente baixos níveis de eficácia e segurança. Os bisfosfonatos são compostos que inibem a enzima farnesil difosfato sintase (FPPS) que atua nos estágios iniciais da síntese do ergosterol que mantém a integridade da bicamada lipídica do parasito causador da doença. Nesse sentido, o objetivo central deste projeto é avaliar a atividade antiparasitária de compostos sintéticos à base de bisfosfonatos em *Leishmania amazonensis*. Vinte quatro compostos cobrindo uma faixa de concentração de 100 μ M a 1 μ M foram avaliados contra promastigotas de *L. amazonensis* pelo período de 24 horas através do ensaio colorimétrico de resazurina, e os que obtiveram inibição superior a 50% da concentração inicial foram selecionados para determinação de valores de IC₅₀. Além disso, foi avaliado o *docking* molecular frente a enzima FPPS de *L. major* e os possíveis mecanismos da atividade antiparasitária desses compostos. A triagem parasitária apresentou significativa redução na maior concentração nos compostos 1656 e 1662, com valores de inibição de 100 % (IC₅₀ = 58,39 μ M) e 88% (IC₅₀ = 52,86 μ M), respectivamente. No *docking* molecular os compostos 1656 e 1662 interagiram com a enzima FPPS através da ligação com pontes de hidrogênio. E no ensaio de dupla fixação por Anexina V-FITC e PI, o composto 1662 apresentou apoptose nas concentrações de 100 μ M (3,84%) e 50 μ M (1,75%) e necrose em 100 μ M (17,7%) e 50 μ M (12,4%). Apenas o composto 1656 apresentou necrose com os valores de 2,70 e 2,73%, na mesma sequência de concentração. Estes resultados denotam que compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mostraram ser potenciais candidatos à quimioterapia da leishmaniose. Uma vez que as principais medidas de controle dessa doença são através de programas de tratamento terapêutico, este projeto encoraja novos estudos a identificar composto(s) ativo(s) para o controle da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*; Bisfosfonatos; Farnesil difosfato sintase; Fármacos Antiparasitários.

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the main neglected tropical diseases caused by several species of parasite of the genus *Leishmania* responsible for at least twelve million cases of infections worldwide. Despite its importance in terms of public health, treatment of patients is limited and has mainly low levels of efficacy and safety. Bisphosphonates are compounds that inhibit the enzyme farnesyl diphosphate synthase (FPPS) that acts in the initial stages of ergosterol synthesis that maintains the integrity of the lipid bilayer of the disease-causing parasite. In this sense, the main objective of this project is to evaluate the antiparasitic activity of synthetic compounds based on bisphosphonates in *Leishmania amazonensis*. Twenty four compounds covering a concentration range of 100 μ M to 1 μ M were evaluated against *L. amazonensis* promastigotes for a period of 24 hours through the colorimetric assay of resazurin, and those that obtained inhibition greater than 50% of the initial concentration were selected to determine values IC₅₀. In addition, molecular docking was evaluated against the *L. major* FPPS enzyme and the possible mechanisms of the antiparasitic activity of these compounds. Parasitic screening showed a significant reduction in the highest concentration in compounds 1656 and 1662, with inhibition values of 100% (IC₅₀ = 58.39 μ M) and 88% (IC₅₀ = 52.86 μ M), respectively. In molecular docking, compounds 1656 and 1662 interacted with the FPPS enzyme by bonding with hydrogen bonds. And in the double fixation assay by Annexin V-FITC and IP, compound 1662 showed apoptosis at concentrations of 100 μ M (3.84%) and 50 μ M (1.75%) and necrosis at 100 μ M (17.7%) and 50 μ M (12.4%). Only compound 1656 showed necrosis with values of 2.70 and 2.73%, in the same concentration sequence. These results show that synthetic compounds based on bisphosphonates have been shown to be potential candidates for leishmaniasis chemotherapy. Since the main measures to control this disease are through therapeutic treatment programs, this project encourages further studies to identify active compound (s) for the control of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; Bisphosphonates; Farnesyl diphosphate synthase; Antiparasitic Drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Casos confirmados de leishmaniose visceral notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, 2007 a 2018.....	20
Figura 2	Casos confirmados leishmaniose tegumentar notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, 2007 a 2018.....	20
Figura 3	Classificação de <i>Leishmania</i> em família, gênero, subgênero, complexos e espécies.....	21
Figura 4	Ciclo biológico e estágios evolutivos de <i>Leishmania</i>	26
Figura 5	Estrutura química geral do pirofosfato e BPs.....	32
Figura 6	Estrutura química dos principais BPs nitrogenados e não nitrogenados.....	33
Figura 7	Esquema da ação dos bisfosfonatos nitrogenatos na via do mevalonato.....	34
Figura 8	Esquema da microplaca utilizada para ensaio de inibição do crescimento parasitário.....	38
Figura 9	Redução de células viáveis pela conversão da resazurina em resorufina.....	39
Figura 10	Código de identificação, estrutura química e massa molecular dos 24 compostos sintéticos à base de BPs.....	42
Figura 11	Triagem antiparasitária dos compostos sintéticos à base de BPs em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Figura 12	Ensaio <i>in silico</i> dos compostos sintéticos à base de BPs mais promissores e a proteína FPPS de <i>L. major</i>	50
Figura 13	Análise dos possíveis mecanismos da atividade antiparasitária de <i>L. amazonensis</i> tratados com os compostos 1656 e 1662.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Distribuição geográfica de espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas aos seres humanos.....	23
Quadro 2	Medicamentos antileishmaniais e suas principais características.....	29
Quadro 3	IC ₅₀ dos compostos sintéticos à base de BPs sobre o crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATB	Automated topology build
BPs	Bisfosfonatos
B.O.D.	Biological oxygen demand
CC	Controle dos compostos
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTN	Doença tropical negligenciada
ELISA	Imunoenzimático
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPP	Farnesil difosfato
FPPS	Farnesil difosfato sintase
GPP	Geranil pirofosfato
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IPP	Isopentenil pirofosfato
LV	Leishmaniose visceral
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
MTT	3-brometo(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
N-BPs	Bisfosfonatos nitrogenados
NM	Novo Mundo
OMS	Organização Mundial de Saúde

PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
PDB	Protein data bank
PI	Iodeto de propídio
PPi	Pirofosfato inorgânico
PS	Fosfatidilserina
RIFI	Imunofluorescência indireta
RPMI	Instituto roswell park memorial
SFB	Soro fetal bovino
VM	Velho Mundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Leishmaniose no Brasil e no mundo.....	19
2.2	Sistema taxonômico de <i>Leishmania</i>.....	20
2.3	Características gerais da espécie <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	22
2.4	Manifestações clínicas da leishmaniose em humanos.....	22
2.5	Mecanismos de transmissão, hospedeiros, morfologia e ciclo da leishmaniose.....	24
2.6	Diagnóstico clínico e laboratorial da leishmaniose em humanos e animais.....	27
2.7	Medidas preventivas e de controle da leishmaniose em humanos e animais.....	27
2.8	Tratamento farmacológico da leishmaniose em humanos.....	28
2.9	Biossíntese de esterol como potencial alvo farmacológico para o tratamento da leishmaniose em humanos.....	31
2.10	Breve histórico sobre os bisfosfonatos.....	31
2.11	Características gerais sobre a estrutura química e classificação dos bisfosfonatos.....	32
2.12	Mecanismo de ação dos bisfosfonatos não nitrogenados e nitrogenados.....	33
2.13	Atividade biológica dos bisfosfonatos nitrogenados.....	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Compostos sintéticos à base de bisfosfonatos.....	37
4.2	Cultivo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....	37
4.3	Triagem da atividade antiparasitária dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos frente a promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....	37
4.4	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mais promissores à enzima FPPS de <i>L. major</i>.....	40

4.5	Avaliação dos possíveis mecanismos de atividade antiparasitária de compostos sintéticos à base de bisfosfonatos.....	40
4.6	Análise estatística.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	Identificação dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos.....	42
5.2	Triagem antiparasitária de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por compostos sintéticos à base de bisfosfonatos.....	44
5.3	Estudo <i>in silico</i> dos compostos à base de bisfosfonatos à proteína FPPS de <i>L. major</i>	49
5.4	Análise dos possíveis mecanismos da atividade antiparasitária de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com os compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mais promissores.....	51
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICE A – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO.....	68
	APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO PULICADO.....	69

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) responsável por pelo menos doze milhões de casos de infecções em todo o mundo e trezentos e cinquenta milhões de pessoas estão em risco em pelo menos 98 países (SOUZA *et al.*, 2018), da América tropical, África, subcontinente indiano, áreas subtropicais do sudeste da Ásia e na região do Mediterrâneo (SOOSARAEI *et al.*, 2018), a doença tem uma mortalidade de 20.000 a 40.000 mortes por ano (BRITO *et al.*, 2018).

Causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida vetorialmente por flebotomíneos fêmeas (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019) a doença apresenta manifestações clínicas que variam de infecções assintomáticas a lesões em locais cutâneos (leishmaniose cutânea), mucosos (leishmaniose mucocutânea) ou em órgãos viscerais (leishmaniose visceral), dependendo da espécie do parasito e das características do hospedeiro (GALLUZZI *et al.*, 2018).

A quimioterapia é o principal meio de lidar com esta infecção. Entretanto poucos medicamentos estão disponíveis no mercado, e cada um apresenta uma desvantagem específica, que juntamente com regimes a longo prazo comprometem a adesão do paciente ao tratamento e, conseqüentemente, o surgimento de cepas resistentes (SOUZA *et al.*, 2018).

A atual primeira linha de medicamentos para o tratamento da leishmaniose consiste em antimoniais pentavalentes, no entanto, a sua baixa eficácia diminuiu a sua utilização. A segunda linha é composta por formulações de miltefosina e anfotericina B, sendo que a teratogenicidade e a nefrotoxicidade são amplamente relatados, respectivamente. A pentamidina é um medicamento potencial, entretanto seu uso é limitado nos países em desenvolvimento devido ao seu alto custo. Outro medicamento antileishmaniose é a paromomicina, que possui baixo custo, porém apresenta elevada toxicidade (CASA *et al.*, 2018).

Com isso, é necessário o apoio a pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes, mais baratos e não tóxicos para a prevenção, tratamento e redução da mortalidade por leishmaniose (SOOSARAEI *et al.*, 2018). Um importante alvo farmacológico para o tratamento da leishmaniose é a proteína farnesil difosfato sintase, responsável pela biossíntese do ergosterol, um esteroide encontrado em eucariotos, como os protozoários de *Leishmania* (TIWARI *et al.*, 2017), mantendo a integridade da bicamada lipídica das membranas celulares, e assim permitindo o crescimento e viabilidade desses parasitos (BIGI; BOANINI, 2018). Essa proteína é inibida por compostos denominados bisfosfonatos (BPs),

utilizados comercialmente para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo, tais como a osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia, displasia fibrosa e metástases ósseas tumorais (GALAKA *et al.*, 2019). E recentemente, descobriu-se que esses compostos exibem uma ampla gama de atividades biológicas que incluem, estimulação de células $T\gamma\delta$ do sistema imunológico (DAS *et al.*, 2001; SANDERS *et al.*, 2004), atividade antimicrobiana (ABDOU *et al.*, 2016; ERMER *et al.*, 2018), antitumoral (GREEN; LIPTON, 2010), herbicida (CROMARTIE; FISHER; GROSSMAN, 1999) e antiparasitária (ARIPIRALA *et al.*, 2012; MUKHERJEE; BASU; ZHANG, 2019).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antiparasitária de vinte quatro novos compostos sintéticos à base de BPs contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leishmaniose no Brasil e no mundo

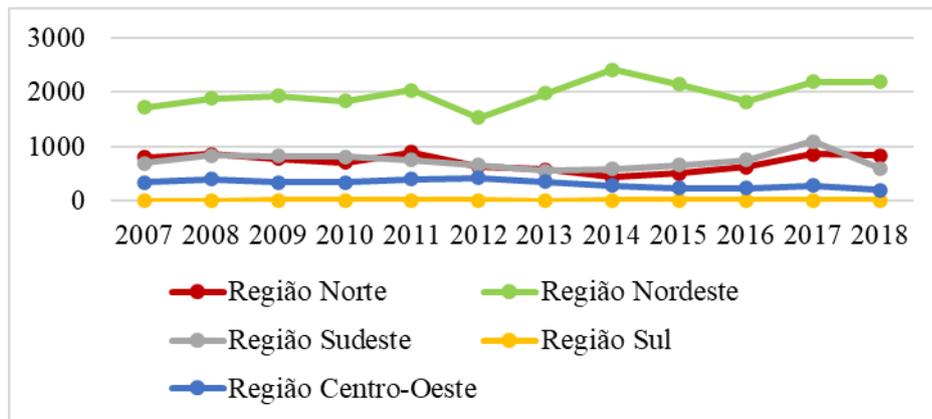
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é classificada como Doença Tropical Negligenciada (DTN), endêmica nas áreas tropicais, subtropicais e na bacia do Mediterrâneo, afetando cerca de 12 milhões de pessoas em 98 países da Europa, África, Ásia, América e na Região do Mediterrâneo. Calcula-se que 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco de infecção. Além disso, estima-se que entre 0,9 e 1,7 milhão de pessoas sejam infectadas todos os anos, mas apenas uma pequena fração delas desenvolverá a doença e a mortalidade é de 20.000 a 40.000 por ano (AKHOUNDI *et al.*, 2017; PORCINO *et al.*, 2019).

Em 2017 houve 22.145 novos casos de leishmaniose no mundo, e 20.792 dos casos relatados ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Essa expansão é resultado de vários fatores, entre eles o desmatamento intenso que leva a modificações no habitat dos hospedeiros naturais e de seus vetores, o baixo índice de desenvolvimento humano, pela ausência do saneamento básico na maioria das residências e fluxo migratório (VALDIVIA *et al.*, 2017).

Existem dois tipos clínicos principais de leishmaniose, ocasionados por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*: leishmaniose visceral (LV), causada pelos agentes etiológicos *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* e *Leishmania tropica*, responsável por lesões em órgãos viscerais e leishmaniose tegumentar (LT) causada por várias espécies de *Leishmania*, afetando a pele e as mucosas (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

O Brasil é um dos setes países que concentra 90% dos novos casos de LV, transmitida aos seres humanos e animais, principalmente através da picada do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Historicamente é uma doença predominantemente rural, atingindo altas proporções no nordeste brasileiro, como demonstrado na figura 1 (REIS *et al.*, 2016; SEVÁ *et al.*, 2017).

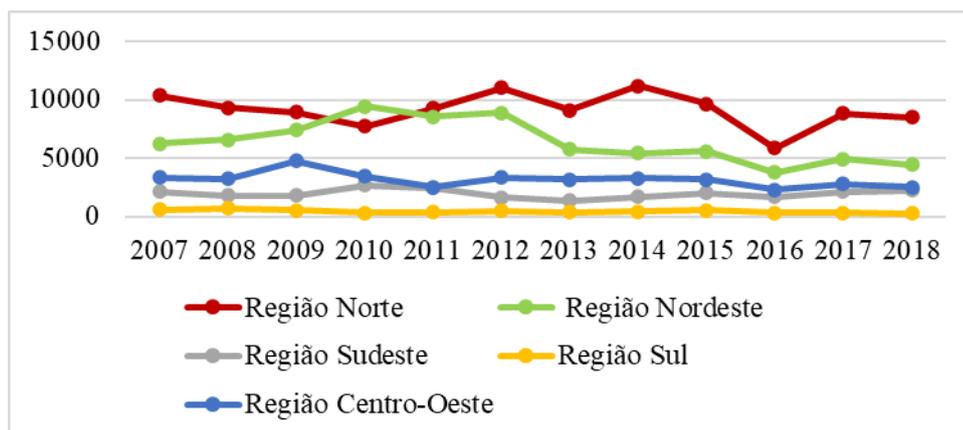
Figura 1 - Casos confirmados de leishmaniose visceral notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, 2007 a 2018.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN.

Na região norte do Brasil, a LT possui alta incidência (figura 2), devido em parte pela ocupação humana associada a atividades agrícolas, extração mineral e desmatamento intenso. Além disso, essa região brasileira possui baixo índice de desenvolvimento humano, com a ausência de serviços de saneamento básico, que conduz a potenciais ocorrências de leishmaniose (ÁVILA *et al.*, 2018).

Figura 2 - Casos confirmados leishmaniose tegumentar notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, 2007 a 2018.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN.

2.2 Sistema taxonômico de *Leishmania*

A leishmaniose é um grupo de doenças parasitárias causadas por pelo menos 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, eucariotos unicelulares da ordem

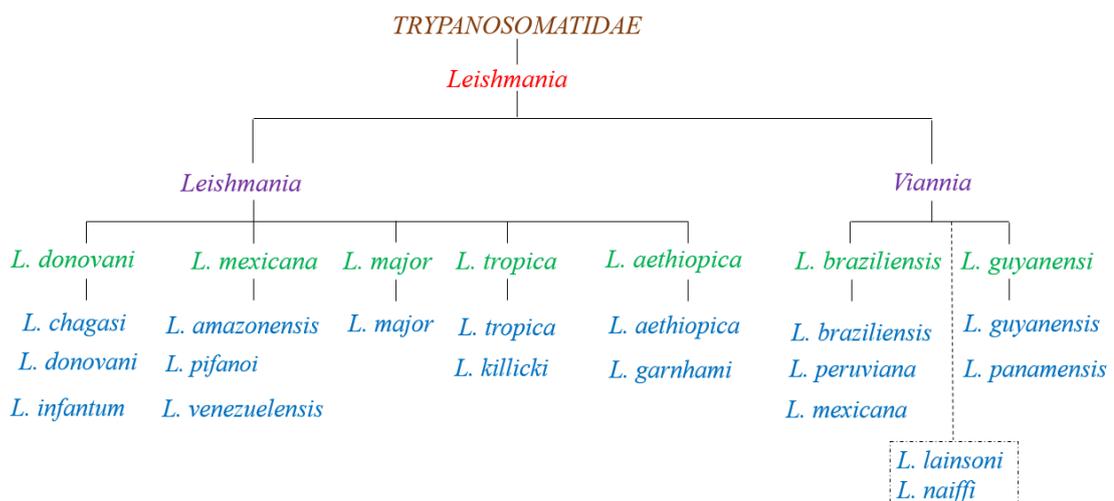
Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Leishmania são parasitos tripanossomatídeos pertencentes a um grupo específico de protozoários que possuem um único flagelo próximo a mitocôndria do parasito, e caracterizam-se pela presença do cinetoplasto, que abriga o DNA mitocondrial dos tripanossomatídeos (CAVALCANTI; SOUZA, 2018; CHRISTENSEN *et al.*, 2016).

Um marco na história dos parasitos *Leishmania* foi a implantação de um sistema taxonômico proposto por Lainson e Shaw (1987), que dividem as leishmânias em subgêneros de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitos no trato digestivo do inseto vetor. As espécies que se desenvolvem no intestino posterior dos flebotomíneos são classificadas no subgênero *Viannia*, e as que passam por desenvolvimento intraluminal no intestino médio, no subgênero *Leishmania*.

O subgênero *Viannia* inclui os parasitos que pertencem ao complexo “*Leishmania braziliensis*” e “*Leishmania guyanensis*”, sendo conhecidas apenas no Novo Mundo. Já os protozoários que pertencem ao subgênero *Leishmania* estão classificados em seis complexos denominados “*Leishmania mexicana*”, “*Leishmania donovani*”, “*Leishmania major*”, “*Leishmania tropica*” e “*Leishmania aethiopica*”, as espécies de cada complexo estão expostas no figura 3 (BRASIL, 2006).

Figura 3 – Classificação de *Leishmania* em família, gênero, subgênero, complexos e espécies.



Em marrom encontra-se a família de *Leishmania*, vermelho o gênero, roxo os subgêneros, verde os complexos e em azul as espécies correspondentes a cada complexo. Fonte: Adaptado de Brasil (2006).

2.3 Características gerais da espécie *Leishmania (L.) amazonensis*

Um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose no Novo Mundo é a *Leishmania amazonensis* (RANGEL *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2018), no Brasil a espécie é encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste.(VALDIVIA *et al.*, 2017).

A transmissão por *L. amazonensis* aos seres humanos ocorre de forma acidental, uma vez que o parasito é naturalmente encontrado em reservatórios silvestres de vertebrados, como roedores e marsupiais, e seu principal vetor, o *Lutzomyia flaviscutelata*, é um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, porém, devido ao desmatamento e a falta de saneamento básico adequado no país, cresceu o número de casos de infecções em seres humanos (BRASIL, 2006; RATH *et al.*, 2019).

A infecção por *L. amazonensis* pode causar diversas manifestações clínicas, incluindo leishmaniose cutânea (a mais comum), mucosa (MARTINS *et al.*, 2019; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017), e em alguns casos a visceral, tanto em humanos quanto em cães (ALMEIDA *et al.*, 1986; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017), além de leishmaniose cutânea difusa (LCD), sendo esta última resistente ao tratamento antileishmania (BARBOSA *et al.*, 2018).

2.4 Manifestações clínicas da leishmaniose em humanos

Segundo a OMS as formas clínicas das leishmanioses em humanos podem ser agrupadas da seguinte maneira: Leishmaniose visceral (LV), e Leishmaniose tegumentar (LT), esta última ramifica-se em leishmaniose mucocutânea/mucosa (LMC) e leishmaniose cutânea (LC) (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Leishmaniose visceral, conhecida também como kala-azar, é a forma mais grave da doença, podendo ser letal quando não tratada. Apresenta-se nas formas: assintomática, refletindo a capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de controlar o parasito; e sintomático, caracterizado por crises irregulares de febre, perda substancial de peso, anemia, inchaço do baço e fígado (ALCÂNTARA *et al.*, 2018; MIAO *et al.*, 2017).

Na leishmaniose mucocutânea, as lesões podem levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas das cavidades do nariz, boca e garganta e tecidos circundantes, dificultando a inclusão social dos indivíduos afetados (SOUZA *et al.*, 2017).

A leishmaniose cutânea apresenta outras formas clínicas: i) leishmaniose cutânea localizada, a forma mais comum da doença, na qual provoca uma lesão geralmente indolor no local da picada do vetor (QUARESMA *et al.*, 2018); ii) disseminada, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais (MEMBRIVE *et al.*, 2017); e a iii) forma clínica difusa, cuja lesões tendem a ser nodulares ou em extensas placas difusas, não ulcerativas e estão relacionadas a deficiências na resposta imunológica do hospedeiro (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

A variedade de manifestações clínicas pode ser atribuída a diversos fatores, como a variabilidade na virulência do parasito, resposta imune do hospedeiro, espécie do agente infeccioso e a distribuição geográfica, como descritos no quadro 1 (STEVERDING, 2017).

Quadro 1 – Distribuição geográfica de espécies de *Leishmania* patogênicas aos seres humanos.

Subgênero	Espécies	Velho/Novo Mundo	Doença clínica	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	VM	LCL, LCD	África Oriental (Etiópia, Quênia)
	<i>L. amazonensis</i>	NM	LCL, LCD, LMC	América do Sul (Brasil, Venezuela, Bolívia)
	<i>L. donovani</i>	VM	LV	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia, China
	<i>L. infantum</i>	VM, NM	LV, LC	Países do Mediterrâneo (Norte da África e Europa), sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte, Central e do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia)
	<i>L. major</i>	VM	LC	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central
	<i>L. mexicana</i>	NM	LCL, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru
	<i>L. tropica</i>	VM	LCL, LV	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central, Índia
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LCL	Norte da América do Sul, Venezuela
	<i>L. waltoni</i>	NM	LCD	República Dominicana

(Continuação do quadro 1)

Subgênero	Espécies	Velho/Novo Mundo	Doença clínica	Distribuição
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL, LMC	Bacia Amazônica Ocidental, América do Sul (Guatemala, Venezuela, Brasil, Bolívia, Peru)
	<i>L. guyanensis</i>	NM	LCL, LMC	Norte da América do Sul (Guiné Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia)
	<i>L. lainsoni</i>	NM	LCL	Brasil, Bolívia, Peru
	<i>L. lindenbergi</i>	NM	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	NM	LCL	Brasil, Guiné Francesa
	<i>L. panamensis</i>	NM	LCL, LMC	América Central e do Sul (Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil)
	<i>L. peruviana</i>	NM	LCL, LMC	Peru, Bolívia

LCD = Leishmaniose cutânea difusa; LCL = leishmaniose cutânea localizada; LMC = leishmaniose mucocutânea; LV = leishmaniose visceral; NM = Novo Mundo; VM = Velho Mundo. Fonte: Steverding e colaboradores (2017).

2.5 Mecanismos de transmissão, hospedeiros, morfologia e ciclo biológico da leishmaniose

A transmissão natural envolve hospedeiros vertebrados (mamíferos, como roedores, canídeos, marsupiais, mangustos, morcegos e os seres humanos) e invertebrados, insetos vetores denominados de flebotomíneos (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017), pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros: *Phlebotomus* encontrados no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e *Lutzomya* no Novo Mundo (América) (LAGO *et al.*, 2019). No Brasil são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, cangalhinha, birigui, mulambinho e catuqui (LIMA *et al.*, 2019).

Entretanto existem ainda outros mecanismos de transmissão, que ocorrem mais raramente, como transfusões de sangue (FRANÇA *et al.*, 2018), compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (LINDOSO *et al.*, 2018), transmissão congênita (BERGER *et al.*, 2017) e exposição ocupacional (GONZÁLEZ; SOLÍS-SOTO; RADON, 2017).

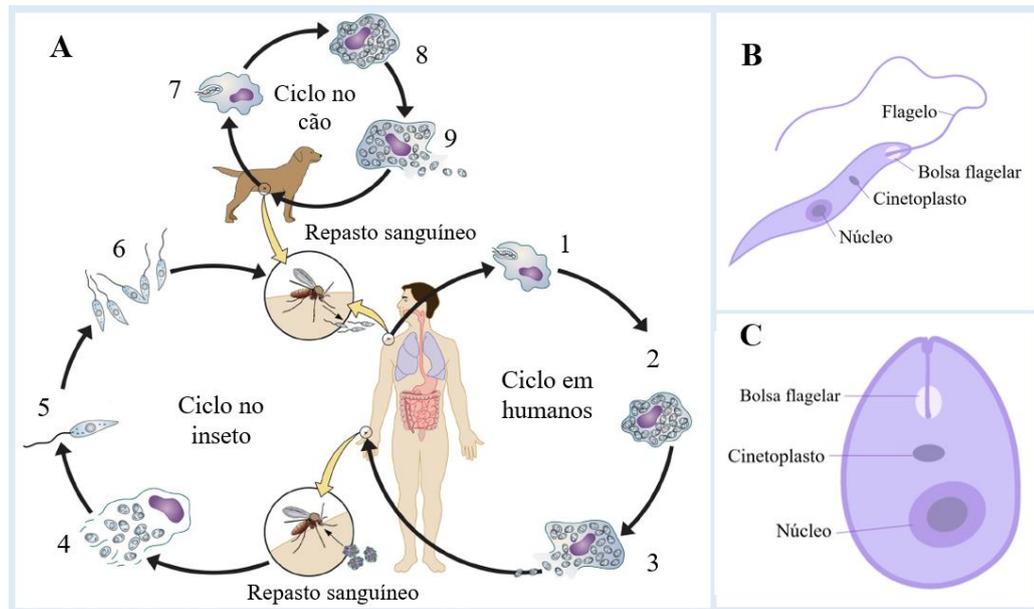
Os protozoários, *Leishmania*, são eucariotos unicelulares com ciclo de vida digenético (LAGO *et al.*, 2019), apresentando dois estágios evolutivos bem distintos (Figura 4):

promastigotas, forma extracelular, alongada, flagelada, móvel, medindo cerca de 5-15 μm de comprimento e com cinetoplasto localizado entre o núcleo e a extremidade anterior; e amastigotas, com forma intracelular obrigatória, esférica ou oval e com cerca de 2,5-5,0 μm de diâmetro, possuindo um cinetoplasto localizado próximo ao núcleo (ANVERSA *et al.*, 2018; HUSSAINI; OKUNEYE; GUMEL, 2017).

O ciclo biológico inicia-se quando fêmeas do flebótomo, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, aspiram através da sua probóscide formas amastigotas da *Leishmania sp.*, que ao atingirem o intestino médio do inseto diferenciam-se em promastigotas procíclicas, forma replicativa flagelada do parasito, que aderem-se ao epitélio intestinal por meio do flagelo e permanecem no intestino médio anterior dos flebotomíneos por cerca de cinco dias, após esse período diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, forma não replicativa e infecciosa ao hospedeiro vertebrado. O processo de diferenciação de promastigotas procíclicas em metacíclicas, é denominado metaciclogênese e coincide com a procura do inseto por outro repasto sanguíneo (KLATT *et al.*, 2019; YOREK *et al.*, 2019).

Durante um novo repasto sanguíneo promastigotas metacíclicas são transferidas para à derme de mamíferos pela saliva dos insetos, que possui neuropeptídios vasodilatadores que, além de facilitar a alimentação do inseto, suprime a resposta imune do hospedeiro localmente. Esses parasitos são rapidamente englobadas pelas células fagocíticas do hospedeiro, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no local da infecção (GIRAUD *et al.*, 2019). Uma vez dentro do fagossoma, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas, e multiplicam se por simples divisão binária até lisar a célula hospedeira liberando amastigotas para infectar novas células, como demonstrado na figura 4 (ANVERSA *et al.*, 2018; ATAN *et al.*, 2018).

Figura 4 - Ciclo biológico e estágios evolutivos de *Leishmania*.



(A) Ciclo biológico da leishmaniose tem início com o hospedeiro mamífero infectado com a forma (1) promastigota do parasito, sendo rapidamente fagocitados por macrófagos, posteriormente (2) promastigotas transformam-se em amastigotas dentro do macrófago e (3) amastigotas multiplicam-se por divisão binária até lisarem a célula hospedeira, liberando as formas amastigotas para infectar novas células; já o ciclo no inseto inicia-se com o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado com as formas amastigotas, ocorrendo a (4) ingestão de células parasitadas que ao chegarem no intestino do vetor (5) transformam-se em promastigotas que (6) multiplicam-se por divisão binária; por último o ciclo no novo hospedeiro, que inicia-se também com o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, onde (7) promastigotas são fagocitadas por macrófagos e posteriormente (8) transformam-se em amastigotas, então (9) multiplicam-se em células de vários tecidos do cão. No lado direito da figura temos a organização estrutural das formas promastigota (B) e amastigota (C). Fonte: Adaptado de Esch e Petersen (2013) e por própria autora utilizando o aplicativo Biorender (<https://biorender.com/>).

No interior das células fagocíticas, as formas amastigotas de *Leishmania sp.* conseguem inibir as funções dessas células, como os processos de produção de radicais livres, apresentação de antígenos e produção de citocinas, decorrentes da ativação da expressão de moléculas imunossupressoras pelos parasitos (TIWARI *et al.*, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Além disso, a glicoproteína gp63 possui atividade proteolítica e consegue clivar o componente C3b que atua na opsonização do parasito em uma forma inativa denominada, C3bi. Assim, a ligação aos receptores do sistema complemento não ativam os mecanismos oxidativos microbicidas do fagócito e facilita a entrada do parasito na célula-alvo (GARDE *et al.*, 2018; YARAGUPPI *et al.*, 2020).

2.6 Diagnóstico clínico e laboratorial da leishmaniose em humanos e animais

Devido ao amplo espectro de hospedeiros e reservatórios não humanos e ao grande número de vetores envolvidos na transmissão, o diagnóstico rápido e eficaz de *Leishmania* é uma característica importante aos programas de controle (AKHOUNDI *et al.*, 2017). O diagnóstico envolve a associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da doença, sendo este último constituído de três grupos de exames: parasitológico, imunológico e molecular (ANVERSA *et al.*, 2018).

O exame parasitológico consiste de alguns métodos, como a pesquisa de amastigotas em esfregaços obtidos pela borda lesão em LC e em aspirado de medula óssea, baço, fígado e linfonodos para LV; isolamento em cultivo *in vitro* para confirmação do agente etiológico e posterior identificação da espécie de *Leishmania* e isolamento *in vivo* através da inoculação em animais (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Quanto aos exames imunológicos a primeira etapa consiste no teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) para investigação de LC, fundamentando-se na visualização da resposta de hipersensibilidade tardia; em uma segunda etapa são realizados testes sorológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes (JAMAL *et al.*, 2017; ROCHA; PETRONI, 2017).

Já os exames moleculares baseiam-se na análise do DNA do parasito por meio da técnica de amplificação pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) que além de apresentar alta sensibilidade, pode ser realizada a partir de diferentes amostras clínicas, e possibilita a caracterização das espécies de *Leishmania* envolvidas (ANVERSA *et al.*, 2018).

2.7 Medidas preventivas e de controle da leishmaniose em humanos e animais

Considerando que a transmissão vetorial é a principal via de disseminação da leishmaniose, as medidas de controle devem se concentrar na prevenção do contato com o vetor (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019). Esse contato pode ser evitado através do uso: i) barreiras físicas, como mosquiteiro e utilização de roupas grossas e compridas; ii) barreiras químicas, com a pulverização de inseticida; iii) manuseio, evitando a exposição aos horários de atividades do vetor (crepúsculo e noite); e por iv) manejo ambiental, com a limpeza de quintais e terrenos, para evitar o estabelecimento de criadouros (RIBEIRO *et al.*, 2018; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

A prevenção por meio de vacina até o momento não está disponível para humanos, pois nenhuma produziu a imunidade necessária para bloquear a patogênese leishmanial (CECÍLIO *et al.*, 2017; TIWARI *et al.*, 2017). Atualmente, a disponibilidade de vacinas no mercado só é possível para cães, entretanto devido as diversas respostas sobre sua eficácia, recomenda-se o uso da coleira impregnada de pesticida para diminuir a possibilidade de contato com o vetor (RIBEIRO *et al.*, 2018). Já em casos de sorologia positiva em cães recomenda-se a eutanásia, pois esses animais representam fator de risco para infecção humana (ABBASZADEH AFSHAR *et al.*, 2018).

Outra forma de controle é o diagnóstico precoce que pode evitar complicações e ajudar a instituir o melhor tratamento (UZUN *et al.*, 2018). Juntamente com a implementação de medidas de educação em saúde que visem a conscientização da população sobre o problema e o reconhecimento do risco pessoal de contrair a doença (COUTO *et al.*, 2018).

A indisponibilidade de uma vacina profilática eficaz somando com o regime medicamentoso limitado da leishmaniose, requer preocupação e maior agilidade na pesquisa de desenvolvimento de fármacos que sejam baratos e eficazes (TIWARI *et al.*, 2017).

2.8 Tratamento farmacológico da leishmaniose em humanos

Em geral, as opções atuais de tratamento para leishmaniose (Quadro 2) são consideradas insatisfatórias, devido ao regime medicamentoso a longo prazo, a via de administração limitada, graves reações adversas, e em alguns casos o alto custo e a baixa eficácia, influência a desistência ou não adesão do paciente ao tratamento (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). O medicamento de primeira linha são os antimoniais pentavalentes, entretanto, o aumento da resistência do parasito a droga restringiu seus benefícios. Os medicamentos de segunda linha incluem a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina, porém cada um apresenta uma desvantagem específica (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Quadro 2 - Medicamentos antileishmaniais e suas principais características

Fármacos	Dosagem	Via de administração	Reações adversas	Forma clínica
Antimoniais pentavalentes	20 mg/kg/dia por 30 dias	Intravenoso, intramuscular ou intralinfático	Cardiotoxicidade grave, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade	LV, LC
Desoxicolato de anfotericina B	1 mg/kg/dia por 30 dias	Intravenoso	Nefrotoxicidade grave, tromboflebite e hipocalcemia	LV, LC
Pentamidina	3 mg/kg/dia por 4 dias	Intramuscular	Hiperglicemia grave, hipotensão da miocardite e taquicardia	LV, LC
Paromomicina	15 mg/kg/dia por 21 dias	Intramuscular tópica	Ototoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade	LV, LMC
Miltefosina	2–2.5 mg/kg/dia por 28 dias	Oral	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade	LV

LV = Leishmaniose visceral; LC = Leishmaniose cutânea; LMC = Leishmaniose mucocutânea. Fonte: Zulfiqar; Shelper e Avery (2017).

Os antimoniais pentavalentes incluindo antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio são considerados os medicamentos de primeira linha e o padrão ouro no tratamento da leishmaniose (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Entretanto, esses medicamentos requerem até 30 dias de administração injetável e devido a sua alta toxicidade podem causar cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, que podem exigir hospitalização e monitoramento cuidadoso dos pacientes (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Este regime de tratamento tem limitações para mulheres grávidas, idosos e pacientes com HIV, e outras desvantagens, como alto custo, aumento do número de falhas terapêuticas, surgimento de cepas resistentes, tornaram o uso desse medicamento restrito (BAHRAMI *et al.*, 2017).

A anfotericina B exerce sua atividade antileishmanial através de uma interação de alta afinidade com ergosterol, o principal componente da membrana celular de fungos e parasitos. Sua ligação induz a formação de canais de membrana que aumentam a permeabilidade a íons e pequenas moléculas, levando à morte do parasito (ABU AMMAR *et al.*, 2019). Com isso, esse medicamento é um potente antifúngico e antileishmanial, entretanto sua baixa solubilidade em água, alto custo, reações adversas, como hipocalcemia, anemia, tromboflebite,

vômitos e alta toxicidade renal limitam a eficiência terapêutica e a aplicabilidade clínica deste medicamento (CASA *et al.*, 2018; SARWAR *et al.*, 2018).

Formulações de anfotericina B (o complexo lipídico, a forma coloidal e a forma lipossomal) foram desenvolvidas para reduzir as reações adversas e melhorar a farmacocinética e a biodisponibilidade. Embora menos tóxicas, essas formulações têm limitações para uso em países em desenvolvimento devido ao seu alto custo (WIJNANT *et al.*, 2018).

A pentamidina é um medicamento para o tratamento alternativo de LV. No entanto, foi descontinuado devido a reações adversas como diabetes mellitus, hipotensão, problemas gastrointestinais e toxicidade cardíaca (SERENO; HARRAT; EDDAIKRA, 2019; SUNDAR; SINGH, 2018). Atualmente, é recomendado para terapia de coinfeção por HIV-LV, pois em estudos realizados por Diro e colaboradores (2015) na Etiópia, observou-se que a sobrevivência sem recidiva da LV foi alcançada usando pentamidina como profilaxia secundária em indivíduos infectados pelo HIV.

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, usado no tratamento tópico para LT e como uma droga alternativa para LV (VERMA *et al.*, 2019), é o agente antileishmanial mais barato disponível no mercado. Entretanto, sua administração parenteral sofre depuração rápida, exigindo múltiplas doses altas que podem levar à ototoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade com o seu uso prolongado (ESFANDIARI *et al.*, 2019).

A miltefosina é o primeiro medicamento não parenteral e pode ser administrado por via oral e local no tratamento de LV e LC (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A terapêutica com este medicamento não necessita de hospitalização. Entretanto, apresenta várias reações adversas, tais como: vômitos, diarreia, toxicidade nos sistemas gastrointestinal, hepático e renal (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Além disso, a miltefosina em mulheres grávidas ou em idade reprodutiva é contraindicada devido à possibilidade de teratogenicidade (ABONGOMERA *et al.*, 2019).

Todas as alternativas terapêuticas mencionadas acima apresentam preocupações relacionadas a reações adversas e o risco de resistência parasitária (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficazes, seguros e de baixo custo (BAHRAMI *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2017).

2.9 Biossíntese de esterois como potencial alvo farmacológico para o tratamento da leishmaniose em humanos

Recentemente, cresceu o número de estudos sobre a biossíntese de esteróis como um potencial alvo farmacológico molecular para terapia da leishmaniose (DINESH *et al.*, 2017), pois essa biossíntese é uma via metabólica essencial para produção de diferentes substâncias, incluindo o ergosterol, através do caminho do mevalonato (BAHRAMI *et al.*, 2017).

O ergosterol está funcionalmente ligado à manutenção da integridade estrutural e proteção do parasito contra o estresse e a toxicidade induzida por drogas, ou pelo ambiente hostil do macrófago hospedeiro (SANNIGRAHI *et al.*, 2019).

Existem vários medicamentos disponíveis no mercado e em ensaios clínicos, que potencialmente interferem na biossíntese de esteróis como os azasteróis que inibem a metiltransferase (PESSOA, 1956); a estatina e os bisfosfonatos (BPs), que inibem a HMG-CoA redutase e a farnesil difosfato sintase, respectivamente (SOUMYA *et al.*, 2017; TIWARI *et al.*, 2017).

2.10 Breve histórico sobre os bisfosfonatos

A síntese pioneira dos BPs ocorreu em 1865 na Alemanha, por Menshutkin. Inicialmente o uso desses compostos estava voltado para propriedades industriais e aplicações domésticas, incluindo amaciantes, detergentes, agentes de tratamento de água e anticorrosivos (FLEISCH; BISAZ, 1962).

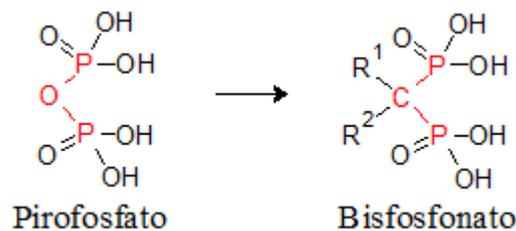
No início da década de 60, descobriu-se que o pirofosfato inorgânico (PPi) atuava como um inibidor natural da calcificação. A partir dessa descoberta as propriedades desse composto foi direcionada a aplicações farmacológicas no tratamento de reabsorção óssea. Entretanto, o PPi é rapidamente hidrolisado no trato gastrointestinal e metabolicamente instável. Assim, buscou-se os BPs, análogos dos PPi, que são mais estáveis e evitam eficazmente a calcificação (CHMIELEWSKA; KAFARSKI, 2016; RUSSELL, 2011).

Somente na década de 70 que o potencial terapêutico desta classe de fármacos foi desenvolvido como drogas para uso em várias patologias associadas à reabsorção óssea (GRAHAM; RUSSELL, 1999), incluindo osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia, displasia fibrosa e metástases ósseas tumorais (SANTOS *et al.*, 2020).

2.11 Características gerais sobre a estrutura química e classificação dos bisfosfonatos

Os BPs são análogos dos PPI e substituiu a ponte de oxigênio entre os dois átomos de fósforo no pirofosfato (ligação P-O-P) por átomo de carbono (ligação P-C-P), o que lhes confere alta resistência à degradação enzimática e maior tempo de meia vida. Esses compostos apresentam fórmula estrutural geral $(HO)_2P(O)CR_1R_2P(O)(OH)_2$ (DLAMINI *et al.*, 2018), representada na Figura 5, e duas cadeias laterais covalentes, R1 e R2, completam a tetravalência do átomo de carbono, gerando uma grande família de compostos (GALAKA *et al.*, 2017).

Figura 5 - Estrutura química geral do pirofosfato e BPs

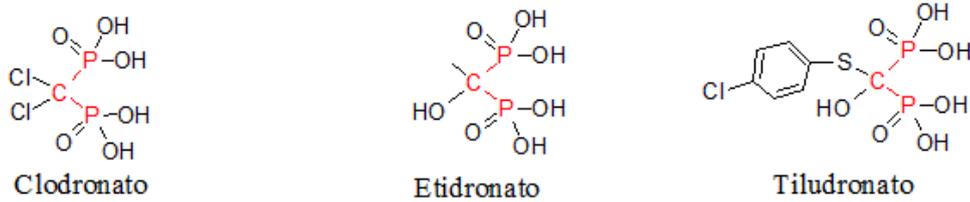


Fonte: Autoria própria.

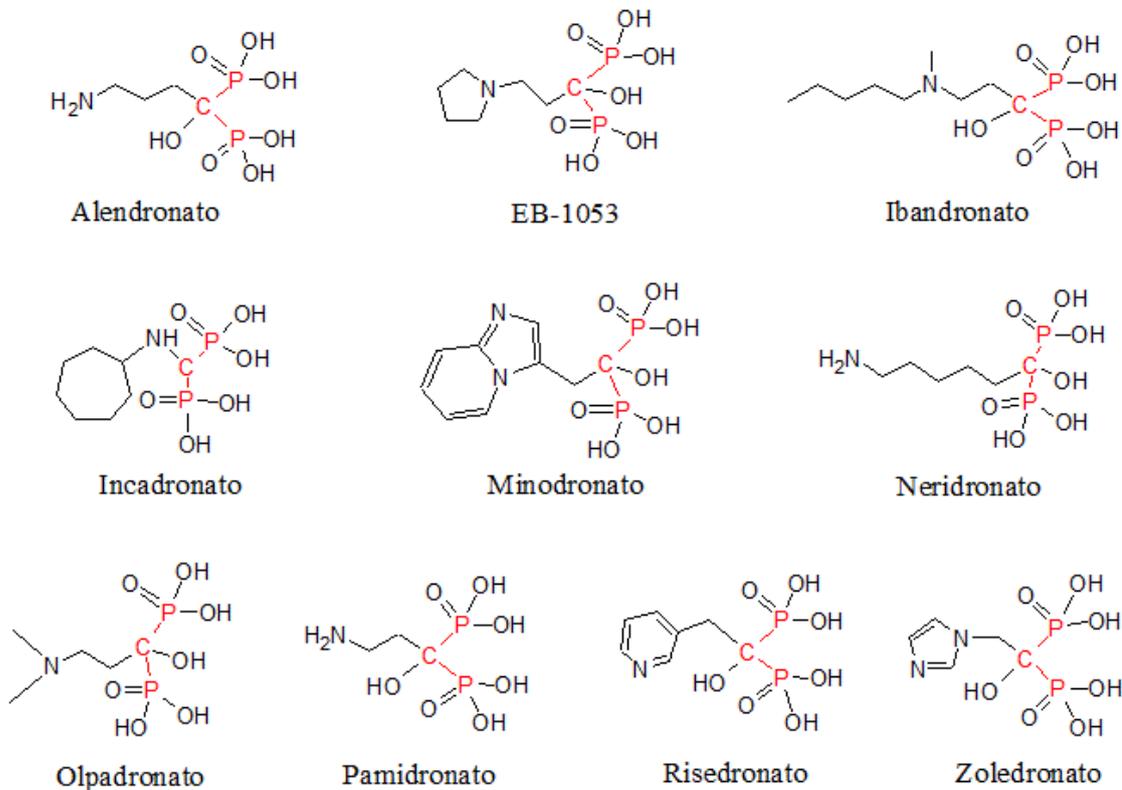
As duas cadeias laterais são essenciais para a ligação ao mineral ósseo. A cadeia R1 quando representada por um grupo hidroxila (-OH) ou amina (-NH₂) possui alta afinidade pelo cálcio e, portanto, pelo mineral ósseo. Já a estrutura e conformação tridimensional da cadeia lateral R2 determina a potência antirreabsortiva e a capacidade destes fármacos em interagir com alvos moleculares específicos (DEMORO *et al.*, 2018; RASMUSSEN; ABTAHI, 2014). Conforme o tipo de cadeia R2, os BPs são classificados como não nitrogenados e nitrogenados, com base na ausência e presença, respectivamente, de um átomo de nitrogênio (BIGI; BOANINI, 2018), conforme demonstrado na figura 6.

Figura 6 - Estrutura química dos principais BPs nitrogenados e não nitrogenados.

Bisfosfonatos não nitrogenados



Bisfosfonatos nitrogenados



Estruturas química dos BPs comerciais não nitrogenados (clodronato, etidronato e tiludronato) e nitrogenados (alendronato, EB-1053, ibandronato, incadronato, minodronato, neridronato, olpadronato, pamidronato, risedronato, zoledronato). Fonte: Autoria própria.

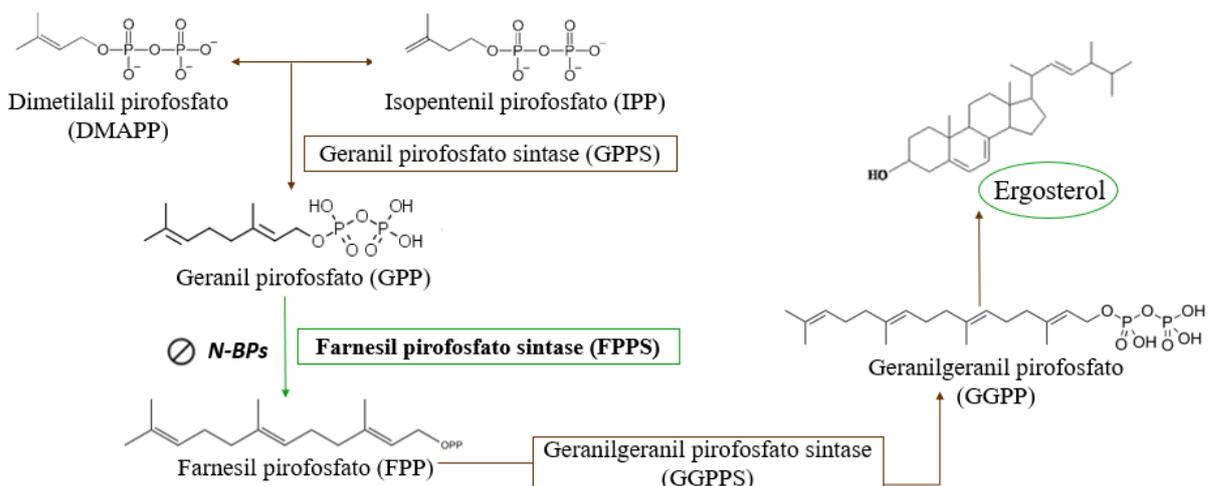
2.12 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos não nitrogenados e nitrogenados

Os BPs não nitrogenados e nitrogenados (N-BPs) exibem diferentes mecanismos de ação. Os não nitrogenados exibem excelentes resultados na distribuição da superfície óssea por quelação de cálcio (BIGI; BOANINI, 2018). Por outro lado, os N-BPs interferem na via do mevalonato, em particular na inibição da farnesil difosfato sintase (FPPS; também chamado de farnesil pirofosfato sintase), uma enzima chave na via do

mevalonato/isoprenóide, para a síntese de proteínas farnesiladas e à biossíntese de dolícois e esteróis, como colesterol e ergosterol (GABELLI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2020).

O FPPS catalisa a condensação de dois compostos de cinco carbonos (C-5), isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), para produzir geranyl pirofosfato (GPP; C-10) e a condensação subsequente de GPP com IPP para produzir pirofosfato de farnesil (FPP; C-15) (ARIPIRALA *et al.*, 2014; MUKHERJEE; BASU; ZHANG, 2019), como demonstrado na figura 7. Esses precursores são essenciais para a formação da maioria dos isoprenóides e esteróis, como o ergosterol (MUKHERJEE; BASU; ZHANG, 2019; SUMBRIA; SINGLA, 2019), composto que garante a integridade da bicamada lipídica das membranas celulares, permitindo o crescimento e viabilidade celular de eucariotos, como os parasitos (BIGI; BOANINI, 2018).

Figura 7 – Esquema da ação dos bisfosfonatos nitrogenatos na via do mevalonato.



Os bisfosfonatos nitrogenados (N-BPs) inibem a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS), impedindo assim a síntese de farnesil pirofosfato (FPP) e pirofosfato de geranylgeranyl (GGPP) necessários para a prenilação de proteínas e posterior formação do ergosterol. Fonte: Autoria própria.

2.13 Atividade biológica dos bisfosfonatos nitrogenados

Além de sua eficácia no tratamento de distúrbios ósseos, os BPs exibem uma ampla gama de atividades biológicas que incluem, além da estimulação de células $T\gamma\delta$ do sistema imunológico (DAS *et al.*, 2001; GREEN; LIPTON, 2010; SANDERS *et al.*, 2004), atividade antimicrobiana contra um painel de patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (ABDOU *et al.*, 2016;

ERMER *et al.*, 2018), herbicida (CROMARTIE; FISHER; GROSSMAN, 1999) e antiparasitária contra os agentes etiológicos *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (ARIPIRALA *et al.*, 2012; GADELHA *et al.*, 2020; GHOSH *et al.*, 2004; LING *et al.*, 2005, 2007; MARTIN *et al.*, 2001; MORENO; LI, 2008; MUKHERJEE; BASU; ZHANG, 2019; RODRIGUEZ *et al.*, 2002; ROSSO *et al.*, 2011; SZAJNMAN *et al.*, 2008; TODOLÍ *et al.*, 2009; YARDLEY *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de BPs como compostos antiparasitários direcionados à biossíntese de ergosterol tornou-se uma rota importante para intervenção terapêutica a leishmaniose (ARIPIRALA *et al.*, 2014). Como demonstrado por Yardley e colaboradores (2002), onde em seu estudo *in vivo* contra *L. donovani*, o pamidronato foi ativo por administração intravenosa, e o risedronato teve uma dosagem 50% eficaz de cinco doses intraperitoneais de 2,6 mg/kg de peso corporal contra camundongos Balb/c infectados. E no estudo desenvolvido por Rodriguez e colaboradores (2002) o pamidronato administrado por via intraperitoneal na dose de 10 mg /kg/dia por 5 dias causou regressão total das lesões causadas por *Leishmania mexicana amazonensis* em camundongos Balb/c, evidenciado pelo desaparecimento de amastigotas no local de lesão.

Com base nesses estudos pioneiros sobre o uso de bisfosfonatos nitrogenados na terapia experimental da leishmaniose, agregado as desvantagens do tratamento terapêutico, tais como, reações adversas, regime medicamentoso a longo prazo e a via de administração limitada, com este projeto de pesquisa pretende-se contribuir com novos estudos a identificar compostos à base de BPs que sejam ativos para o tratamento leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiparasitária de vinte e quatro novos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos em *Leishmania amazonensis*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Revisar a literatura a respeito da atividade antiparasitária de compostos à base de bisfosfonatos como potencial antiparasitário;
- b) Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* de vinte e quatro compostos sintéticos à base de bisfosfonatos frente a promastigotas de *L. amazonensis*;
- c) Avaliar *in silico* a interação dos compostos mais promissores à base de bisfosfonatos utilizando como alvo farmacológico a enzima FPPS de *L. major*;
- d) Avaliar possíveis mecanismos de atividade antiparasitária de *L. amazonensis* após o tratamento com os compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mais significativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos sintéticos à base de bisfosfonatos

Os compostos sintéticos à base de BPs utilizados neste estudo foram sintetizados pela Profa. Sandra Gabelli da Universidade Johns Hopkins, Baltimore – EUA e gentilmente cedidos no âmbito do projeto de cooperação com o Laboratório de Imunoparasitologia (LIMPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Sintetizou-se vinte e quatro compostos, na concentração de 10000 micromolar (μM), em seguida foram diluídos em água deionizada estéril para obtenção das concentrações de 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM e 10 μM , sendo todos armazenados em freezer a -20°C .

4.2 Cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*

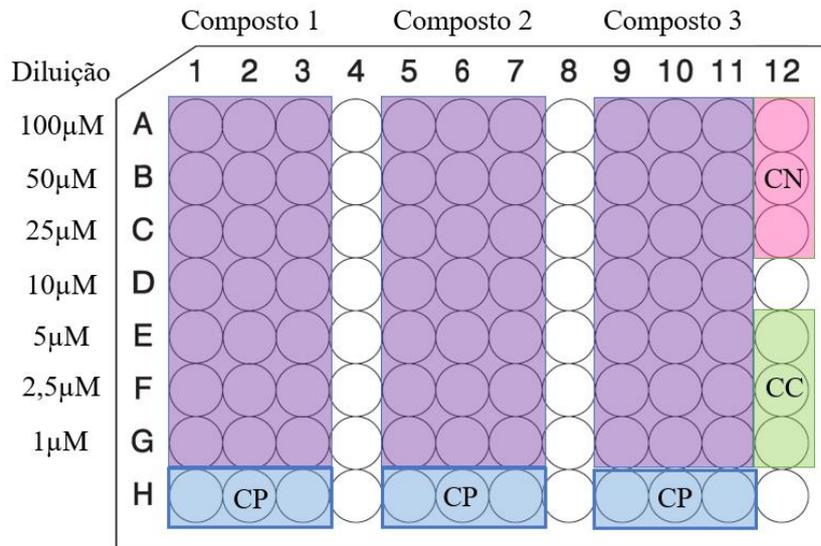
Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/71973/M2269) foram descongeladas e mantidas em cultivos axênicos em meio RPMI 1640 suplementados com estreptomicina e penicilina de 10.000U/mL (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco) inativado, sendo mantidas em estufa incubadora Biological Oxygen Demand (B.O.D.) a 27°C por 5 a 7 dias até atingirem a fase estacionária (SACKS; SILVA, 1987).

4.3 Triagem da atividade antiparasitária dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos frente a promastigotas de *L. amazonensis*

Para identificação de compostos com atividade antileishmania foi realizado o ensaio colorimétrico por resazurina como descrito por Corral e colaboradores (2013), com algumas modificações. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase estacionária de crescimento foram diluídas em meio RPMI 1640 até atingirem a concentração de 1×10^7 parasitos/mL. Posteriormente foi adicionado 180 μl de suspensão do parasito em placas de fundo chato de 96 poços, com 20 μl de diferentes concentrações dos compostos, cobrindo uma faixa de concentração de 100 μM a 1 μM , em seguida as placas foram incubadas em estufa B.O.D. a temperatura de 27°C . Cada concentração dos compostos foi avaliada em triplicada. Poços de controle contendo apenas meio de cultura denominado de controle negativo (CN), poços com a maior concentração dos compostos – Controle de compostos

(CC) e poços com cultura de parasitos não tratadas – Controle positivo (CP), foram incluídos (figura 8).

Figura 8 - Esquema da microplaca utilizada para ensaio de inibição do crescimento parasitário.

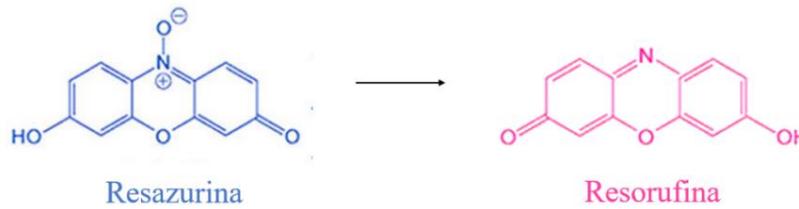


As diluições dos compostos foi realizada nas linhas de A até G sinalizados na figura pela cor roxa. A linha H, com a cor azul, foi utilizada como controle positivo (CP) para crescimento de parasitos, na ausência de compostos; na coluna 12 representado pela cor rosa foi utilizado o controle negativo, contendo apenas meio estéril; e ainda na coluna 12, mas com a cor verde, foi utilizado o controle dos compostos, na ausência de parasitos. Fonte: Autoria própria.

Após 24 horas de exposição ao composto, 20 µL de resazurina a 1mM (Sigma-Aldrich Co.) foi adicionado em cada poço, permitindo a obtenção do ensaio colorimétrico, que é amplamente utilizado na triagem de compostos com potencial leishmanicida por serem simples de usar, baratos e atóxico para os parasitos (BASTOS *et al.*, 2017).

A resazurina é um sal de sódio utilizado como um indicador redox permeável às células, cujo princípio subjacente a este corante é a redução enzimática da forma oxidada não fluorescente resazurina (solução de cor azul), para a forma reduzida fluorescente resorufina (solução de cor rosa), como demonstrado na figura 9, cuja a quantidade produzida da resorufina é proporcional ao número de células viáveis (RISS *et al.*, 2016).

Figura 9 - Redução de células viáveis pela conversão da resazurina em resorufina.



A resazurina, um corante não fluorescente de cor azul, é convertida em resorufina, um produto fluorescente rosa.

Fonte: Adaptado de RISS e colaboradores (2016).

Novamente as placas foram incubadas por mais 24 horas. Após esse período, a absorbância foi quantificada usando um leitor de microplacas (Epoch, BioteK, EUA). Entretanto, as duas formas do corante (oxidada ou reduzida) absorvem luz em comprimentos de onda diferentes (CORRAL *et al.*, 2013), com isso as leituras foram feitas a 570 nm (detecção da forma reduzida) e 600 nm (detector da forma oxidada). A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{[A_{570T} - (A_{600T} \times RO)]}{[A_{570CP} - (A_{600CP} \times RO)]} \times 100$$

Nessa fórmula, A_{570} = absorbância a 570nm, A_{600} = absorbância a 600nm, T = poços de tratamento, CP = poços de controle positivo e RO é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (CN), com ausência de parasitos, contendo apenas meio nutritivo e resazurina [$RO = (A_{570CN} / A_{600CN})$].

Apesar de apresentar diversas vantagens, alguns fatores como a temperatura e o tempo de incubação podem influenciar o metabolismo da resazurina, assim como as células mortas, que podem produzir fortes sinais fluorescentes indicando resultados falso-positivos (BASTOS *et al.*, 2017). Devido a esses possíveis fatores de interferência, fez-se também a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer.

Após a triagem dos vinte e quatro compostos sintéticos à base de BPs, foi selecionado os que apresentaram inibição de promastigostas de *L. amazonensis* numa faixa superior a 50% da concentração de 100 μ M para determinação de valores de IC_{50} .

4.4 Avaliação *in silico* da interação dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mais promissores à enzima FPPS de *L. major*

Os compostos mais promissores a atividade antiparasitária, foram utilizados também para estudos de acoplamento molecular computacional, conhecidos como docagem, ancoragem ou *docking* molecular, de modo que fosse observado as possíveis ligações entre os compostos, 1656 e 1662, à proteína FPPS, encontrada em protozoários de *Leishmania*. Entretanto, como as estruturas químicas dos compostos não possuem depósito em bancos de dados, seus desenhos em 2D foram realizados utilizando o ChemSketch v. 12.0 e em seguida, com o auxílio do software Avogrado v. 1.2.0 foi obtido as estruturas tridimensionais de ambos compostos. Para otimizar a topologia 3-D da estrutura química dos compostos foi utilizado o software Automated Topology Build (ATB), onde as angulações, torções, nível energético e a forma estrutural foram melhoradas. As estruturas proteicas cristalizadas da proteína FPPS foi adquirida a partir do *protein data bank* (PDB – site <https://www.rcsb.org/>; número de identificação: 4K10), entretanto o único depósito de *Leishmania* encontrado refere-se a espécie *L. major*, e dos modelos validados, foi realizado o ancoramento usando o software AutoDock Vina (PETTERSEN *et al.*, 2004), que parametriza o ancoramento, onde a estrutura proteica do parasito fica imóvel e os possíveis ligantes dos compostos é permitido o movimento, na busca do melhor encaixe, sendo visualizado por meio do software UCSF CHIMERA v.1.1.4 (TROTT; OLSON, 2012).

4.5 Avaliação dos possíveis mecanismos de atividade antiparasitária de compostos sintéticos à base de bisfosfonatos

Os compostos com significativa atividade antiparasitária para promastigostas de *L. amazonensis* foram submetidos ao ensaio de fixação de Anexina V conjugada com o fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC - Annexin V FITC Apoptosis detection Kit - Invitrogen) e Iodeto de propídio (PI) para análise do possível mecanismo de morte celular. A anexina V-FITC é uma proteína de ligação a fosfolipídios dependente de Ca^{2+} como a fosfatidilserina (PS), que é exposto na superfície da membrana celular no estágio inicial de apoptose. Já o PI permeia as células em decomposição e se liga ao DNA ou RNA, servindo como marcador de um estágio de apoptose tardia ou necrose (ROM *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2020).

Com isso, para o desenvolvimento do teste, inicialmente, os parasitos mantidos em garrafas de cultivo de células foram transferidos para tubos falcon e centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente foram lavados e resuspenso com PBS 1x gelado e adicionado 10 µl do marcador anexina V-FITC (marcador de apoptose) por um período de 15 minutos. Em seguida, foram novamente centrifugados e o pellet formado foi resuspendido com PBS 1x gelado e adicionado o marcador PI (marcador de necrose). A seguir a porcentagem de células viáveis e apoptóticas foi determinada por leitura no citômetro de fluxo (*FACSCanto II*, *BD Biosciences*, OR, USA) na UFRN, nos comprimentos de onda de 488 e 633 nm. Foram analisadas as marcações de morte celular nos estágios de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose nas concentrações de 100µM e 50µM dos compostos 1656 e 1662, após 24 horas de tratamento. Os resultados foram descritos no software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR, EUA) e 10.000 eventos foram quantificados para cada uma das análises realizadas.

4.6 Análise estatística

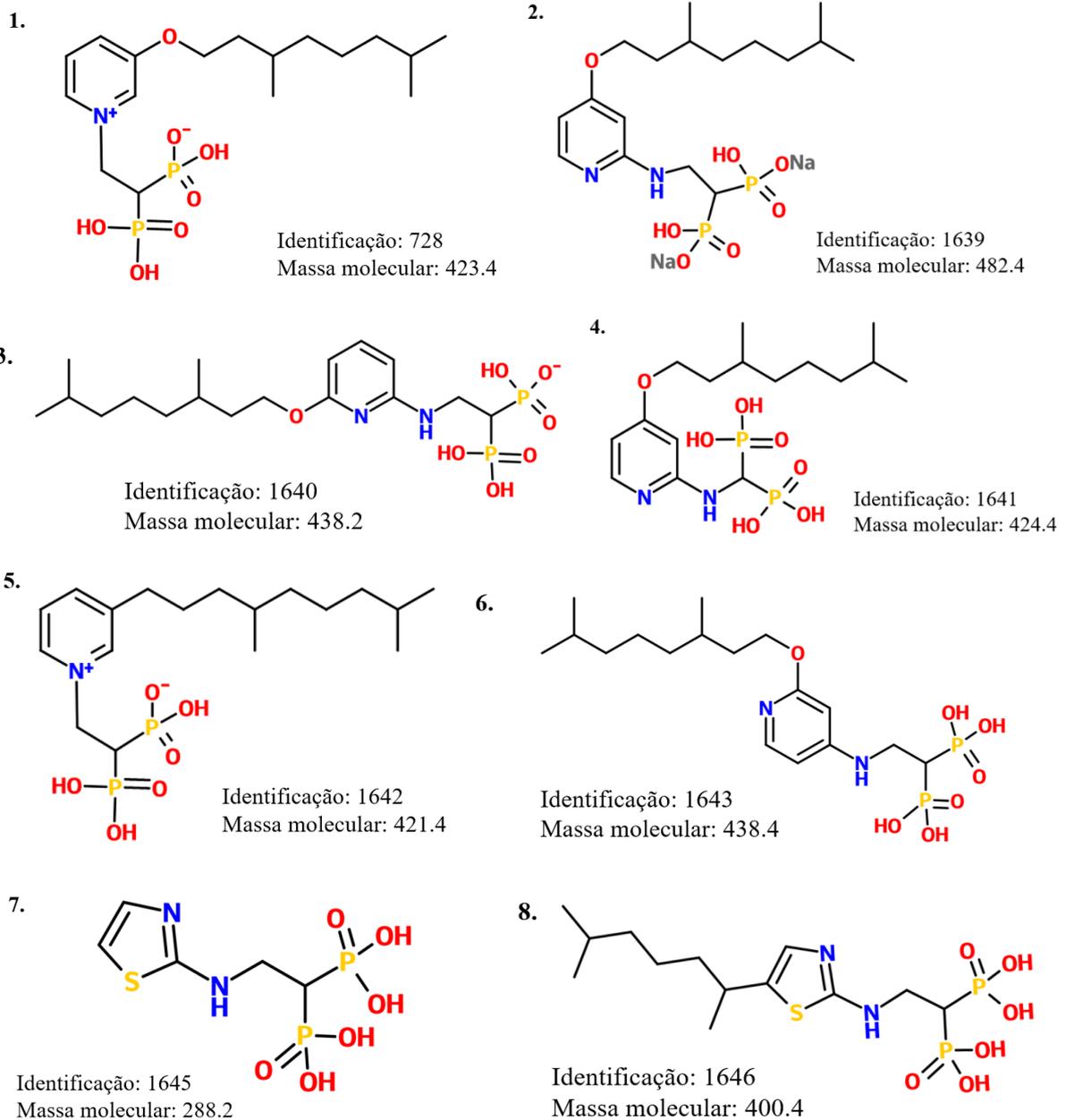
A análise estatística dos resultados foi realizada pelos programas Microsoft Excel® (Microsoft Co.) 2016 e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são expressos com valores médios e desvio padrão, e analisados por variância (ANOVA) bem como o teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

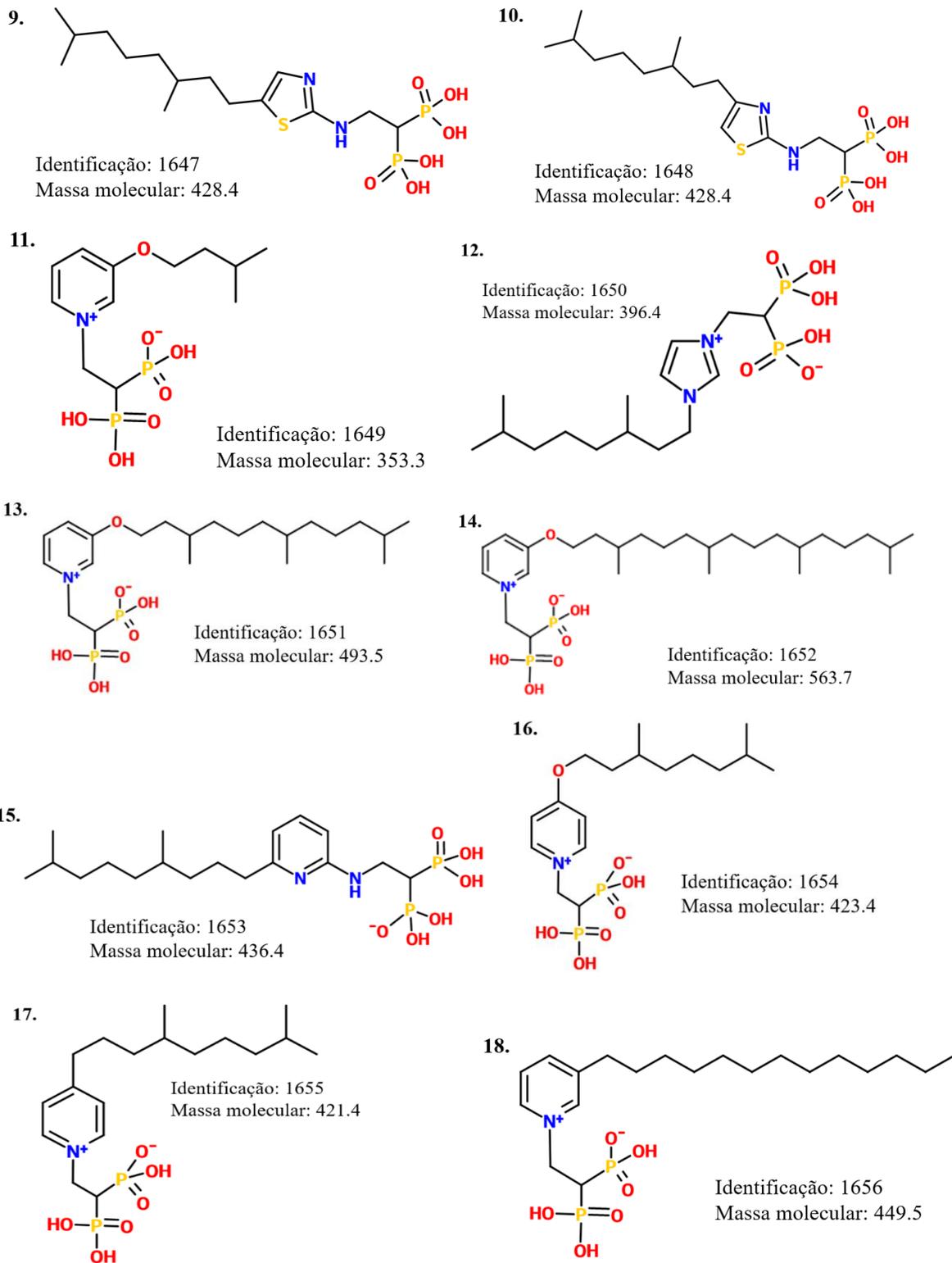
5.1 Identificação dos compostos sintéticos à base de bisfosfonatos

Neste trabalho vinte e quatro compostos sintéticos à base de bisfosfonatos foram produzidos na concentração de 10000 μM e codificados conforme a figura 10.

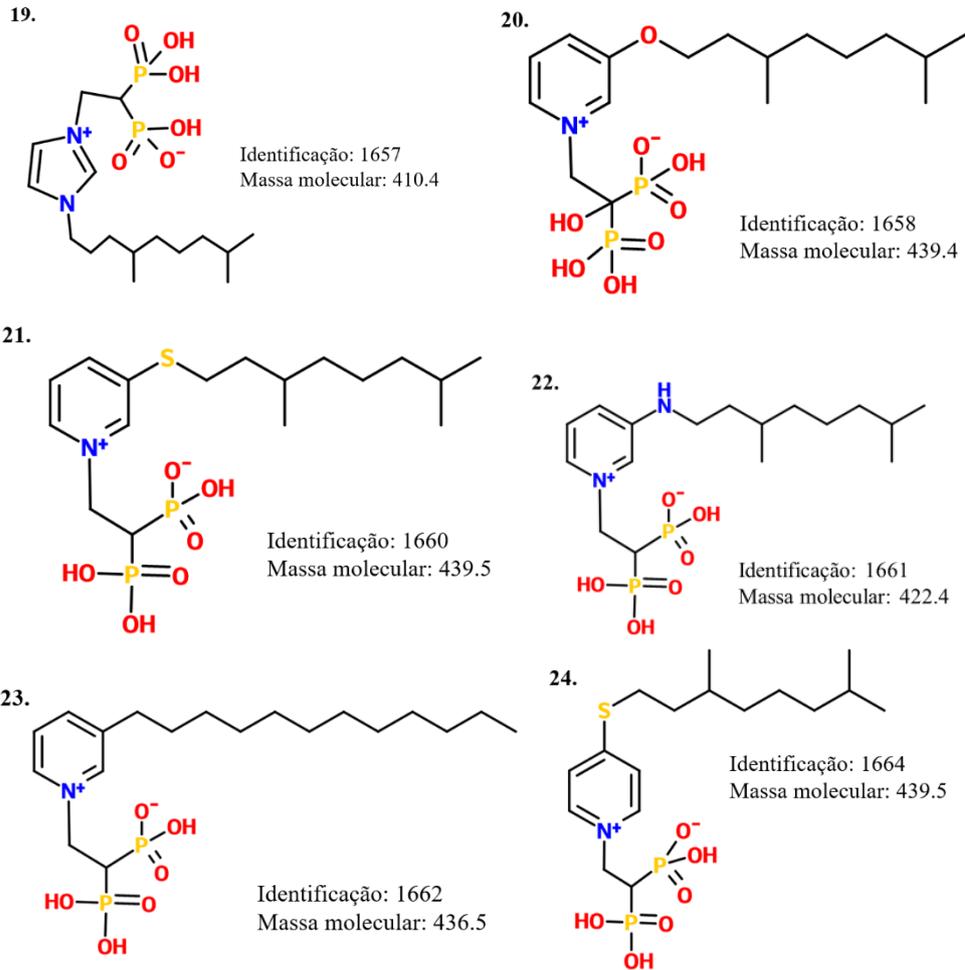
Figura 10 - Código de identificação, estrutura química e massa molecular dos 24 compostos sintéticos à base de BPs.



(Continuação da figura 10)



(Continuação da figura 10)

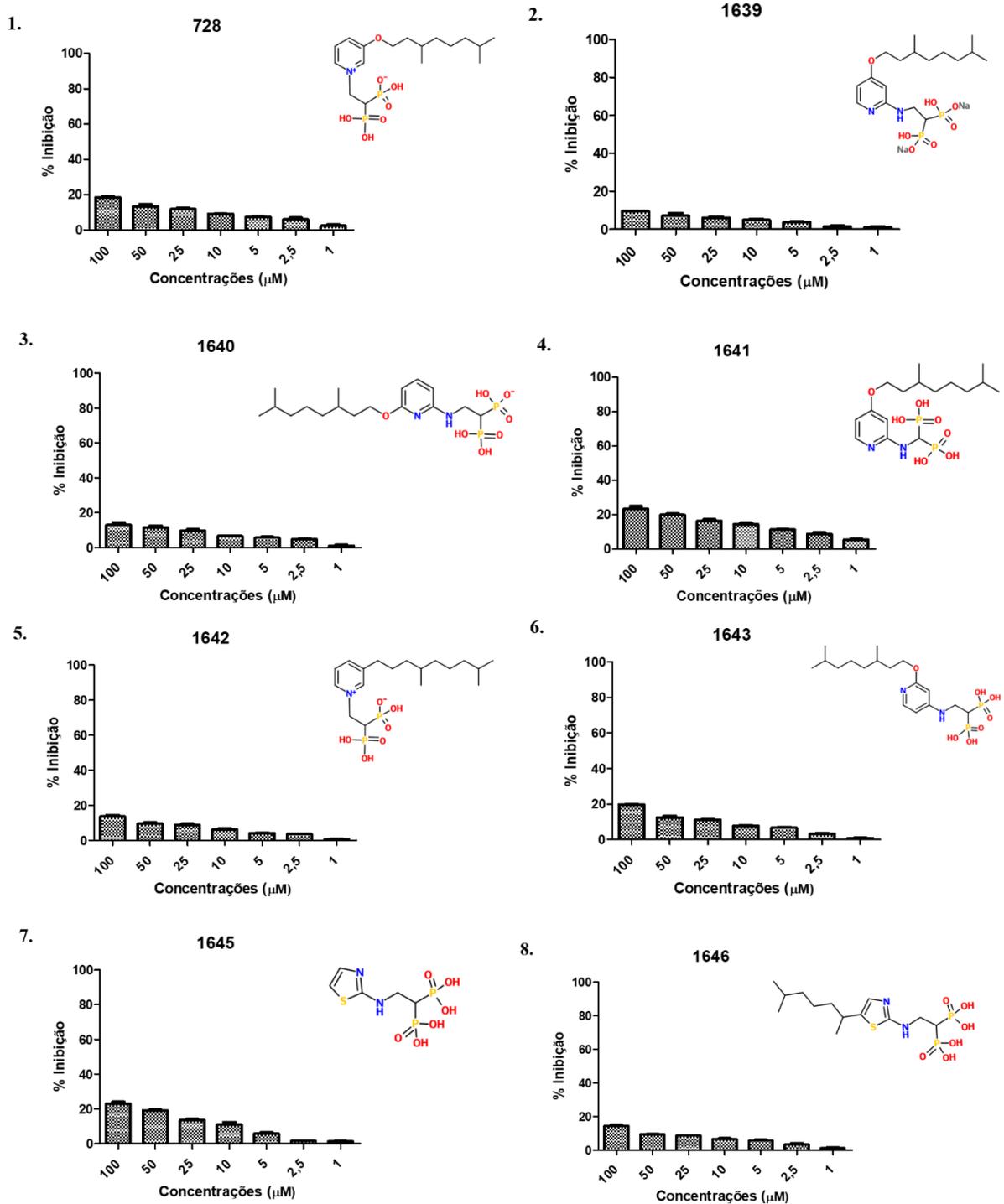


Fonte: Autoria própria.

5.2 Triagem antiparasitária de promastigotas de *L. amazonensis* por compostos sintéticos à base de bisfosfonatos

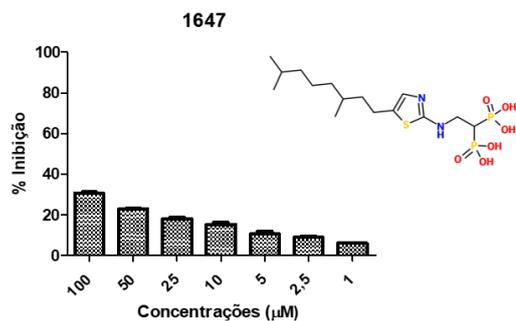
Posteriormente, os 24 compostos sintéticos a base de bisfosfonatos, foram submetidos a triagem parasitológica de 24 horas contra promastigotas de *L. amazonensis*, que apesar de ser a forma evolutiva encontrada no inseto vetor, mas segundo Gadelha e colaboradores (2020), apresentam uma boa inibição à via do ergosterol, uma vez que exibem uma alta expressão de FPPS avaliada por RNA.

Figura 11 - Triagem antiparasitária dos compostos sintéticos à base de BPs em promastigotas de *L. amazonensis*.

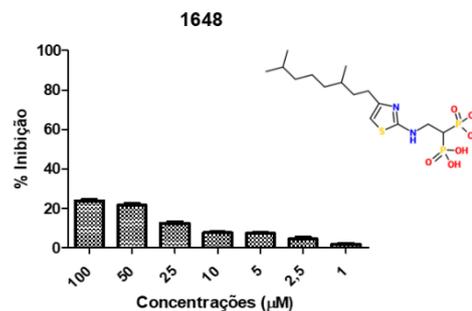


(Continuação da figura 11)

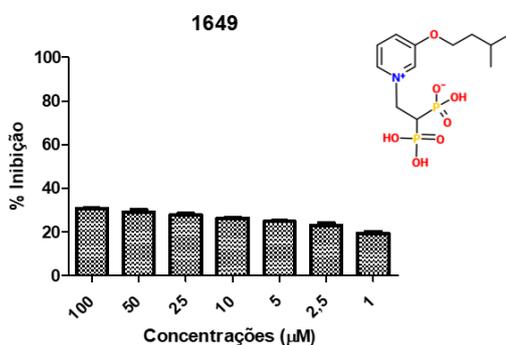
9.



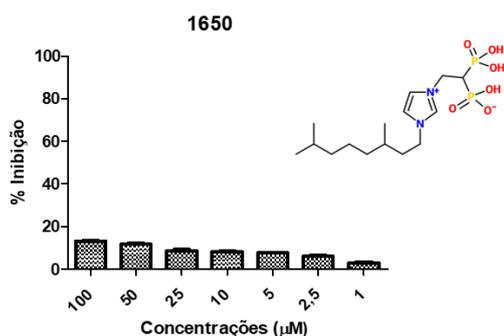
10.



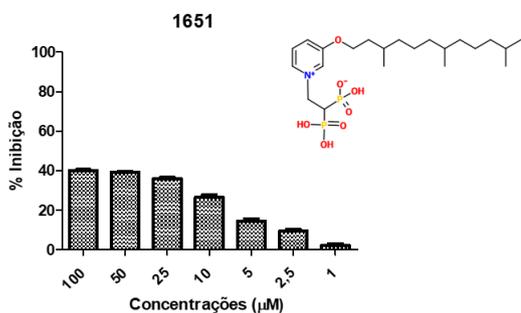
11.



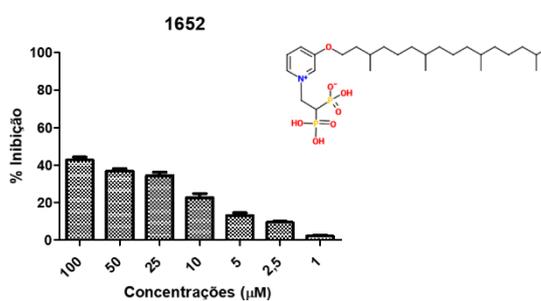
12.



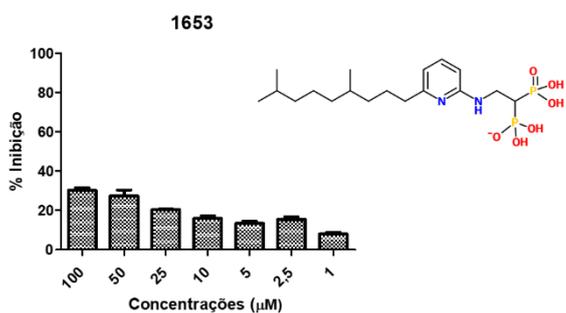
13.



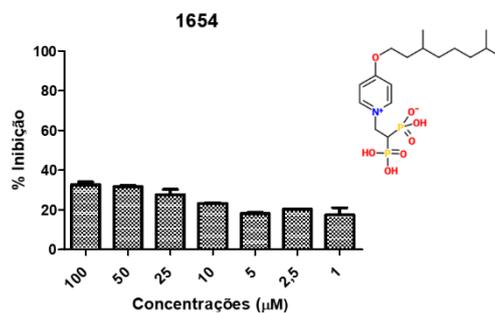
14.



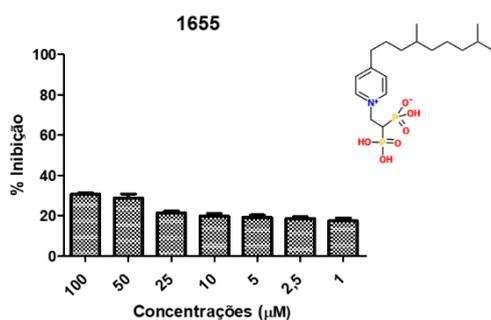
15.



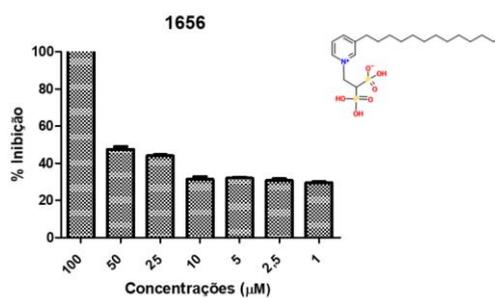
16.



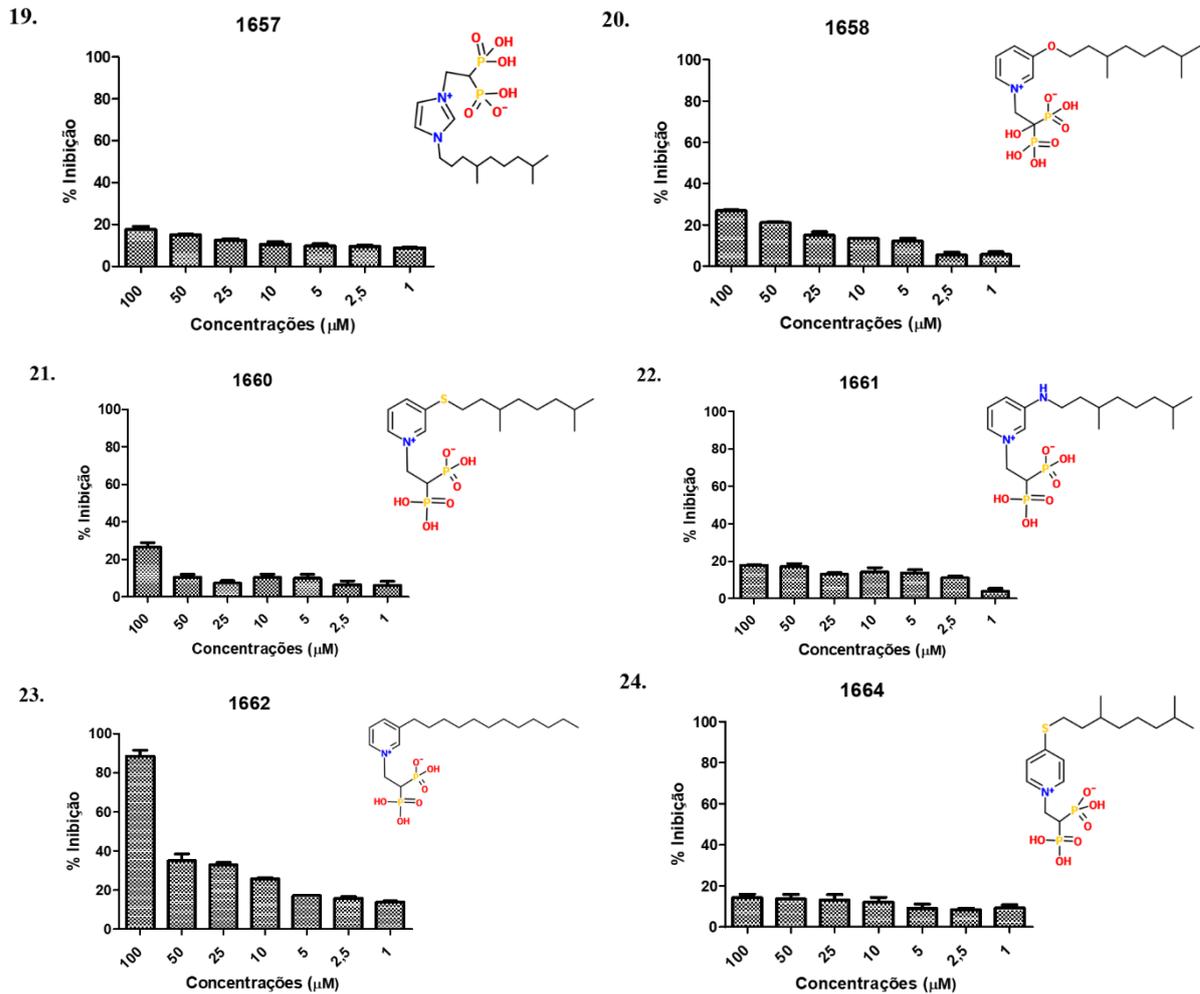
17.



18.



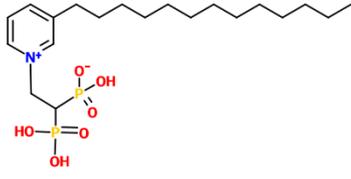
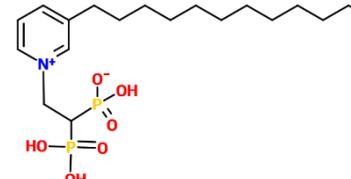
(Continuação da figura 11)



Inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* por 24 compostos sintéticos à base de BPs. Os parasitos foram ajustados a 1×10^7 parasitos/mL e incubados em triplicata na presença de 100 a 1 µM de cada composto. Os parasitos foram expostos ao tratamento de 24 horas, com a adição de resazurina para leitura no espectrofotômetro. Os valores são expressos com média \pm desvio padrão do resultado obtido em três testes independentes em triplicata (n=3). Fonte: Autoria própria002E

Nota-se neste trabalho que os compostos com cadeia lateral longa e sem ramificações apresentaram maior atividade antiparasitária, descritos como 1662 e 1656, na concentração de 100 µM, exibiram valores de 88% ($IC_{50} = 52,86$ µM) e 100% ($IC_{50} = 58,39$ µM), respectivamente (Figura 11 e Quadro 3). Em outros estudos, compostos derivados de N-BPs com essas mesmas características na cadeia lateral foram eficazes contra *T. cruzi* (GALAKA *et al.*, 2017) e *T. brucei* a $2,5 \times 10^3$ parasitos/mL durante tratamento de 72 horas (YANG *et al.*, 2015).

Quadro 3 – IC₅₀ dos compostos sintéticos à base de BPs sobre o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*.

Código de identificação	Estrutura química	IC ₅₀ (µM)
1656		58,39
1662		52,86

IC₅₀ = Concentração capaz de inibir em 50% o número de protozoários em cultura. Fonte: Autoria própria.

Além disso, observa-se que pequenas mudanças no número de carbonos na cadeia alquil influenciam a ação biológica desses compostos, como o 1656 e 1662, que possuem estruturas química semelhantes, divergindo apenas no número de carbonos, contendo 13 e 12 carbonos, respectivamente (Quadro 3). Sendo que, o composto 1656 com o maior número de carbonos, foi também o de maior atividade antiparasitária (figura 11). Percebe-se esse mesmo comportamento, com o ibandronato, um *n*- alquil bisfosfonato que possui uma cadeia lateral com sete carbonos, e no estudo desenvolvido por Martin e colaboradores (2002) apresentou IC₅₀ = 1 µM contra tripomastigotas de *T. brucei*.

Constata se também, que os compostos contendo enxofre são exemplos interessantes de antiparasitários, como 1645, 1646, 1647, 1648, 1660 e 1664 (figura 11), sendo essa característica perceptível quando comparamos os compostos 1661 e 1660, que possuem estruturas química semelhantes, porém a presença do nitrogênio no 1661 foi substituída pelo enxofre no 1660, resultando um aumento de 9% da inibição parasitária (figura 11). Confirmando este conceito, Galaka e outros colaboradores (2019) reportaram que BPs lineares contendo enxofre foram eficientes agentes anti- *Toxoplasma*.

Desses 24 compostos testados, com exceção dos 1662 e 1656, os demais apresentaram atividade antiparasitária abaixo de 50%. Entretanto, todos obtiveram influência na redução parasitária contra 1×10⁷ promastigotas/mL de *L. amazonensis*, inclusive o menor valor encontrado foi de 9% correspondendo ao composto 1639.

N-BPs, como o pamidronato, alendronato e risedronato, foram testados em diversos estudos parasitológicos, inicialmente em 1999, por Urbina e colaboradores, onde o

pamidronato na concentração de 100 μM inibiu 85% ($\text{IC}_{50} = 65 \mu\text{M}$) da proliferação *in vitro* de amastigotas de *T. cruzi*. Um ano depois, Rodrigues e colaboradores (2000), utilizaram pamidronato, risedronato e alendronato, nas concentrações de 75 μM , 100 μM e 100 μM , respectivamente, e apresentaram inibição intracelular para *T. gondii* de 70% ($\text{IC}_{50} = 42 \mu\text{M}$), 50% ($\text{IC}_{50} = 95 \mu\text{M}$) e 60% ($\text{IC}_{50} = 37 \mu\text{M}$), na mesma ordem, após tratamento de 19 horas.

Em 2002, Martin e colaboradores usaram o risedronato nas concentrações de 83,54; 27,85; 9,27; 3,09; 1,03 e 0,33 μM e observaram a inibição de 100; 100; 86,49; 23,49; 19,30 e 0%, na mesma sequência das concentrações, no crescimento de tripomastigotas de *T. brucei rhodesiense* a 1×10^5 parasitos/mL com tratamento de 72 horas, e obteve um valor de $\text{IC}_{50} = 4,12 \mu\text{M}$. Já, em 2004 o mesmo fármaco foi testado por Garzoni e colaboradores, para inibição da proliferação de 10^6 epimastigotas/mL das cepas Y e EP de *T. cruzi*, nas concentrações de 25 μM a 400 μM , e adquiriram valores de $\text{IC}_{50} = 30,3 \mu\text{M}$ e $26,4 \mu\text{M}$, para as ambas estirpes consecutivamente.

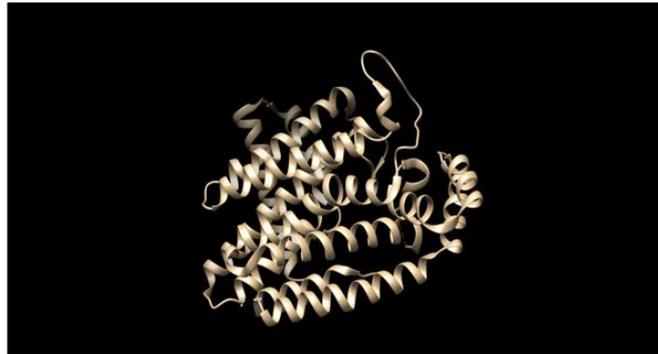
Em 2011, Jordão e colaboradores, notaram inibição de 55,2% ($\text{IC}_{50} = 20,3 \mu\text{M}$) no crescimento de *Plasmodium falciparum* (Agente causador da Malária) após 48 horas de tratamento por risedronato, na concentração de 1000 nM. Por fim, no estudo desenvolvido por Gadelha e colaboradores (2020), o risedronato, ibandronato e alendronato nas concentrações 5 μM a 500 μM , com tratamento de 72 horas contra 10^6 promastigotas/mL de *L. infantum*, obtiveram valores de IC_{50} , igual a 13,8 μM , 85,1 μM e 112,2 μM , respectivamente. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de estudos acerca da atividade antiparasitária dos N-BPs e seus derivados.

5.3 Estudo *in silico* dos compostos à base de bisfosfonatos à proteína FPPS de *L. major*

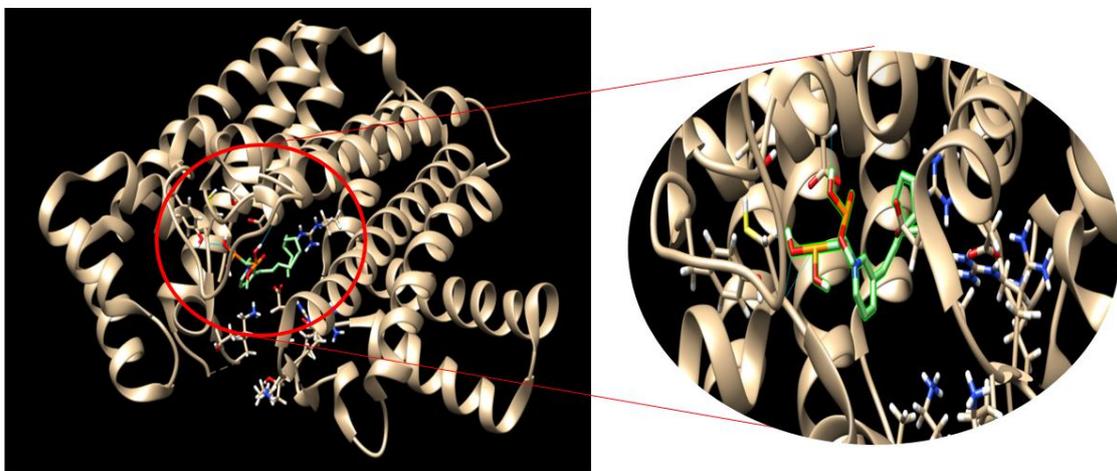
O *docking* molecular é uma técnica computacional usada para prever como uma proteína interage com os compostos ativos. Desta forma, através da figura 12 percebe-se que o ancoramento dos compostos mais promissores, 1656 e 1662 atuando no centro ativo das estruturas proteicas cristalizadas da proteína FPPS de *L. major*, mostraram-se estáveis e com interações entre seis pontes de hidrogênio em cada composto.

Figura 12 – Modelo *in silico* dos compostos sintéticos à base de BPs mais promissores e a proteína FPPS de *L. major*.

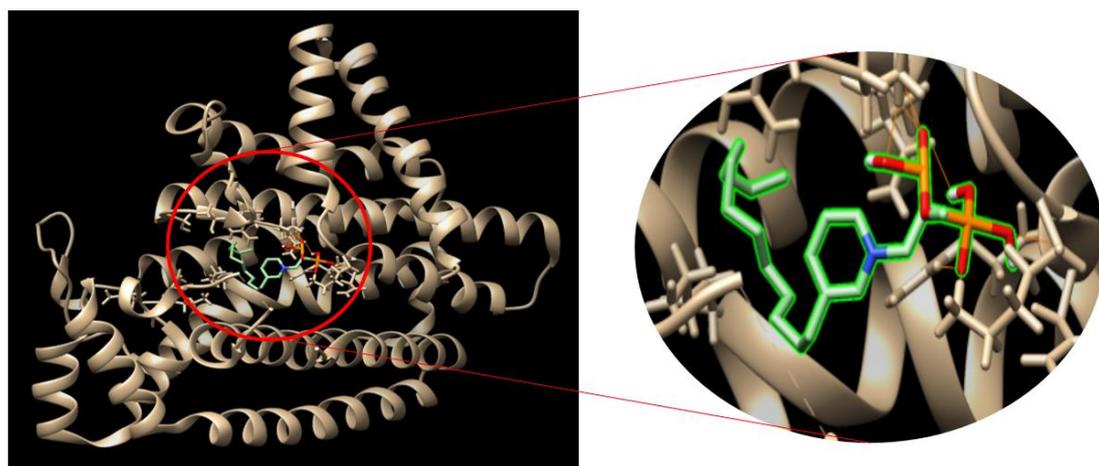
A.



B.



C.



(A) Estrutura tridimensional da proteína FPPS de *L. major*, (B) interação da proteína FPPS com o composto 1656 e (C) e o composto 1662. Fonte: Autoria própria.

Corroborando com outros estudos, onde diferentes inibidores da classe N-BPs como, o risedronato (CHENG; OLDFIELD, 2004; LIU *et al.*, 2018; METELYTSIA *et al.*, 2019),

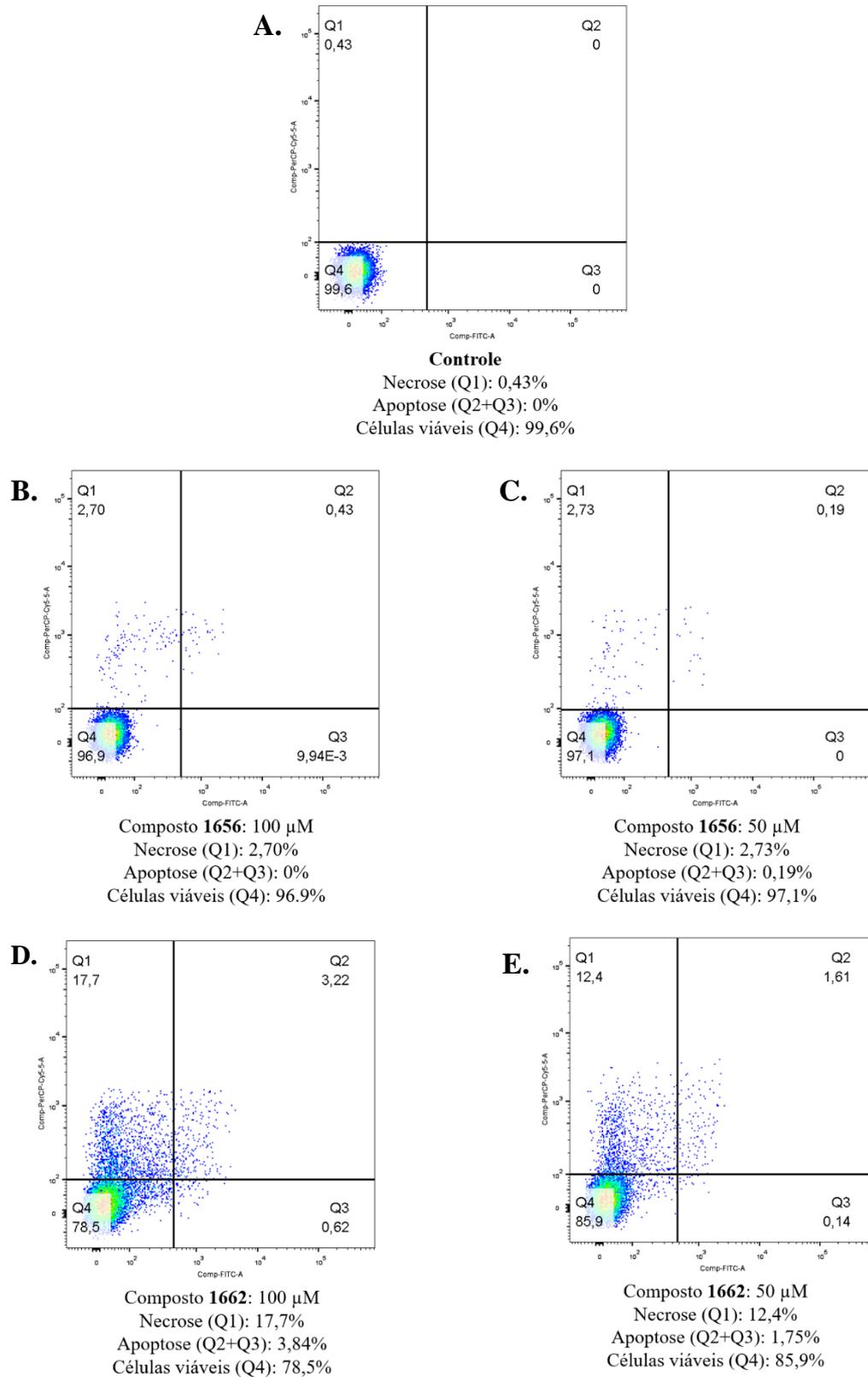
zoledronato (LIU *et al.*, 2018) e alendronato (METELYTSIA *et al.*, 2019), foram acoplados com a enzima ligante FPPS e apresentaram fortes interações eletrostáticas através de pontes de hidrogênio. Entretanto, essas fortes interações só foram observadas em BPs com presença de nitrogênio. Há exemplo, foi o estudo desenvolvido por Montalvetti e colaboradores (2001), onde o etidronato, bisfosfonato sem nitrogênio, não forneceu interação eletrostática com o sítio alvo, a proteína FPPS de *T. cruzi*, apenas uma interação hidrofóbica mínima. Ao contrário, o risedronato, pertencente ao agrupamento dos N-BPs, demonstrou uma interação eletrostática muito mais favorável com a proteína. e maior interação hidrofóbica.

5.4 Análise dos possíveis mecanismos da atividade antiparasitária de *L. amazonensis* após tratamento com os compostos sintéticos à base de bisfosfonatos mais promissores

Os compostos 1656 e 1662 também foram avaliados por dupla fixação de Anexina V-FITC (marcador de apoptose inicial) e PI (marcador de apoptose tardia ou necrose). Sendo assim, cada gráfico (figura 13) é dividido por quatro quadrantes, quadrante 1 (Q1) indica as células marcadas somente com PI (células em necrose), o quadrante 2 (Q2) representa as células com dupla marcação, ou seja, com anexina V-FITC e PI (células em apoptose tardia), o quadrante 3 (Q3) mostra as células marcadas somente com anexina V-FITC (células em apoptose inicial) e o quadrante 4 (Q4) são das células que apresentaram nenhuma marcação (células viáveis).

O tratamento com o composto 1656 não apresentou valores de indução de apoptose nas concentrações de 100 μ M e 50 μ M. Já, o composto 1662 apresentou um total de apoptose de 3,84%, distribuída em 3,22% em apoptose tardia e 0,62% em apoptose inicial na concentração de 100 μ M, e um total de apoptose de 1,75% na concentração de 50 μ M, distribuída em 1,61% em apoptose tardia e 0,14% em apoptose inicial. Também foi observado o efeito de necrose em ambos compostos, onde o 1662 apresentou maior resultado, com valores de 17,7% na concentração de 100 μ M e 12,4% em 50 μ M, e o composto 1656 com 2,70% e 2,73% seguindo a mesma ordem de concentração (Figura 13).

Figura 13 - Análise dos possíveis mecanismos da atividade antiparasitária de *L. amazonensis* tratados com os compostos 1656 e 1662.



Os compostos 1656 e 1662 nas concentrações de 100 µM e 50 µM, foram submetidos aos ensaios de fixação por Anexina V e PI para avaliação do mecanismo de morte celular de *L. amazonensis*, após tratamento de 24 horas.

(A) Controle com promastigotas não tratados com compostos; (B) Tratamento com o composto 1656 na concentração de 100 μM ; (C) Tratamento com o composto 1656 na concentração de 100 μM ; (D) Tratamento com o composto 1662 na concentração de 100 μM e (E) Tratamento com o composto 1662 na concentração de 50 μM . Para análise dos gráficos foi realizado o delineamento dos quadrantes, onde no quadrante inferior esquerdo encontra-se a incidência de células viáveis (Q4) e no superior esquerdo a necrose (Q1). Já no quadrante superior direito, a incidência de apoptose tardia (Q2) e no inferior direito, as células em apoptose inicial (Q3).
Fonte: Autoria própria.

Estes dados indicam que os compostos 1656 e 1662 causaram alterações na membrana do parasito, gerando poros que possibilitem a permeabilidade do marcador PI, que penetra e fixa facilmente ao DNA ou RNA das membranas das células não viáveis, indicando morte celular por necrose e/ou apoptose tardia (MASCOTTI; MCCULLOUGH; BURGER, 2000). Além disso, os resultados sugerem que os compostos suscitam um mecanismo regulador de morte celular diferente ou inibem possíveis alvos de fixação do marcador anexina V, uma vez que os bisfosfonatos possuem a capacidade de ligarem se a íons de cálcio (Ca^{2+}) (STEINMETZ *et al.*, 2020), utilizado pela anexina V marcada com o fluorocromo FITC para ligação com fosfolípidios com carga negativa, como a PS (ERAY *et al.*, 2001), podendo gerar competição pelo uso de íons de Ca^{2+} entre os bisfosfonatos e a anexina V, ocasionando impacto na viabilidade do ensaio de fixação por Anexina V.

Nesse sentido, precisamos continuar os estudos sobre a atividade antileishmanial desses vinte e quatro compostos sintéticos à base de bisfosfonatos para determinar o seu potencial inibitório. Uma vez que, os dados apresentados sugerem que os N-BPs e seus derivados podem ser potenciais candidatos à quimioterapia em uma variedade de doenças infecciosas negligenciadas, incluindo a leishmaniose (ARIPIRALA *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÕES

Com esse trabalho vinte e quatro compostos sintéticos novos à base de bisfosfonatos apresentaram inibição parasitária contra promastigotas de *L. amazonensis* com tratamento de 24 horas, sendo que desses compostos, os denominados de 1656 e 1662, foram mais promissores, por apresentarem inibição acima de 50%.

No ensaio de *docking* molecular esses compostos mais promissores obtiveram interações por pontes de hidrogênio com a enzima FPPS de *L. major*. Além disso, pelo ensaio de fixação de Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio demonstraram necrose, e o composto 1662 apoptose tardia.

Devido ao bom desempenho *in vitro* dos compostos 1656 e 1662 frente a *L. amazonensis*, sugere-se que esses compostos sejam potenciais candidatos à quimioterapia. Uma vez que a principal medida de controle dessa doença é através de programas de tratamento terapêutico, com este projeto de pesquisa pretende-se contribuir com as iniciativas públicas encorajando novos estudos a identificar composto(s) ativo(s) para o controle da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH AFSHAR, M. J. *et al.* Canine visceral leishmaniasis; A seroepidemiological survey in Jiroft district, Southern Kerman Province, Southeastern Iran in 2015. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 13, n. 1, p. 67–71, 2018.
- ABDOU, W. M. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of newly synthesized N,S-Bisphosphonate derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 525–532, 2016.
- ABONGOMERA, C. *et al.* Severe post-kala-azar dermal leishmaniasis successfully treated with miltefosine in an Ethiopian HIV patient. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 221–224, 2019.
- ABU AMMAR, A. *et al.* Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 1, p. 76–84, 2019.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86–90, 2017.
- AKHOUNDI, M. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 2017.
- ALCÂNTARA, L. M. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430–439, 2018.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.
- ALMEIDA, R. P. *et al.* Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 2, p. 178- 184., 1986.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ARIPIRALA, S. *et al.* Design, synthesis, calorimetry and crystallographic analysis of 2-

alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl diphosphate synthase. **J Med Chem.**, v. 55, n. 14, p. 6445–6454, 2012.

ARIPIRALA, S. *et al.* Structural and thermodynamic basis of the inhibition of *Leishmania major* farnesyl diphosphate synthase by nitrogen-containing bisphosphonates. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 3, p. 802–810, 2014.

ATAN, N. A. D. *et al.* Metabolomics-based studies in the field of Leishmania /leishmaniasis . **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 383–390, 2018.

ÁVILA, M. M. *et al.* Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

BAHRAMI, S. *et al.* Isobologram curve of leishmanicidal effects of amiodarone and ketoconazole. **Jundishapur Journal of Health Sciences**, v. 9, n. 4, p. e57990, 2017.

BARBOSA, F. M. C. *et al.* Extracellular Vesicles Released by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. v. 9, n. December, p. 1–14, 2018.

BASTOS, M. S. *et al.* Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.

BERGER, B. A. *et al.* Pathophysiology of leishmania infection during pregnancy. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 935–946, 2017.

BIGI, A.; BOANINI, E. Calcium phosphates as delivery systems for bisphosphonates. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 6, 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial.** [s.l.: s.n.]. v. 52

BRITO, R. C. F. *et al.* Peptide vaccines for leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1043, 2018.

CAMACHO, E. *et al.* Complete assembly of the *Leishmania donovani* (HU3 strain) genome

and transcriptome annotation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

CASA, D. M. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 12–18, 2018.

CAVALCANTI, D. P.; SOUZA, W. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, v. 2018, p. 10, 2018.

CECÍLIO, P. *et al.* Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–26, 2017.

CHENG, F.; OLDFIELD, E. Inhibition of isoprene biosynthesis pathway enzymes by phosphonates, bisphosphonates, and diphosphates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 5149–5158, 2004.

CHMIELEWSKA, E.; KAFARSKI, P. Physiologic activity of bisphosphonates – Recent advances. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**, v. 3, n. 1, p. 56–78, 2016.

CHRISTENSEN, A. T. *et al.* Studies of the effectiveness of bisphosphonate and vanadium-bisphosphonate compounds in vitro against axenic leishmania tarentolae. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 12, 2016.

CIPRIANI, M. *et al.* Multi-target heteroleptic palladium bisphosphonate complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 509–519, 2020.

CORRAL, M. J. *et al.* Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 2, p. 111–116, 2013.

COUTO, I. M. . *et al.* Visceral leishmaniasis: Epidemiology and health education. **Open Journal of Epidemiology and Public Health**, v. 1, n. 7, p. 1–5, 2018.

CROMARTIE, T. H.; FISHER, K. J.; GROSSMAN, J. N. The discovery of a novel site of action for herbicidal bisphosphonates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 63, n. 2, p. 114–126, 1999.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniasis control in the context of one health.

Emerging Infectious Diseases, v. 25, n. 12, 2019.

DAS, H. *et al.* V γ 2V δ 2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1616–1618, 1 Sep. 2001.

DEMORO, B. *et al.* Ibandronate metal complexes: solution behavior and antiparasitic activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 303–312, 2018.

DINESH, N. *et al.* Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 21–29, 2017.

DIRO, E. *et al.* Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2015.

DLAMINI, N. L. *et al.* Carbon nanospheres conjugated bisphosphonates: synthesis, characterization and in vitro antimalarial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup3, p. S287–S296, 2018.

ERAY, M. *et al.* Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of Annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 43, n. 2, p. 134–142, 2001.

ERMER, M. A. *et al.* *In vitro* investigation of the antimicrobial effect of three bisphosphonates against different bacterial strains. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 3, p. 553–560, 2018.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

ESFANDIARI, F. *et al.* Paromomycin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and targeted drug delivery against leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 197, n. July, p. 105073, 2019.

FLEISCH, H.; BISAZ, S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. **The American journal of physiology**, v. 203, p. 671–675, 1962.

FRANÇA, A. O. *et al.* Leishmania infection in blood donors: A new challenge in leishmaniasis transmission? **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2018.

GABELLI, S. B. *et al.* Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from

Trypanosoma cruzi: Implications for drug design. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 62, n. 1, p. 80–88, 2006.

GADELHA, A. P. R. *et al.* Insights about the structure of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) and the activity of bisphosphonates on the proliferation and ultrastructure of *Leishmania* and *Giardia*. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 168, p. 1–18, 2020.

GALAKA, T. *et al.* Antiparasitic activity of sulfur- and fluorine-containing bisphosphonates against trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–22, 2017.

GALAKA, T. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1-alkylaminomethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 16, p. 3663–3673, 2019.

GALLUZZI, L. *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

GARDE, E. *et al.* Analysis of the antigenic and prophylactic properties of the leishmania translation initiation factors eIF2 and eIF2B in natural and experimental leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

GARZONI, L. R. *et al.* Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 273–285, 2004.

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

GHOSH, S. *et al.* Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 175–187, 2004.

GIRAUD, E. *et al.* Osteopontin in the host response to *Leishmania amazonensis*. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2019.

GONZÁLEZ, A. M.; SOLÍS-SOTO, M. T.; RADON, K. Leishmaniasis: Who uses personal protection among military personnel in Colombia? **Annals of Global Health**, v. 83, n. 3, p. 519–523, 2017.

GRAHAM, R.; RUSSELL, G. The bisphosphonate odyssey. A journey from chemistry to the

clinic. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 144, n. 1, p. 793–820, 1999.

GREEN, J.; LIPTON, A. Anticancer properties of zoledronic acid. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 9, p. 944–957, 2010.

HUSSAINI, N.; OKUNEYE, K.; GUMEL, A. B. Mathematical analysis of a model for zoonotic visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Modelling**, v. 2, n. 4, p. 455–474, 2017.

JAMAL, F. *et al.* Identification of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–22, 2017.

JORDÃO, F. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2026–2031, 2011.

KLATT, S. *et al.* *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1–29, 2019.

KUMAR, P. *et al.* QSAR Models for Nitrogen Containing Monophosphonate and Bisphosphonate Derivatives as Human Farnesyl Pyrophosphate Synthase Inhibitors Based on Monte Carlo Method. **Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 159–167, 2018.

LAGO, J. *et al.* Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, 2019.

LIMA, D. A. *et al.* Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba–Rio de Janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 64–81, 2019.

LINDOSO, J. A. L. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193–201, 2018.

LING, Y. *et al.* Bisphosphonate inhibitors of *Toxoplasma gondii* growth: *in vitro*, QSAR, and *in vivo* investigations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3130–3140, 1 May 2005.

LING, Y. *et al.* The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30804–30816, 2007.

LIU, Q. Z. *et al.* 3D-QSAR, molecular docking, and ONIOM studies on the structure–activity relationships and action mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates. **Chemical biology & drug design**, v. 91, n. 3, p. 735–746, 2018.

MARTIN, M. B. *et al.* Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A potential route to chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 909–916, 2001.

MARTIN, M. B. *et al.* Activity of Bisphosphonates against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 14, p. 2904–2914, 1 Jul. 2002.

MARTINS, A. M. F. *et al.* Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in *Leishmania amazonensis* -infected BALB / c mice reduce parasite load. **scientific reports**, v. 9, p. 1–13, 2019.

MASCOTTI, K.; MCCULLOUGH, J.; BURGER, S. R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. v. 40, n. 6, p. 693–696, 2000.

MEMBRIVE, N. A. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. 2–5, 2017.

METELYTSIA, L. O. *et al.* New anti-candida active nitrogen-containing bisphosphonates as inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthase *Candida albicans*. **Ukrainian Biochemical Journal**, v. 91, n. 3, p. 78–89, 2019.

MIAO, R. *et al.* Clinical and epidemiologic features of visceral leishmaniasis in children in southwestern China: A retrospective analysis from 2001 to 2015. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 1, p. 9–12, 2017.

MONTALVETTI, A. *et al.* Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33930–33937, 2001.

MOREIRA, A. L. *et al.* Acyclic sesquiterpenes from the fruit pericarp of *Sapindus saponaria*

Induce ultrastructural alterations and cell death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

MORENO, S. N. J.; LI, Z. H. Targeting the isoprenoid pathway of *Toxoplasma gondii*. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 12, n. 3, p. 253–263, 2008.

MUKHERJEE, S.; BASU, S.; ZHANG, K. Farnesyl pyrophosphate synthase is essential for the promastigote and amastigote stages in *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 230, p. 8–15, 2019.

NEVES, G. M. H. *et al.* Targeting pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase: The old is a new trend for leishmaniasis drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 207–2130, 2019.

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

PESSOA, S. B. Leishmaniose tegumentar americana. **Paulistas de medicina e cirurgia**, v. 71, n. 4, p. 275–283, 1956.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

QUARESMA, P. F. *et al.* Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. **Proceedings of the International Astronomical Union**, v. 145, n. 9, p. 1161–1169, 2018.

RAJ, S. *et al.* An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. **Parasitology Research**, 2020.

RANGEL, E. F. *et al.* Sand fly vectors of american cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Brazilian Sand Flies**, p. 341–380, 2018.

RASMUSSEN, L.; ABTAHI, J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: An update on pathophysiology, risk factors, and treatment. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, p. 471035, 2014.

RATH, C. T. *et al.* Amazonian Phlebovirus (Bunyaviridae) potentiates the infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Role of the PKR / IFN1 / IL-10 axis. **PLoS**

neglected tropical diseases, v. 13, n. 6, 2019.

REIS, A. C. S. M. *et al.* O cenário de políticas públicas do Brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. **Saúde & Ciência em Ação - Revista Acadêmica do Instituto da Ciência**, v. 3, n. 1, p. 99–107, 2016.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

RISS, T. L. *et al.* Cell viability assays. In: **Assay Guidance Manual**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

ROCHA, G. P.; PETRONI, T. F. Leishmaniose visceral e tegumentar americana visceral and cutaneous leishmaniasis. **Revista Saúde UniToledo**, v. 1, n. 2, p. 40–55, 2017.

RODRIGUES, C. O. *et al.* Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PP(i)) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. **Biochemical Journal**, v. 349, n. 3, p. 737–745, 2000.

RODRIGUEZ, N. *et al.* Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 138–140, 2002.

ROM, O. *et al.* Pomegranate Juice Polyphenols Induce Macrophage Death via Generation: a Central Role for Oxidative Stress. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 106–114, 2016.

ROSSO, V. S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 2211–2217, 2011.

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: The first 40 years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2–19, 2011.

SACKS, D. L.; SILVA, R. P. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 9, p. 3099–3106, 1987.

SANDERS, J. M. *et al.* Quantitative structure-activity relationships for $\gamma\delta$ T cell activation by bisphosphonates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 375–384, 2004.

SANDERS, J. M. *et al.* Pyridinium-1-yl bisphosphonates are potent inhibitors of farnesyl

diphosphate synthase and bone resorption. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 2957–2963, 2005.

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.

SANNIGRAHI, A. *et al.* Effect of ergosterol on the binding of KMP-11 with phospholipid membranes: implications in leishmaniasis. **ACS Omega**, v. 4, n. 3, p. 5155–5164, 2019.

SANTOS, J. C. B. *et al.* Bisphosphonate-based molecules as potential new antiparasitic drugs. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1–20, 2020.

SARWAR, H. S. *et al.* Design of mannosylated oral amphotericin B nanoformulation: efficacy and safety in visceral leishmaniasis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 521–531, 2018.

SERENO, D.; HARRAT, Z.; EDDAIKRA, N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate *Leishmania* drug resistance phenotyping into the clinic. **Acta Tropica**, v. 191, p. 204–211, 2019.

SEVÁ, A. DA P. *et al.* Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2017.

SOOSARAEI, M. *et al.* A decade bibliometric analysis of global research on leishmaniasis in Web of Science database. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 26, p. 30–37, 2018.

SOUMYA, N. *et al.* Functional analysis of an AMP forming acetyl CoA synthetase from *Leishmania donovani* by gene overexpression and targeted gene disruption approaches. **Parasitology International**, v. 66, n. 1, p. 992–1002, 2017.

SOUZA, A. *et al.* Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018.

SOUZA, R. M. *et al.* Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: An emerging problem? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. 6, 2017.

STEINMETZ, H. P. *et al.* Engineering of new durable cross-linked poly(styryl bisphosphonate) thin coatings onto polypropylene films for biomedical applications. **Applied Surface Science**, v. 508, p. 145171, 2020.

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

SUČIĆ, M.; LJUBIĆ, N.; ČULIG, Z. Cytomorphology of late-onset *Leishmania* endophthalmitis: A case report. **Cytopathology**, v. 31, n. 2, p. 158–160, 2020.

SUMBRIA, D.; SINGLA, L. D. Pharmacokinetics and pharmacology to drugs used for control of emerging cryptosporidiosis and toxoplasmosis in livestock and humans. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 2, p. 1306–1313, 2019.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2019.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481–489, 2018.

SZAJNMAN, S. H. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3283–3290, 2008.

TASBIHI, M. *et al.* Comparative mitochondrial proteomics of *Leishmania tropica* clinical isolates resistant and sensitive to meglumine antimoniate. **Parasitology Research**, v. 119, n. 6, p. 1857–1871, 2020.

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, 2017.

TODOLÍ, F. *et al.* Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 17–23, 2009.

TOLEZANO, J. E. *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 280–284, 2007.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research** 2017, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and updates gabedit — A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, p. 174–182, 2012.

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

URBINA, J. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33609–33615, 1999.

UZUN, S. *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 57, n. 8, p. 973–982, 2018.

VALDIVIA, H. O. *et al.* Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–11, 2017.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221–227, 2018.

VERMA, A. *et al.* Elucidation of role of an acetyltransferase like protein in paromomycin resistance in *Leishmania donovani* using *in silico* and *in vitro* approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–16, 2019.

WIJNANT, G. J. *et al.* Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 223–228, 2018.

YANG, G. *et al.* *In vitro* and *in vivo* investigation of the inhibition of *Trypanosoma brucei* cell growth by lipophilic bisphosphonates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7530–7539, 2015.

YARAGUPPI, D. A. *et al.* Identification of potent natural compounds in targeting *Leishmania* major CYP51 and GP63 proteins using a high-throughput computationally enhanced screening. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 18, 2020.

YARDLEY, V. *et al.* *In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 929–931, 2002.

YOREK, M. S. *et al.* *Leishmania major* degrades murine CXCL1 – An immune evasion strategy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1–24, 2019.

YU, Y. *et al.* A novel anti-microbial peptide from pseudomonas, redlk induced growth inhibition of *Leishmania tarentolae* promastigote *in vitro*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 173–179, 2020.

ZABALA-PENAFIEL, A. *et al.* The potential of live attenuated vaccines against Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 210, p. 107849, 2020.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

APÊNDICE A – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

Chapter

Cell Culture and Maintenance of the Evolutionary Forms of *Trypanosoma cruzi* for Studies of Parasitic Biology

Cláudia Jassica Gonçalves Moreno, Johnny Wylsas de Freitas Oliveira, Joice Castelo Branco, Laura Araújo, Aline Maria Queiroz, Sílvia Tavares Donato, Nilton José da Silva Júnior, Emily Thays da Silva Rodrigues and Marcelo Sousa Silva

Abstract

This chapter aims to present and discuss the main cell culture techniques used for the growth and maintenance of the different evolutionary forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of the Chagas disease. Chagas disease is a neglected tropical disease endemic in several Latin American countries. Here, we intend to present the main difficulties, advantages, and disadvantages of using *Trypanosoma cruzi* cell culture in parasitic biology. Finally, we present the main research opportunities in the context of *Trypanosoma cruzi* parasitic biology using cell culture techniques, such as drug development, characterization of pharmacological targets, molecular markers for diagnosis, structural biology, and many other biomedical applications.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, cell culture, in vitro assay, metacyclogenesis

MORENO, C. J. G. ; OLIVEIRA, J. W. F. ; BRANCO, J. C. ; ARAUJO, L. ; QUEIROZ, A. M. ; DONATO, S. T. ; SILVA JUNIOR, N. J. ; RODRIGUES, E. T. S. ; SILVA, M. S. Cell culture and maintenance of the evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi* for studies of parasitic biology. In: Wanderley de Souza. (Org.). *Biology of Trypanosoma cruzi*. ed. xxx London: Intechopen Limited, 2019, v. xxx, p. 11-15, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84733>.

APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO



Review

Bisphosphonate-Based Molecules as Potential New Antiparasitic Drugs

Joice Castelo Branco Santos ^{1,2,†} , Jonathas Alves de Melo ^{1,3,†}, Sweta Maheshwari ^{4,†}, Wendy Marina Toscano Queiroz de Medeiros ^{1,2}, Johnny Wylsas de Freitas Oliveira ^{1,3} , Cláudia Jassica Moreno ^{1,2,3} , L. Mario Amzel ⁴, Sandra B. Gabelli ^{4,5,*}  and Marcelo Sousa Silva ^{1,2,3,6,*} 

¹ Immunoparasitology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, 59012-570 Natal, Brazil; joic.cast@hotmail.com (J.C.B.S.); biomedjonathas@outlook.com (J.A.d.M.); wendymedeiros@gmail.com (W.M.T.Q.d.M.); johny3355@hotmail.com (J.W.d.F.O.); claudia.mrn1@gmail.com (C.J.M.)

² Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, 59012-570 Natal, Brazil

³ Postgraduate Program in Biochemistry, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, 59012-570 Natal, Brazil

⁴ Department of Biophysics and Biophysical Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA; sweta@jhmi.edu (S.M.); mamzel@jhmi.edu (L.M.A.)

⁵ Department of Medicine and Oncology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

⁶ Global Health and Tropical Medicine, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, 1800-166 Lisbon, Portugal

* Correspondence: gabelli@jhmi.edu (S.B.G.); mssilva@ihmt.unl.pt (M.S.S.); Tel.: +1-443-7426227 (S.B.G.); Tel.: +55-84-99193-1313 (M.S.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 4 April 2020; Accepted: 27 May 2020; Published: 3 June 2020



Abstract: Neglected tropical diseases such as Chagas disease and leishmaniasis affect millions of people around the world. Both diseases affect various parts of the globe and drugs traditionally used in therapy against these diseases have limitations, especially with regard to low efficacy and high toxicity. In this context, the class of bisphosphonate-based compounds has made significant advances regarding the chemical synthesis process as well as the pharmacological properties attributed to these compounds. Among this spectrum of pharmacological activity, bisphosphonate compounds with antiparasitic activity stand out, especially in the treatment of Chagas disease and leishmaniasis caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., respectively. Some bisphosphonate compounds can inhibit the mevalonate pathway, an essential metabolic pathway, by interfering with the synthesis of ergosterol, a sterol responsible for the growth and viability of these parasites. Therefore, this review aims to present the information about the importance of these compounds as antiparasitic agents and as potential new drugs to treat Chagas disease and leishmaniasis.

Keywords: bisphosphonate; farnesyl pyrophosphate synthase; leishmaniasis; chagas disease; neglected tropical diseases

SANTOS, J. C. B.; DE MELO, J. A.; MAHESHWARI, S.; DE MEDEIROS, W. M. T. Q.; DE FREITAS OLIVEIRA, J. W.; MORENO, C. J.; SOUSA SILVA, M. Bisphosphonate-Based Molecules as Potential New Antiparasitic Drugs. *Molecules*, v. 25, n. 11, p. 2602, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25112602>