



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE -
COSAS**

ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM COMPLEXOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MANAUS/AM

2021

ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM COMPLEXOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, Doutora.

Coorientador: Andriy Grafov, Doutor.

MANAUS/AM

2021

Ficha Catalográfica

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

C433e Chagas, Ana Flávia da Silva
Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea. / Ana Flávia da Silva Chagas . 2021
181 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Leishmaniose. 2. Complexos de coordenação. 3. Nanotecnologia. 4. Metais. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea”

DISCENTE: ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós- Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 27/09/2021.

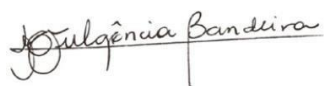

Prof. Dr. Emerson Silva Lima Coordenador do
PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Antonia Maria Ramos Franco Pereira, DSc.
Pesquisador titular III, Produtividade CNPq 2
CSAS/Lab. Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA
Av. André Araújo, no. 2936, Aleixo
Tel +55 (92) 3643-3068/3065, Fax +55 (92) 3643-3061
e-mail: afranco@inpa.gov.br

Antonia Maria Ramos Franco Pereira
Pesquisador Titular
SIAPE nº 1313036
INPA/MCT

Profa. Dra. Antonia Maria Ramos Franco
Orientadora e presidente da banca



Profa. Dra. Maria Fulgência Costa Lima BandeiraMembro
(UFAM)



Profa. Dra. Iryna Grafova
Membro (Universidade de Helsinki)



Profa. Dra. Aline Fagundes da SilvaMembro
(Fiocruz)



Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Membro (UFAM)

AGRADECIMENTOS

– Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

– E isso importa?

– Mais do que a própria guerra!

(Ernest Hemingway)

A Deus pelos milagres, pela perfeição da natureza e por me permitir ver na ciência e na pesquisa as suas maravilhas. Por todo cuidado diário me permitindo conhecer pessoas incríveis, corajosas, honestas e leais, que me inspiraram, me fortaleceram e me incentivaram. Por ter me dado oportunidades e desafios incríveis, além da coragem para aceitar, viver e não desistir nos momentos mais difíceis.

A mim mesma por toda a resiliência e persistência, por todo carinho que dediquei a essa pesquisa e pela paciência que dispensei a mim mesma para aceitar as mudanças e crescimento; e especialmente por ter aprendido a respeitar o meu tempo para aprender, ensinar, crescer e mudar durante essa jornada.

A Dory minha eterna amiga e companheira que me recepciona em casa com ânimo sem igual mesmo após muitas horas ou meses ausente; sem dúvida minha metade de quatro patas.

Aos meus pais e ao meu irmão por toda a educação, amor, carinho e paciência dados a mim durante toda essa jornada acadêmica e em todos os dias da minha vida.

A Dra. Antonia Franco pela confiança dispensada a mim em muitos momentos e pelas oportunidades, ensino, incentivo, paciência e cobranças.

A Dra. Maricleide Naiff por toda a paciência, carinho e conselhos, muito do meu caráter pessoal e profissional foram forjados e modificados em nossas infinitas horas de conversa.

A Dra. Marina Porchia e Dr. Francesco Tisato por toda paciência em compartilhar conhecimentos da química, pela colaboração, compromisso, confiança e pontualidade.

Ao Dr. Andriy Grafov pela receptividade na Finlândia, paciência em compartilhar conhecimentos da química e pela colaboração, compromisso, confiança e pontualidade.

Ao técnico Lourival Maciel por toda ajuda e ensinamentos compartilhados.

A MSc. Anny Maíza Brasil pela parceria, colaboração, carinho, amizade, paciência e respeito, sua colaboração foi imprescindível na realização dessa pesquisa. Dividir a bancada,

os desafios, as alegrias e tristeza com você foi uma honra e desejo imensamente que possamos compartilhar mais viagens, mais alegrias e momentos de diversão.

A MSc. Pauline Soldera pela parceria desde o mestrado, por toda paciência, bondade, carinho e respeito.

Aos ex alunos de PIBIC que colaboraram com esse projeto, Thais Pinto, Breno Mota, Theodora Paiva, Carolina Correa, Kamila Vieira, Joyara Menezes e Rayane Matsuhi, muito obrigada por toda a colaboração e pelos ensinamentos. Especialmente ao Breno Mota, Theodora Paiva e Carolina Correa que me ensinaram muito sobre pesquisa, ensino e extensão, e por serem sempre presentes em momento cruciais e sobretudo por terem se tornado grandes amigos, tenho muito orgulho de vocês.

Aos meus amigos Ellen Diana Lopes e José Roberto Lopes por toda a parceria, companheirismo, conversas e churrasco nos últimos anos.

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes e colaboraram com essa pesquisa e com minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa Europeu Horizon 2020MSCA-RISE-2016 –VAHVISTUS.

EPÍGRAFE

Todo o Universo se formou no seu falar [...]
Dono de toda a ciência, sabedoria e poder [...]
Antes que o haja houvesse Ele já era Deus.

(Preto no Branco – Ninguém explica Deus)

‘They said I would never make it
But I was built to break the mold
The only dream that I've been chasing is my own.’

(Alicia Keys – Underdog)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença infecciosa, que apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo esta causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, o antimoniato de meglumina é o tratamento de primeira escolha no Brasil e o isetionato de pentamidina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal são os medicamentos de segunda escolha. Devido à eficácia limitada e alta toxicidade desses fármacos há a necessidade de estudos para o desenvolvimento de medicamentos que possuam maior eficácia e menor toxicidade. Neste sentido, a química inorgânica medicinal vem despertando o interesse da comunidade científica, dado os seus estudos com íons metálicos que tem apresentado atividades terapêuticas promissoras. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antileishmania de complexos e nanopartículas metálicas. Deste modo, foram realizadas avaliações *in vitro* da atividade antileishmania em formas promastigotas e amastigotas, bem como a avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos. As substâncias que se apresentaram promissoras nos ensaios *in vitro* foram selecionadas para os ensaios *in vivo*, tendo sido avaliada a atividade antileishmania do complexo de cobre(I) e das nanopartículas de tântalo (NPsTa) em hamsters e camundongos infectados com *Leishmania* spp., respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* o complexo cobre(I) e os complexos de paládio(II) apresentaram citotoxicidade moderada com viabilidade celular média de 80% e 60%, respectivamente; enquanto que as nanopartículas de tântalo (NPsTa) e nanopartículas de bismuto (NPsBi) não apresentaram citotoxicidade, com viabilidade celular de 94% e 90%, respectivamente. O complexo de cobre(I) apresentou melhor eficácia em promastigotas (CI₅₀ 0,071 mM) e amastigotas [redução de 75% da taxa de infecção (TI)] de *L. (V.) braziliensis*. Os complexos de paládio(II) foram eficazes em inibir promastigotas (CI₅₀ < 0,00037 mM) e em formas amastigotas apresentaram redução de 20% da TI de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. As NPsTa induziram a inibição parasitária das formas promastigota (CI₅₀ 3 µM) e amastigotas (redução 50% da TI) de *L. (V.) braziliensis*. As NPsBi apresentaram melhor eficácia na inibição de promastigotas (CI₅₀ 0,05 µM) e amastigotas (redução de 70% da taxa de infecção) de *L. (L.) amazonensis*. Os ensaios *in vivo* foram realizados com o complexo de cobre(I) e NPsTa e os dados gerais dos ensaios biológicos *in vivo* demonstraram que o tratamento tópico com pomada contendo o complexo de cobre(I) mostraram baixa eficácia na redução no volume do focinho de hamsters (redução < 18%) e o tratamento intralesional com as NPsTa induziram um aumento significativo (aumento de 28%) no volume da pata dos camundongos, com uma ação inflamatória exacerbada no local da aplicação das NPsTa. Diante dos resultados obtidos, ficou evidente que as substâncias inorgânicas testadas apresentaram atividade promissora *in vitro*, especialmente em formas promastigotas e com citotoxicidade moderada ou mínima para macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos. Nos ensaios *in vivo* o complexo de cobre(I) e as NPsTa não induziram cura clínica e parasitológica nas concentrações, tempo e formulações testadas.

Palavras – chave: leishmaniose, complexos de coordenação, nanotecnologia, metais.

ABSTRACT

Tegumentary Leishmaniasis is an infectious disease that presents different clinical manifestations, caused by protozoa of the *Leishmania* genus. Currently, meglumine antimoniate is the first-choice treatment in Brazil and pentamidine isethionate, amphotericin B and liposomal amphotericin B make part of the second-choice drugs. Due to the limited efficacy and high toxicity of these drugs, there is a need for studies to develop drugs that have greater efficacy and less toxicity. In this sense, medicinal inorganic chemistry has been arousing the interest of the scientific community, given its studies with metallic ions that have shown promising therapeutic activities. The present study aimed to evaluate antileishmanial *in vitro* and *in vivo* activity of metal complexes and nanoparticles. Thus, *in vitro* evaluations of antileishmanial activity in promastigote and amastigote forms were carried out, as well as the evaluation of cytotoxicity in murine peritoneal macrophages and human monocytes. The substances that showed promise in the *in vitro* assays were selected for the *in vivo* assays, in which the antileishmanial activity of the copper (I) complex and tantalum nanoparticles (TaNPs) was evaluated in hamsters and mice infected with *Leishmania* spp., respectively. The obtained results demonstrated that in the *in vitro* cytotoxicity assays the copper (I) complex and the palladium (II) complexes presented moderate cytotoxicity with mean cell viability of 80% and 60%, respectively; while tantalum nanoparticles (TaNPs) and bismuth nanoparticles (BiNPs) did not show cytotoxicity, with cell viability of 94% and 90%, respectively. The copper (I) complex showed better efficacy in promastigotes (IC_{50} 0.071 mM) and amastigotes [reduction of 75% of the infection rate (IR)] of *L. (V.) braziliensis*. Palladium (II) complexes were effective in inhibiting promastigotes (IC_{50} < 0.00037 mM) and in amastigote forms showed a 20% reduction in the IR of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*. TaNPs induced parasitic inhibition of promastigote (IC_{50} 3 μ M) and amastigotes (50% reduction in IR) of *L. (V.) braziliensis*. BiNPs showed better efficacy in inhibiting promastigotes (IC_{50} 0.05 μ M) and amastigotes (70% reduction in the infection rate) of *L. (L.) amazonensis*. *In vivo* assays were performed with copper (I) complex and TaNPs and general data from *in vivo* biological assays demonstrated that topical treatment with ointment containing copper (I) complex showed low efficacy in reducing the volume of the snout of hamsters (reduction < 18%) and intralesional treatment with TaNPs induced a significant increase (increase of 28%) in mouse paw volume, with an exacerbated inflammatory action at the site of application of TaNPs. According to the obtained results, it was evident that the inorganic substances tested showed promising activity *in vitro*, especially in promastigote forms and with moderate or minimal cytotoxicity to murine peritoneal macrophages and human monocytes. In *in vivo* assays, copper (I) complex and TaNPs did not induce clinical and parasitological cure at the tested time, concentrations, and formulations.

Keywords: leishmaniasis, coordination complexes, nanotechnology, metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formas amastigotas (A) interiorizadas em macrófago e formas promastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 2 – Inseto vetor (Diptera: Psychodidae).....	27
Figura 3 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	30
Figura 4 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose cutânea localizada (A); disseminada (B); recidiva cútis (C) e difusa (D).	33
Figura 5 – Polimorfismo das lesões de Leishmaniose cutânea. Lesão tipo pápula (A); lesão em placa (B); úlcera franca (C); impetigóide (D); ectimatoide (E); nodular (F); úlcero-vegetante (G) e lesão verrucosa (H).....	33
Figura 6 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose mucocutânea mucosa tardia (A); mucosa sem lesão cutânea prévia (B); mucosa concomitante (C); mucosa contígua (D) e mucosa primária (E).	35
Figura 7 – Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil (2015 - 2019).	37
Figura 8 – Casos de Leishmaniose Tegumentar nas Regiões Brasileiras (2015 - 2019).	38
Figura 9 – Casos de Leishmaniose Tegumentar na Região Norte (2017).....	39
Figura 10 – Estrutura química do antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem [®]	40
Figura 11 – Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem [®]	42
Figura 12 – Estrutura química do isetionato de pentamidina. BKchem [®]	43
Figura 13 – Estrutura química da pentoxifilina. BKchem [®]	44
Figura 14. Pomadas envasadas em seringas para administração em animais de experimentação com lesões leishmanióticas.....	71
Figura 15 – Estrutura molecular de complexo [HB(pz) ₃]Cu(PCN) (PCN = tris-cianometilfosfina, HBPz ₃ = ânion trispirazoliborato).	81
Figura 16 – Curva de crescimento das espécies <i>Leishmania</i> . (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> (linha azul), <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis</i> (linha rosa), <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> (linha verde) e <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>naiffi</i> (linha marrom).	86

Figura 17 – Viabilidade parasitária de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B), <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (D). Controle (promastigotas não tratadas), tratadas com DMSO (1%), Glucantime® (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04, 0,02 e 0,01 mM). Cada barra representa a média ± desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	88
Figura 18 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B), <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (D). Controle (macrófagos peritoneais murinos não tratados), tratados com Glucantime® (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 mM). Cada barra representa a média ± desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	90
Figura 19 – Consistência da pomada de complexo de cobre em diferentes temperaturas em T(30).	91
Figura 20 – Pomadas (placebo e complexo de cobre) após a centrifugação.	91
Figura 21 – Volume do focinho de <i>hamsters</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A), <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C). Hamster não infectado e não tratado (linha marrom), infectado e não tratado (linha rosa), infectado e tratado com placebo (linha laranja), infectado e tratado com 20 mg/kg/dia de Glucantime® por via intramuscular (linha verde) e infectado e tratado com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (linha azul).	93
Figura 22 – Aspecto clínico das lesões em focinho de <i>Mesocricetus auratus</i> infectado por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) no 25º dia de tratamento, <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) no 30º dia de tratamento. A1, B1, C1 - animal não infectado e não tratado. A2, B2, C2 - animal infectado e não tratado. A3, B3, C3 - animal infectado e tratado com Glucantime® (20 mg/kg/dia por via intramuscular). A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com placebo. A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 80 mg pomade contend 0,5 mg de complexo de cobre(I).	94
Figura 23 – Taxa de infecção em macrófagos contada pela impressão em lâmina de fragmentos de lesões de <i>hamsters</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C). Animais infectados e não tratado (barra rosa), animais infectados e tratados com 20 mg/kg/dia de Glucantime® (barra verde), animais infectados e tratados com placebo (barra laranja) e	

animais infectados e tratados com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (barras azuis). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes.....	95
Figura 24 – Viabilidade de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) expostas ao Glucantime® (33 mM), complexos de Pd(II) (0,06 a 0,0038 mM) e ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico (0,06 mM). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	114
Figura 25 – Taxa de infectividade de macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). Controle negativo (macrófagos não tratados), Glucantime® (33 mM), Pd(2) e Pd(3) (0,06, 0,03, 0,015 e 0,0075 mM), ibandronato de sódio e prodonato de sódio (0,06 mM). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	115
Figura 26 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).....	128
Figura 27 - Viabilidade parasitária de formas promastigotas (A) e taxa de infecção (B) de <i>Leishmania. (Viannia) braziliensis</i> . Controle (-) sem tratamento, Glucantime® (3 μ M/mL); NMGA (30 μ M/mL) e NPsTa (3 a 0,19 μ M/mL). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	129
Figura 28 - Peso corporal (A) e evolução clínica do volume das patas (B) de <i>Mus musculus</i> BALB/c. Controle (+) camundongos não infectados; controle (-) infectados e não tratados; placebo; Glucantime® (infectados e tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μ M).	131
Figura 29 - Aspecto clínico morfológico macroscópico de nódulos dérmicos em <i>Mus musculus</i> BALB/c, infectados por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> durante o tratamento (intervalos de 72h). Controle (+) camundongos não infectados (A); controle (-) infectados e não tratados (B), placebo (C), Glucantime® (infectados e tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia) (D) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μ M) (E).	132
Figura 30 - Taxa de amastigotas, macrófagos infectados e não infectados de fragmentos do dorso da pata de <i>Mus Musculus</i> infectados com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Controle negativo (barras pretas), tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia de Glucantime® (barras cinzas	

claro), Placebo (barras pontilhadas) e 3 μ M de NPsTa (barras cinzas escuro). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras.	133
Figura 31 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).....	144
Figura 32 – Viabilidade parasitária de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). Controle (-) promastigotas sem tratamento, Glucantime [®] (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	146
Figura 33 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . Controle (-) macrófagos infectados sem tratamento, Glucantime [®] (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	148
Figura 34 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos tratados com Glucantime [®] (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do gênero <i>Leishmania</i>	25
Tabela 2 – Relação entre manifestações clínicas e espécies de <i>Leishmania</i> no Novo Mundo. ...	36
Tabela 3 – Protocolo Terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde.	45
Tabela 4 – Preços de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.*	47
Tabela 5 – Esquema de ensaios biológicos realizados com as diferentes substâncias.	67
Tabela 6 – Composição da pomada.	71
Tabela 7 – Concentração Inibitória (CI_{50} mM $\pm$ SD) e índice de seletividade (IS) de [HB(pz) ₃]Cu(PCN) e Glucantime [®] em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	87
Tabela 8 – Concentração Inibitória máxima (CI_{50} mM $\pm$ SD) do complexo [HB(pz) ₃]Cu(PCN) e Glucantime [®] em amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos.	89
Tabela 9 – Viabilidade celular média (%) de macrófagos peritoneais murinos na presença de complexos de Pd(II), ibandronato, iedrônico, prodonato e Glucantime [®]	112
Tabela 10 – Metade da concentração inibitória máxima (CI_{50} mM $\pm$ SD) dos complexos de paládio, Glucantime [®] , ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico em promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	113
Tabela 11 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsTa em formas promastigotas e amastigotas.	128
Tabela 12 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsBi, Glucantime [®] e MES em formas promastigotas.	144
Tabela 13 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsBi, Glucantime [®] e MES em formas amastigotas.	147

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
µg	Micrograma
µM	Micromol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEN	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucleico
Bi	Bismuto
BR	Brasil
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
CC	Concentração citotóxica 50%
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₃	Cloreto de cobalto
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsufóxido
ECG	Eletrocardiograma
EV	Endovenosa
Fe	Ferro
g	Gramas
HBPz ₃	ânion trispirazolilborato
IL	Intralesional
IM	Intramuscular
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IS	Índice de seletividade
K	Potássio
kg	Quilograma
L	Litro

LC	Leishmaniose cutânea
LCC	Leishmaniose cutânea recidiva cútis
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicanos
LT	Leishmaniose tegumentar
MDAS	<i>Dasypodidae</i>
mg	Miligrama
MHOM	<i>Homo sapiens</i>
mL	Mililitro
Mn	Manganês
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Ministério da Saúde
Na	Sódio
nm	nanomêtro
NMGA	N-metil-glucosamina
NNN	Neal, Novy, Nicolle
NPs	Nanoparticulas
NPs	Nanopartículas
NPsBi	Nanopartículas de bismuto
NPsTa	Nanopartículas de tântalo
NTDs	<i>Neglected Tropical Diseases</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PCN	tris-cianometilfosfina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pd	Paládio
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

Sb ³⁺	Antimônio trivalente
Sb ⁵⁺	Antimônio pentavalente
SFBi	Soro fetal bovino inativado
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
Ta	Tântalo
TA	Temperatura ambiente
WHO	World Health Organization
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	Histórico da Leishmaniose	23
2.2	O gênero <i>Leishmania</i>	24
2.3	Os vetores.....	26
2.4	Os hospedeiros	28
2.5	Ciclo Biológico	29
2.6	Aspectos imunopatológicos.....	30
2.7	Leishmaniose Tegumentar (LT).....	32
2.7.1	Leishmaniose Cutânea (LC)	32
2.7.2	Leishmaniose Mucocutânea (LMC)	33
2.8	Diagnóstico.....	36
2.9	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar	37
2.10	Tratamento da Leishmaniose Tegumentar	39
2.10.1	Antimonial Pentavalente	40
2.10.2	Anfotericina B.....	41
2.10.3	Pentamidina	43
2.10.4	Pentoxifilina.....	43
2.10.5	Protocolo Terapêutico	44
2.10.6	Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose	46
2.10.7	Impactos Econômicos do Tratamento da Leishmaniose.....	46
2.11	Metalômica e Química Inorgânica Medicinal.....	48
2.11.1	Química de compostos de coordenação	50
2.11.2	Nanopartículas metálicas	52
2.11.3	Metais de transição na biomedicina.....	53
2.11.3.1	Cobre	53

2.11.3.2	Paládio.....	55
2.11.3.3	Tântalo.....	55
2.11.3.4	Bismuto	56
2.12	Vias alternativas de tratamento na Leishmaniose Tegumentar	57
2.12.1	Pomadas.....	58
3	OBJETIVOS.....	60
3.1	Objetivo geral.....	60
3.2	Objetivos específicos.....	60
4	METODOLOGIA	62
4.1	Síntese das substâncias.....	62
4.1.1	Síntese do complexo de cobre(I)	62
4.1.2	Síntese dos complexos de paládio	62
4.1.3	Síntese das nanopartículas de tântalo (NPsTa)	64
4.1.4	Síntese das nanopartículas de bismuto (NPsBi).....	64
4.2	Aspectos Éticos	64
4.3	Estudo pré-clínico <i>in vitro</i>	65
4.3.1	Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária.....	65
4.3.2	Curva de Crescimento.....	65
4.3.3	Esquema de ensaios biológicos.....	67
4.3.4	Ensaio biológico com formas promastigota.....	68
4.3.5	Ensaio biológico de citotoxicidade	68
4.3.6	Ensaio biológico com formas amastigotas.....	70
4.4	Estudo pré-clínico <i>in vivo</i> com complexo de cobre(I)	70
4.4.1	Formulação tópica com complexo de cobre(I)	70
4.4.2	Procedência dos animais de experimentação	72
4.4.3	Infecção experimental	72
4.4.4	Delineamento Experimental	72

4.4.5	Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção	73
4.4.6	Eutanásia	73
4.5	Estudo pré-clínico <i>in vivo</i> com NPsTa	73
4.5.1	Procedência dos animais de experimentação	73
4.5.2	Infecção experimental	74
4.5.3	Delineamento Experimental	74
4.5.4	Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção	74
4.5.5	Eutanásia	74
4.6	Diagnóstico parasitológico	75
4.6.1	Método direto (impressão por aposição em lâmina - <i>imprint</i>)	75
4.6.2	Método de cultivo	75
4.6.3	Análise Estatística	75
Capítulo 1		77
Capítulo 2		105
Capítulo 3		121
Capítulo 4		139
5	DISCUSSÃO GERAL	154
6	CONCLUSÃO GERAL	157
REFERÊNCIAS		159

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças assolam a humanidade desde a antiguidade até os dias atuais e a concentração destas nos trópicos fez com que fossem denominadas “doenças tropicais negligenciadas” (*Neglected Tropical Diseases* - NTDs). Esta denominação está em uso desde o século XIX e refere-se a doenças que afetam principalmente, mas não exclusivamente, países em desenvolvimento que possuem populações pobres em que as condições de moradia, estrutura sanitária e alimentação são precárias, além da dificuldade no acesso aos sistemas de saúde (ANDRADE, 2015).

Essa denominação também é utilizada para fazer referência a doenças que não recebem atenção por parte do governo, não despertam interesse econômico das indústrias farmacêuticas e não recebem investimentos sólidos e contínuos em pesquisa e desenvolvimento que possam levar à prevenção ou a cura. Em vista dessa situação, há uma falha institucional que acaba por comprometer o desenvolvimento de fármacos para essas doenças (BOECHAT; MAGALHÃES, 2012; FERES *et al.*, 2016).

Segundo a *World Health Organization* - WHO (2017) há 20 doenças consideradas negligenciadas, sendo elas: esquistossomose, oncocercose, filariose linfática, tracoma, boubá, verminoses, dracunculose, tripanossomíase africana, hanseníase, cisticercose, equinococose, doença de chagas, úlcera de buruli, dengue, chikungunya, raiva, micetoma, sarna, picada de cobra e leishmaniose; ao menos seis dessas doenças ocorrem no Brasil, dentre elas a leishmaniose (BODIMEADE; MARKS; MABEY, 2019).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença que apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo classificada em leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. Segundo a WHO (2021), a LT está presente em 92 países, dentre estes, o Brasil apresenta-se endêmico com notificação em todos os estados, tendo registrado 16.135 casos em 2019 e na região norte do país o registro foi de 7.123 casos (SINAN/SVS/MS, 2021).

A doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que são protozoários intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). As principais formas deste parasita são as formas promastigotas, encontradas no inseto vetor e as formas amastigotas, encontradas em fagócitos mononucleares dos hospedeiros (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

Os vetores são fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*; estes são conhecidos popularmente como mosquitos-

palha, cangalhinha ou birigui (GALATI *et al.*, 2017). Há registros de animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, que desempenham a função de reservatórios em diferentes localidades; sendo considerada acidental a transmissão para animais domésticos e humanos (PATZ *et al.*, 2000; ROHOUSOVA *et al.*, 2015; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

Devido à diversidade de espécies de *Leishmania*, hospedeiros e vetores, o Ministério da Saúde (MS) fez modificações no esquema terapêutico a ser adotado para o tratamento da leishmaniose, determinando a utilização de antimoniato de meglumina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, isetionato de pentamidina e a pentoxifilina. A escolha do fármaco e administração do mesmo irá depender das manifestações clínicas do paciente, da espécie envolvida, da resposta ao tratamento e disponibilidade de medicamentos (BRASIL, 2017).

Neste sentido, é perceptível que ainda há limitações no esquema terapêutico, devido à baixa eficácia dos medicamentos, alta toxicidade, tratamento longo e doloroso, alto custo financeiro e resistência parasitária. Sendo assim, justifica-se a busca por novos princípios ativos que possam atuar de forma eficaz no tratamento da doença (BASTOS *et al.*, 2016).

A química inorgânica medicinal é o campo de conhecimento que estuda as funções, metabolismo e aplicações de íons inorgânicos em sistemas biológicos, visando à aplicação no diagnóstico e na terapêutica de doenças. Os metais são utilizados para “poções” desde as civilizações antigas e diversos metais já foram utilizados no campo farmacêutico devido ao alto potencial de atividade terapêutica, entretanto, é necessário que haja precaução e que seu uso seja realizado de forma cautelosa, visto que os mesmos podem causar toxicidade ao organismo (MAGNER, 2005; THOMPSON; ORVIG, 2006; BRADFORD; COWAN, 2014; MJOS; ORVIG, 2014).

Nesse contexto, a aplicação dos conhecimentos da química de coordenação e desenvolvimento de tecnologias como as nanopartículas, podem oferecer perspectivas quanto à melhora na eficácia da distribuição do fármaco e diminuição da toxicidade no organismo (BARRY; SANDLER, 2013; BRADFORD; COWAN, 2014). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar em sistemas *in vitro* e *in vivo* a atividade antileishmania de complexos e nanopartículas metálicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade e existem relatos de estudos arqueológicos que demonstram que durante a era pré-colombiana os incas reproduziram figuras humanas mutiladas por diferentes moléstias em vasos de cerâmica, certificando a ocorrência da *uta* e *espúndia* - denominações locais para leishmaniose tegumentar, que inicialmente foi confundida com sífilis (VALE; FURTADO, 2005). Posteriormente estudos da paleomedicina apresentaram descobertas a respeito de múmias com lesões na pele e mucosa com características de leishmaniose tegumentar (SANTOS; COIMBRA, 1994; NEVES, 2009).

No Brasil, no entanto, não foi possível fazer a constatação da presença de leishmaniose através do estudo de cerâmicas antropomórficas produzidas por indígenas, por apresentarem um caráter rudimentar. Sendo assim, a única indicação fidedigna e mais antiga da leishmaniose no Brasil é apresentada em 1908, na tese de Tello, “*Antigüedad de la syphilis em el Peru*”, referente à obra escrita, *Pastoral Religioso-Político Greographico*, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica. Na obra são descritas observações feitas a respeito de indivíduos que apresentavam úlceras nos braços, pernas e lesões destrutivas na boca e nariz, sendo observado que o mesmo acontecia após a picada de insetos (VALE; FURTADO, 2005).

Inicialmente acreditava-se que a doença era proveniente do Peru e da Bolívia, apesar de apresentar-se endêmica na Amazônia. A doença teria se disseminado nos estados do norte e no restante do país por indivíduos que para lá se dirigiram em busca de trabalho nos seringais e que retornaram infectados a suas origens. Em 1855, Cerqueira observou fortes evidências da leishmaniose no Brasil, devido a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. No final do século XIX, Breda diagnosticou imigrantes italianos ao retornarem de uma viagem feita a São Paulo com uma doença chamada ‘*buba brasileira*’ (VALE; FURTADO, 2005).

Em 1909, Lindenberg, descreveu os primeiros casos no Brasil, encontrando formas de *Leishmania* idênticas às encontradas no Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo e sugeriu a denominação “leishmaniose ulcerosa” (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003). Entretanto, devido às

manifestações ulcerosas, vegetativas e infiltrantes, Rabello propôs a expressão ‘leishmaniose tegumentar’ (VALE; FURTADO, 2005).

Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna denominou e descreveu o agente etiológico *L. braziliensis* e em 1912 descobriu a cura das leishmanioses pelo tártaro emético (NEVES, 2009). Até a década de setenta, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. braziliensis* e a classificação dos parasitas baseava-se no comportamento clínico-evolutivo, visto que a morfologia dos parasitas à microscopia óptica não permitia sua distinção (VALE; FURTADO, 2005). As classificações mais utilizadas na atualidade seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987), que dividem as leishmanias nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Os primeiros conhecimentos sobre os transmissores foram em 1921, que Sergent conseguiu transmitir o botão do oriente inoculando triturados de *Phlebotomus papatasi* em soldados. Cerqueira (1920) e Aragão (1922) conseguiram infectar um cão a partir de fêmeas de *Lutzomyia intermedia* que haviam realizado repasto sanguíneo de um paciente com leishmaniose tegumentar. Atualmente, é conhecido um grande número de espécies de *Lutzomyia* responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas (NEVES, 2009).

Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas e as características clínicas e geográficas da doença foram sendo complementadas pelo estudo do comportamento das diferentes espécies de *Leishmania*, dos hospedeiros e vetores, fortalecendo a base para a classificação e compreensão desta enfermidade (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003; MONTEIRO, 2013).

2.2 O gênero *Leishmania*

Os parasitas que causam as leishmanioses são protozoários que apresentam a classificação taxonômica descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do gênero *Leishmania*.

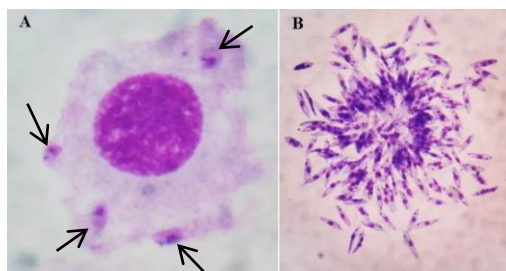
Reino	Protista	Haeckel, 1866
Sub-reino	Protozoa	Goldfuss, 1817
Filo	Sarcomastigophora	Honigberg & Balamuth, 1963
Sub-filo	Mastigophora	Desing, 1866
Classe	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Ordem	Kinetoplastida	Honigberg, 1963, Vickerman, 1976
Sub-ordem	Trypanosomatida	Kent, 1880
Família	Trypanosomatidae	Doflein, 1901, Grobben, 1905
Gênero	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903
Subgêneros	<i>Viannia</i>	Lainson & Shaw, 1987
	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903, Saf'janova, 1982
Espécie	<i>Leishmania</i> spp.	

Fonte: Levine, 1980; Neves, 2009.

Sabe-se que existem aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*; ao menos 31 são parasitas de diferentes espécies de mamíferos e cerca de 20 espécies são patogênicas para humanos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). São protozoários flagelados que possuem um ciclo de vida heteroxênico, que envolve inseto vetor e hospedeiro mamífero. Estes parasitas apresentam uma diversidade de morfologia celular que sofrem adaptações ao longo do ciclo de vida para que o parasita tenha sucesso no desenvolvimento nos hospedeiros (SUNTER; GULL, 2017).

O parasita exibe duas formas morfológicas principais em seu ciclo de vida; a forma amastigota (Figuras 1A) e a forma promastigota (Figura 1B).

Figura 1 – Formas amastigotas (A) interiorizadas em macrófago e formas promastigotas (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: Próprio autor (2021).

As principais diferenças são:

- **Amastigotas:** são encontradas nos hospedeiros vertebrados parasitando células do sistema mononuclear fagocitário (intracelular), possuem formato arredondado ou ovalado (3 μm de largura e 6 μm de comprimento) e apresentam flagelo imóvel que possui especialmente funções sensoriais (GLUENZ *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017);
- **Promastigotas:** são encontradas no intestino dos vetores invertebrados ou em meio de cultivo em laboratórios (extracelular), apresentam formato ovoide alongado (6 e 8 μm) e possuem flagelo livre que tem como principal função fornecer força propulsora, possivelmente para facilitar o percurso através do trato digestivo do inseto vetor (CUVILLIER *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

Apesar das diferenças morfológicas entre as formas amastigota e promastigota, vale ressaltar que a arquitetura celular básica é conservada nas duas formas durante o seu ciclo de vida (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

2.3 Os vetores

Os flebotomíneos (Figura 2) são insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Estes têm sido amplamente estudados visto que desempenham importante papel como transmissores de diversos agentes patogênicos aos humanos, incluindo diferentes espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GALATI *et al.*, 2017).

Figura 2 – Inseto vetor (Diptera: Psychodidae).



Fonte: Bari e Rahmana (2008).

Atualmente foi descrito aproximadamente mil espécies de flebotomíneos em todo o mundo, embora essas classificações permaneçam sem uma padronização das terminologias e caracteres, existem pelo menos 464 espécies no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GALATI *et al.*, 2017). Dessas espécies já descritas são conhecidas 50 espécies dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) que são responsáveis pela transmissão de *Leishmania* sp. aos hospedeiros, incluindo o homem (BARI; RAHMANA, 2008).

Esses insetos são pequenos (1 a 3 mm de comprimento) e tem como características o corpo e asas cobertas de cerdas, coloração castanho claro ou cor de palha, o voo consiste em pequenos saltos, quando pousados permanecem com as asas entreabertas e a atividade é noturna ou crepuscular. Popularmente são conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, cangalha, cangalhinha, entre outros (BRASIL, 2013).

Fatores ambientais como clima, precipitação, umidade e temperatura, afetam diretamente a distribuição, metabolismo e interações desses vetores com as diferentes espécies de *Leishmania*, sendo essencial que encontrem condições climáticas favoráveis para a sua expansão geográfica (HLAVACOVA; VOTYPRA; VOLF, 2013; RANGEL *et al.*, 2018).

Esses insetos possuem predileção por ambientes ricos em matéria orgânica em decomposição, com bom teor de umidade, pouca ou nenhuma luz, tendo como pontos de refúgio folhas caídas no solo da floresta, troncos de árvores com raízes tabulares, fendas em rochas, tocas de animais selvagens, cavernas, entre outros. Porém, devido às modificações ambientais realizadas por atividades humanas, algumas espécies de flebotomíneos estão se adaptando a ambientes urbanos e periferias das grandes cidades, tendo como abrigos artificiais os galinheiros, chiqueiros, currais e outros (DE AGUIAR; VIERA, 2018).

Sabe-se, além disso, que a umidade relativa do ar é um fator determinante para a manutenção desses insetos, dessa forma, durante as primeiras chuvas ocorre o aumento da umidade do ar, favorecendo o surgimento das formas adultas de flebotomíneos (DE AGUIAR; VIERA, 2018).

Em geral, ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e se alimentam de açúcar de plantas; entretanto, as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Sendo assim, o flebotomíneo fêmea pode ser infectado quando realiza o repasto sanguíneo em um mamífero previamente infectado. Habitualmente cada espécie de flebotomíneo possui uma especificidade para uma determinada espécie de *Leishmania*, entretanto tem sido observadas modificações e adaptações do vetor e do agente etiológico nesse sentido (BARI; RAHMANA, 2008; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que a competência vetorial é um fator determinante para a transmissão da *Leishmania*, visto que há múltiplos hospedeiros nas áreas endêmicas de leishmaniose (QUINNEL; DYE; SHAW; 1992; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

2.4 Os hospedeiros

Os hospedeiros vertebrados são de fundamental importância para manter o ciclo de vida das espécies de *Leishmania* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Entretanto as espécies de hospedeiros apresentam variações regionais e temporais, sendo necessário um estudo de área para determinar quais animais estão desempenhando a função de reservatório em um determinado ambiente (RAYMOND *et al.*, 2003; ROQUE; JANSEN, 2014). Há registros de animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, dentre eles estão: roedores, raposas, chacais, lobos, morcegos, primatas, tatus, preguiças, tamanduás, cães, gatos e outros animais que desempenham essa função de reservatórios em diferentes localidades (ROHOUSOVA *et al.*, 2015).

A transmissão para animais domésticos e humanos é considerada acidental, pois a infecção destes ocorre apenas quando há alteração da ecologia local através de desmatamento para construções, serviços profissionais e outras atividades em que o homem passe a conviver ou morar em regiões selvagens que possuam o ciclo biológico da *Leishmania* (PATZ *et al.*, 2000; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017), portanto, a infecção dos humanos está diretamente associada as alterações ambientais efetuadas pelos mesmos (ORYAN; AKBARI, 2016).

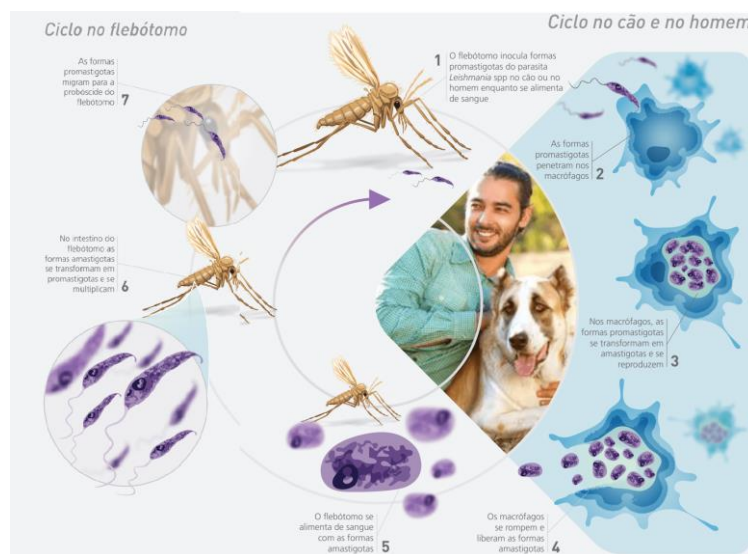
2.5 Ciclo Biológico

Durante o repasto sanguíneo ocorre a infecção do flebotomíneo (fêmea) ao ingerir células (principalmente macrófagos) contendo formas amastigotas de hospedeiros previamente infectados com *Leishmania*. Após a ingestão as formas amastigotas se libertam do macrófago no trato digestório do vetor e na região anterior do trato digestório no interior da matriz peritrófica as formas amastigotas passam por um processo de diferenciação para as formas promastigotas procíclicas. Não se sabe ao certo quais os mecanismos e influências para que ocorram essas modificações, porém acredita-se que as mudanças sejam influenciadas por uma combinação de temperatura, pH e desencadeadores químicos (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

Após o processo de transformação as formas promastigotas rompem a matriz peritrófica e migram para o epitélio do trato digestório, onde passam pelo processo de divisão celular e aderência pelo flagelo. Posteriormente essas formas migram para a válvula estomodeal localizada na região anterior do intestino, nesse momento as formas promastigotas sofrem o processo de metaciclogênese, que consiste em uma redução do tamanho das formas promastigotas, tornando-se extremamente móveis e altamente infectivas, sendo denominada promastigota metacíclica. Após passar por esse processo as formas promastigotas irão migrar para o probóscide do flebotomíneo e durante um novo repasto sanguíneo as promastigotas são inoculadas nos hospedeiros vertebrados (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Durante o repasto sanguíneo ocorre uma série de fatores que induzem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e estes irão fagocitar as promastigotas que foram inoculadas. No interior dos vacúolos parasitóforos dentro dos macrófagos as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas que aderem à membrana interna do vacúolo e iniciam o processo de divisão celular até ocupar uma grande área do macrófago. Em seguida, a membrana do macrófago sofre lise liberando as formas amastigotas que poderão invadir novos macrófagos ou serão ingeridas por uma nova fêmea de flebotomíneo, iniciando novamente o ciclo biológico da *Leishmania* (Figura 3) (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.



Fonte: Leevre (2015).

2.6 Aspectos imunopatológicos

A relação parasita/hospedeiro irá determinar a sobrevivência do parasita e evolução da infecção, sendo isto determinado principalmente por condições inerentes ao hospedeiro como a resposta imune e polimorfismos genéticos; entretanto, a evolução e gravidade da doença estão também associadas à espécie de *Leishmania* envolvida (ROSSI; FASEL, 2017).

Após a transmissão ao mamífero, os parasitas necessitam localizar rapidamente células hospedeiras, visto que são parasitas intracelulares obrigatórios, desta forma, as promastigotas interagem em contato direto com o sistema imune do hospedeiro e buscam fugir ou modular esse sistema de forma a garantir a sua sobrevivência (SCOTT; NOVAIS, 2016; ROSSI; FASEL, 2017).

Após as primeiras horas de infecção o parasita se beneficia das propriedades pró-inflamatórias da saliva do flebotomíneo que desempenha um papel fundamental na quimioatração de células do sistema fagocitário. Atualmente, sabe-se que neutrófilos, monócitos e macrófagos estão envolvidos em respostas distintas no combate ao parasita, entretanto, não se sabe em sua totalidade quais são os mecanismos utilizados por essas células, além disso, essas respostas podem resultar na eliminação do parasita ou contribuir para a patogênese da doença (CHAGAS *et al.*, 2014; ROSSI; FASEL, 2017).

Sugere-se que inicialmente os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção, onde irão atuar na liberação das chamadas “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (AEN) que tem por finalidade causar danos ao parasita levando a morte dos mesmos, porém, essa resposta mediada pelos neutrófilos torna-se contraditória, pois não é uma resposta eficiente para todas as espécies. De fato, em quanto que parasitas da espécie *L. amazonensis* são eficientemente mortos pela AEN, as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. mexicana* se beneficiam para progressão da infecção (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Outra resposta imune realizada pelos neutrófilos (vivos ou necróticos) está associada à capacidade de induzir os macrófagos a produzir espécies reativas de oxigênio que irão atuar no controle parasitário. Esse mecanismo é eficiente em espécies como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, entretanto em infecções causadas por *L. major*, esse mecanismo atua na melhor sobrevivência do parasita (ROCHAEL *et al.*, 2015; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Nos primeiros dias de infecção os monócitos inflamatórios são as células que apresentam maior infecção pelos parasitas de *Leishmania*. A resposta dos monócitos a infecção envolve uma forte explosão respiratória, sendo eficientes em controlar a carga parasitária e matar os parasitas através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, estando também associados ao possível controle em casos de reinfecção. Além disso, os monócitos podem estar associados também à promoção da diferenciação de células TH1 que irão migrar para a pele e eliminar os parasitas através do aumento da explosão respiratória ou produção do óxido nítrico (ON). Entretanto, a eficácia dessas respostas mediada pelos monócitos também pode ser dependente da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Apesar desses mecanismos de resposta imune mediada pelos neutrófilos e monócitos os parasitas conseguem sobreviver e a infecção duradoura no hospedeiro ocorre de fato dentro dos macrófagos. Nesta célula, os parasitas conseguem se diferenciar das formas promastigotas para amastigotas, isso ocorre especialmente devido o revestimento que possuem de lipofosfoglicanos (LPG) que protege o parasita da temperatura hostil e ácida dentro dos macrófagos, além disso, esse revestimento retarda a formação do fagolisossomo (SCOTT; NOVAIS, 2016).

A atuação dos macrófagos nas primeiras horas de infecção está associada à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que tem como objetivo eliminar patógenos invasores sem danificar a célula hospedeira, entretanto os parasitas desenvolveram diversos mecanismos para interferir nesses processos, dentre eles o LPG atua novamente na proteção

das formas amastigotas retardando e suspendendo a produção das espécies reativas de oxigênio. Ou seja, os parasitas conseguem moldar a resposta imune desde a sua entrada no organismo hospedeiro até a sua sobrevivência e reprodução dentro dos macrófagos, comprometendo tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (ROSSI; FASEL, 2017).

2.7 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT manifesta-se sob as formas leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC), que podem apresentar manifestações clínicas diferenciadas que estão associadas geralmente à espécie do parasita envolvido, ao estado imunológico e genético do indivíduo afetado (MARTINS *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

2.7.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

A LC é a forma menos severa da doença e possui um período de incubação que varia entre duas semanas a dois meses. A úlcera típica é geralmente indolor e são geralmente encontradas em áreas descobertas do corpo, apresentando como características lesões ulcerativas ou nodulares, de formato arredondado ou ovalado, com bordas bem delimitadas, com base eritematosa, infiltrada e granulações grosseiras (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017). O Ministério da Saúde (2017) classifica a LC em:

a. Forma cutânea localizada (LCL): lesão geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla e tem como característica acometimento primário da pele (Figura 4A);

b. Forma cutânea disseminada (LD): múltiplas lesões papulares, de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais envolvendo com frequência a face e o tronco. A disseminação do parasita provavelmente ocorre por via hemática ou linfática, causando lesões distantes do local de inoculação do parasita (Figura 4B);

c. Forma recidiva cútis (LCC): após cicatrização, há uma ativação da lesão nas bordas, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial. A resposta terapêutica costuma ser inferior à da lesão primária (Figura 4C);

d. Forma cutânea difusa (LCD): inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; posteriormente evolui de forma lenta com formação de placas e

múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. Essa forma clínica é rara e grave, pois não apresenta resposta à terapêutica e ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune (Figura 4D).

Figura 4 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose cutânea localizada (A); disseminada (B); recidiva cútis (C) e difusa (D).



Fonte: Brasil (2017).

Dentro das classificações já descritas, deve-se considerar que as lesões de LC apresentam polimorfismo, sendo assim, há vários tipos de lesões menos frequentes que podem ser encontradas nos pacientes como: lesão tipo pápula, lesão em placa, úlcera franca, impetigóide, ectimatoide, nodular, úlcero-vegetante e lesão verrucosa (Figura 5) (NAIFF JÚNIOR *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

Figura 5 – Polimorfismo das lesões de Leishmaniose cutânea. Lesão tipo pápula (A); lesão em placa (B); úlcera franca (C); impetigóide (D); ectimatoide (E); nodular (F); úlcero-vegetante (G) e lesão verrucosa (H).



Fonte: Naiff Júnior *et al.* (2009).

2.7.2 Leishmaniose Mucocutânea (LMC)

A leishmaniose mucocutânea (LMC) tem como característica lesões destrutivas das mucosas e geralmente o acometimento é da mucosa nasal, entretanto podem ocorrer lesões na orofaringe, palato, lábios, língua, laringe, traqueia e árvore respiratória superior; de forma mais rara pode ocorrer o comprometimento de conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais e ânus (BRASIL, 2017).

Sabe-se que a forma clássica da LMC pode ocorrer de forma secundária a lesões inicialmente cutâneas em que o paciente não teve o tratamento adequado ou teve cura espontânea e posteriormente houve uma evolução crônica para a forma mucosa. O acometimento por LMC não é bem compreendido, acredita-se que possa ser um resultado de uma interação complexa de fatores entre hospedeiro e parasita (BRASIL, 2017).

O Ministério da Saúde (2017) classifica as manifestações clínicas de LMC em:

- a. Forma mucosa tardia:** está associada à evolução de lesões cutâneas múltiplas em que não há cura espontânea ou não é responsiva ao tratamento, sendo esta a forma mais comum (Figura 6A);
- b. Forma mucosa sem lesão cutânea prévia:** essa forma está associada a infecções subclínicas ou lesões cutâneas pequenas que teriam passado despercebidas sem deixar cicatrizes perceptíveis (Figura 6B);
- c. Forma mucosa concomitante:** quando lesões na mucosa e lesões cutâneas estão ativas ao mesmo tempo (Figura 6C);
- d. Forma mucosa contígua:** ocorre por propagação direta de lesão cutânea localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas (Figura 6D);
- e. Forma mucosa primária:** ocorre eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios (Figura 6E).

Figura 6 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose mucocutânea mucosa tardia (A); mucosa sem lesão cutânea prévia (B); mucosa concomitante (C); mucosa contígua (D) e mucosa primária (E).



Fonte: Brasil (2017).

As diferentes manifestações clínicas se dão em grande parte pela diversidade de espécies de *Leishmania*. Nas Américas são conhecidas 13 espécies e ao menos sete espécies estão relacionadas com a LT no Brasil, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (TELES, *et al.*, 2016).

Considerando o estado do Amazonas, sabe-se que circulam pelo menos quatro espécies conhecidas, sendo elas: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, que são responsáveis por diferentes manifestações clínicas da LT (Tabela 2) (FIGUEIRA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013; BRASIL, 2017).

Tabela 2 – Relação entre manifestações clínicas e espécies de *Leishmania* no Novo Mundo.

	Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. infantum chagasi</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>L. pifanol</i>	<i>L. naiffi</i>
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. peruviana</i>
		<i>L. lainsoni</i>
		<i>L. lindenbergi</i>
		<i>L. shawi</i>
Leishmaniose cutânea disseminada	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. mexicana</i>	
	<i>L. amazonensis</i>	
Leishmaniose mucocutânea		<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>

Fonte: Teixeira *et al.* (2013).

2.8 Diagnóstico

O correto diagnóstico pode ser desafiador, pois esta doença mimetiza outras diversas condições infecciosas e malignas. Em geral, o diagnóstico de LT baseia-se nas manifestações clínicas do paciente, conhecimento epidemiológico da região e testes laboratoriais (HANDLER *et al.*, 2015). Numerosos métodos de diagnóstico podem ser utilizados com uma grande variação na precisão, incluindo exames parasitológicos, imunológicos e diagnósticos moleculares. Entretanto, apesar da precisão do exame ser de extrema importância, a seleção do método a ser utilizado geralmente baseia-se na infraestrutura disponível e recursos (GOTO; LINDOSO, 2010; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Os exames parasitológicos possuem alta especificidade e podem incluir exames diretos como a escarificação, biópsia com impressão por aposição em lâmina e punção aspirativa, que permitem a observação das formas amastigotas utilizando técnicas de microscopia; ou métodos indiretos que consistem em realizar o isolamento do parasita em cultivo *in vitro* e em

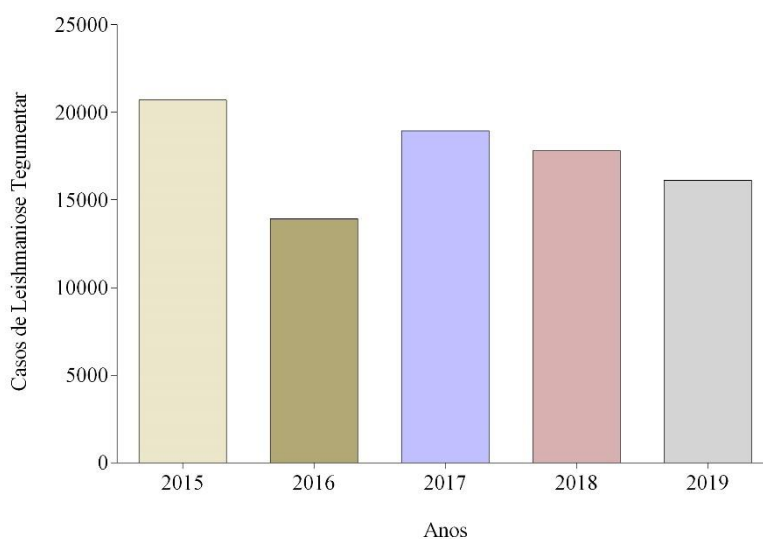
animais de experimentação *in vivo* como o *Mesocricetus auratus* (COMANDOLLI – WYREPKOWSKI, 2015; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Outra forma de realizar o diagnóstico é através da reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), que consiste em um exame molecular que permite amplificar em escala exponencial sequências de ADN (ácido desoxirribonucleico), sendo capaz de detectar quantidades relativamente baixas de ADN do parasita. Apesar de ser uma técnica com alta sensibilidade, as exigências técnicas e o custo limitam a utilização rotineira, sendo assim, os exames parasitológicos direto permanecem como o padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose (MURRAY *et al.*, 2005; COMANDOLLI – WYREPKOWSKI, 2015).

2.9 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

A falta de controle em áreas remotas torna difícil estimar a real incidência, mas sabe-se que causa impacto em 92 países e mais de 1 milhão de pessoas estão em risco. A maioria dos casos de LT ocorre no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã e Síria (DNDi, 2018a). Segundo o Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN (2021) no Brasil houve um total de 16.135 casos de LT em 2019 (Figura 7).

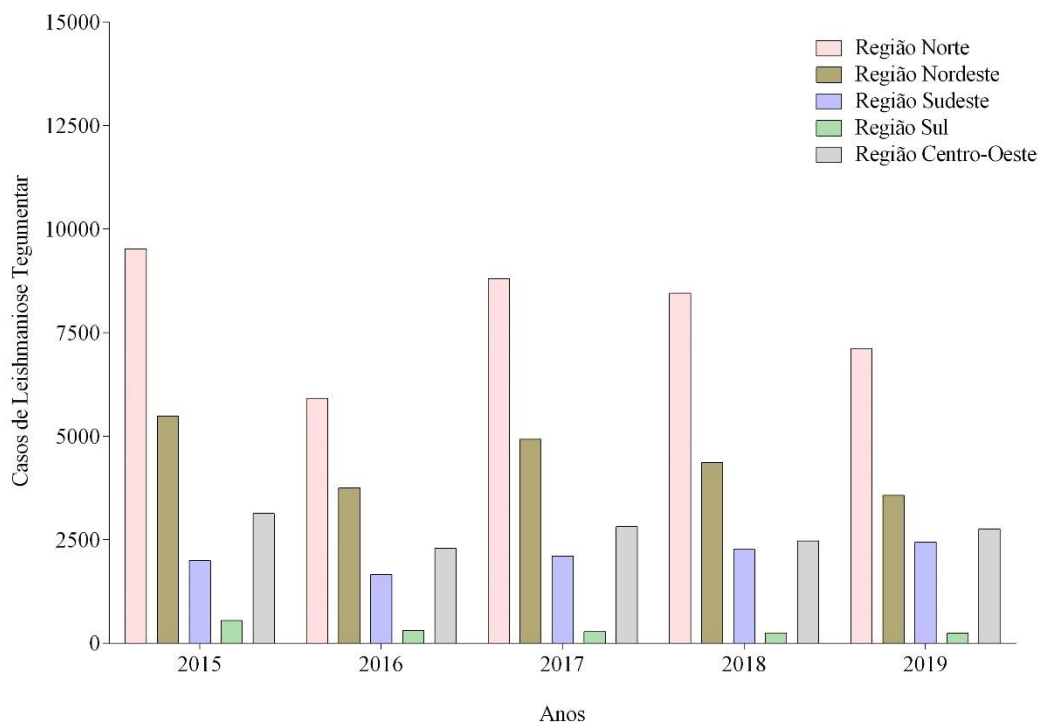
Figura 7 – Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil (2015 - 2019).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Considerando os casos por notificação nas regiões entre os anos 2015 - 2019, observa-se que neste período de tempo a região norte apresentou maior número de casos, tendo notificado um total de 7.123 casos em 2019 (Figura 8) (SINAN/SVS/MS, 2021).

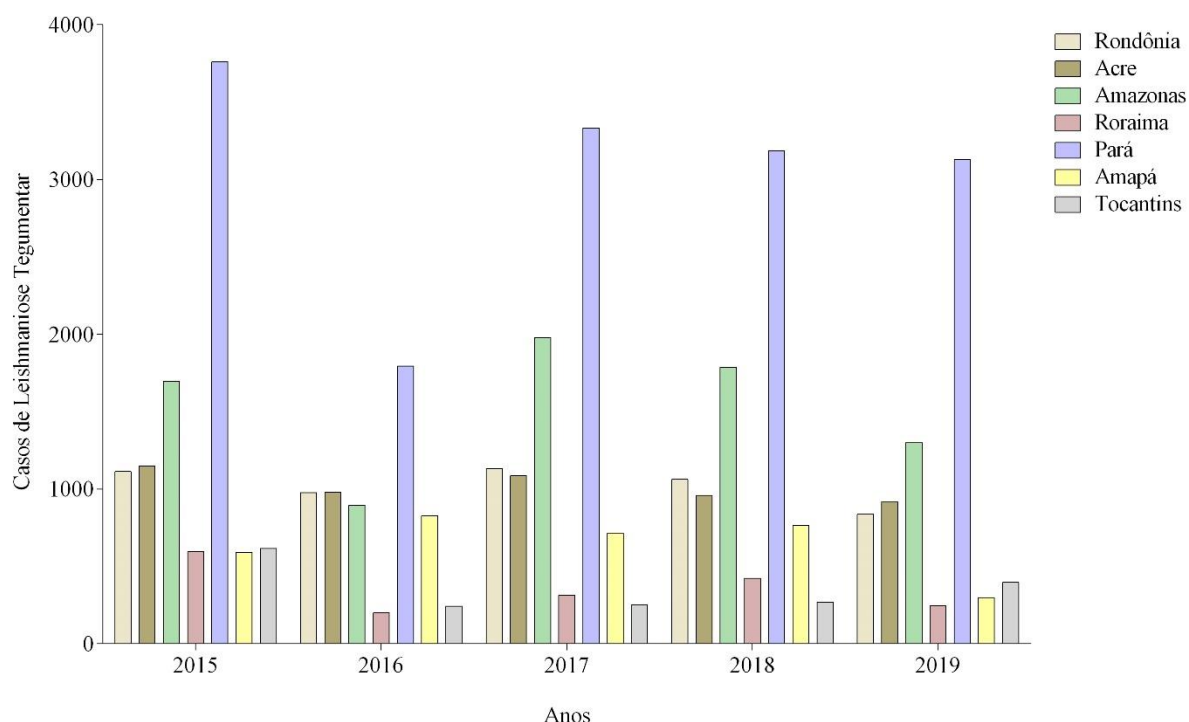
Figura 8 – Casos de Leishmaniose Tegumentar nas Regiões Brasileiras (2015 - 2019).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Na Região Norte as Unidade Federativas que apresentaram maior número de casos em 2019 foram o Pará (3.130 casos), Amazonas (1.300 casos) e Acre (916 casos) (Figura 9) (SINAN/SVS/MS 2021).

Figura 9 – Casos de Leishmaniose Tegumentar na Região Norte (2017).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Historicamente a LT foi considerada uma “doença profissional”, ou seja, relacionada à profissão de pessoas que adentravam ambientes florestais. Entretanto sua epidemiologia tem sofrido uma considerável modificação nas últimas décadas em consequência da proximidade das zonas urbanas com as áreas florestais, ocorrendo uma adaptação do vetor a ambiente peridomiciliar (BARI; RAHMANA, 2008; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Um agravante a esta situação são as medidas de prevenção que não mudam há décadas, atualmente nenhuma vacina está disponível, desta forma, as medidas de controle e prevenção restringem-se a profilaxia pessoal como o uso de repelentes ou mosquiteiros, controle e limpeza de ambientes visando erradicar os flebotomíneos e controle canino ou de outros possíveis hospedeiros em região peridomiciliar. Em vista disso, o intuito é o desenvolvimento de vacinas e medicamentos que possam ser eficazes em prevenir e tratar a leishmaniose (REDDY, 2019).

2.10 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar

A problemática envolvida no combate as infecções causadas pela LT está no seu tratamento. Atualmente os medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde são

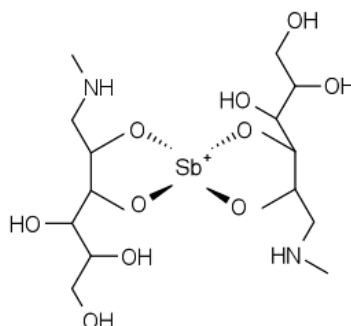
antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e pentoxifilina (BRASIL, 2017; CARGNIN, 2017).

2.10.1 Antimonial Pentavalente

Em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna descobriu a cura das leishmanioses pelos sais de antimônio trivalente (Sb^{+3}), mais especificamente tartarato de antimônio e potássio emético, entretanto a utilização foi descontinuada devido à alta toxicidade, passando a ser utilizado o antimônio pentavalente (Sb^{+5}) (CARVALHO *et al.*, 2019).

Desde 1940, no Brasil o antimonial pentavalente está disponível na formulação de antimoniato de meglumina (Figura 10), conhecido comercialmente como Glucantime[®] (BRASIL, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

Figura 10 – Estrutura química do antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem[®].



Fonte: Próprio autor (2021).

O medicamento é apresentado em ampolas de 5 mL contendo 1.500 mg do sal bruto de antimoniato de meglumina, o que equivale a uma concentração do sal bruto de 300 mg/mL. Desta forma, uma ampola corresponde a 405 mg de Sb^{+5} , ou seja, cada mL contém 81 mg de Sb^{+5} (GLUCANTIME[®], 2015; CARVALHO *et al.*, 2019).

As doses e vias de aplicação preconizadas pelo Ministério da Saúde (2017) são 10 a 20 mg/ Sb^{+5} /Kg/dia e a administração deve ser preferencialmente por via endovenosa (EV), podendo também ser administrado por via intramuscular (IM) ou intralesional (IL) (BRASIL, 2017).

As reações adversas comuns reportadas são dores articulares e musculares, náusea e vômito, cefaleia, febre, anorexia, alterações nos testes de função hepática, níveis de lipase e

amilase, leucopenia, anormalidades no eletrocardiograma (ECG). Podendo também ocorrer reações adversas raras como mal estar geral, dispneia, erupção cutânea, edema facial, dor abdominal, e alterações nos testes da função renal, pancreatite e arritmias severas. Vale ressaltar que este medicamento é contraindicado em casos de hipersensibilidade ao antimoniato de meglumina e aos demais componentes do produto e no período de gravidez (GLUCANTIME[®], 2015).

Estudos quanto à farmacocinética do Glucantime[®] apontam que mais que 80% da dose administrada é excretada dentro de 24 horas na urina na forma inalterada. É eliminada em duas fases, na primeira fase, a meia-vida é pequena e aproximadamente de 2 horas e na segunda fase, a meia-vida é mais lenta, cerca de 76 horas (GLUCANTIME[®], 2015).

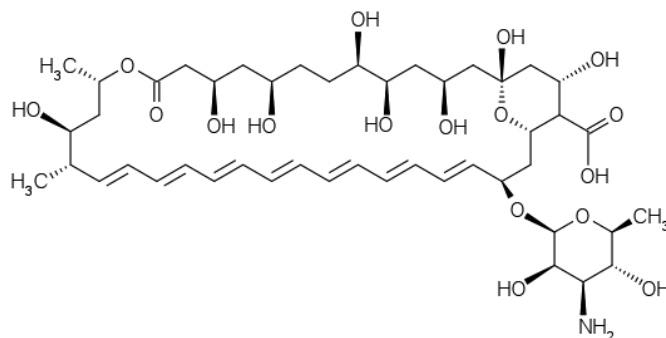
A farmacodinâmica do medicamento permanece incerta. Segundo a bula do Glucantime[®] (2015), pressupõe-se que várias enzimas de *Leishmania* spp. sejam inibidas seletivamente. Esses agentes também parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato. Outras hipóteses são levantadas na literatura, como I) Mecanismo de oxirredução: o Sb^{+5} pode sofrer redução em sistemas biológicos, levando à formação de compostos de Sb^{+3} , tóxicos ao parasita (DEMICHELI *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2019).

Nesta hipótese, os antimoniais podem ser considerados como um pró-fármaco (BASTOS *et al.*, 2016); II) Formação de complexos entre o Sb^{+5} com alguns nucleotídeos: interfere no metabolismo, através da inibição da topoisomerase do parasita (DEMICHELI *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019); III) Formação de complexos entre o Sb^{+5} com alguns glicoconjugados ricos em guanosina 5'-difosfato-D-manose: interfere na virulência do parasita (CHAI *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019); IV) Inibição da enzima superóxido dismutase: ocasiona o aumento do nível de radicais superóxido, com a consequente morte do parasita (RAYCHAUDHURY *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019) e V) Indução de danos ao ADN: o medicamento induz danos ao ADN de células de mamífero infectados por meio da geração de espécies de oxigênio, os quais disparam mecanismos de resposta celular ao estresse oxidativo (MOREIRA, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

2.10.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. No Brasil, estão disponíveis o desoxicolato de anfotericina B (Figura 11) e as formulações lipídicas (BRASIL, 2017).

Figura 11 – Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem[®].



Fonte: Próprio autor (2021).

O desoxicolato de anfotericina B tem como formulação uma suspensão coloidal e é comercializada em um frasco contendo 50 mg de desoxicolato sódico liofilizado de anfotericina B. A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é 0,7 a 1 mg/Kg/dia e a via de aplicação deve ser EV lenta (BRASIL, 2017).

Dentre os efeitos adversos, os mais comuns estão febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, anemia e distúrbios do comportamento (ANFOTERICINA B, 2015). Deve ser ressaltado que este medicamento possui contra indicação em casos de insuficiência renal, hipersensibilidade à anfotericina B ou outro componente da formulação e em casos de gravidez deverá ser empregado com cuidado e somente se os prováveis benefícios a serem obtidos com a medicação prevalecerem sobre os potenciais riscos envolvidos ao feto (ANFOTERICINA B, 2015).

A anfotericina B lipossomal apresenta-se comercialmente em frasco-ampola contendo 50 mg de anfotericina B encapsulada em lipossomas em forma liofilizado estéril para infusão intravenosa, fornecido na forma de pó estéril amarelo-vivo. A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 2 a 5 mg/Kg/dia, por via EV (BRASIL, 2017).

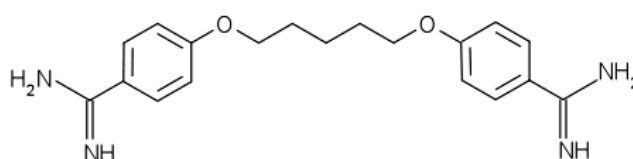
O medicamento é bem tolerado e apresenta como efeitos colaterais mais comuns náusea, vômitos e cefaleia leve. Apresenta contra indicações de uso em pacientes que apresentam hipersensibilidade a qualquer constituinte da formulação e deverá somente ser

utilizado durante a gravidez se os possíveis benefícios se sobrepuserem aos potenciais riscos envolvidos (AMBIOSOME, 2015).

2.10.3 Pentamidina

As pentamidinas são pertencentes às diamidinas aromáticas e o fármaco é apresentado como isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina (Figura 12) (BRASIL, 2017).

Figura 12 – Estrutura química do isetionato de pentamidina. BKchem[®].



Fonte: Próprio autor (2021).

A apresentação comercial do isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) é em frasco - ampola com 300 mg do sal e a dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 3 - 4 mg/Kg/dia por via EV lenta ou IM (BRASIL, 2017).

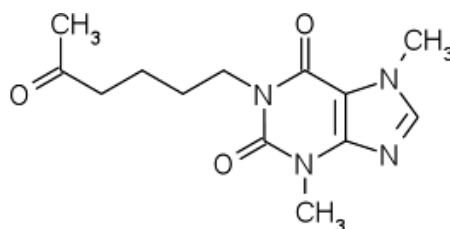
As reações adversas incluem comumente dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Devido ao medicamento ter ação tóxica aguda sobre as células beta-pancreáticas, pode haver hipoglicemia durante o tratamento e diabetes mellitus tardio (BRASIL, 2017).

Além das precauções quanto aos efeitos adversos deve ser considerado que o medicamento é contraindicado em caso de gestação, aleitamento, crianças menores de 1 ano, diabetes mellitus, intolerância à glicose, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas ou hipersensibilidade aos componentes do medicamento (BRASIL, 2017).

2.10.4 Pentoxifilina

A pentoxifilina (Figura 13) é um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas (BRASIL, 2017).

Figura 13 – Estrutura química da pentoxifilina. BKchem®.



Fonte: Próprio autor (2021).

Sua apresentação comercial é como comprimido revestido, de liberação prolongada, contendo 400 mg de pentoxifilina. Vale a ressalva que este medicamento tem papel como adjuvante, não tem indicação como medicamento isolado, mas sim em associação ao antimoníaco de meglumina (BRASIL, 2017).

A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é um comprimido de 400 mg, três vezes ao dia, durante 30 dias por via oral. Tem como principais efeitos adversos flush e distúrbios gastrointestinais, sendo contra indicado em casos de alergia à pentoxifilina e a outras metilxantinas ou a algum de seus excipientes; hemorragias maciças, hemorragia retiniana extensa, durante a gravidez e em crianças (BRASIL, 2017).

2.10.5 Protocolo Terapêutico

O Ministério da Saúde decidiu atualizar as recomendações sobre o manejo dos pacientes com LT (Tabela 3) para a realidade brasileira, desta forma deve-se levar em consideração a forma clínica, a espécie de *Leishmania*, a resposta ao tratamento, a avaliação de risco-benefício ao paciente e a disponibilidade do medicamento a ser utilizado (BRASIL, 2017).

Tabela 3 – Protocolo Terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde.

Protocolo Terapêutico		
Forma Clínica	Espécie	Terapêutica
LCL	<i>Leishmania</i> spp. exceto <i>L. (V.) guyanensis</i>	Primeira escolha: - Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal. Segunda escolha: - Desoxicolato de anfotericina B e Isetionato de pentamidina.
LCL	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Primeira escolha: - Isetionato de pentamidina e Anfotericina B lipossomal. Segunda escolha: - Antimoniato de meglumina e Desoxicolato de anfotericina B.
LD	<i>Leishmania</i> spp.	Primeira escolha: - Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal Segunda escolha: - Desoxicolato de anfotericina B.
LCD	<i>Leishmania</i> spp.	Primeira escolha: - Isetionato de pentamidina Segunda escolha: - Antimoniato de meglumina, Desoxicolato de anfotericina B e Anfotericina B lipossomal.
LM	<i>Leishmania</i> spp.	Primeira escolha: - Antimoniato de meglumina (EV ou IM) associado à pentoxifilina, Antimoniato de meglumina (EV ou IM) e Anfotericina B lipossomal. Segunda escolha: - Desoxicolato de anfotericina B e Isetionato de pentamidina.

Fonte: Brasil (2017).

2.10.6 Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose

A administração de apenas um medicamento (monoterapia funcional) levou ao desenvolvimento de cepas resistentes, desta forma as combinações de medicamentos tornaram-se alternativas de tratamento. Dentre as diversas combinações terapêuticas, têm recebido destaque as associações de medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde com medicamentos como a miltefosina e paromomicina (ALVAR *et al.* 2006; SUNDAR *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2016).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como fármaco antineoplásico, teve o primeiro registro como medicamento oral para leishmaniose em 2002 na Índia (GUERIN *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2016). Este medicamento foi avaliado na Colômbia, Guatemala (SOTO *et al.*, 2004) e Bolívia (SOTO *et al.*, 2008) para o tratamento de LC e apresentou uma taxa de cura de 91%, 53% e 88%, respectivamente. Machado *et al.* (2010) realizaram um estudo no Brasil (Bahia) em que demonstram que a miltefosina apresentou maior eficácia no tratamento de pacientes com *L. (V.) braziliensis* quando comparado ao antimonio de meglumina. Dentre os efeitos adversos causados por este medicamento, os mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal (GUERIN *et al.*, 2002).

A paromomicina é um aminoglicosídeo produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*. Uma das maiores vantagens do uso da paromomicina é por ser considerado um medicamento de baixo custo, entretanto apresenta desvantagens como os efeitos adversos que incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade e disfunção hepática, além da dificuldade da administração que deve ser feita via parenteral (BASTOS *et al.*, 2016).

2.10.7 Impactos Econômicos do Tratamento da Leishmaniose

As drogas utilizadas no tratamento das doenças negligenciadas são, de um modo geral, inacessíveis as populações mais pobres, dessa forma, em busca de melhorar o fornecimento dos medicamentos, as empresas e a OMS/WHO realizam um esforço em conjunto para que esses medicamentos possam ter custos preferenciais (reduzir o valor ou fornecer a custo de produção) ou até mesmo distribuir através de programas de doação (BOER *et al.*, 2011). O WHO (2010) apresentou o custo de cada fármaco, porém cabe a ressalva de que os valores informados foram negociados conjuntamente com as empresas fabricantes visando à obtenção dos medicamentos por um custo acessível (Tabela 4).

Tabela 4 – Preços de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.*

Composto	Nome comercial/Fabricante	Dose	Custo Médio	Custo Médio (R\$)
Antimoniato de Meglumina	Glucantime® Aventis Single Source	Frasco de 5 mL de 81mg/mL	US\$ 1,2	R\$ 6,25
Isetionato de Pentamitina	Pentacarinat® Sanofi	Grátis (Programa de doação)	Grátis (Programa de doação)	Grátis (Programa de doação)
Anfotericina B Desoxicolato	Anfotericina B Unianf	Frasco de 50 mg	US\$ 7,5 por	R\$ 39,08
Anfotericina B Lipossomal	AmBisome® Gilead USA Source	Frasco de 50 mg	US\$ 18	R\$ 93,78
Miltefosina	Impavido® Paladin, Canada Single Source	56 cápsulas (50 mg)	Adultos: € 45,28–54,92 Crianças: € 34,36–39,3	R\$ 279,89 – 339,48 R\$ 212,39 – 242,92
Paromomicina	Paromomicyn® Gland Pharma, India Single Source	Tratamento para 21 dias	US\$ 15	R\$ 78,13

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

*Custo médio em Real (R\$) calculado considerando Dólar Americano US\$ 5,21 e o Euro € 6,18, calculado em 1 agosto de 2021.

No Brasil o tratamento para leishmaniose é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de forma que o diagnóstico e os medicamentos são fornecidos “gratuitamente” a população. Recentemente a miltefosina foi incorporada ao esquema terapêutico para LT no Brasil e foram investidos cerca de 3,5 milhões de reais para a aquisição de 100.976 cápsulas de miltefosina de 50 mg, assim o Ministério da Saúde busca demonstrar os esforços que estão sendo realizados para que mais brasileiros sejam assistidos e tratados com abordagem menos invasivas e mais acessíveis. O conhecimento dessas estimativas é essencial para determinar a formulação de novas políticas para garantir soluções sustentáveis para reduzir os custos do tratamento (SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2018; SVS/MS, 2020).

2.11 Metalômica e Química Inorgânica Medicinal

A metalômica é uma ciência integrada que visa estudar a presença e funcionamento de compostos traço contendo metal e elementos não metálicos em organismos vivos. Através dessa ciência foi comprovado que íons metálicos contribuem criticamente para manutenção e evolução da vida (MARET, 2016).

Recentemente foram descritos cerca de 20 elementos essenciais para o funcionamento adequado do organismo, dentre estes, 10 são elementos metálicos e com base no conhecimento atual constatou-se que metais como sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), manganês (Mn), cobalto (Co), cobre (Cu), zinco (Zn) e molibdênio (Mo) são elementos essenciais, além disso o organismo necessita de quantidades apropriadas para o correto funcionamento (ZORODDU *et al.*, 2019).

A importância dos íons metálicos nos processos biológicos foi sendo descoberta à medida que foram sendo observados que um crescente número de biomoléculas continha ou necessitava de metais em sua estrutura e para o seu funcionamento. Os íons metálicos desempenham papéis cruciais em diversos processos biológicos, sendo componentes essenciais para manter a homeostase humana. Estão envolvidos em processos como equilíbrio de eletrólitos, transporte de oxigênio, transferência de elétrons, catálise, atuação como cofatores na função biológica das proteínas, entre outros (AISEN; ENNS; WESSLING-RESNICK, 2001; ANDREINI *et al.*, 2008; WALDRON *et al.*, 2009; BRADFORD; COWAN, 2014; VAROL, 2016).

Sabe-se que cerca de 30 a 40% de todas as proteínas conhecidas requerem cofatores metálicos, desta forma a saúde, envelhecimento, distúrbios fisiológicos e doenças estão relacionados à presença ou ausência de íons metálicos e seus complexos com biomoléculas no corpo (KASTENHOLZ, 2006; KASTENHOLZ, 2007; SANJAY; SINGH, 2009).

Em geral, os íons metálicos ou os seus compostos apresentam várias funções biológicas que podem ser resumidas em: a) realizar reações difíceis em condições fisiológicas (a maioria dos metais de transição tem a capacidade de fornecer elétrons desemparelhados e doar simultaneamente carga eletrônica); b) realizar transferência de elétrons em pares redox, e estabilizar estados de oxidação “incomum” de metal ativo redox; c) participar na degradação, formação ou metabolismo de compostos orgânicos por sítios metálicos em várias enzimas; c) transferir informações por transportadores de carga e d) participar na formação estrutural de moléculas e em vias de biomineralização (BRADFORD; COWAN, 2014; VAROL, 2016).

Além das funções biológicas, os metais são utilizados para poções farmacêuticas desde as civilizações antigas como a Mesopotâmia, China, Egito e Índia. A ação microbida dos metais foi uma das atividades mais exploradas pelas primeiras civilizações, tem-se o conhecimento de que os egípcios e gregos utilizavam o cobre e a prata para manter a água pura, os romanos armazenavam vinho em urnas de prata e os australianos utilizaram moedas de cobre e prata em tanques de água ou barris de leite para evitar a deterioração (MEDICI; PEANA; ZORODDU, 2018).

Recentemente, os metais têm sido amplamente estudados e aplicados no diagnóstico e terapia de diversas doenças, e o campo de conhecimento que realiza essa forma de estudo é conhecido como química inorgânica medicinal. Apesar da utilização dos metais ser historicamente comprovada o estudo da química inorgânica medicinal ainda é considerado recente (MAGNER, 2005; THOMPSON; ORVIG, 2006; MJOS; ORVIG, 2014).

Na atualidade, os metais utilizados na medicina para a terapêutica de muitas doenças, são denominados de metalofármacos (*Metallo drugs*). Um dos primeiros metalofármacos foi à arsfenamina, comercializada como Salvarsan[®], um agente antimicrobiano à base de arsênio desenvolvido por Paul Ehrlich, que foi utilizado até a segunda guerra mundial como tratamento padrão para sífilis, entretanto a estrela do campo é o agente anticancerígeno cisplatina (Platinol), que foi descoberto em 1965 (MJOS; ORVIG, 2014).

Outros metais já foram utilizados no campo farmacêutico, por exemplo, a prata já foi utilizada como antibiótico no tratamento de feridas, queimaduras e úlceras (VAROL, 2016); o ouro foi usado para tratar doenças há milhares de anos na China (MAGNER, 2005; KRAATZ; METZLER-NOLTE, 2006; VAROL, 2016); o mercúrio foi administrado sob a forma de cloreto de mercúrio(I) como antisséptico e diurético, o cloreto de mercúrio(II) para o tratamento da sífilis (BRADFORD; COWAN, 2014) e o antimônio(V) permanece como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose (CARVALHO et al, 2019).

Além disso, muitas drogas de natureza orgânica não possuem um modo de ação puramente orgânico e necessitam da atuação de vestígios de íons metálicos direta ou indiretamente para ativação ou biotransformação (KASTENHOLZ, 2006; KASTENHOLZ, 2007; SANJAY; SINGH, 2009).

Uma preocupação são as diversas doenças relacionadas à abundância ou deficiência de metal no organismo, podendo ser citadas a hemocromatose (excesso de Fe), anemia (deficiência de ferro), doença de Wilson (excesso de Cu) (LORINCZ, 2010) e a hipozincemia (deficiência de Zn) (TUBEK; GRZANKA; TUBEK, 2008; BRADFORD; COWAN, 2014).

Desta forma, apesar dos íons metálicos apresentarem alto potencial de atividade terapêutica, é necessário que sejam tomadas devidas precauções e que seu uso seja realizado de forma cautelosa quando não houver uma compreensão clara de seu mecanismo de ação, visto que os mesmos podem causar toxicidade ao organismo (BRADFORD; COWAN, 2014).

Apesar da toxicidade ser uma preocupação séria, esta pode ser abordada pelo design adequado dos ligantes, conhecimentos da química de coordenação e desenvolvimento de tecnologias como as nanopartículas; essas abordagens podem oferecer perspectivas interessantes para melhorar a entrega, a captação celular e o direcionamento dos metalofármacos, para torná-los mais eficazes e seguros (BARRY; SANDLER, 2013; BRADFORD; COWAN, 2014).

2.11.1 Química de compostos de coordenação

Antigamente os compostos de coordenação eram considerados um grande desafio para os químicos, devido à dificuldade em compreender como um sal estável como CoCl_3 (cloreto de cobalto) poderia reagir com a amônia em diferentes relações estequiométricas originando novos compostos com coloração diferente. Diversas teorias foram propostas para explicar estes compostos, entretanto, foi Alfred Werner por volta de 1875 e 1915 que deu o ponto de partida para a compreensão dos atualmente chamados “complexos metálicos”, tendo sido assim denominado visto a difícil compreensão do comportamento desses compostos (SANTOS *et al.*, 2014).

Dessa forma, o estudo da química de coordenação iniciou-se a partir das teorias de Alfred Werner e atualmente o enfoque central da química de coordenação é o estudo dos complexos metálicos que consistem em um átomo metal central ou íon metálico ligado a átomos ou grupos de átomos chamados ligantes (do latim *ligare*, que significa “ligar”) que são íons ou moléculas que contêm um ou mais pares de elétrons que podem ser compartilhados com o metal (RAMOS, 2011).

O íon metálico é denominado ácido de Lewis (espécie receptora de pares de elétrons) e os ligantes são as bases de Lewis (espécies doadoras de elétrons). O complexo metálico pode ser neutro, carregado positivamente, ou carregado negativamente; os complexos metálicos eletricamente carregados são às vezes chamados de íons complexos. Um composto de coordenação contém um ou mais complexos metálicos (RAMOS, 2011; CHEMISTRY LIBRETEXTS, 2018).

Inicialmente o estudo dos compostos de coordenação buscou compreender e encontrar novas geometrias, estados de oxidação, cores e números de coordenação dos metais, entretanto com o avanço da tecnologia o comportamento dos complexos começou a ser elucidado e as buscas foram redirecionadas para a compreensão das propriedades magnéticas, biológicas e aplicações na medicina (RAMOS, 2011).

Apesar da utilização dos metais desde a antiguidade, o uso de complexos metálicos estruturalmente definidos ocorreu somente por volta do século XX com a descoberta do Salvarsan[®] que teve a estrutura elucidada somente em 2005. Desde então, diversos complexos começaram a ser sintetizados e aplicados na medicina (GASSER; PRIZE, 2015).

A era dos complexos metálicos na medicina foi de fato anunciada com a descoberta da cisplatina e seu sucesso clínico contra vários tipos de câncer, como câncer de ovário, cabeça e pescoço, pulmão, testículo e bexiga. Com o intuito de melhorar os perfis farmacológicos de complexos metálicos e descobrir novas propriedades medicinais, os cientistas estão se interessando cada vez mais pelo desenvolvimento de compostos de metal não platinado, como rutênio, titânio, índio, gálio, ouro, prata, cobre, entre outros (VAROL, 2016).

Existem vários exemplos de medicamentos à base de metal que ainda estão atualmente em uso e esses compostos ilustram tanto o potencial dessa classe de compostos como a necessidade de um trabalho adicional para aperfeiçoar seu uso em um ambiente clínico (MJOS; ORVIG, 2014).

Os complexos metálicos oferecem propriedades extraordinárias para a produção de produtos farmacêuticos que podem vir a ser utilizados em DTNs, visto que esses complexos possuem propriedades únicas como a fácil síntese em larga escala, além de apresentarem características como capacidade em contornar os mecanismos de resistência e a possibilidade de utilizar a abordagem de design de moléculas multi-alvo, ou seja, síntese de compostos que podem atingir o organismo alvo por pelo menos dois mecanismos independentes. Um exemplo proeminente é auranofin, um dos medicamentos mais antigos que estão sendo reaproveitados por mais de uma doença, incluindo artrite reumatóide, leishmaniose e esquistossomose (ONG *et al.*, 2019).

Atualmente, sabe-se que a união dos ligantes (agentes quelantes) com um íon metálico formam o complexo metálico (quelato) e esse processo de quelação permite melhor direcionamento e proteção contra possíveis reações colaterais, tornando o complexo mais ativo e menos tóxico que o metal de forma isolada. Os ligantes desempenham um papel crucial na eficácia dos complexos metálicos, visto que são responsáveis pela modulação das

propriedades rígidas e flexíveis do metal e o equilíbrio lipofílico e hidrofílico, modificando a solubilidade, bem como a capacidade de atravessar a membrana celular, além disso, a natureza do ligante determina a estabilidade do complexo em relação à transquelação com moléculas biológicas e tem como função transportar o metal para o alvo de maneira estável (MAFFEI *et al.*, 2009; GANDIN *et al.*, 2014).

Devido à versatilidade dos metais de coordenação e a possibilidade de utilizar diferentes ligantes em busca de menor toxicidade, maior atividade biológica, especificidade melhorada, melhor estabilidade ou uma meia vida melhorada *in vivo*, estes têm sido uma nova estratégia para encontrar novas drogas leishmanicidas (TAHGHIGHI, 2014).

2.11.2 Nanopartículas metálicas

A nanomedicina envolve o desenvolvimento e aplicação de materiais e tecnologias em escala nanométrica que sejam recicláveis, sustentáveis, confiáveis e baratas, desta forma, destaca-se por ser um campo interdisciplinar, onde a nanociência, nanoengenharia e nanotecnologia interagem com a finalidade de contribuir na área da saúde (SANCHEZ *et al.*, 2011; BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SILVA, 2016).

A nanotecnologia abre um vasto campo de pesquisa e aplicação devido à capacidade de desenvolver moléculas biológicas em nanoescala, podendo ter aplicabilidade no diagnóstico, tratamento e medicina regenerativa (PELAZ, 2016).

A busca pelo desenvolvimento de medicamentos em nanoescala tem ganho espaço, e estes medicamentos são denominados de nanofármacos (*Nanodrugs*). As nanopartículas (NPs) são os componentes-chave, sendo idealizadas para o sistema de entrega direcionada do medicamento em um sítio alvo, visando o direcionamento do princípio ativo, aumentando a eficácia do fármaco e diminuindo a toxicidade para o organismo (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SILVA, 2016).

A composição, estrutura e características de superfície das NPs podem variar e estas podem possuir um tamanho de 1 - 100 nm. Existem diversos tipos de nanopartículas como lipossomas, micelas, dendrímeros, nanoesferas, nanocápsulas, entre outras. Devido a essas características essas partículas podem realizar a entrega do princípio ativo em locais de difícil acesso no organismo (FARAJI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012; SILVA, 2016).

É necessário ressaltar que o sistema fagocitário mononuclear possui a tendência de eliminar essas NPs, desta forma, é necessário que a propriedade da superfície seja planejada

durante o desenvolvimento em busca de atingir alvos específicos, podendo ocorrer à incorporação de proteínas, anticorpos, glicoproteínas e polissacarídeos na superfície dessas NPs (HE *et al.*, 2010; BISWARO, 2016).

Os macrófagos, células alvo das espécies de *Leishmania*, são conhecidos por apresentarem uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões em sua superfície, sendo assim, há a possibilidade do desenvolvimento de NPs que sejam planejadas para obter o reconhecimento dos receptores presentes na superfície dos macrófagos (GUPTA *et al.*, 2009; SILVA, 2016). As NPs de metal estão despertando interesse devido à atividade antibacteriana, mas diversos estudos têm apresentado atividade significativa de NPs metálicas contra vírus, fungos e parasitas (DELLA PEPA *et al.*, 2017).

2.11.3 Metais de transição na biomedicina

Os metais de transição apresentam características peculiares que favorecem o desempenho em funções biológicas, sendo elas: a) mais de um estado de valência relativamente estável; b) íons de metais de transição, formam complexos fortes com ânions ou com a extremidade negativa de moléculas dipolares, e particularmente em suas valências mais baixas, podem se ligar a O₂, que é uma molécula neutra e simétrica; c) podem apresentar uma surpreendente multifuncionalidade biológica devido a versatilidade nos possíveis ligantes e pelo arranjo espacial dos mesmos (MALKIN; MALMSTROM, 1970).

Na busca e desenvolvimento de novos fármacos os metais de transição surgem como uma alternativa atraente devido ao seu amplo espectro de ação, podendo atuar em diversos compartimentos e organelas dos protozoários, além da baixa toxicidade em hospedeiros mamíferos (VELÁSQUEZ *et al.*, 2017). Diante dessas vantagens diversos estudos tem sido desenvolvido com diferentes metais de transição como cobre, paládio, bismuto e tântalo na busca por atividade leishmanicida (CHAGAS, 2015; KHAN *et al.*, 2018, PATHAK *et al.*, 2017; DOMINGOS, 2018).

2.11.3.1 Cobre

O cobre (Cu) é um metal de transição com número atômico 29 e massa molecular 63,546 g/mol, com três estados de oxidação acessíveis: Cu⁰, Cu⁺ e o Cu²⁺, sendo os dois últimos encontrados nos sistemas biológicos (SABINO, 2014). É um micronutriente essencial

aos organismos que vivem em ambientes ricos em oxigênio, sendo assim, um elemento biologicamente ativo, exercendo diversas funções biológicas como desenvolvimento embrionário, respiração mitocondrial, regulação dos níveis de hemoglobina, respiração celular, metabolismo do ferro, biossíntese de neurotransmissores, desintoxicação por radicais livres, entre outros (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008).

Esse metal em geral está associado a proteínas específicas e as funções desenvolvidas se enquadram em três categorias principais: participação em reações de transferência de elétrons, transporte de oxigênio e transporte ou armazenamento do próprio metal (MALKIN; MALMSTROM, 1970).

A sua ingestão pode ser realizada através do consumo de plantas e a maior concentração de Cu é encontrada no leite materno humano (0,25 a 6,0 mg/L). A absorção desse metal ocorre no estômago e trato intestinal superior, tendo a maior deposição em hepatócitos (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008).

O transporte e a utilização do cobre envolvem uma interação complexa entre transportadores e proteínas/acompanhantes de ligação pois o cobre intracelular precisa ser mantido em um estado complexo e as concentrações de cobre intracelular devem ser extremamente reguladas para evitar o dano oxidativo, visto que íons de cobre livre são extremamente tóxicos e podem causar danos ao ADN, proteínas e componentes da membrana. A presença em excesso ou total ausência de cobre está relacionada a doenças como doença de Wilson e doença de Menkes (TISATO, 2010; KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008; GANDIN *et al.*, 2014).

Além das funções biológicas o cobre complexado pode desempenhar funções terapêuticas; estudos como de Gandin *et al.* (2014) e Porchia *et al.* (2020) têm sido realizados sob a inspiração dos derivados de Cu^+ , apresentando resultados em que complexos de cobre(I) são capazes de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, estudos estão utilizando complexos de cobre em diferentes estados de oxidação contra formas promastigotas e amastigotas, os estudos de Arndt *et al.* (2017), Portas *et al.* (2011) e Maffei *et al.* (2009) apresentam a síntese de complexos de Cu(II) e demonstram a atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Outros estudos foram realizados com diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LT e leishmaniose visceral, podendo ser citado o estudo de Singh *et al.* (2017) que testou salicilaldoxima de cobre (CuSAL) contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani*; Saeed *et al.* (2018) testaram complexos de Cu(I) contra formas promastigotas de *L. tropica* e

Mendéz-Arriaga *et al.* (2018) utilizou complexos de cobre(II) contra formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. donovani*.

2.11.3.2 Paládio

O paládio (Pd) é um metal de transição com número atômico 46 e massa molecular 106,42 g/mol. Apesar de possuir diversos estados de oxidação acessíveis, os principais são II e IV, sendo o Pd(II) o estado de oxidação mais estável e que pode ser encontrado na forma de óxidos, haletos, nitratos e sulfatos (GOIS, 2018).

Atualmente, sabe-se que os compostos de coordenação de Pd(II) apresentam diversas aplicações devido a extensa variedade de ligantes que coordena, entretanto nas últimas décadas, o estudo desses complexos foram concentrados no campo das atividades antiproliferativas e da catalanálise. Novos estudos com esse elemento estão sendo desenvolvidos visando identificar fragmentos farmacofóricos para projetar novos metalofármacos anticâncer bioativos para terapias mais baratas e seguras (KHAN *et al.*, 2018).

Os complexos de paládio destacam-se atualmente devido a atividade antitumoral comparável ou superior a cisplatina, visto que apresentam similaridades estruturais com os de platina, além de apresentar melhor solubilidade e menor toxicidade, tendo como propriedade a interação com ADN e ARN (ácido ribonucleico) (PASSALACQUA, 2018; GOIS, 2018); além de atividades antimicobacteriana e antiprotozoária (SOUZA, 2017).

Diversos estudos têm apresentado resultados da atividade de complexos de Pd contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp., podendo ser citado o estudo realizado por Khan *et al.* (2018) em que complexos de Pd(II) foram testados contra formas promastigotas de *L. tropica* e Cunha *et al.* (2020) e Velásquez *et al.* (2017) que testaram complexos de Pd(II) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

2.11.3.3 Tântalo

O tântalo é um metal de transição, com número atômico 73 e massa molar 180,9479 g/mol, sendo este muito utilizado na indústria para a produção de componentes eletrônicos e equipamentos que necessitam de alta resistência mecânica ou química (KIM *et al.*, 2016), este

metal tem recebido destaque visto que o Brasil é detentor de 98% das reservas comercialmente viáveis, sendo o segundo maior produtor de Ta (USGS, 2017).

Quanto a aplicação biomédica o Ta tem sido relatado como um dos principais componentes em implantes e próteses, visto a sua resistência e baixa capacidade de rejeição (CHELLAN; SADLER, 2015), outros relatos incluem aplicabilidade como possível antitumoral e antiparasitário (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014; DOMINGOS, 2018). Além disso, sabe-se que o tântalo está presente em quantidades mensuráveis no organismo humano, cerca de 0,2 mg, entretanto sem função biológica definida (GREENWOOD, 2003).

Apesar do pouco conhecimento a respeito da aplicação biomédica, bem como o conhecimento da função biológica, esse metal destaca-se, pois, apresenta características semelhantes ao antimônio (Sb), como baixa toxicidade e possibilidade de produção de óxidos, além de ser atrativo comercialmente (KIM *et al.*, 2016).

O estudo de Domingos (2018) é o único relato do uso de nanopartículas de tântalo para o tratamento experimental da leishmaniose cutânea, demonstrando que houve eficácia *in vitro* contra as espécies *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, não apresentando citotoxicidade em modelos *in vitro*, porém em ensaios experimentais *in vivo* com infecção de *Mesocricetus auratus* por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, houve o agravamento na evolução das lesões cutâneas.

2.11.3.4 Bismuto

O bismuto (Bi) é considerado um metal (ou semi-metal), localizado no grupo 15 da classificação periódica, com número atômico 83 e massa molar 208,9, com dois estados de oxidação predominantes, sendo eles o trivalente e o pentavalente. Biologicamente sabe-se que este metal está associado a interações com nucleosídeos/nucleotídeos; aminoácidos/peptídeos e proteínas/enzimas, dessa forma esse metal desperta interesse no estudo para identificação de possíveis alvos de medicamentos à base de Bi (SUN *et al.*, 2011; KEOGAN; GRIFFITH, 2014), além disso outro fator notável é a baixa toxicidade desse metal (KANATZIDIS; SUN; DEHNEN, 2020).

Na medicina os efeitos adstringentes, anti-sépticos e diuréticos de compostos de Bi são conhecidos e aplicados desde os tempos alquimistas, e embora tenha sido utilizado amplamente para o tratamento de sífilis, a demanda desses medicamentos diminuiu

drasticamente após o surgimento dos antibióticos. A retomada da utilização de composto de Bi ocorreu após a descoberta deste elemento como um princípio ativo promissor para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, alguns medicamentos mais famosos são o Pepto-Bismol (subsalicilato de bismuto) e De-Nol (subcitrato de bismuto coloidal) (KEOGAN; GRIFFITH, 2014).

Recentemente, pesquisas com Bi buscam desenvolver novos agentes de contraste de imagem, compostos bioativos de bismuto como fármacos antiinflamatórios, metalodrogas com atividade antimicrobiana, antitumoral e antileishmania (KANATZIDIS; SUN; DEHNEN, 2020).

Estudos recentes foram realizados com complexos de Bi(III) e Bi(V) avaliando atividade antileishmania; Andleeb *et al.* (2019) avaliou a atividade de sete complexos de Bi(V) contra formas promastigotas de *Leishmania tropica* (kwh23) e no estudo realizado por Pathak *et al.* (2017) dois complexos de Bi(III) obtiveram resultados promissores em promastigotas de *Leishmania major*.

2.12 Vias alternativas de tratamento na Leishmaniose Tegumentar

Há cerca de 40 anos atrás o termo “farmacocinética” foi introduzido para denominar o estudo da absorção, distribuição, biotransformação e excreção do fármaco no decurso do tempo. Sendo a absorção o primeiro dos passos cinéticos e para que esta ocorra a droga precisa ser introduzida ou administrada no organismo (SCHELLACK, 2005).

As drogas podem ser administradas sistemicamente ou aplicadas por via tópica; as vias sistêmicas são utilizadas quando há necessidade de absorção pela circulação sanguínea para que a droga seja efetiva, em quanto que na via tópica a absorção ocorre em uma área específica da superfície corporal onde exercerão um efeito localizado. As vias mais utilizadas no tratamento da leishmaniose são intramusculares, endovenosa e intralesional (SCHELLACK, 2005; BRASIL, 2017).

Apesar das vantagens da administração dos medicamentos por via sistêmica, o DNDi (2018b) considera o tratamento da leishmaniose como de difícil administração, além de se tornarem muitas vezes de longa duração e/ou necessitem de hospitalização, o que consequentemente acarreta na desistência do tratamento.

Frente às dificuldades encontradas no tratamento da leishmaniose, há a necessidade da busca por tratamentos alternativos, especialmente visando o desenvolvimento de formulações

para o tratamento tópico e oral que possam ser mais eficazes e com efeitos adversos menores. Neste contexto, o tratamento tópico torna-se uma abordagem atraente para formas clínicas simples de LC que não exijam terapia sistêmica, além disso formulações tópicas podem oferecer vantagens significativas como facilidade de administração, menores efeitos adversos e relação custo-benefício (NASSIF *et al.*, 2017).

Entretanto, para a utilização dessas formulações tópicas deve-se levar em consideração vários fatores como a preparação da formulação (solubilidade, propriedades físico-químicas, pH, viscosidade) e as várias barreiras na pele (condições da pele, hidratação, microflora, pH, temperatura, metabolismo, efeitos dos solventes, agentes bioquímicos, transpiração) considerando que a mesma é constituída de diversas camadas, sendo elas: camada córnea, epiderme, derme, hipoderme e os apêndices (folículos capilares, glândulas sebáceas, glândulas écrinas e glândulas apócrinas) (GARNIER; CROFT, 2002).

Outra consideração importante refere-se às diferentes manifestações clínicas que a LT apresenta, visto que as condições da pele podem apresentar característica de favorecimento a formulações tópicas como a presença de lesões abertas em que há perda das propriedades de barreira da camada córnea ou a presença de espessamento epitelial e formação de escara que pode apresentar um impedimento adicional à absorção (GARNIER; CROFT, 2002; NASSIF *et al.*, 2017).

Dessa forma, o desenvolvimento de formulações tópicas deve considerar propriedades físico-químicas e o efeito na liberação percutânea de absorção e retenção de drogas nos locais de infecção na derme, sempre ressaltando que a eficácia terapêutica irá depender da permeação adequada e da potência farmacológica (GARNIER; CROFT, 2002; NASSIF *et al.*, 2017).

2.12.1 Pomadas

As pomadas são preparações semissólidas, de consistência mole, destinadas ao uso na pele e/ou mucosas, sendo utilizadas como lubrificantes ou hidratantes, ou para aplicação de substâncias ativas na pele, com fim protetor, terapêutico ou profilático, quando se deseja promover um efeito oclusivo. Quando aplicadas sobre a pele devem amolecer ou fundir-se com a temperatura corporal, necessitando em algumas circunstâncias de pequenos esforços mecânicos na aplicação. Comumente as pomadas apresentam atividade terapêutica mais efetiva quando comparado aos cremes, entretanto, há uma predileção dos pacientes ao uso de cremes (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018; PATRÍCIO, 2018).

As pomadas podem ser obtidas a partir da incorporação (não necessita de aquecimento) ou fusão (necessita de aquecimento). As preparações a temperatura ambiente (TA), apenas utilizando método de mistura sem aquecimento são indicadas como de melhor conduta visto que possuem a capacidade de melhor preservação do princípio ativo e melhores características quanto à espalhabilidade (PATRÍCIO, 2018).

As pomadas podem ter características hidrofóbicas ou hidrofílicas; usualmente as pomadas hidrofóbicas possuem efeito emoliente, são de difícil remoção, não “secam” ou alteram visivelmente com o tempo, além disso, servem para manter o fármaco em contato prolongado com a pele e agem como curativos oclusivos. São em geral constituídas de anidras e absorvem apenas pequenas quantidades de água, utilizando como bases para sua formulação hidrocarbonetos insolúveis em água, como parafinas, óleos vegetais, gorduras animais, ceras, entre outras (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

As pomadas tipicamente hidrofílicas são miscíveis e removíveis com água, de base gordurosa (hidrofóbica) na qual um agente emulsificante A/O (gordura de lanolina, álcool de lanolina, éster de sorbitano, monoglicerídeo ou álcool graxo) é incorporado para torná-las hidrofílicas (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

A escolha da base para a formulação deve considerar diversos fatores, como a natureza do fármaco, a ação desejada, a biodisponibilidade, as condições clínicas do local em que será aplicado e estabilidade física e química (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma avaliação pré-clínica de complexos (cobre e paládio) e nanopartículas (tântalo e bismuto) metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- Avaliar o efeito *in vitro* do complexo de cobre(I) em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* do complexo de cobre(I) em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos;
- Investigar a eficácia *in vivo* do complexo de cobre(I) no tratamento experimental de leishmaniose cutânea em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania* spp.

Capítulo 2

- Sintetizar complexos de paládio(II);
- Avaliar o efeito *in vitro* dos complexos de paládio em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos complexos de paládio em macrófagos peritoneais murinos.

Capítulo 3

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de tântalo;
- Avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de tântalo em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas de tântalo em macrófagos peritoneais murinos;
- Investigar a eficácia *in vivo* das nanopartículas de tântalo no tratamento experimental de leishmaniose cutânea em camundongos (*Mus musculus*) infectados por *Leishmania* spp.

Capítulo 4

- Avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de bismuto em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de bismuto em macrófagos peritoneais murinos.