



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

ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

**ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PENTAVALENTE E DA
HESPERIDINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL**

**MANAUS - AM
2023**

ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

**ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PENTAVALENTE E DA
HESPERIDINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, Dra.
Coorientadora: Ana Flávia da Silva Chagas.

**MANAUS - AM
2023**

Ficha Catalográfica

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

B823e Brasil, Anny Maíza Vargas
Estudo de nanopartículas de antimônio pentavalente e da
hesperidina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental /
Anny Maíza Vargas Brasil . 2023
137 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientadora: Ana Flávia da Silva Chagas
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Nanopartículas. 2. Antimônio pentavalente. 3. Hesperidina. 4.
LTA-Leishmaniose Tegumentar Americana. 5. Intralesional. I.
Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

“Estudo de nanopartículas de antimônio pentavalente e da hesperidina no tratamento de leishmaniose tegumentar”

DISCENTE: ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

PARECER:

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

Manaus - AM, 17/07/2023.



Documento assinado digitalmente
EMERSON SILVA LIMA
Data: 29/05/2026 22:02:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGIF

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


Antônia Maria Ramos Franco Pereira, DSc.
Pesquisador titular III, Produtividade Científica 2
CSAS/Lab. Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA
Av. André Araújo, no. 2936, Alameda
Tel +55 (92) 3643-3068/3065, Fax +55 (92) 3643-3063
e-mail: afreco@inpa.gov.br
Antônia Maria Ramos Franco Pereira
Pesquisador Titular
BIAPE nº 131208
BPA/INCT

Profa. Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira
Orientadora e Presidente da banca



Documento assinado digitalmente
HELIDE ALBUQUERQUE MARINHO
Data: 18/07/2023 18:28:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Helyde Albuquerque Marinho
Membro (INPA)



Documento assinado digitalmente
THAIS TIBERY ESPIR
Data: 19/07/2023 14:52:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Thaís Tibery Espir
Membro (UFAM)



Documento assinado digitalmente
DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO
Data: 19/07/2023 14:04:34-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente
JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA
Data: 19/07/2023 09:30:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Membro (INPA)

DEDICATÓRIA

A DEUS, a razão de tudo, o arquiteto de tudo, o dono da minha vida
Aos meus pais e familiares, que sempre me deram asas para ir além de tudo quanto eu
poderia imaginar que conquistaria,
Aos amigos e parceiros dessa caminha,
A todas as pessoas indispensáveis na minha vida,
ESSE MÉRITO É NOSSO!

AGRADECIMENTOS

“Os que com lágrimas semeiam, com júbilo ceifaram”

Salmos 126:5

Deus, nessa longa jornada de anos nada seria possível se o Senhor não fosse meu alicerce, não é possível expressar essa experiência em palavras, mas o que me conforta é saber que nunca estive sozinha, você sempre esteve lá, ao meu lado! Obrigada, Aba pai!

A toda minha família, em especial aos meus pais Adonias e Maria Nelci, por todo amor, dedicação, educação e paciência, por serem pessoas incríveis e inspiradoras. Minha mãe, minha primeira professora, que me alfabetizou e meu pai sempre dando todo suporte, me apaixonei pelos livros através de vocês! Obrigada por abrirem as portas e me permitirem sonhar! A minha irmã que em um dos momentos mais difíceis, se mudou para Manaus para que eu não desistisse da minha jornada, obrigada pela amizade, parceria e todo amor! Amo vocês!

Ao meu esposo, Amauri Junior, que veio como um Porto Seguro no meio dessa trajetória, obrigada pela paciência, amor, cuidado, abraços quentinhos nas crises de ansiedade e por acreditar em mim. Amo você!

A minha orientadora Dra. Antonia Franco, a todos os ensinamentos, oportunidades e confiança dispensada a mim, por todas às vezes que disse “vai dar tudo certo”, meu MUITO OBRIGADA com uma carga enorme de gratidão.

A Dra. Maricleide Naiff, pelos conselhos, ensinamentos e por sempre estar disposta a nós ouvir e ajudar no que for preciso.

Ao Dr. Andriy Grafov pela receptividade na Finlândia, paciência e colaboração.

Ao grupo do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas em especial aos técnicos Ana Cleide e Lourival Maciel, por todo suporte, colaboração e ensino.

A Dra. Ana Flávia Chagas, pela amizade, parceria, colaboração, paciência e conhecimento compartilhado comigo desde o mestrado, sua ajuda foi indispensável para a realização dessa pesquisa. A Dra. Pauline Soldera pela amizade, bondade, e todo suporte. Passar por essa jornada com vocês com certeza tornaram os nossos dias mais leves, que honra compartilhar tudo isso com vocês, o maior presente com certeza é levar vocês para a vida.

Aos ex alunos de iniciação científica que colaboraram com esse projeto, Theodora Paiva, Rayane Matsuhi, João Lopes, a colaboração de vocês foi imprescindível na realização

dessa pesquisa, obrigada pela parceria e amizade, eu aprendi muito com vocês. Não poderia deixar de agradecer também a Breno Mota, Carolina Correa, Joyara Menezes, pela amizade e tantos momentos compartilhados. Todos vocês marcaram a minha trajetória acadêmica e além de tudo, se tornaram grandes amigos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF), 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

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

EPÍGRAFE

Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança. Jeremias 29:11
(Palavras dele (DEUS) para mim no dia que tudo começou ainda no mestrado)

“Pensei
que a liberdade vinha com a idade
depois pensei
que a liberdade vinha com o tempo
depois pensei
que a liberdade vinha com o dinheiro
depois pensei
que a liberdade vinha com o poder
depois percebi
que a liberdade não vem
não é coisa que lhe aconteça
terei sempre de ir eu”

(Constelação de Sónia Balacó)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose infecto-parasitária, não contagiosa ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. O esquema terapêutico da LTA no Brasil diferencia-se de acordo com a manifestação clínica, espécie e localidade em que ocorreu a infecção. Apesar da eficácia dos fármacos atuais, eles possuem alta toxicidade, efeitos colaterais e resistência parasitária. Neste sentido, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para a obtenção de novas formulações farmacêuticas, partindo da química inorgânica medicinal devido aos estudos com íons metálicos apresentarem atividades terapêuticas promissoras, assim como, também fármacos de origem sintética que representam uma significativa parcela do mercado farmacêutico. O presente estudo tem como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antileishmania de nanopartículas do antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) e a atividade da hesperidina comercial (glicosídeo flavanona) frente às espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi*, *in vitro* e *in vivo*. Neste sentido as NPSb⁵⁺ (4 a 0,25 mg/ Sb⁵⁺/mL) e a hesperidina (9 a 0,56 mg/mL) foram testadas *in vitro* frente as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. Para averiguar a viabilidade parasitária e taxa de infecção, respectivamente; assim como a atividade citotóxica frente a macrófagos peritoneais murinos. Os ensaios *in vivo* foram realizados com as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) frente a dois protocolos terapêuticos. Os resultados demonstram que as NPSb⁵⁺ apresentam resultados promissores *in vitro* frente as espécies de *Leishmania* testadas e não apresentou citotoxicidade a macrófagos peritoneais murinos, no estudo pré-clínico induziram a cura clínica dos animais infectados com *L. (V.) guyanensis* (protocolo 1 e 2) e *L. (V.) braziliensis* (protocolo 1) e não apresentou sinais clínicos indicativos de toxicidade. A hesperidina apresentou resultados promissores *in vitro* frente às espécies de *Leishmania* testadas, entretanto, apresentou citotoxicidade moderada em macrófagos peritoneais murinos nas maiores concentrações, no estudo pré-clínico a hesperidina induziu a cura clínica de 50% dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* tratados com GTH2 (Grupo infectado e tratado com 4 mg/mL da hesperidina). A continuidade desse estudo é necessária de modo a avaliar outros parâmetros, considerando as NPSb⁵⁺ como fortes candidatos ao tratamento da leishmaniose tegumentar com eficácia superior ao observado no tratamento com a hesperidina.

Palavras-chave: Nanopartículas, Antimônio pentavalente, Hesperidina, LTA, Intralesional.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious-parasitic, non-contagious zoonosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which affects the skin and mucous membranes. The therapeutic scheme for ATL in Brazil differs according to the clinical manifestation, species and locality where the infection occurred. Despite the effectiveness of current drugs, they have high toxicity, side effects and parasite resistance. In this sense, several researches are being developed to obtain new pharmaceutical formulations, starting from medicinal inorganic chemistry due to studies with metallic ions presenting promising therapeutic activities, as well as drugs of synthetic origin that represent a significant portion of the pharmaceutical market. The present study aims to synthesize, characterize and evaluate the antileishmania activity of pentavalent antimony nanoparticles (NPSb⁵⁺) and the activity of commercial hesperidin (flavanone glycoside) against the species *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) naiffi*, *in vitro* and *in vivo*. In this sense, the NPSb⁵⁺ (4 to 0.25 mg/Sb⁵⁺/mL) and hesperidin (9 to 0.56 mg/mL) were tested *in vitro* against promastigotes and amastigotes of *Leishmania* spp. To ascertain parasite viability and infection rate, respectively; as well as the cytotoxic activity against murine peritoneal macrophages. The *in vivo* assays were carried out with the species *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* in hamsters (*Mesocricetus auratus*) against two therapeutic protocols. The results demonstrate that the NPSb⁵⁺ present promising results *in vitro* against the *Leishmania* species tested and did not present cytotoxicity to murine peritoneal macrophages, in the preclinical study they induced the clinical cure of the animals infected with *L. (V.) guyanensis* (protocol 1 and 2) and *L. (V.) braziliensis* (protocol 1) and did not show clinical signs indicative of toxicity. Hesperidin showed promising *in vitro* results against the *Leishmania* species tested, however, it showed moderate cytotoxicity in murine peritoneal macrophages at the highest concentrations, in the preclinical study hesperidin induced clinical cure in 50% of animals infected with *L. (V.) braziliensis* treated with GTH2 (Group infected and treated with 4 mg/mL of hesperidin). The continuity of this study is necessary in order to evaluate other parameters, considering the NPSb⁵⁺ as strong candidates for the treatment of tegumentary leishmaniasis with greater efficacy than that observed in the treatment with hesperidin.

Keywords: Nanoparticles, Pentavalent antimony, Hesperidin, LT, Intralesional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2 - Inseto vetor da Leishmaniose, gênero <i>Lutzomia</i> spp.....	18
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 4 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. A) Leishmaniose cutânea localizada; B) Leishmaniose cutânea disseminada; C) Leishmaniose cutânea difusa; D) Leishmaniose mucosa.....	21
Figura 5 - Número de casos de LTA nas Américas no período de 2001-2021, com destaque para Brasil, Área Andina, América Central, Cone sul, Caribe não - latino e México.	22
Figura 6 - Escala de grandezas. A) Proporção entre diâmetros da terra, bola e fulereno C-60. B) Escala comparativa de tamanho entre milímetro e nanômetro.....	29
Figura 7 - Tipos de nanopartículas.....	30
Figura 8 - Estrutura química básica dos flavonoides	35
Figura 9 - Estrutura química da (A) hesperetina e (B) hesperidina	35
Figura 10 - Fluxograma com delineamento experimental por espécie estudada	43
Figura 11. Cronograma esquemático – protocolo I	44
Figura 12. Cronograma esquemático – protocolo II.....	45
Figura 13 - Efeito citotóxico das NPSb ⁵⁺ (4 – 0,25 mg/Sb ⁵⁺ /mL) em cinza, em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas, em comparação aos controles Glucantime [®] em verde (8 mg/ Sb ⁵⁺ /mL) e NMGA em azul (0,101 mg/mL).....	81
Figura 14. Atividade das NPs Sb ⁵⁺ em cinza (4 – 0,25 mg/Sb ⁵⁺ /mL) frente às formas promastigotas de (A): <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , (B): <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , (C): <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (D): <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> no período de 24, 48 e 72 horas em comparação ao controle negativo em rosa, NMGA em azul (0,101 mg/mL) e Glucantime [®] em verde (8 mg/ Sb ⁵⁺ /mL). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey (p<0,05). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey (p<0,05).	82

Figura 15. Efeito das NPs Sb^{5+} em cinza (4 – 0,25 mg/ Sb^{5+} /mL) em amastigotas intracelulares de (A): *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, (B): *Leishmania (Viannia) guyanensis*, (C): *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (D): *Leishmania (Viannia) naiffi* em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação ao controle negativo em rosa (macrófagos infectados e não tratados), NMGA em azul (0,101 mg/mL) e Glucantime® em verde (8 mg/ Sb^{5+} /mL). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). 84

Figura 16. Volume do focinho de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). Hamster não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha roxa), infectado e tratado com placebo (linha amarela), infectado e tratado com 1,15 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de Glucantime® por via intralesional (linha azul), infectado e tratado com 1,15 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de GSb1 por via intralesional (cor verde claro) e infectado e tratado com 4,0 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de GSb2 por via intralesional (linha verde escuro) 85

Figura 17. Aspecto clínico das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C) no 60º 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 solução salina (placebo). A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com 1,15 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de Glucantime®. A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 1,15 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de GSb1 por via intralesional. A6, B6, C6 - animal infectado e tratado com 4,0 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de GSb2 por via intralesional 86

Figura 18 -Volume do focinho de hamsters infectados com *L. (V.) guyanensis* durante o tratamento (A1) e período de observação A2 e hamsters não infectados para avaliação de toxicidade durante o tratamento (B1) e período de observação (B2). Hamster não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha roxa), infectado e tratado com solução salina placebo (linha amarela), infectado e tratado com 4 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de Glucantime® por via intralesional (linha azul), infectado e tratado com 4 mg. Sb^{5+} .Kg.dia de NPSb $^{5+}$ por via intralesional(linha verde escuro). 88

Figura 19 - Aspecto clínico do focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (V.) guyanensis* e tratados com NPSb $^{5+}$ (B) e análises de toxicidade em focinho *Mesocricetus auratus* não infectados e tratados com NPSb $^{5+}$ (C). A-Grupos controles: A1- animal não infectado e não tratado, A2- animal infectado e não tratado, A3 - animal infectado e tratado

com solução salina (placebo). B1 e B3: Animal infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime® e NPSb⁵⁺ após 30 dias de tratamento. B2 e B4: 30° de observação pós-tratamento. C1 e C3: Animal não infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime® e NPSb⁵⁺ após 30 dias de tratamento. C2 e C4: 30° de observação pós-tratamento..... 89

FIGURA 20 - Efeito citotóxico da hesperidina (9,00 – 0,56 mg.mL⁻¹, barras amarelas) e Glucantime® (8 mg.Sb⁵⁺.mL⁻¹, barras azuis) em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas. (*) representa diferença estatística comparada ao Glucantime® segundo teste de Tukey (p < 0,05). 56

FIGURA 21 - Atividade da hesperidina (9,00 – 0,56 mg.mL⁻¹, barras amarelas) frente às formas promastigotas de (A) *L. (L.) amazonensis*, (B) *L. (V.) guyanensis*, (C) *L. (V.) braziliensis* e (D) *L. (V.) naiffi* no período de 24, 48 e 72 horas em comparação ao controle negativo (barras rosas) e Glucantime® (8 mg. Sb⁵⁺.mL, barras azuis). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey (p < 0,05). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey (p < 0,05). 57

FIGURA 22 - Efeito da hesperidina (9,00 – 0,56 mg.mL⁻¹, barras amarelas) em amastigotas intracelulares de (A) *L. (L.) amazonensis*, (B) *L. (V.) guyanensis*, (C) *L. (V.) braziliensis* e (D) *L. (V.) naiffi* em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação ao controle negativo (barras rosas) (macrófagos infectados e não tratados), e Glucantime® (8 mg.Sb⁵⁺.mL⁻¹, barras azuis). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey (p < 0,05). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey (p < 0,05)...... 59

FIGURA 23. Volume do focinho de *hamsters* infectados com *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). *Hamster* não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha lilás), infectado e tratado com placebo (linha amarela), infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia de Glucantime® (linha azul), infectado e tratado com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina (verde escuro) e infectado e tratado com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina (verde claro). 61

FIGURA 24. Aspecto clínico das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C) no 60° dia de experimentação. 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 placebo. A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com Glucantime® (1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia). A5, B5, C5 – animal

infectado e tratado com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina. A6, B6, C6 - animal infectado e tratado com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina 62

FIGURA 25. Taxa de infectividade em macrófagos contada pela impressão em lâmina de fragmentos de lesões de *hamsters* infectados com *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). Animais infectados e não tratados (barra rosa), animais infectados e tratados com 1,15 mg/kg/dia de Glucantime[®] (barra azul), animais infectados e tratados com placebo (barra amarela), animais infectados e tratados com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina (barra verde escuro) e animais infectados e tratados com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina (barra verde claro). Cada barra representa a média ± desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes 64

Figura 26 - Casos notificados no Brasil em 2022 no período de janeiro a dezembro por Leishmaniose Tegumentar. 100

Figura 27- Casos notificados em Unidades Federativas de infecção por Leishmaniose Tegumentar em 2022. 101

Figura 28 - Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar por sexo no Brasil em 2022. 102

Figura 29 - Tipo de entrada (caso novo ou recidiva) de Leishmaniose Tegumentar no Brasil em 2022. 102

Figura 30 - Critério de confirmação de casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil em 2019. 103

Figura 31 - Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar por manifestação clínica. 103

Figura 32- Evolução dos casos de Leishmaniose Tegumentar quanto a cura e abandono 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos novos de LT entre os anos de 2012 a 2019, nas regiões do Brasil.....	23
Tabela 2- Concentração inibitória (CI_{50} mg $\pm$ SD) das NPSb ⁵⁺ e Glucantime [®] em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	81
Tabela 3 Concentração inibitória (CI_{50} mg $\pm$ SD) das NPSb ⁵⁺ e Glucantime [®] em formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	83
Tabela 4 - Concentração inibitória média (CI_{50} mg $\pm$ SD) da hesperidina e Glucantime [®] em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	56
Tabela 5 - Concentração inibitória média (CI_{50} mg $\pm$ SD) da hesperidina e Glucantime [®] em amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos	58
Tabela 6- Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar por raça e sexo no Brasil em 2019	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DIs – Doenças infecciosas

DNDi – *Drugs for Neglected Diseases initiative*

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

DP – Desvio Padrão

EV – Endovenoso

FDA – *Food and Drug Administration*

IL – intralesional

IM – Intramuscular

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

LC – Leishmaniose Cutânea

LM – Leishmaniose Mucosa

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg – miligramas

MS – Ministério da Saúde

nm – Nanômetro

NMGA – N-metilglucamina

NNN – Meio de cultura sólido Novy, McNeal e Nicolle

NPs – Nanopartículas

OMS – Organização Mundial de Saúde

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute Medium

Sb – Antimônio

Sb³⁺ – Antimônio Trivalente

Sb⁵⁺ – Antimônio Pentavalente

SBFi – Soro Fetal Bovino inativado

SINAN – Sistema de Informação de Agravos e Notificações

uM – micromolar

WHO – World Health Organization

NPsSb⁵⁺ – Nanopartículas de Antimônio Pentavalente

DIs – Doenças Infecciosas

NNI – Iniciativa Nacional de Nanotecnologia

GNI – Grupo não infectado

GINF – Grupo infectado e não tratado

GTP – Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo);

GTG – Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL de Glucantime[®]

GTH1 – Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺

GTH2 – Grupo infectado e tratado com 4 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺

GI1 – Grupo infectado e não tratado

GP1 – Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo)

GG1 – Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL de Glucantime[®];

GSb1 – Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺

GSb2 – Grupo infectado e tratado com 4 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺

° graus

° C graus Celsius

® marca registrada

% por cento

* asterisco

+ sinal de mais

™ marca comercial

ζ zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Doenças Tropicais Negligenciadas	13
2.2	Histórico da Leishmaniose	14
2.3	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	16
2.3.1	O gênero <i>Leishmania</i>	16
2.3.2	Insetos vetores e hospedeiros vertebrados	17
2.3.3	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	18
2.3.4	Manifestações clínicas da LT	20
2.3.5	Epidemiologia da LT	22
2.3.6	Tratamento da LT	23
2.4	Reposicionamento de fármacos para tratamento da LT	26
2.5	Nanotecnologia para o tratamento da LT	28
2.5.1	O elemento antimônio (Sb).....	31
2.6	A utilização de produtos naturais na indústria farmacêutica.....	33
2.6.1	Hesperidina	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODO	38
4.1	Etapa 1: Síntese e caracterização das nanopartículas (NPs).....	39
4.1.1	Nanopartículas de Antimônio Pentavalente (NPSb ⁵⁺)	39
4.1.2	Caracterização das NPSb ⁵⁺	39
4.2	Etapa 2: Atividade biológica – Estudo <i>in vitro</i>	39
4.2.1	Aspectos éticos.....	40
4.2.2	Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária	40

4.2.3	Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	10
4.2.4	Determinação da atividade das NPSb ⁵⁺ e da hesperidina contra formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	40
4.2.5	Obtenção e manutenção de macrófagos peritoneais murinos	41
4.2.6	Ensaio de citotoxicidade	41
4.2.7	Verificação da viabilidade de formas amastigotas após exposição às NPSb ⁵⁺ e a hesperidina	42
4.3	Etapa 3. Atividade Biológica – Estudo pré-clínico <i>in vivo</i>	42
4.3.1	Procedência dos animais	42
4.3.2	Infecção em hamsters dourados (<i>Mesocricetus auratus</i>) por <i>Leishmania</i> spp.	42
4.3.3	Delineamento experimental do tratamento com NPSb ⁵⁺	43
4.3.4	Delineamento experimental do tratamento com hesperidina	45
4.3.5	Eutanásia dos animais	46
4.3.6	Diagnóstico parasitológico por método direto	46
4.3.7	Diagnóstico parasitológico por cultivo	46
4.3.8	Avaliação hematológica.....	46
4.3.9	Avaliação de toxicidade	47
4.3.10	Análise Estatística	47
4.4	Etapa 4 - Levantamento Epidemiológico	47
Capítulo 1.....		48
Capítulo 2.....		73
Capítulo 3.....		97
5	DISCUSSÃO GERAL	109
6	CONCLUSÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS.....		112

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas e não contagiosas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, ocasionando desde infecção visceral progressiva (Leishmaniose Visceral – LV) a lesão cutânea e mucosa (Leishmaniose Tegumentar Americana – LT), esta última por sua vez apresenta manifestação polimórfica de pele e mucosa, estando associada à alta morbidade (STEVERDING, 2017; GLANS et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento. Aproximadamente, 98 países já notificaram a doença, acometendo 12 milhões de pessoas e 350 milhões estão expostas a doença em todo o mundo (WHO, 2013). No Brasil a LT é considerada uma das afecções dermatológicas que merecem atenção, pois apresenta ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões. Em 2018, foram notificados no Brasil 16.432 novos casos, com destaque para a região norte (7.519 casos) e nordeste (3.717 casos). No mesmo período, foram reportados 1.684 novos casos no Amazonas, sendo classificado como o segundo estado da região norte com maior número de notificações para LT (SINAN/SVS/MS, 2019; BRASIL, 2017).

O tratamento das diferentes formas clínicas da leishmaniose durante décadas utilizou os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) como drogas de primeira escolha (MAIA; MONTE, 2019). Atualmente no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso de quatro fármacos, o Antimoniato de N-metil Glucamina (Glucantime®), Anfotericina B (Albucet®), Anfotericina B lipossomal e o Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat®). Para determinação da terapêutica, deve considerar principalmente as características clínicas das lesões, a susceptibilidade aos medicamentos, a localização geográfica em que a infecção foi adquirida e a espécie de *Leishmania* infectante (BRASIL, 2017).

Os fármacos utilizados atualmente apresentam eficácia limitada, visto que exibem alta toxicidade, estão relacionados a uma série de efeitos adversos, além de uso parenteral, resistência parasitária e o custo elevado no tratamento. Diante dessas limitações a OMS recomenda o incentivo à busca por novos medicamentos e tratamentos como drogas alternativas (BRASIL, 2017; HOLANDA et al., 2018; FILHO et al., 2020).

Diversas pesquisas estão estudando a possibilidade de reposicionamento de fármacos, que é uma estratégia utilizada geralmente para doenças que não recebem tantos investimentos como é o caso da leishmaniose, este se trata de uma forma de pesquisa que investiga se um medicamento já conhecido e utilizado clinicamente apresenta alguma atividade contra outra doença ainda sem tratamento ou ainda para a mesma doença, no entanto, com alguma modificação na sua formulação (SILVA, 2015; SILVA, 2015).

Nesse sentido, estudos tem sido realizados com substâncias advindas de produtos naturais como a hesperidina, que segundo Gomes et al. (2017) trata-se de um flavonoide pertencente ao grupo das chalconas comumente utilizadas em estudos de atividade antileishmania; também outras pesquisas estão sendo desenvolvidas na área inorgânica como as nanopartículas produzidas a partir de antimônio Sb^{5+} conforme descreve Franco et al. (2016) sobre a eficácia dessa formulação frente a espécie *L. (L.) amazonensis* causadora de LT.

Com isso esse estudo tem como objetivo testar dois princípios ativos já aprovados na terapêutica clínica, os antimoniais pentavalentes já utilizados para o tratamento de leishmaniose, no entanto com a aplicação de uma nova tecnologia, assim como também a hesperidina, um princípio ativo aprovado em sinergismo com a diosmina, conhecido comercialmente como Daflon[®], preconizado para tratar varizes e outros sintomas relacionados a insuficiência venosa crônica, ambos reposicionados nesse trabalho para avaliar a atividade antileishmania em espécies causadoras de LT.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Doença é uma condição particular que prejudica a função normal de órgãos, sistemas e do organismo como um todo, associado a sinais e sintomas específicos. Alguns fatores levam ao comprometimento dessas funções, os fatores intrínsecos surgem de dentro do hospedeiro geralmente associado às características genéticas de um organismo, enquanto os fatores extrínsecos são originados de fora do hospedeiro, geralmente associado ao contato com um agente infeccioso, essas são denominadas Doenças Infecciosas (DIs) (NII-TREBI, 2017).

As DIs ocupam uma posição de destaque no mundo, estima-se que pelo menos 25% das cerca de 60 milhões de mortes que ocorrem no mundo a cada ano, são devidas as doenças infecciosas, dentro dessa parcela estão inclusas as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) (NII-TREBI, 2017; HERNANDEZ et al., 2019), representadas por um grupo diversificado de doenças transmissíveis (protozoários, bactérias, helmintos e vírus) que afetam principalmente pessoas que vivem em situação de pobreza, com dificuldades de acesso a água tratada, falta de saneamento básico, condições precárias de habitação e em contato com vetores e agentes infecciosos (YAMEY et al., 2018; HERNANDEZ et al., 2019; OMS/OPAS, 2019).

A OMS priorizou 23 DTNs por serem endêmicas em 149 países, afetarem mais de 1,4 bilhão de pessoas anualmente e contribuírem para a morbidade, incapacidade e pobreza substancial, dessa forma gerando um impacto considerável nessas regiões (YAMEY et al., 2018; HERNANDEZ et al., 2019).

Contudo, as DTNs carecem de incentivos de mercado para estimular o desenvolvimento de novos medicamentos, recebendo poucos investimentos em pesquisa de governos ou empresas. Mesmo que os financiamentos de parcerias público-privadas entre 2000 e 2011 tenham ajudado a comercializar 37 novos tratamentos para DTNs, essa proporção representa apenas 4% entre os novos produtos terapêuticos registrados no mesmo período, o que torna claro a insuficiência em pesquisa e desenvolvimento (YAMEY et al., 2018; HERNANDEZ et al., 2019).

No Brasil, da lista da OMS estão presentes 18 DTNs, sendo as mais comuns: dengue, doenças de chagas, hanseníase, malária e leishmaniose (HERNANDEZ et al., 2019; OMS/OPAS, 2019), esta última é uma doença emergente de notificação compulsória capaz de causar diferentes manifestações clínicas dependendo da espécie infectante e do sistema imune do hospedeiro, no entanto os tratamentos disponíveis para leishmaniose não são totalmente

eficazes, apresentam um série de efeitos colaterais e adversos, resistência parasitária, vias de administração invasiva além de receber poucos incentivos a pesquisa para novos terapias. (HERNANDEZ et al., 2019; OMS/OPAS, 2019).

2.2 Histórico da Leishmaniose

Evidências da existência de espécies de *Leishmania* são descritos desde a pré-história; o primeiro fóssil é de 100 milhões de anos encontrados na mosca-da-areia *Palaeomyia burmitis*, a espécie descrita foi denominada *Paleoleishmania proterus*, o segundo fóssil descrito é de 20 a 30 milhões de anos, denominado *Paleoleishmania neotropicum*, encontrado em mosca-de-areia *Lutzomyia adiketis*. Ambos os registros demonstram que além de promastigotas, foram encontradas formas amastigotas, sugestivo de um ciclo de vida digenético (STERVENDING, 2017).

Em múmias egípcias de Tebas Ocidental (2050-1650 a.C.) de uma tumba do reino médio foi encontrado DNA mitocondrial de *Leishmania donovani*, causadora de LV. A doença também é descrita em uma coleção de documentos médicos dos egípcios que datam de 1500 a.C. no qual eles descrevem uma condição de pele conhecida como espinha do Nilo, que supostamente se refere a leishmaniose cutânea (LC) (STERVENDING, 2017).

Embora haja documentos médicos datados desde a.C que descrevem a doença, foi o britânico David Douglas Cunningham em 1885 na Índia, o primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania*, onde descreveu formas amastigotas em casos de LV (FURUSAWA; BORGES, 2014). Em 1898 na Rússia, Borovsky encontrou esses parasitas em lesões do botão do oriente (calazar) e descreve-os como parasitas diminutos (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003; NEVES, 2009).

No entanto, apenas em 1903, na Índia, William Leishman e Charles Donovan descreveram o agente causador do calazar, que recebeu o nome de *Piroplasma donovani* nomeado por Laveran e Mesnil, o que não durou muito tempo, pois Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e a espécie passou a ser chamada de *Leishmania donovani*, em 1906 esses parasitas foram denominados *Leishmania tropica* (NEVES, 2009).

A primeira referência de leishmaniose no Brasil é citada em relatórios feitos por cronistas viajantes entre 1774 e 1787, no qual descreveram a experiência de um médico residente no Amazonas, a respeito de uma praga de mosquito, cuja picada provocava o

surgimento de úlceras, sem descrever de fato a doença (COSTA, 1992; FURUSAWA; BORGES, 2014).

No entanto, a obra *Pastoral Religiosa-Político Geographico* editada em 1827 é considerada a referência mais segura, ela documenta a viagem do missionário Frey dom Hipólito Sanchez Rangel de Fayas y Quiros, no qual descreve a existência de indivíduos com feridas na boca, nariz e úlceras nos braços e pernas, relacionadas à picada de insetos na região Amazônica (VALE; FURTADO, 2005).

Cerqueira, em 1885 identificou a doença clinicamente como botão de Briska, no entanto, em 1908 passou a ser chamada úlcera de Bauru devido ao grande número de casos oriundos principalmente da cidade de Bauru que chegaram a Santa Casa de São Paulo. Somente em 1909 a natureza leishmaniótica das lesões foi confirmada por Lindenberg e Carini - Paranhos ao identificar formas amastigotas em lesões cutâneas de indivíduos com úlcera de Bauru da cidade de São Paulo, idênticas a *Leishmania tropica* descrita no velho mundo (BASANO; CAMARGO; ARANHA, 2004; LAINSON, 2010).

Em 1911, Gaspar Vianna ao investigar o parasita de lesões cutâneas de um paciente do interior de Minas Gerais, concluiu que a morfologia das amastigotas diferia da *Leishmania tropica*, denominando o parasita de *Leishmania braziliensis*. Em abril de 1912, Vianna apresenta o primeiro caso de cura da leishmaniose tegumentar com a utilização do tártaro emético (BASANO; CAMARGO; ARANHA, 2004; LAINSON, 2010). Em 1915, com exceção dos estados ao sul de São Paulo, os demais estados brasileiros foram observados com casos de leishmaniose tegumentar (FURUSAWA; BORGES, 2014).

Por muitos anos acreditou-se que todos os casos de LT eram provenientes unicamente da *L. braziliensis*, mas com os avanços dos estudos biológicos e epidemiológicos outras espécies foram descritas e em 1961, Pessôa, um parasitologista brasileiro, listou outras espécies causadoras de leishmaniose tegumentar propondo uma subdivisão *L. braziliensis*, *guyanensis*, *peruviana*, *pifanoi* e *mexicana*. Em 1987, foi feita uma classificação revisada por Laison e Shaw, que criaram os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* avaliando critérios de desenvolvimento do parasita no intestino do flebotomíneo (BASANO; CAMARGO, 2004; VALE; FURTADO, 2005; LAINSON, 2010).

Atualmente, no Brasil são conhecidas pelo menos sete espécies que causam a doença em humanos, cada uma apresentando particularidades em relação a vetores, reservatórios, manifestações clínicas, distribuição geográfica, padrões epidemiológicos e resposta terapêutica (VALE; FURTADO, 2005; BRASIL, 2017).

2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

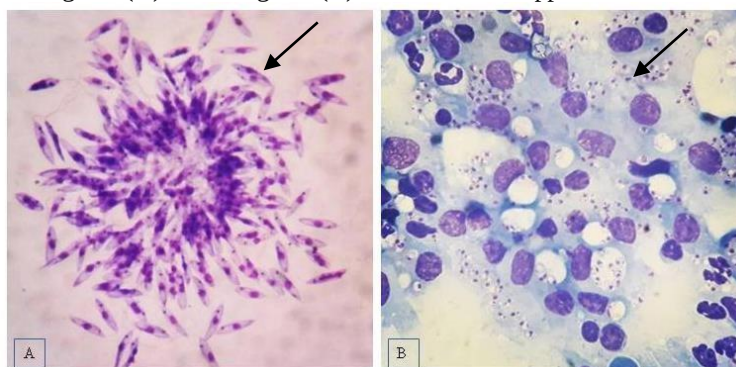
2.3.1 O gênero *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania*, descrito em 1903 por Ross, são classificados sistematicamente em Reino Protista, Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e caracterizados como parasitas flagelados, unicelulares, com ciclo de vida heteroxênico e transmissão vetorial, capazes de causar um conjunto de doenças infecciosas conhecidas como leishmaniose (AKHOUND et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2018). Os parasitas desse gênero apresentam morfologia variada, com dois estágios evolutivos principais, sendo eles:

a) Promastigota: encontrada no inseto vetor, possui forma alongada e elíptica, com núcleo arredondado, flagelo livre e longo emergindo da parte anterior do parasita. O corpo celular possui dimensões de 3 a 8 μm de comprimento (CASTELLANO, 2005; TEIXEIRA et al., 2013) (Figura 1A).

b) Amastigota: é intracelular obrigatória de células do sistema fagocítico mononuclear, possui morfologia arredondada a ovoide, flagelo curto e interiorizado, cinetoplasto em forma de bastão e núcleo grande e arredondado. Possui dimensões entre 1,5 a 3,0 μm de comprimento e 3,0 a 6,5 μm de diâmetro (CASTELLANO, 2005; NEVES, 2009; TEIXEIRA et al., 2013) (Figura 1B).

Figura 1 - Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: CHAGAS (2020).

O gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros, que está relacionado principalmente ao local em que as formas promastigotas se desenvolvem no vetor:

- Subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987): os parasitas se desenvolvem na parte anterior e média do intestino do vetor, além disso, as amastigotas são menores (2 a 4 μm) e as lesões apresentam poucos parasitas (TEIXEIRA et al., 2013).

- Subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982): os parasitas se desenvolvem nas partes anterior, média e posterior do intestino do vetor, além disso, as amastigotas são maiores (3 a 6 µm) e as lesões densamente parasitadas (TEIXEIRA et al., 2013; BRASIL, 2017).

Atualmente, no Brasil, sete espécies de *Leishmania* são capazes de causar a forma tegumentar da doença, sendo elas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) amazonensis* (VANCONCELOS et al., 2018). Dentre essas, quatro são as de maior importância no estado do Amazonas sendo elas *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (FIGUEIRA, 2013).

A *L. (L.) amazonensis* é a única espécie do subgênero *Leishmania*, encontrada de Norte ao Sul do rio Amazonas, é responsável pelos casos de leishmaniose cutânea, mucosa, e por uma forma sem tratamento conhecida por leishmaniose cutânea difusa anérgica (SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2017).

São poucos os relatos de infecção por *L. (V.) naiffi*, essa apresenta um curso clínico benigno com boa resposta ao tratamento e está associada à baixa taxa de virulência em humanos e é responsável por casos com lesões ulceradas e pequenas (LAINSON et al., 1990; NAIFF et al., 1991; FAGUNDES-SILVA et al., 2015).

A *L. (V.) guyanensis* é uma das espécies mais comuns na região Amazônica e considerada a segunda espécie mais prevalente no Brasil geralmente causando múltiplas lesões cutâneas e raramente causando lesões mucosas (FIGUEIRA et al., 2008; OURIVES-NEVES et al., 2011; BRASIL, 2017).

A *L. (V.) braziliensis* é encontrada em todas as regiões endêmicas do país, descrita como a espécie mais prevalente, causando lesões cutâneas e mucosas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MONTEIRO, 2009; MIRANDA, 2011).

2.3.2 Insetos vetores e hospedeiros vertebrados

Países do Novo Mundo possuem as condições ideais para o desenvolvimento de diferentes espécies de flebotomíneos, através do seu clima tropical e das extensas áreas silvestres. Existem aproximadamente 900 espécies catalogadas, das quais 260 são encontradas no Brasil e dentre essas 120 são descritas na Amazônia, contudo, apenas 32 espécies são responsáveis pela transmissão da leishmaniose em humanos (RANGEL; LAINSON, 2003; BASTOS, 2012).

São as fêmeas adultas dos flebotomíneos as responsáveis pela transmissão da doença, estes vetores são conhecidos popularmente como mosquito asa dura, birigui, tatuquira,

mosquito palha, dentre muitos outros, os flebotomíneos estão divididos em seis gêneros, dentre esses o *Lutzomyia* predomina em países do Novo Mundo. Esses insetos (Figura 2) são de pequeno porte, com corpo piloso e delgado, mede até 0,5 cm de comprimento, possui dois pares de asas permitindo que se desloque por pequenos saltos e apresentam atividade noturna (BASTOS, 2012; BRASIL, 2017; VANCONCELOS et al., 2018).

Figura 2 - Inseto vetor da Leishmaniose, gênero *Lutzomyia* spp.



Fonte: CARVALHO (2011).

O ciclo de transmissão da *Leishmania* é mantido através dos hospedeiros vertebrados que funcionam como reservatório primário e secundário da doença, os representantes silvestres são principalmente marsupiais (gambá), roedores (paca e rato) e edentados (tatu e tamanduá) e com o advento da urbanização animais domésticos passaram a ser envolvidos na cadeia epidemiológica como canídeos, ungulados e felinos. É caracterizada primariamente como zoonose de animais silvestres, no entanto pode vir a acometer o homem de forma acidental (LIMA, 2010; VANCONCELOS et al., 2018).

2.3.3 Ciclo biológico da *Leishmania*

O ciclo tem início quando a fêmea do flebotomíneo realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e ingere amastigotas interiorizadas em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) ou livre no tecido e dessa forma inicia-se a infecção no inseto vetor (TEIXEIRA et al., 2013).

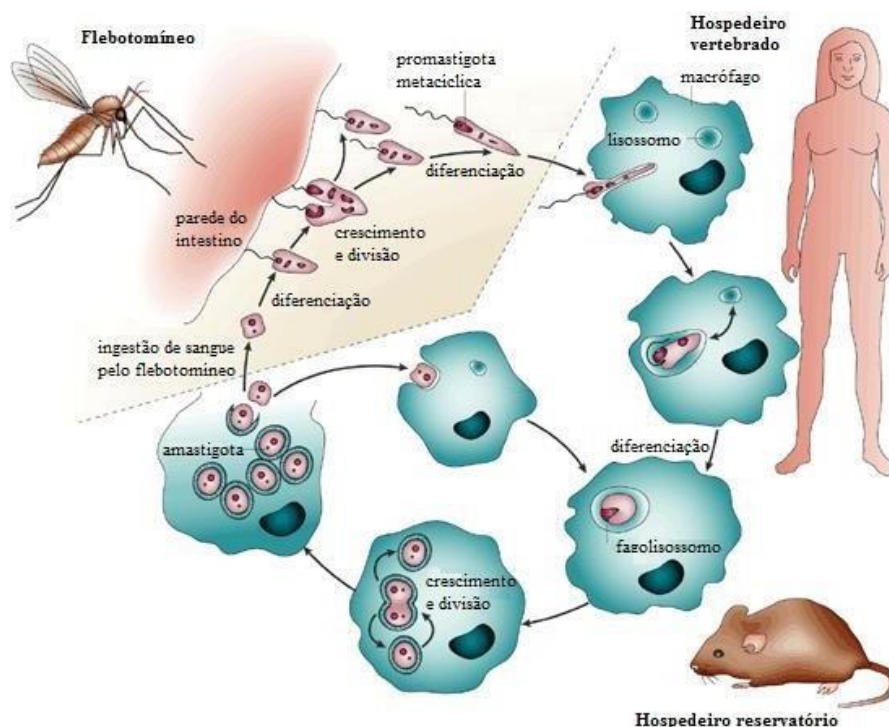
No intestino dos flebotomíneos, as células do trato digestório secretam uma matriz peritrófica responsável por englobar todo o bolo alimentar ingerido no repasto sanguíneo, neste ambiente as amastigotas formam aglomerados denominados ninhos ou ilhas e inicia um processo de transformação de amastigotas para promastigotas procíclicas (fase em que se multiplicam rapidamente por divisão binária simples) também conhecida como fase não infectante (PEREIRA, 2012; SUNTER; GULL, 2017).

A matriz peritrófica se fragmenta permitindo com que os parasitas consigam migrar para o epitélio do intestino médio, no qual passará por um processo de diferenciação morfológica e funcional denominado metaciclogênese, nesse momento o parasita passa da forma procíclica inicial para a forma metacíclica infectante, estas migram para a probóscide do inseto onde permanecem até serem transmitidas a outro hospedeiro dando continuidade ao ciclo (TEIXEIRA et al., 2013; SUNTER; GULL, 2017).

O hospedeiro vertebrado adquire a doença durante o repasto sanguíneo, no qual os parasitas são inoculados juntamente com a saliva que contém propriedades anestésicas, vasodilatadoras e imunossupressoras, além de contribuir para o papel modulador na resposta imunológica do hospedeiro (AEDO, 2007; SILVEIRA et al., 2008).

As formas promastigotas são fagocitadas por células do SFM (primeiras células recrutadas para o local dérmico da infecção por *Leishmania*), ocorrendo à formação do fagossomo, este se funde aos lisossomos formando o vacúolo digestivo, local onde o parasita sobrevive e estabelece condições favoráveis para sua diferenciação em amastigota. O parasita nessa forma em meio ácido, tem a capacidade de se desenvolver e multiplicar, levando a célula a sofrer lise celular e consequentemente liberar as amastigotas, essas podem infectar outros macrófagos ou serem ingeridas no momento do repasto sanguíneo por outros insetos vetores reiniciando o ciclo (Figura 3) e propagando a infecção (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012, TEIXEIRA et al., 2013; SUNTER; GULL, 2017).

Figura 3 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: GONÇALVES (2014).

2.3.4 Manifestações clínicas da LT

A LT compreende um grupo de doenças infecciosas de evolução crônica, cujas manifestações clínicas dependem de fatores como a relação parasita – hospedeiro, a espécie de *Leishmania* envolvida e o estado genético do indivíduo. Essa doença é caracterizada pelo comprometimento de tecidos cutâneos e secundariamente por lesões de tecido mucoso, manifestando desde infecções assintomáticas a formas clínicas descritas a seguir: a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Mucosa (LM) (CORREA, 2007; COELHO, 2010; GLANS et al., 2018).

A LC é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, sendo a manifestação clínica mais frequente surgindo como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. O período de incubação é de duas semanas a dois meses até o surgimento da lesão ulcerada em áreas expostas da pele, geralmente indolor, atribuindo um formato arredondado ou ovalado, com bordas elevadas, bem delimitadas, fundo com tecido de granulações grosseiras caracterizando a lesão clássica com bordas em moldura (SCORZA; EDGAR; WILCON, 2017; GLANS et al., 2018; CARIDHA et al., 2019). Pode ser classificada segundo o Ministério da Saúde (2017) de acordo com as seguintes apresentações clínicas:

- Forma cutânea localizada: é expressa por lesões ulceradas, única ou múltipla, com o aparecimento de lesões diretamente relacionadas a múltiplas picadas, possui boa resposta ao tratamento e tendência à cura (Figura 4A) (SCORZA; EDGAR; WILCON, 2017);

- Forma cutânea disseminada: é caracterizada por múltiplas lesões papulares de aparência acneiforme. Inicia com uma ou várias lesões localizadas de característica clássica, posteriormente os parasitas são disseminados por via hematogênica ou linfática causando lesões distintas do local da picada. Apresenta resultados variáveis com o uso de antimoniais, tornando-se necessários tratamentos adicionais para alcançar a cura clínica (Figura 4B) (CARIDHA et al., 2019);

- Forma cutânea difusa: é a forma mais rara e grave da doença, ocorrendo em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular e em pacientes com anergia. Inicia de forma insidiosa com múltiplas lesões, evoluindo lentamente com formação de placas e nodulações não ulceradas em grandes extensões cutâneas, apresentando má resposta ao tratamento (Figura 4C) (GUIMARÃES et al., 2016).

A LM é caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, indolor, podendo acometer o septo nasal, orofaringe, língua, palato, lábios, dentre outros (Figura 4D). Esses pacientes estão relacionados à LC de evolução crônica, curada com tratamento inadequado ou sem tratamento, em alguns casos ocorre por extensão da lesão cutânea ou com início da lesão na semimucosa exposta. É uma doença de difícil tratamento apresentando um prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura (BRASIL, 2017; GLANS et al., 2018; CARIDHA et al., 2019).

Figura 4 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. A) Leishmaniose cutânea localizada; B) Leishmaniose cutânea disseminada; C) Leishmaniose cutânea difusa; D) Leishmaniose mucosa.



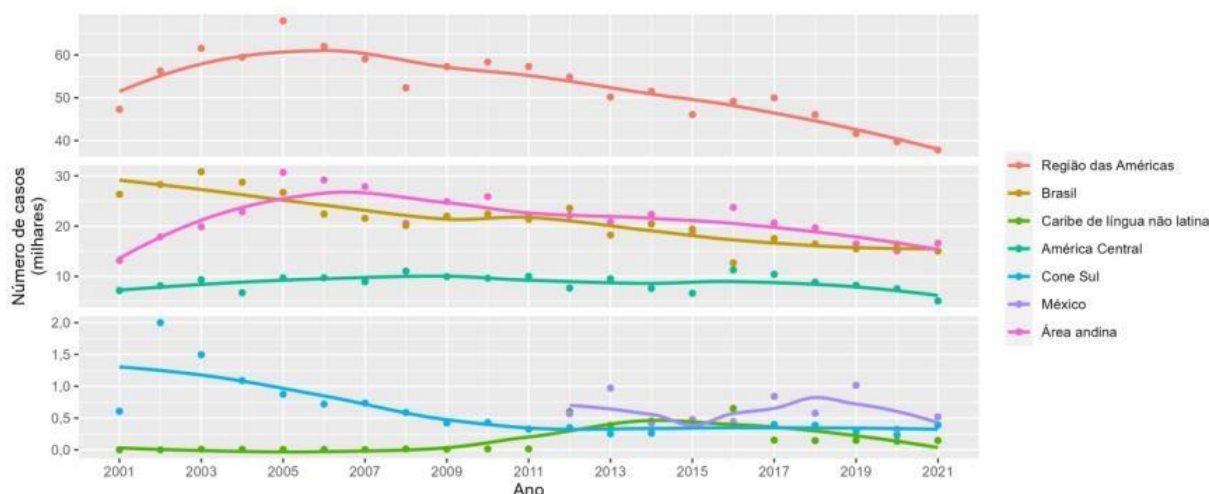
Fonte: BRASIL (2017); FORUMSAÚDE (2018).

2.3.5 Epidemiologia da LT

A LT segundo a OMS está entre as seis doenças infecciosas de maior importância, considerada endêmica em 98 países e acomete cerca de 1,3 milhão de pessoas por ano, distribuídos em quatro dos sete continentes (OMS, 2019).

No continente americano a doença está presente em 18 países, dentre esses 17 países reportaram um total de 1.111.144,8 casos de LT no período de 2001 a 2021, apresentando uma média anual de 54.950 casos. No ano de 2021 (Figura 5) foi reportado um total de 37.786 casos o que demonstra uma tendência decrescente nos últimos anos (OMS/OPAS, 2022).

Figura 5 - Número de casos de LTA nas Américas no período de 2001-2021, com destaque para Brasil, Área Andina, América Central, Cone sul, Caribe não - latino e México.



Fonte: OMS/OPAS (2022).

No Brasil, a LTA é considerada uma das afecções dermatológicas que merece atenção, apresentando registro de casos em todas as regiões. No período de 2014 a 2021 foram registrados uma média de 18.319 casos, sendo que em 2021 foram registrados 16.560 casos. Dados detalhados por região foram descritos (Tabela 1), nos quais as regiões Norte (7.486) e nordeste (4.110) permanecem com os maiores índices (SINAN/SVS/MS, 2022; OMS/OPAS, 2022).

Tabela 1 - Casos novos de LT entre os anos de 2014 a 2021, nas regiões do Brasil.

Região	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Brasil	20.296	19.395	12.690	17.526	16.432	15.484	17.772	16.560
Região Norte	10.387	8.939	5.075	7.832	7.519	7.123	8.305	7.486
Região Nordeste	4.969	5.152	3.166	4.264	3.717	3.100	3.463	4.110
Região Sudeste	1.460	1.762	1.221	1.545	1.646	2.200	2.781	2.616
Região Sul	373	493	212	180	158	175	272	247
Região Centro-Oeste	3.038	2.937	1.974	2.421	2.086	2.600	2.951	2.119

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021 e OPAS/2022.

Na região norte os estados que apresentaram maior número de casos foram Pará (2.585) e Amazonas (1.227) apresentando alta incidência de LT devido à abertura de núcleos residenciais em locais de floresta tropical, treinamento militar, dentre outros fatores que levam o homem a adentrarem regiões de mata e entrarem em contato com o parasita (BRASIL, 2017; SINAN/SVS/MS, 2022).

2.3.6 Tratamento da LT

O arsenal terapêutico medicamentoso disponível para o tratamento da LT é bastante precário, no Brasil o tratamento durante décadas é realizado conforme estabelecido pela OMS, no qual se limita ao uso de drogas de primeira escolha que são representadas pelos antimoniais pentavalentes e as drogas de segunda escolha que são representados pelos não antimoniais (CDC, 2016; BRASIL, 2017).

2.3.6.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) são preconizados sob duas formulações disponíveis no mercado, o Estibogluconato de Sódio (Pentostan[®], Glaxo - Smith Kline) comercializado nos países de língua inglesa e o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®], Sanofi Aventis) formulação comercializada no Brasil e países de língua francesa e espanhola (HOLANDA et al., 2018; MAIA; MONTE, 2019).

Durante décadas os antimoniais permaneceram como a terapia de primeira escolha para o tratamento da LT, embora no Brasil para indicação na terapêutica clínica o Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso do Glucantime® considerando a espécie de *Leishmania* infectante (BRASIL, 2017; MAIA; MONTE, 2019).

O Glucantime® é comercializado em frascos de 5 (cinco) mL na concentração de 81 mg/mL, segundo o esquema terapêutico preconizado pela OMS a dose do antimônio deve ser calculada em mg/Sb⁵⁺/Kg/dia durante um período de 20 a 30 dias com as aplicações por via endovenosa (EV), intramuscular (IM) e dependendo do número e extensão das lesões aplicação intralesional (IL), essa última forma de administração tem se mostrado menos tóxica por não desencadear reações sistêmicas (BRASIL, 2017; HOLANDA et al., 2018; FILHO et al., 2020).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não é totalmente elucidado apesar de ser empregado há muitos anos no tratamento contra leishmaniose, no entanto a literatura descreve algumas hipótese de como esses compostos podem agir; os primeiros trabalhos sugeriram que eles atuam inibindo a glicose e a oxidação de ácidos graxos de organelas localizadas nas formas amastigotas, consequentemente reduzindo a produção de ATP e GTP e dessa forma interferindo na bioenergética desses parasitas, que quando expostos ao Sb⁵⁺/mL facilita a destruição do parasita (BERMAN; WADDELL; HANSON, 1985; ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007); outra hipótese é que o Sb⁵⁺ exerce pouco efeito sobre formas promastigotas, supondo que é necessário que ocorra redução do antimonial pentavalente (Sb⁵⁺) para antimonial trivalente (Sb³⁺) em meio biológico através dos tióis para que ocorra a atividade leishmanicida (FRÉZARD; SCHETTINI, 2005) e ainda sugerem que o Sb³⁺ leva a morte parasitária por um processo de apoptose de amastigotas envolvendo fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana (SERENO et al., 2001).

Embora os antimoniais pentavalentes tenham bons resultados clínicos no tratamento da LT os efeitos colaterais são diversos e tem sido extensivamente descrito pela literatura tais como artralgia, mialgia, cefaleia, febre, vômitos, náuseas, tonturas, pancreatite, toxicidade cardíaca e renal, dentre outros, podendo chegar à morte súbita, além disso, possuem, desvantagens quanto ao tratamento longo, com administração parenteral diária, acompanhamento constante, toxicidade e serem contraindicados para gestantes por serem abortivos (HOLANDA et al., 2018; FILHO, 2020).

2.3.6.2 Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat®)

O Pentacarinat® é utilizado como medicamento de segunda escolha nos casos não responsivos aos medicamentos à base de antimônio, trata-se de uma diamina aromática recomendada para diferentes manifestações clínicas da LT na concentração de 4 mg/Kg/dia com intervalos de 48 horas e aplicação IM e EV (BRASIL, 2017; HOLANDA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

O mecanismo de ação também não é totalmente elucidado, estudos sugerem que o fármaco demonstra uma relação com a inibição da RNA polimerase, na síntese de proteínas, de fosfolípidios e da função ribossomal (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012; HOLANDA et al., 2018). Esse medicamento apresenta efeitos colaterais graves principalmente em pacientes com disfunção hepática, renal, hipotensão, hipertensão, hiperglicemia, hipoglicemia, dentre outros, sendo os efeitos mais frequentes vômitos, tontura, mialgia e cefaleia (BRASIL, 2017; HOLANDA et al., 2018).

2.3.6.3 Anfotericina B (Abelcet®)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico utilizado no tratamento de infecções fúngicas generalizadas, isolada pela primeira vez em cultura de *Streptomyces nodosus* e constitui um dos fármacos de segunda escolha para o tratamento da LT. Esse medicamento é comercializado em frascos de 50 mg e sua administração ocorre via EV de forma gradativa conforme a tolerância do paciente, iniciando com uma dose de 0,5 mg/Kg/dia até uma dose máxima de 1 mg/Kg/dia. As aplicações devem ser feitas em dias alternados até completar a dose total de 1 a 1,5 g em casos de LC e de 2,5 a 3 g em casos de LM (ANFOTERICINA B, 2015; SINGH et al., 2016, BRASIL, 2017).

O seu mecanismo de ação consiste em formar poros na membrana plasmática que altera a permeabilidade e o fluxo iônico através da interação com os lipídios resultando em morte parasitária, agindo em formas promastigotas e amastigotas. Também há evidências de que leva ao aumento de radicais livres por indução do estresse oxidativo (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012; HOLANDA et al., 2018).

Assim como os demais medicamentos, também apresenta efeitos colaterais severos, os mais comuns incluem vômitos, febre, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas, além de cardio e nefrotoxicidade e o uso EV impossibilita seu uso fora do ambiente hospitalar (SINGH et al., 2016; BRASIL, 2017; HOLANDA et al., 2018).

2.3.6.4 Pentoxifilina

A pentoxifilina é um medicamento que atua nas propriedades do fluxo sanguíneo; trata-se de um vasodilatador periférico com propriedades hemorreológicas e age como adjuvante associado ao Glucantime[®] no tratamento da LT sendo assim preconizado pela OMS e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), não tendo indicação como um medicamento isolado (BULA PENTOXIFILINA, 2019; BRASIL, 2017).

Esse medicamento é comercializado na concentração de 400 mg para ser administrado de forma oral como comprimido revestido de liberação prolongada, com a dose usual de um comprimido duas ou três vezes ao dia. Os efeitos colaterais mais comuns são flush (rubor facial com sensação de calor) e distúrbios gastrointestinais, como sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito ou diarreia. É contraindicado para crianças menores de 12 anos e gestantes (BULA PENTOXIFILINA, 2019; BRASIL, 2017).

2.3.6.5 Miltefosina

A Miltefosina é um medicamento com comercialização aprovado recentemente no Brasil, sendo incorporada no SUS em 31 de outubro de 2018 pela portaria n° 60 como primeira linha para o tratamento da LT, embora ainda não esteja disponível pelo MS. É o primeiro medicamento oral efetivo para LT com dose recomendada de 2,5 mg/Kg/dia não podendo ultrapassar a dose máxima de 150 mg/dia durante 28 dias (HOLANDA et al., 2018; RODRIGUES, 2020). Os efeitos colaterais mais comuns são náusea, vômito, cefaleia, cinetose, nefro e hepatotoxicidade, sendo contraindicado para gestantes e lactantes, no entanto tem a vantagem de poder ser administrado em cardiopatas e grupo de pacientes que possui contraindicações aos demais tratamentos para LT (HOLANDA et al., 2018; RODRIGUES, 2020).

2.4 Reposicionamento de fármacos para tratamento da LT

O tratamento para leishmaniose ainda é um desafio e os atuais medicamentos disponíveis na quimioterapia são pouco eficazes, pois apesar de existir vários medicamentos na terapêutica nenhum deles pode ser identificado como um medicamento ideal devido as suas desvantagens como alta toxicidade, reações adversas graves, longa duração do tratamento que muitas vezes leva ao abandono, alto custo no tratamento, resistência

parasitária; além disso, não eliminam completamente o parasita dos indivíduos infectados (MENEZES et al., 2015; ABAMOR; ALLAHVERDIYEV, 2016).

A necessidade de um medicamento ideal para tratar a LT é inevitável, e este precisa ser eficaz em doses mínimas, a resposta terapêutica deve ser independente da espécie, não induzir a resistência aos medicamentos, ser de baixo custo, livres de efeitos colaterais ou adversos, não ter contraindicação, não ser teratogênico e não precisar de hospitalização, infelizmente nenhum dos medicamentos até agora utilizados para todas as formas da doença cumprem todos esses critérios (DNDi, 2016; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Com isso, a OMS recomenda o incentivo à busca de novos medicamentos, tratamentos com drogas alternativas, reposicionamento de fármacos ou tratamentos combinados (SUNDAR; CHAKRAVATY, 2015).

Inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de obter novas formulações farmacêuticas, sejam provenientes de produtos naturais, sintéticos ou semissintéticos (JAIN et al., 2011). Essencialmente duas estratégias são disponíveis para o desenvolvimento de novos medicamentos, a primeira envolve o planejamento ou síntese de novas substâncias ativas ou de fármacos já conhecidos, a outra envolve a associação de fármacos já conhecidos a um sistema transportador, dessa forma evitando o fármaco de exercer toxicidade ao direcioná-lo para a célula alvo (FRÉZARD; SCHETTINI, 2005).

Estima-se que para levar um único fármaco novo para o mercado o custo médio é de US\$ 2,6 milhões, levando um período de 15 anos (DIMASI, 2014). O processo de descoberta e desenvolvimento de um medicamento é altamente regulamentado, longo e caro, são 2 a 3 anos para descoberta e validação, um ano para selecionar o modelo e atividade biológica, 1 a 3 anos para otimizar, 2 anos para determinar as propriedades de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade em modelos animais, 5 anos em ensaios clínicos para avaliar segurança e eficácia e mais 2 anos para obter a aprovação e chegar no mercado (LI; IVONY; JONES, 2012; SILVAa, 2015).

Nesse contexto se insere o termo reposicionamento de fármacos, que nada mais é do que uma forma de pesquisa que investiga se um medicamento já conhecido e utilizado clinicamente possui alguma atividade contra outra doença ainda sem tratamento ou ainda para a mesma doença, no entanto, com alguma modificação na sua formulação. Essa é uma estratégia utilizada geralmente para doenças que não recebem tanto investimento como é o caso da leishmaniose (SILVAa, 2015; SILVAb, 2015).

Alguns exemplos de reposicionamento de fármacos aprovados é o caso da anfotericina B, que é um antibiótico antifúngico para tratar infecções generalizadas, mas no Brasil é

preconizado principalmente para LV assim como também para LT (SINGH et al., 2016; BRASIL, 2017). A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que desde a década de 60 foi identificado como tendo atividade leishmanicida e atua como droga alternativa para o tratamento da LT (EL-ON; SNEIER; ELIAS, 1992; SILVAb, 2015).

Outro exemplo é a miltefosina, produzida originalmente para tratamento de câncer, no entanto lançada no mercado inicialmente na Colômbia para tratamento da LT, na Alemanha para tratamento de LV e atualmente no Brasil para o tratamento da LT (ALMEIDA; SANTOS, 2011, HOLANDA et al., 2018).

A azitromicina trata-se de um antibiótico preconizado no tratamento de diversas doenças infecciosas, sendo preconizada para pacientes nos quais os tratamentos disponíveis para leishmaniose não tiveram sucesso ou tenham contraindicações como é o caso de crianças pequenas, pacientes com doenças graves ou ainda mulheres grávidas (BLUM; HATZ, 2009).

Dessa forma, a utilização de medicamentos já aprovados sendo testados para o tratamento da LT é uma prática comum, viável e mais rápida para o descobrimento de um novo medicamento, seguindo todos os critérios de validações e análises (SILVAb, 2015).

2.5 Nanotecnologia para o tratamento da LT

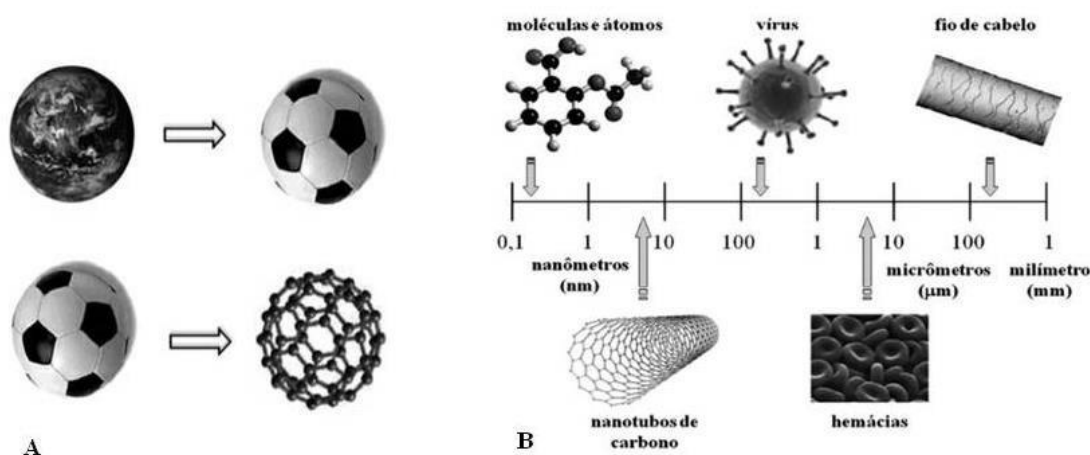
A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem encontrado aplicações desde a indústria alimentar, biotecnológica, eletrônica, energética, até aplicações na medicina, caracterizada pela capacidade de criar produtos com mais eficácia, mais segurança e confiabilidade (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; ROSSI-BERGMANN, 2008; AKBARI et al. 2017).

Segundo a Sociedade Real e a Academia Real de Engenharia Britânica, a nanotecnologia estuda o desenho, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, dessa forma para um material ser considerado dentro dessa escala, deve ter tamanho no intervalo entre 1 a 100 nanômetros (nm), sendo que cada nm equivale a um bilionésimo do metro (10^{-9} m) (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; AKBARI et al., 2017).

Para efeito de comparação dessa escala a figura 6 mostra a relação de tamanho entre a bola de futebol, o planeta terra e o fullereno (molécula de 60 átomos de carbono), no qual a diferença de tamanho é em 100 milhões de vezes da terra em relação à bola de futebol, e por sua vez da bola de futebol em relação à estrutura de fullereno medida em nm (ROZ et al., 2015). Também podemos exemplificar materiais distintos em escala nano como um fio de

cabelo (1000.000 nm), um glóbulo vermelho (7.000 nm) ou ainda um vírus (entre 45 e 200 nm) (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; ROZ et al., 2015).

Figura 6 - Escala de grandezas. A) Proporção entre diâmetros da terra, bola e fulereno C-60. B) Escala comparativa de tamanho entre milímetro e nanômetro.



Fonte: FERREIRA, MARYSTELA, 2011. Nanoestruturas.

Segundo a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI) um dispositivo para ser considerado nanotecnológico, não basta ter apenas dimensões nanométricas, ele precisa apresentar propriedades diferenciadas, como a capacidade de modular em escala pequena fenômenos observáveis em escala macroscópica (ROZ et al., 2015).

Dessa forma, a capacidade do homem manipular nanoestruturas, abre um campo de exploração para novas propriedades químicas, físicas e biológicas, significativamente diferentes de materiais numa escala maior, um exemplo seria a relação entre a diminuição do tamanho da partícula e o aumento da atividade química devido ao aumento da área de superfície específica (ROZ et al., 2015; FDA, 2014).

Nos últimos anos as inovações nanotecnológicas proporcionaram novas abordagens em todos os campos da ciência e dentre elas a nanomedicina, que nada mais é do que a aplicação biomédica de nanomateriais que englobam desde a área de diagnóstico a produção de novas drogas, e com isso tem sido intensamente explorada para o tratamento de diversas doenças (ABAMOR, 2016).

Na última década, vários estudos propuseram a aplicação da nanotecnologia para o tratamento da leishmaniose devido à combinação de drogas antileishmania com nanocarreadores, isso é possível devido a esses nanomateriais conseguirem liberar o

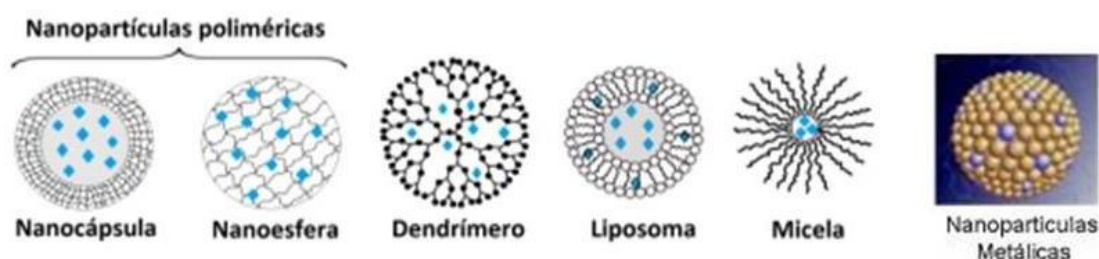
medicamento em órgãos e células específicas, dessa forma a nanotecnologia utiliza dois mecanismos no tratamento dessa infecção (SIEFERT et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

O primeiro mecanismo faz uso do sistema de entrega de nanofármacos para drogas convencionais, sendo uma das mais promissoras para terapias antileishmania, devido alta eficácia, baixa toxicidade, alta concentração, sistema de controle de liberação de drogas, vida útil prolongada e entrega da droga em órgãos ricos em macrófagos como medula óssea, baço e fígado e dessa forma aumentando a eficácia terapêutica (ABAMOR, 2016).

A segunda abordagem é a nanonização do medicamento tirando proveito de um mecanismo de captação de material particulado por macrófagos que é a principal célula fagocítica envolvida na infecção por *Leishmania*. Estas células expressam receptores que internalizam eficientemente nanopartículas na faixa de 50 - 500 nm através da fagocitose, dessa forma aumentando a concentração intracelular da droga que é o seu local de ação melhorando a eficácia e diminuindo os efeitos tóxicos (ABAMOR, 2016, SIEFERT et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Sendo assim, nanopartículas (NPs) nada mais são do que partículas poliméricas na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica ou inorgânica) nas quais o fármaco está encapsulado, adsorvido ou absorvido pelo material da matriz, como por exemplo, nanopartículas metálicas, lipídicas, poliméricas, lipossomas, nanocristais dentre outras (Figura 7) (KALANGI et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Figura 7 - Tipos de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de CRUZ (2016).

As NPs metálicas têm sido o alvo de muitos estudos na nanomedicina, além de todas as vantagens já descritas para essa tecnologia esse tipo de NPs destaca-se pelo método de síntese verde que é uma abordagem ecológica e livre de solventes, essa NP é caracterizada por possuir um ou mais átomos metálicos em sua composição (CANCINO et al., 2014; AROKIYARAJ et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Estudos tem mostrado o potencial de substâncias inorgânicas nanoparticuladas contra leishmaniose. Avaliando o comportamento de nanopartículas de selênio (SeNPs) frente a *Leishmania major*, Beheshti et al. (2013) descrevem o potencial de inibição da proliferação frente as formas promastigotas e amastigotas, além de limitar o crescimento da LC em modelo animal.

A atividade antileishmania de nanopartículas de prata (AgNPs) foi descrita por Baiocco et al. (2011) demonstrando a alta eficácia frente a espécie *Leishmania donovani*. Em estudo realizado por Allahverdiyev et al. (2011) as AgNPs na presença de luz ultravioleta (UV) apresentaram atividade em *Leishmania tropica* e Kalangi et al. (2016) relataram o sinergismo entre AgNPs e miltefosina com redução da concentração inibitória (CI₅₀).

Jebali e Kazemi (2013) estudaram a atividade antileishmania de algumas NPs metálicas, na presença de luz UV, e descreveram o aumento da atividade contra o parasita, além da luz UV melhorar as propriedades antileishmania para as nanopartículas de prata, ouro, dióxido de titânio, óxido de zinco e óxido de magnésio, sucessivamente.

Além disso, também são descritos NPs metálicas associadas a outros compostos bioativos, como é o caso de AuNPs associadas a quercetina, com atividade antileishmania frente a cepas resistentes aos tratamentos convencionais ou ainda NPs de titânio e prata (TiAgNPs) em combinação com óleos essenciais de *Nigella sativa* mostrando atividade satisfatória contra *Leishmania tropica* (DAS et al., 2013; ABAMOR; ALLAHVERDIYEV, 2016).

2.5.1 O elemento antimônio (Sb)

O elemento químico antimônio (Sb) tem o seu símbolo originado do seu nome em latim *stibium*, na tabela periódica é classificado como um metalóide encontrado na família 5A, possuindo número atômico 51, massa atômica de 127,75 g/mol, ponto de fusão de 630°C e ponto de ebulição de 1380°C (MATSUBARA, 2011). Segundo a classificação de Goldschmidt, o Sb é considerado um calcófilo, encontrado na natureza principalmente na forma de Sb₂S₃ conhecido como estibina, um mineral de cinza escuro, considerado a principal fonte de Sb na crosta terrestre, encontrado nos minérios de cobre, prata e chumbo além dos componentes de carvão e petróleo (FILELLA; BALZILE; CHEN, 2002).

O Sb possui dois isótopos estáveis, ou seja, possui duas variantes do elemento químico que apresentam o mesmo número de prótons (número atômico), mas se diferem no número de nêutrons e massa, sendo eles ¹²¹Sb e o ¹²³Sb de abundância praticamente equivalente

(SIQUEIRA, 2013). São conhecidos quatro estados de oxidação para o antimônio ($-3, 0, +3, +5$), no entanto é principalmente encontrado nos estados trivalente ($+3$) e pentavalente ($+5$), ambos possuem forte afinidade por ligantes oxigenados, com oxigênio carregado negativamente como OH^- (TELLA; POKROVSKI, 2009).

Este elemento possui várias aplicações industriais na produção de detectores de infravermelho, semicondutores e diodos, sendo ideal para soldas, chapas, peças fundidas, tubos de metal, além da composição de ligas metálicas para baterias de chumbo-ácido (REFERÊNCIA?).

Além da utilização na indústria, o uso medicinal do Sb é conhecido desde a antiguidade para diversos fins terapêuticos, como por exemplo, os antimoniais trivalentes que foram utilizados para tratamento da doença do sono na metade do século XX (SIQUEIRA, 2013).

Atualmente, sua forma pentavalente é utilizada como padrão ouro para o tratamento de leishmaniose, no entanto, pesquisas com essa finalidade tiveram início em 1912, com médico Brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna, ao relatar que o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio) uma formulação a base de antimônio trivalente era eficaz na terapêutica da LT, contudo, embora promissor apresentou-se tóxica e com efeitos colaterais severos como cardiotoxícos e intolerância gastrointestinal, com isso, precisou a ser substituído por compostos pentavalentes (RATH et al., 2003; MATSUBARA, 2011; SIQUEIRA, 2013).

O primeiro composto a base de antimônio pentavalente foi criado oito anos após a descoberta do tártaro emético em 1920 por Bramachari, denominado de ureia estibamina, um derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico, esse foi utilizado por 16 anos, e então substituído pelo gluconato de antimônio pentavalente sódico conhecido comercialmente por Pentostam[®] ou Solustibosan[®] em 1936 por Schmidt. Durante 10 anos esse foi o único medicamento a base de antimonial pentavalente disponível para o tratamento da leishmaniose (RATH et al., 2003; BORBOREMA, 2010; SIQUEIRA, 2013).

Ao fim da segunda guerra mundial na França, foi desenvolvido um composto alternativo também a base de antimônio pentavalente, denominado antimoniato de N-metil glucamina, comercialmente conhecido como Glucantime[®]. Atualmente ambos os medicamentos ainda são utilizados para o tratamento da leishmaniose (RATH et al., 2003; BORBOREMA, 2010; SIQUEIRA, 2013).

Atualmente, diversos estudos buscam o aprimoramento da utilização dos antimoniais para o tratamento da LT e em relação ao uso de sistemas nanoparticulados a base do antimonial pentavalente para atividade antileishmania, existe pouca informação descrita na

literatura. Frézard, Demichelli e Ribeiro (2009) relataram a síntese de Nps lipossomais de antimônio pentavalente para administração oral. Villa (2010) estudou uma nanoemulsão de antimoniato de meglumina em úlceras de LC em modelo animal, levando a cura clínica. Franco et al. (2016) estudou NPs metálicas de antimônio pentavalente *in vitro* e *in vivo* frente a espécie *L. (L.) amazonensis*, no qual descrevem o potencial de inibição em formas promastigotas e amastigotas, além de efeito benéfico no controle da parasitose *in vivo* levando a cura clínica.

2.6 A utilização de produtos naturais na indústria farmacêutica

Desde os primórdios, o homem retira das fontes naturais (plantas, animais e minerais) recursos para tratar doenças e aliviar dores. O uso de plantas para fins medicinais foi difundido inicialmente pelos egípcios, indianos e chineses há mais de 8.000 anos (NASCIUTTI, 2012).

A civilização egípcia foi marcada por suas técnicas medicinais por meio de preparados de plantas que permitiam a conservação de múmias, sendo até hoje de um desafio para a medicina moderna, na China por sua vez a medicina tradicional desenvolveu-se com tanta eficiência que até hoje os preparados vegetais são estudados almejando o desenvolvimento do mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos. Por conseguinte, a utilização de recursos naturais foi então se espalhando para outras regiões do mundo como a civilização greco-romana que descobriu os venenos a partir da natureza, dessa forma utilizavam para sua própria defesa, para caçar e até mesmo para meios ilícitos como o conhecido caso da morte de Sócrates com o veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) (BOLZANI; JUNIOR, 2006; NASCIUTTI, 2012).

Os farmacêuticos a partir de Galeno (129-199 d.C.) começaram a investigar e utilizar a forma pura de medicamentos naturais. Friedrich Sertturner em 1806 foi o primeiro a isolar o alcaloide da morfina da papoula (*Papaver somniferum* L.) o que marcou a busca por outros medicamentos a partir de plantas, levando a descoberta de outros compostos farmacologicamente ativos (CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

A descoberta da salicina (analgésico e antitérmico) em 1829 foi o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica a partir da planta *Salix alba* L. Devido ao seu caráter ácido a salicina atacava o estômago causando desconforto às pessoas que faziam uso, diante dessa situação, variações dessa molécula foram obtidas e testadas realizando a primeira modificação estrutural da história que deu origem em 1839 ao ácido

salicílico, que apesar de se mostrar eficiente ainda possuía o caráter fortemente ácido. Felix Hoffman em 1897 a partir do ácido salicílico sintetizou a aspirina (ácido acetil salicílico) e dessa forma obteve a primeira patente que se tem conhecimento na área de medicamentos (BOLZANI; JUNIOR, 2006; BARREIRO, 2009).

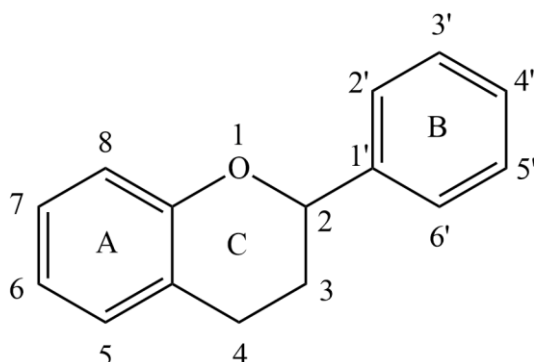
Com o desenvolvimento da química orgânica teórica e experimental, outras substâncias com propriedades terapêuticas são sintetizadas em laboratório. Atualmente os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico (MENEGATTI et al., 2001; BARREIRO, 2009).

Em uma revisão de fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2014 os produtos naturais (PN) tem desempenhado um grande papel na descoberta de novos fármacos ao longo de mais de 30 anos, visto que 30% eram PN ou seus derivados, 14% eram sintetizados de origem natural e 5% antiparasitários, dentre esses apenas 16 medicamentos foram introduzidos no mercado, sendo principalmente advindos de produtos naturais e seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

2.6.1 Hesperidina

Os flavonoides são metabolitos secundários pertencentes ao grupo dos polifenóis, que devido aos inúmeros efeitos farmacológicos aos quais estão envolvidos tem atraído o interesse como agentes terapêuticos potenciais. A estrutura básica desses compostos é formada por 15 carbonos ($C_6 - C_3 - C_6$), distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B) interligados a uma estrutura heterocíclica central, o anel pirano (C) conforme a figura 8 (KAMBOH et al., 2015, DONATO, 2017). A classificação dos flavonoides é feita pelo estado de oxidação do anel pirano, sendo as subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas (JAGANATAH; CROZIER, 2010).

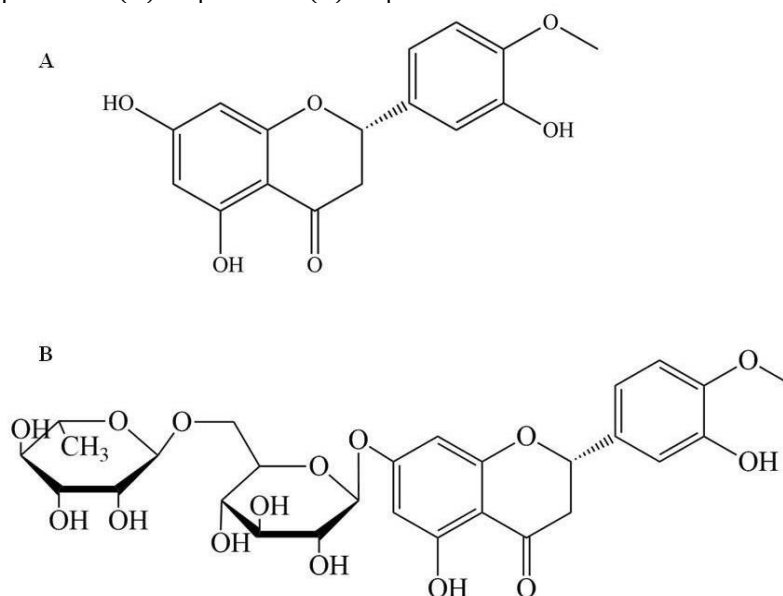
Figura 8 - Estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: BRASIL, 2020.

Pertencente à subclasse das flavanonas a hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo) é amplamente encontrada em epicarpo, mesocarpo, endocarpo e sucos de frutas cítricas como laranja e limão, embora principalmente contida nas cascas. Foi isolada pela primeira vez por Lebetron em 1827, possui peso molecular de 610, 56 g/mol e ponto de fusão entre 250 e 255°C (DONATO, 2017; ANTUNES, 2017; BORTOLON, 2018). A estrutura química dessa molécula é constituída pela hesperetina (forma agliconada) ligada aos açúcares glicose e ramnose na posição 7 (Figura 9) (BORTOLON, 2018; PIVA, 2019).

Figura 9 - Estrutura química da (A) hesperetina e (B) hesperidina.



Fonte: BRASIL, 2020

A hesperidina (CAS: 520-26-3) é utilizada como princípio ativo combinado a diosmina, sendo outro flavonoide classificado como flavona, esses dois princípios ativos em sinergismo constituem o medicamento comercialmente denominado Daflon - 500 mg[®], sendo

50 mg de hesperidina e 450 mg de diosmina, preconizado para o tratamento principalmente da insuficiência venosa crônica, funcional, orgânica, no pré e pós-operatório para safenectomia, no pós-operatório de hemorroidectomia, dentre outros (DONATO, 2017).

A hesperidina por si só possui algumas propriedades tais como antioxidante e antiinflamatória (AHMAD et al., 2012; HIRATA et al., 2005; PARHIZ et al., 2015), antineoplásico (LEE et al., 2010), neuroprotetores (HWANG; YEN, 2008) antiviral, antibacteriana e antifúngica (ARANGANATHAN et al., 2008; HOU et al., 2012) e está incluída no grupo das chalconas que tem sido amplamente estudadas quanto a atividade antileishmania (GOMES et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPSb⁵⁺) e da hesperidina por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* frente as espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Viannia) naiffi*.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- Avaliar o efeito da hesperidina em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* da hesperidina em macrófagos peritoneais murinos;
- Avaliar o efeito no tratamento da leishmaniose cutânea experimental *in vivo* da hesperidina em hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania* spp.

Capítulo 2

- Realizar a síntese e a caracterização das NPSb⁵⁺;
- Avaliar o efeito das NPSb⁵⁺ em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* das NPSb⁵⁺ em macrófagos peritoneais murinos;
- Avaliar o efeito no tratamento da leishmaniose cutânea experimental *in vivo* das NPSb⁵⁺ em hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania* spp. expostos a diferentes protocolos terapêuticos.

Capítulo 3

- Realizar um levantamento epidemiológico por meio do sistema de tabulação TABWIN da plataforma do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) de casos notificados da LTA no Brasil em 2022.

4 MATERIAL E MÉTODO

Essa pesquisa foi desenvolvida por meio da colaboração dos laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco Pereira;
- Laboratório Temático Biotério Central do INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, coordenado pelo MSc. Leonardo Brandão Matos;
- Departamento de Química, Universidade de Helsinque - Helsinque, Finlândia, Colaboração com Dr. Andriy Grafov.

4.1 Etapa 1: Síntese e caracterização das nanopartículas (NPs)

4.1.1 Nanopartículas de Antimônio Pentavalente (NPSb⁵⁺)

As suspensões com NPSb⁵⁺ possuem registro de patente pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob nº BR 10 2013 02961800, a síntese para esse trabalho seguiu o protocolo descrito neste documento, todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente (TA) e as suspensões estabilizadas com o ligante orgânico N-metil-D-glucosamina (NMGA) (FRANCO et al., 2016).

4.1.2 Caracterização das NPSb⁵⁺

Dentre os parâmetros estudados para avaliar uma nanopartícula, os mais importantes são o tamanho e estabilidade. Deste modo foi utilizada a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para avaliar essas características nas nanopartículas aqui estudadas.

Foram utilizados 1,5 mL das suspensões com NPSb⁵⁺, estas foram mensuradas no equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Filadelfia, PA), para avaliação do tamanho hidrodinâmico, as análises foram realizadas em triplicatas para obtenção do tamanho médio das NPs, a partir da média de cada amostra incluindo os desvios padrões é possível calcular o tamanho das partículas. O mesmo equipamento foi utilizado para medir a estabilidade das NPs através do potencial Zeta (ζ) das suspensões (FRANCO et al., 2016).

4.2 Etapa 2: Atividade biológica – Estudo *in vitro*

Neste trabalho foram testadas as substâncias nas seguintes concentrações:

Estudo pré-clínico *in vitro*:

- Nanopartículas de antimônio pentavalente (NPSb⁵⁺): 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 mg/Sb⁵⁺/mL;
- Hesperidina – metil – chalcona (Sigma aldrichTM): 9; 4,5; 2,25; 1,12 e 0,56 mg/mL;
- N-metil-D-glucosamina (NMGA): 0,101; 0,050; 0,025; 0,012 e 0,006 mg/mL;
- Glucantime[®]: 8; 4; 2; 1 e 0,5 mg/Sb⁵⁺/mL.

Estudo pré-clínico *in vivo*:

Nanopartículas de antimônio pentavalente: 1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia; 4 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia

Glucantime®: 1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia; 4 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia

4.2.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia para os testes *in vitro* (CEUA/INPA: 014/2015) e para testes *in vivo* (CEUA/INPA: 029/2020)

4.2.2 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

Foram utilizadas formas promastigotas das espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) e *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), mantidas e criopreservadas no criobanco de cepas de *Leishmania* no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, COSAS, INPA. Os parasitas foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFBi) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e incubados a 25°C para obtenção de massa parasitária, posteriormente foram utilizados para os bioensaios e criopreservação.

4.2.3 Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Para avaliar o crescimento das formas promastigotas, os parasitas foram ajustados para a concentração de 2×10^6 promastigotas/mL e semeados em placa de 96 poços em triplicata contendo meio RPMI completo suplementado com 10% SFBi e incubados em estufa a 25° C por sete dias. A cada 24 horas alíquotas da cultura foram retiradas e quantificadas em câmara de Neubauer até a verificação da morte parasitária (SILVA - JUNIOR, 2013).

4.2.4 Determinação da atividade das NPSb⁵⁺ e da hesperidina contra formas promastigotas de *Leishmania* spp.

A massa parasitária obtida através de cultivo foi quantificada e ajustada para a concentração de 2×10^6 células/mL. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 uL de meio RPMI completo suplementado com 10% SFBi, em seguida foram adicionados 100 uL das substâncias em teste seguido de uma diluição seriada, conforme as concentrações pré-estabelecidas e por fim foram acrescentadas 100 uL das formas promastigotas, as placas foram incubadas em estufa a 25° C. A atividade das substâncias foi determinada pela viabilidade celular e a concentração efetiva (CI₅₀) no período de 24-72h, utilizando os métodos de contagem de células vivas em câmara de Neubauer, com microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japan) (WYREPKOWSKI et al., 2017). As substâncias testadas foram as NPSb⁵⁺ e a hesperidina, como controles foram adotados o Glucantime® (controle positivo), o NMGA e cultivo com parasitas sem tratamento (controle negativo).

4.2.5 Obtenção e manutenção de macrófagos peritoneais murinos

Os macrófagos peritoneais murinos foram obtidos de camundongos (*Mus musculus*) BALB/c; estes foram eutanasiados a fim de expor a cavidade abdominal para realização da coleta, e em seguida na cavidade peritoneal foram injetados 5 mL de RPMI, posteriormente o animal foi submetido a uma massagem abdominal e em seguida retirado o RPMI com auxílio da seringa contendo os macrófagos, seguindo protocolo descrito por Chagas (2015). Por fim, essas células foram encaminhadas para posteriores ensaios de citotoxicidade e amastigota.

4.2.6 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, 100 uL da suspensão de macrófagos foram adicionadas as placas de 96 poços na concentração de 10^4 células/mL, em meio RPMI sem indicador de Ph vermelho fenol (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) na presença das NPSb⁵⁺ e da hesperidina conforme as concentrações pré-estabelecidas, como controles foram adotados o Glucantime®, o NMGA e células não tratadas. As culturas permaneceram expostas as substâncias por um período de 24-72 horas e incubadas a 37 °C com 5% CO₂. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o teste colorimétrico Alamar Blue® (Sigma Aldrich™, USA) utilizando o protocolo descrito pelo fabricante; por fim as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (BIO-TEK®) com comprimento de onda de 590 nm (FRANCO et al., 2016).

4.2.7 Verificação da viabilidade de formas amastigotas após exposição às NPSb⁵⁺ e a hesperidina

Para verificação da viabilidade de formas amastigotas, os macrófagos foram previamente aderidos às lamínulas em placa de 24 poços na concentração de 10^4 células/mL, em seguida foram infectados com 100 uL de massa parasitária na concentração de 10^5 promastigotas/mL das espécies em estudo por duas horas em estufa a 37 °C com 5% CO₂, após a infecção foram incubados na presença das substâncias em teste nas concentrações pré estabelecidas por 24-72 horas, como controle positivo foram adotados o Glucantime® e células não infectadas, e como controle negativo o NMGA e células infectadas com parasitas sem tratamento. Após o período de incubação foram montadas lâminas para posterior análise, as quais foram quantificados macrófagos infectados e não infectados por meio de contagem aleatória de 100 macrófagos através de observação em microscópio óptico e foi determinada a concentração efetiva (CI₅₀) (FRANCO et al., 2016).

4.3 Etapa 3. Atividade Biológica – Estudo pré-clínico *in vivo*

4.3.1 Procedência dos animais

Foram utilizados para a realização deste trabalho hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, pesando aproximadamente 180 gramas, com 90 dias de vida. Todos os animais provenientes do Biotério Central do INPA, em condições de alimentação e água *ad libitum* e livre de patógenos.

4.3.2 Infecção em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por *Leishmania* spp.

Os animais foram submetidos à infecção por inóculo de 100 uL de promastigotas (10^6 promastigotas/mL) de *L. (L.) amazonensis* L. (V.) *guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, com seringa estéril na região do focinho, ressaltando que cada animal recebeu o inóculo de apenas uma das espécies testadas (DOMINGOS, 2018). Após o surgimento de lesão aparente os animais

foram tratados conforme descrito a seguir. Não será realizado o tratamento em animal com a espécie de *L. (V.) naiffi*, devido essa espécie não causar lesão em hamster.

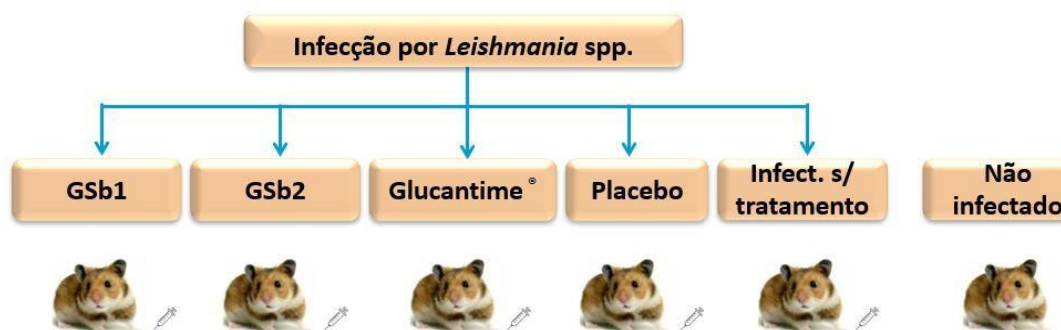
4.3.3 Delineamento experimental do tratamento com NPSb⁵⁺

Os animais foram submetidos a dois protocolos de tratamento, o protocolo 1 nas espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) braziliensis* e o protocolo 2 com a espécie *L. (V.) guyanensis* e testes de toxicidade.

No protocolo 1, para cada espécie estudada os animais foram separados em seis grupos de tratamento contendo seis animais por grupo, sendo cinco grupos compostos por animais infectados e um grupo composto por animais não infectados (Figura 11). Os grupos infectados sem tratamento e placebo (solução salina) serão os controles negativos e os grupos Glucantime[®] e não infectados não tratados serão controles positivos. Os grupos consistiram na seguinte divisão:

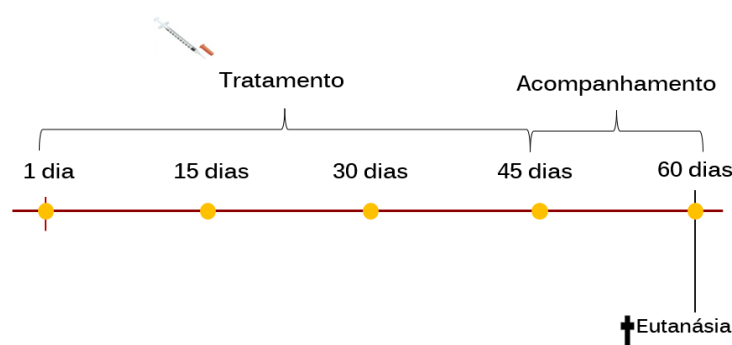
- Grupo não infectado (**GN1**);
- Grupo infectado e não tratado (**GI1**);
- Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (**GP1**);
- Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL de Glucantime[®] (**GG1**);
- Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺ (**GSb1**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/Sb⁵⁺/mL das NPsSb⁵⁺ (**GSb2**).

Figura 10 - Fluxograma com delineamento experimental por espécie estudada.



Os animais foram tratados por 60 dias, as aplicações foram feitas por via intralésional na região do focinho, com intervalos de 15 dias por aplicação, totalizando 4 aplicações, conforme o MS para tratamento intralésional. O esquema pode ser observado na figura 11.

Figura 11. Cronograma esquemático – protocolo I



No protocolo terapêutico 2 os animais foram divididos em 2 grupos, o grupo A para estudo da atividade biológica das NPSb^{5+} frente a espécie *L. (V.) guyanensis* e o grupo B para estudo de toxicidade (todos os animais saudáveis), ambos submetidos ao tratamento com Glucantime® (4 mg/ Sb^{5+} /mL) e NPSb^{5+} (4 mg/ Sb^{5+} /mL⁻¹) e demais grupos controles conforme descrito anteriormente. Os grupos consistiram na seguinte divisão:

Grupo A – Estudo de atividade biológica

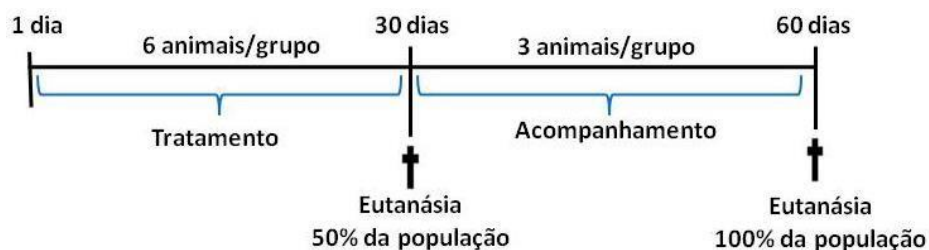
- Grupo não infectado (**GN2-A**);
- Grupo infectado e não tratado (**GI2-A**);
- Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (**GP2-A**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/ Sb^{5+} /mL de Glucantime® (**GG2-A**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/ Sb^{5+} /mL das NPSb^{5+} (**GSb-A**)

Grupo B – Estudo de toxicidade

- Grupo não infectado (**GN2-B**);
- Grupo infectado e não tratado (**GI2-B**);
- Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (**GP2-B**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/ Sb^{5+} /mL de Glucantime® (**GG2-B**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/ Sb^{5+} /mL das NPSb^{5+} (**GSb-B**)

Os animais foram tratados por 30 dias, por via intralesional, os grupos placebo e NPSb^{5+} com intervalos de 48 horas por aplicação e o Glucantime® com intervalos de 5 dias baseados em dados do MS. Após esse período três animais por grupo foram mantidos por mais 30 dias em observação para análises pós-tratamento, conforme a figura 12.

Figura 12. Cronograma esquemático – protocolo II.



Durante o período experimental foi realizado o acompanhamento do volume total das lesões com o paquímetro digital (Zaas precision[®]), fotodocumentação do focinho para análise morfológica macroscópica e pesagem em balança semi-analítica (Toledo[®]) para observação do ganho ou perda de peso.

4.3.4 Delineamento experimental do tratamento com hesperidina

Os animais foram divididos em 3 grupos de 36 animais (Grupo A- *L. (L.) amazonensis*; B- *L. (V.) guyanensis* e C- *L. (V.) brasiliensis*). Para cada espécie estudada os animais foram separados em 6 grupos de tratamento (contendo 6 animais por grupo) sendo 1 grupo composto por animais não infectados (grupo controle) e cinco grupos com animais infectados. Os grupos consistiram na seguinte divisão:

- Grupo não infectado (**GNI**);
- Grupo infectado e não tratado (**GINF**);
- Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (**GTP**);
- Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mLde Glucantime[®] (**GTG**);
- Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mLdas NPSb⁵⁺ (**GTH1**);
- Grupo infectado e tratado com 4 mg/Sb⁵⁺/mLdas NPSb⁵⁺ (**GTH2**).

Os animais foram tratados por 60 dias, as aplicações foram feitas por via intralesional na região do focinho, com intervalos de 15 dias por aplicação, totalizando 4 aplicações, conforme o MS para tratamento intralesional.

4.3.5 Eutanásia dos animais

Ao final dos tratamentos foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para o uso de animais de experimentação e o procedimento foi realizado conforme descrito e aprovado no CEUA 029/2020, por meio dos sedativos Anasedan[®] injetável (Xilasina 2 g) e Dopalen injetável (Ketamina 1,16 g) com apresentação em frasco ampola contendo 10 mL e 50 mL, respectivamente. Após a eutanásia foi realizado a coleta de material biológico para diagnóstico parasitológico.

4.3.6 Diagnóstico parasitológico por método direto

O diagnóstico parasitológico por método direto foi realizado através de fragmentos de lesão e fígado dos animais, foram feitos esfregaços por aposição em lâmina (*imprint*) com auxílio de uma pinça estéril e posteriormente as lâminas foram coradas com o Kit Panótico (Laborclin[®]). A avaliação foi realizada a partir da quantificação de macrófagos infectados, não infectados e quantificação de amastigotas em microscópio óptico com o auxílio do óleo de imersão utilizando a lente objetiva com aumento de 1000x em 20 campos ao acaso (DOMINGOS, 2018).

4.3.7 Diagnóstico parasitológico por cultivo

Para diagnóstico por cultivo, as lesões foram fragmentadas e desinfetadas com solução salina mais Gentamicina[®] (50 ug/mL). Em seguida, os fragmentos foram cultivados em meio NNN (McNeal, Novy e Nicolle), as culturas mantidas durante sete dias, a 25 °C e então avaliada a presença ou ausência de promastigotas utilizando o microscópio óptico para confirmação. (WYREPKOWSKI et al., 2017).

4.3.8 Avaliação hematológica

Esfregaço de sangue dos animais foram confeccionados em lâminas e em seguida foram corados pelo método Panótico Rápido. A análise foi feita através da contagem de 100 células por lâmina com diferenciação e quantificação de células leucocitárias em microscópio óptico com aumento de 400x.

4.3.9 Avaliação de toxicidade

Para análise da toxicidade animais não infectados e tratados foram avaliados quanto ao peso dos animais e dos órgãos (fígado, baço e rim), presença de sinais clínicos como inflamação, edema e integridade tecidual no local da aplicação, mobilidade, vitalidade e letalidade frente as concentrações propostas no tratamento.

4.3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos nas análises *in vitro* e *in vivo* foram inseridos em um banco de dados previamente elaborado no programa GraphPad Prism 6.0 e em seguida analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança.

4.4 Etapa 4 - Levantamento Epidemiológico

Este é um estudo epidemiológico de caráter descritivo e retrospectivo, com a análise de dados secundários que utilizou do banco de dados fornecido publicamente pelo Ministério da Saúde.

As informações coletadas foram obtidas mediante a busca no banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os dados foram obtidos por meio do sistema de tabulação TABWIN da plataforma do DATASUS no período de 12 a 15 de maio de 2023.

A população de estudo foi composta por casos notificados de LTA no Brasil em 2022. Os dados coletados foram casos notificados de LTA no Brasil e Unidades Federativas (UF), tipo de entrada, distribuição da doença por faixa etária, sexo, raça, critério de confirmação, evolução do caso e manifestação clínica. Após a realização da coleta de dados, os mesmos foram transcritos para o programa Microsoft Excel e tabulados para posterior realização da análise descritiva

Capítulo 1

Estudo do potencial terapêutico da hesperidina metil chalcona no tratamento experimental da leishmaniose tegumentar

Submetido a *Acta amazônica* em 29/11/2022 e aceito em 11/08/2023.

CAPÍTULO 1

Estudo do potencial terapêutico da hesperidina metil chalcona no tratamento experimental da leishmaniose tegumentar

Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}, Ana Flávia da Silva Chagas¹, João Roberto de Figueiredo Lopes¹, Atonia Maria Ramos Franco¹.

¹Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 69067-375, Amazonas, Brasil.

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

*Autor correspondente: Anny Maíza Vargas Brasil. Email: mayzabrazil@gmail.com

RESUMO

O reposicionamento de fármacos busca descobrir novas aplicações para um fármaco já aprovado no mercado de forma mais rápida e com menor custo, sendo utilizada geralmente para doenças que recebem pouco investimento, como a Leishmaniose Tegumentar. Nesse contexto, hesperidina, aprovada comercialmente como Daflon, tem despertado o interesse científico, por ser um flavonóides pertencente ao grupo das chalconas, classe que apresenta potencial antileishmania. O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* da hesperidina comercial. Neste sentido a hesperidina (9 a 0,56 mg.mL⁻¹) foi testada frente as formas promastigotas e amastigotas de quatro espécies dermatrópicas de *Leishmania* para determinar a viabilidade parasitária, taxa de infecção e a atividade citotóxica frente a macrófagos peritoneais murinos. Para os testes *in vivo*, hamsters foram infectados e as lesões tratadas com hesperidina intralesional, cuja eficácia foi avaliada através da aferição do volume total da lesão no focinho e determinação da carga parasitária. Os resultados demonstram toxicidade moderada e melhor eficácia nas formas promastigota e amastigota de *L. (Leishmania) amazonensis* (CI₅₀ 3,7 mg, 3,06 mg, respectivamente). Os dados do estudo *in vivo* mostraram que a Hesperidina frente a essa espécie apresentou um padrão de reposta com capacidade de reduzir gradativamente o tamanho da lesão, embora não tenha induzido a cura clínica e parasitológica. No entanto, a Hesperidina revelou-se promissora nos estudos *in vitro* contra *L. (L.) amazonensis*, o que encoraja a progressão para estudos de nova formulação e esquema de tratamento experimental.

Palavras-chave: Flavonoide, *Leishmania*, reposição de fármacos.

ABSTRACT

The repositioning of drugs seeks to discover new applications for a drug that has already been approved in the market more quickly and at a lower cost, and is generally used for diseases that receive little investment, such as Cutaneous Leishmaniasis. In this context, hesperidin, commercially approved as Daflon, has aroused scientific interest, as it is a flavonoid belonging to the chalcone group, a class that has antileishmania potential. The present study aims to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of commercial hesperidin. In this sense, hesperidin (9 to 0.56 mg.mL⁻¹) was tested against the promastigotes and amastigotes forms of four dermatropic species of *Leishmania* to determine parasite viability, infection rate and cytotoxic activity against murine peritoneal macrophages. For the *in vivo* tests, hamsters were infected and the lesions treated with intralesional hesperidin, whose effectiveness was evaluated by measuring the total volume of the lesion in the snout and determining the parasite load. The results demonstrate moderate toxicity and better efficacy in the promastigote and amastigote forms of *L. (Leishmania) amazonensis* (IC₅₀ 3.7 mg, 3.06 mg, respectively). Data from the *in vivo* study showed that Hesperidin against this species presented a response pattern capable of gradually reducing the size of the lesion, although it did not induce clinical and parasitological cure. However, Hesperidin has shown promise in *in vitro* studies against *L. (L.) amazonensis*, which encourages progression to studies of a new formulation and experimental treatment regimen.

Keywords: Flavonoid, *Leishmania*, drug replacement.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é considerada uma doença tropical, infecto-parasitária e não contagiosa ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta manifestação polimórfica de pele e mucosa, estando associada à alta morbidade (Blanco e Nascimento – Júnior, 2017; Glans *et al.*, 2018). No Brasil, há sete espécies patológicas causadoras da LT, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo elas: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) linderbergi* e *L. (L.) amazonensis* (Teles *et al.*, 2016).

Conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) o tratamento das diferentes formas clínicas da LT no Brasil é realizado por meio do uso de cinco fármacos sendo eles Antimoniato de Meglumina, Isetionato de Pentamidina, Anfotericina B ou Anfotericina B Lipossomal e mais recentemente a miltefosina (Brasil, 2017); no entanto estes medicamentos apresentam alta toxicidade, efeitos adversos, uso parenteral, resistência parasitária e custo elevado. Diante dessas limitações a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o

incentivo à busca por novos medicamentos e tratamentos como drogas alternativas (Holanda *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2020).

Diversas pesquisas estudam a possibilidade da realização do reposicionamento de fármacos, que visa investigar se um medicamento já aprovado e utilizado clinicamente apresenta alguma atividade contra outra doença ainda sem tratamento. Essa estratégia tem sido utilizada geralmente para doenças que recebem pouco investimento, como a LT (Bustamante, Ochoa, muskus, 2019). Nesse contexto, alguns flavonoides, como a hesperidina, tem despertado o interesse no meio científico, visto que essa é uma substância pertencente ao grupo de chalconas, aprovada na terapêutica clínica e conhecida comercialmente como Daflon, sendo utilizada em sinergismo com a diosmina para o tratamento de varizes e outros sintomas relacionados à insuficiência venosa crônica. Atualmente a hesperidina tem sido investigada quanto a atividade anticâncer (Pandey, Khan, Maurya, 2021) antioxidante (Hager-Theodorides *et al.*, 2021), antiviral (Attia *et al.*, 2021), imunomoduladora (Berkoz *et al.*, 2021) e antileishmania (Tabrez, 2021) para Leishmanose Visceral.

Não há descrito na literatura estudos que investiguem a reposição da hesperidina para o tratamento da LT, no entanto Gomes *et al.* (2017) relatam que flavonóides pertencentes ao grupo das chalconas, apresentam potencial antileishmania. Na literatura apenas Tabrez (2021) mostrou resultados da atividade da hesperidina em formas promastigotas ($CI_{50} < 1,019$ mM) e amastigotas ($CI_{50} < 0,285$ mM) de *L. donovani* e estudou o possível mecanismo de ação no qual foi descrito que a hesperidina (concentração de 2,0 mM) induziu espécies reativas de oxigênio (ROS) em 96,7% dos parasitas de maneira dose-dependente e consequente indução de morte celular semelhante a apoptose, juntamente com a possível inibição de uma enzima biossintética chave do ergosterol.

Com isso, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania da hesperidina *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LT no Brasil, e assim abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de tratamento com baixa toxicidade, acessível e eficaz contra a leishmaniose.

MATERIAL E MÉTODOS

Substâncias

A molécula alvo em estudo foi a hesperidina-metil-chalcona adquirida de forma comercial da Sigma – Aldrich™ e o antimoníato de meglumina (Glucantime®; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) foi o medicamento padrão utilizado como controle positivo.

Massa parasitária

Foram utilizadas nesse estudo as cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2904) e *Leishmania (Viannia) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), cultivadas inicialmente em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e a cultura expandida no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg.mL⁻¹ de gentamicina (Novafarma, Brasil), incubado a 25 °C.

Comitê de ética

Esse estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia para os testes *in vitro* (CEUA/INPA: 014/2015) e para os testes *in vivo* (CEUA/INPA: 029/2020).

Ensaio de citotoxicidade

Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 10⁵ células.mL⁻¹ em meio RPMI sem indicador de Ph/vermelho fenol (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SFBi e mantidos em incubadora a 5% de CO₂ a 37° C (Forma Série II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Scientific, USA). As células foram tratadas com diferentes concentrações da hesperidina (9,00; 4,50; 2,25; 1,12 e 0,56 mg.mL⁻¹) e Glucantime® (8,00; 4,00; 2,00; 1,00 e 0,50 mg.Sb⁵⁺.mL). Poços com célula sem tratamento e poços sem células foram mantidos como controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando Alamar Blue® (Sigma Aldrich™, EUA) no período de 24, 48 e 72 horas com a adição de 10 µL de solução de estoque de sal de resazurina sódica (4 mg.mL⁻¹ em solução salina tamponada com fosfato) em cada poço, as placas foram novamente incubadas por mais 12h a 37 °C, após esse período foram submetidas

a leitura por espectrofotômetro Elx800™ (BIO-TEK®, Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 590 nm (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológico com formas promastigotas

Em placas de 96 poços foram adicionadas promastigotas (2×10^6 promastigotas.mL⁻¹) e estas foram expostas a hesperidina e Glucantime® nas mesmas concentrações usadas em ensaios de citotoxicidade, poços com parasitas sem tratamento foram mantidos como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis no período de 24, 48 e 72 horas em câmara de Neubauer por meio do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos pela concentração inibitória média (CI₅₀) (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológico com formas amastigotas

Macrófagos peritoneais murinos na concentração de 10^4 células.mL⁻¹ foram cultivados em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFBi, e submetidos a infecção com promastigotas de *Leishmania* spp. na concentração de 10^5 promastigotas.mL⁻¹ por duas horas em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Os macrófagos infectados foram tratados em diferentes concentrações da hesperidina (9,00; 4,50; 2,25 e 1,12 mg.mL⁻¹) e do Glucantime® (8,00; 4,00; 2,00 e 1,00 mg.Sb⁵⁺.mL⁻¹) durante 24, 48 e 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Células infectadas e não tratadas foram mantidas como controle. Em seguida, as lamínulas foram fixadas e coradas a cada 24 horas pelo método Panótico Rápido (Laborclin®, Paraná, Brasil) e analisadas por microscopia óptica. A porcentagem de células infectadas foi determinada pela quantificação aleatória de 100 células infectadas e não infectadas em cada lamínula, assim como também expressos pelo CI₅₀ (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológico *in vivo*

Foram utilizados neste trabalho 108 *hamsters* dourados (*Mesocricetus auratus*), pesando aproximadamente 180 gramas, idade de 90 dias, proveniente do Biotério Central do INPA, local onde foram mantidos em condições de alimentação e água *ad libitum* e livre de

patógenos. Os animais foram divididos em 3 grupos de 36 animais (Grupo A, B e C). Os 36 animais de cada grupo (A, B e C) foram separados em 6 grupos de tratamento (contendo 6 animais por grupo) sendo 1 grupo composto por animais não infectados (grupo controle) e cinco grupos com animais infectados por uma das espécie de *Leishmania* estudada, assim, os grupos foram divididos em: I) Grupo não infectado (GNI); II) Grupo infectado e não tratado (GINF); III) Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (GTP); IV) Grupo infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia de Glucantime[®] (GTG); V) Grupo infectado e tratado com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina (GTH1); VI) Grupo infectado e tratado com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina (GTH2).

Os animais foram submetidos à infecção por inóculo de 0,1 mL⁻¹ de promastigotas (10⁶ promastigotas.mL⁻¹) de *L. (V.) guyanensis* (Grupo A), *L. (L.) amazonensis* (Grupo B), *L. (V.) braziliensis* (Grupo C), na região do focinho. Após o surgimento de lesão os animais foram tratados com a hesperidina, Glucantime[®] e solução salina por via intralesional, com aplicações a cada 15 dias, totalizando 45 dias de tratamento (4 aplicações), conforme o MS para tratamento intralesional. Após os 45 dias de tratamento, os animais ficaram em observação (sem tratamento) por mais 15 dias, totalizando um acompanhamento de 60 dias. Devido ao não desenvolvimento de lesões cutâneas macroscopicamente visíveis por *L. (V.) naiffi*, o estudo dos efeitos *in vivo* da hesperidina não foram avaliados nessa espécie.

Avaliação do tratamento experimental

Durante o tratamento foi realizado semanalmente o acompanhamento do volume total da lesão através da mensuração do focinho com o uso de paquímetro digital (Zaas precision[®]), fotodocumentação do focinho para análise morfológica macroscópica da lesão e pesagem dos animais em balança semianalítica (Toledo[®]) para observação do ganho ou perda de peso (Comandolli-wyrepkowski *et al.*, 2017).

Eutanásia dos animais

Todos os animais foram anestesiados (Ketamina e Xylazina) e eutanasiados por via intramuscular de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação. Após o procedimento de eutanásia foi realizada a coleta de material biológico (fragmentos de lesão, fígado, baço, rins e sangue); os órgãos foram pesados em balança de precisão.

Avaliação parasitológica e hematológica

Fragmentos de tecido coletados da área da lesão dos animais, foram usados para confeccionar esfregaços por aposição em lâmina (*imprint*) com auxílio de uma pinça, que posteriormente foram corados com o Kit Panótico Rápido. A quantificação de células infectadas foi determinada pela contagem de 25 campos ao acaso em microscópio óptico com aumento de 1000x.

Fragmentos de lesão e o fígado foram cultivados em meio NNN, por 7 dias a 25 °C e então foi avaliado a presença ou ausência de promastigotas, sendo considerado positivo quando pelo menos uma forma do parasita foi isolada no meio de cultivo (Comandolli-wyrepkowki *et al.*, 2017).

Esfregaço de sangue dos animais foram confeccionados em lâminas e em seguida foram corados pelo método Panótico Rápido. A análise foi feita através da contagem de 100 células por lâmina com diferenciação e quantificação de células leucocitárias em microscópio óptico com aumento de 400x.

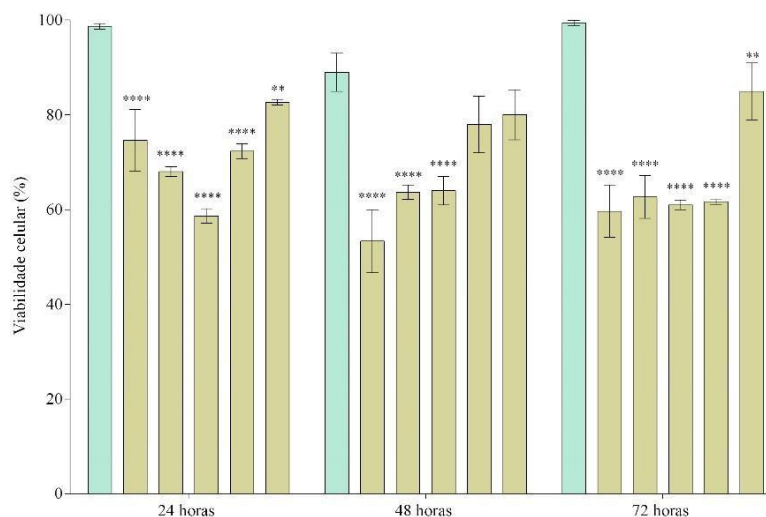
Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (Versão 6.0) e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de cada grupo de tratamento e controles. As análises foram realizadas através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança.

RESULTADOS

A avaliação da citotoxicidade demonstrou que a hesperidina apresentou toxicidade moderada para macrófagos peritoneais murinos, com viabilidade celular média de 61,3% nas maiores concentrações (9,00; 4,5; 2,25 mg.mL⁻¹) e 80% nas menores concentrações testadas (1,12 e 0,56 mg.mL⁻¹), expresso em todo período de incubação com resposta dose dependente, ou seja, à medida que diminui a concentração da hesperidina a viabilidade celular aumenta, como demonstrado na figura 20.

FIGURA 13 - Efeito citotóxico da hesperidina (9,00 – 0,56 mg.mL⁻¹, barras amarelas) e Glucantime® (8 mg.Sb⁵⁺.mL⁻¹, barras azuis) em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas. (*) representa diferença estatística comparada ao Glucantime® segundo teste de Tukey (p < 0,05).



Os dados da tabela 4 mostram o CI₅₀ da hesperidina e Glucantime® frente às formas promastigotas de *Leishmania* spp. no período de 24, 48 e 72 horas.

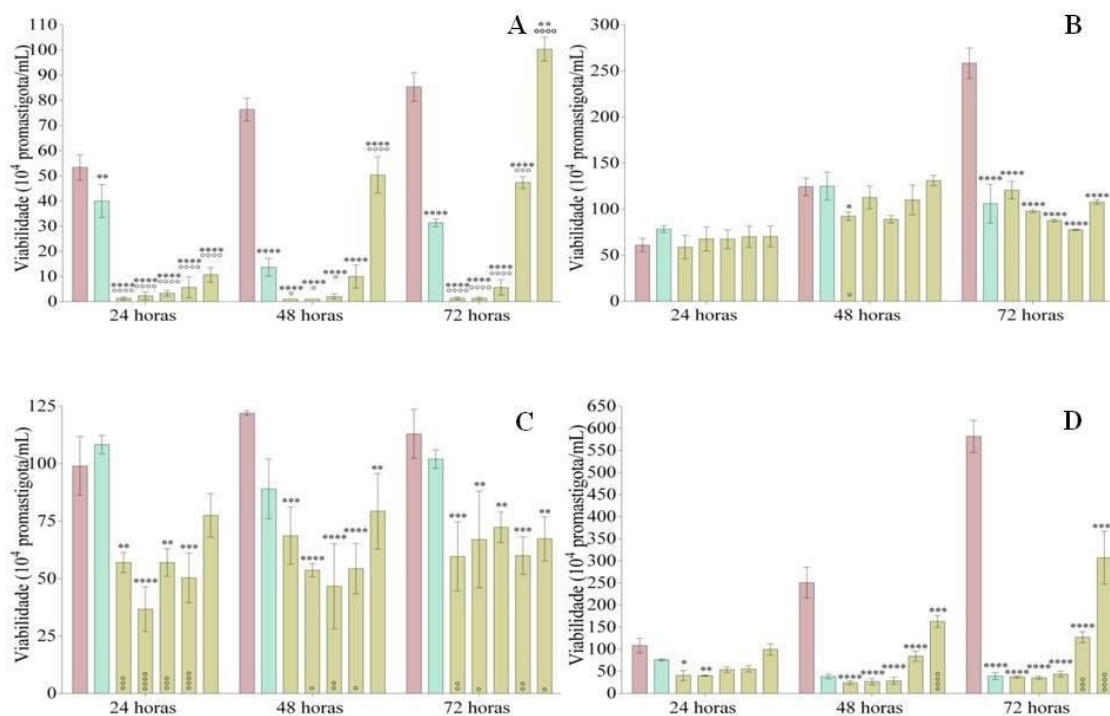
Tabela 2 - Concentração inibitória média (CI₅₀ mg ± SD) da hesperidina e Glucantime® em formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Espécies	Tempo	Hesperidina	Glucantime®
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	< 0,56 ± 2,06	10,1 ± 4,96
	48 h	1,5 ± 3,22	0,56 ± 3,48
	72 h	2,97 ± 2,24	3,3 ± 4,95
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	9,2 ± 11,72	11,0 ± 9,79
	48 h	9,1 ± 8,51	10,1 ± 12,06
	72 h	2,93 ± 3,13	2,92 ± 32,82
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	4,2 ± 8,07	11,6 ± 5,89
	48 h	3,7 ± 12,26	6,3 ± 9,55
	72 h	4,1 ± 12,09	5,2 ± 4,90
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	4,1 ± 7,68	5,7 ± 17,0
	48 h	1,33 ± 8,93	3,2 ± 14,3
	72 h	< 0,56 ± 17,06	0,3 ± 29,34

A hesperidina mostrou um menor CI_{50} em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 24 horas ($CI_{50} < 0,56$ mg), seguido por *L. (V.) naiffi* em 72 horas ($CI_{50} < 0,56$ mg), *L. (V.) guyanensis* em 72 horas ($CI_{50} 2,93$ mg) e *L. (V.) braziliensis* em 48 horas ($CI_{50} 3,7$ mg).

A análise dos diferentes tratamentos mostrou que em *L. (L.) amazonensis* a hesperidina induziu uma redução da viabilidade parasitária ($> 50\%$), com diferença significativa em relação aos controles no período de 24 horas, enquanto que em 48 e 72 horas o mesmo foi observado nas concentrações 9,00; 4,50; 2,25 $mg.mL^{-1}$ (Figura 21A). Em *L. (V.) braziliensis* há uma redução significativa no período de 24 a 72 horas (Figura 21C). Em *L. (V.) guyanensis* há uma redução significativa em 72 horas (Figura 21B); enquanto que em *L. (V.) naiffi* ocorre no período de 48 e 72 horas (Figura 21D). Vale ressaltar que em *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) braziliensis* a hesperidina mostrou uma atividade biológica significativa nas formas promastigotas quando comparado ao Glucantime®.

FIGURA 14 - Atividade da hesperidina (9,00 – 0,56 $mg.mL^{-1}$, barras amarelas) frente às formas promastigotas de (A) *L. (L.) amazonensis*, (B) *L. (V.) guyanensis*, (C) *L. (V.) braziliensis* e (D) *L. (V.) naiffi* no período de 24, 48 e 72 horas em comparação ao controle negativo (barras rosas) e Glucantime® (8 $mg. Sb^{5+}.mL$, barras azuis). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).



O CI_{50} da hesperidina e Glucantime® contra as formas amastigotas de *Leishmania* spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas, é mostrado na tabela 5.

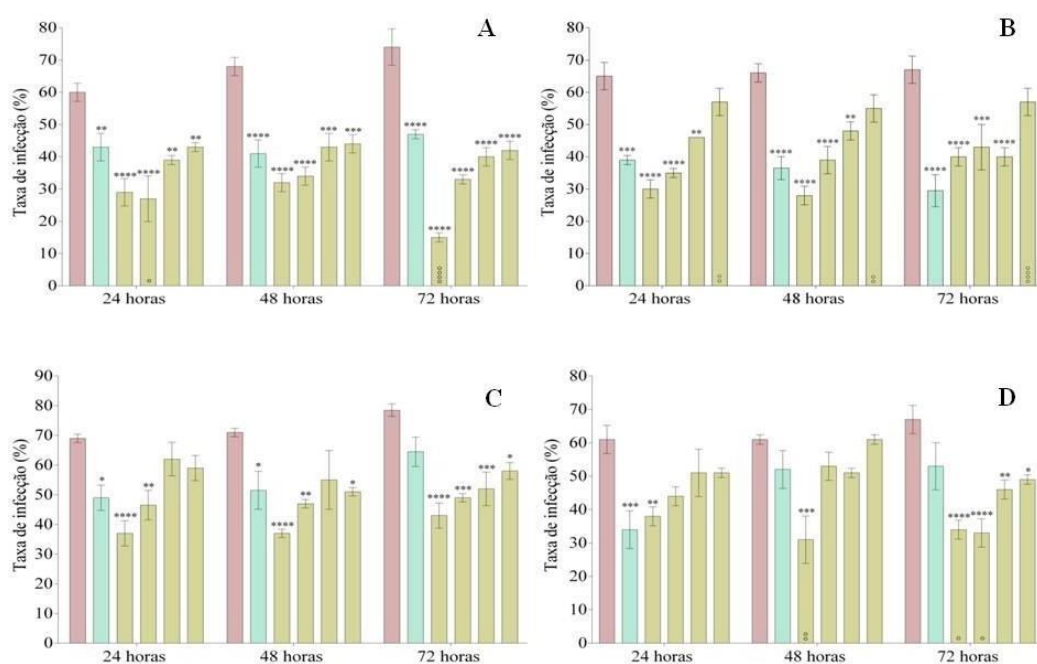
Tabela 3 - Concentração inibitória média (CI₅₀ mg ± SD) da hesperidina e Glucantime® em amastigotas de *Leishmania* spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos.

Espécies	Tempo	Hesperidina	Glucantime®
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	6,24 ± 1,94	10,73 ± 2,82
	48 h	6,73 ± 1,59	9,53 ± 1,23
	72 h	3,06 ± 1,06	9,92 ± 1,59
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	6,29 ± 2,82	9,5 ± 1,76
	48 h	7,41 ± 1,76	3,29 ± 5,12
	72 h	7,60 ± 2,12	4,24 ± 4,94
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	8,65 ± 2,82	>8 ± 3,53
	48 h	7,66 ± 2,65	>8 ± 2,12
	72 h	10,46 ± 1,76	>8 ± 1,23
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	12,33 ± 1,76	7,44 ± 3,88
	48 h	9,44 ± 1,76	9,29 ± 4,24
	72 h	7,17 ± 1,41	8,96 ± 2,82

A hesperidina apresentou resultados promissores contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 72h (CI₅₀ 3,06 mg), *L. (V.) guyanensis* em 24 horas (CI₅₀ 6,29 mg), *L. (V.) naiffi* em 72 horas (CI₅₀ 7,17 mg) e *L. (V.) braziliensis* em 48 horas (CI₅₀ 7,66 mg).

Conforme observado nas formas promastigotas, a hesperidina apresentou eficácia na espécie *L. (L.) amazonensis*, no qual induziu redução da taxa de infecção nas concentrações 9,00, 4,50 mg.mL⁻¹ (> 50%) e 2,25 e 1,12 mg.mL⁻¹ (> 40%) ao longo de todo o período de incubação. Resultados semelhantes são observados em *L. (V.) guyanensis* no período de 24 e 48 horas, em *L. (V.) braziliensis* no período de 24 a 72 horas e em *L. (V.) naiffi* em 48 e 72 horas. Observou-se que nessa forma evolutiva do parasita a hesperidina apresentou eficácia semelhante ao Glucantime® (Figura 22).

FIGURA 15 - Efeito da hesperidina ($9,00 - 0,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, barras amarelas) em amastigotas intracelulares de (A) *L. (L.) amazonensis*, (B) *L. (V.) guyanensis*, (C) *L. (V.) braziliensis* e (D) *L. (V.) naiffi* em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação ao controle negativo (barras rosas) (macrófagos infectados e não tratados), e Glucantime® ($8 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{mL}^{-1}$, barras azuis). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).



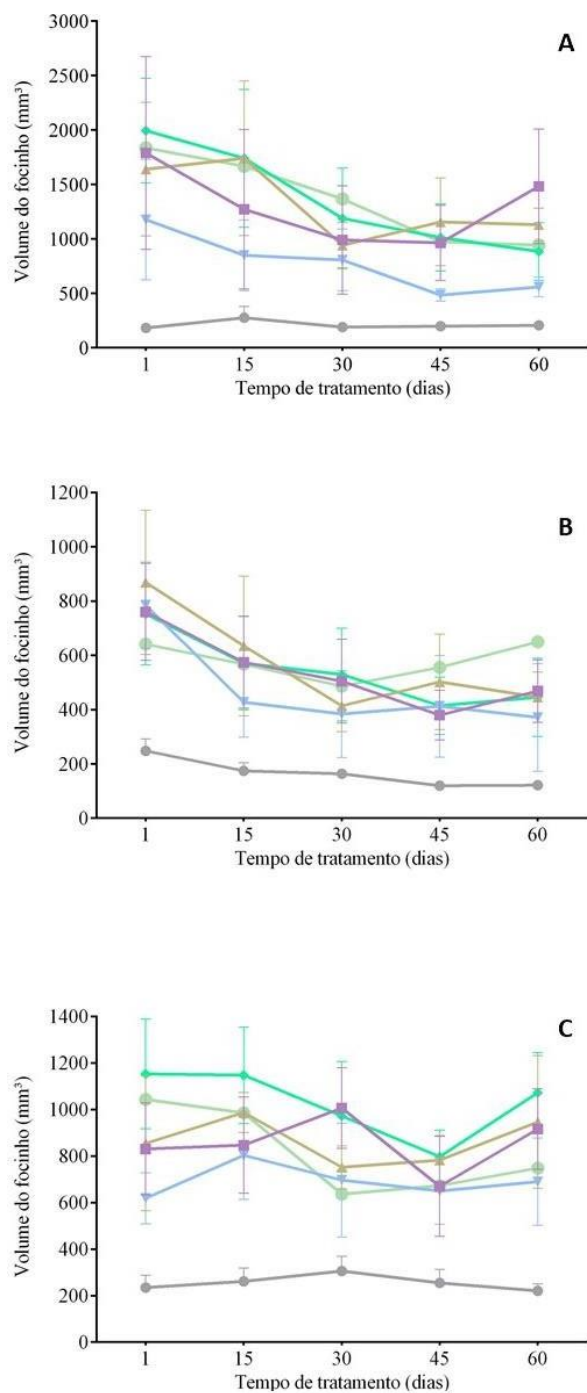
Ao final do tratamento, traçamos um comparativo entre células infectadas e não infectadas tratadas com hesperidina, e foi observado que houve pouca diferença em relação à viabilidade celular, sendo observado nas maiores concentrações testadas a presença de células de tamanho reduzido e diferenças nas delimitações celulares, conforme demonstrado nos ensaios de citotoxicidade. Além das células infectadas e tratadas, observou-se que houve redução parasitária; portanto, a citotoxicidade celular pode estar associada a uma possível atividade antileishmania.

Nos ensaios biológicos *in vivo*, os *hamsters* foram pesados com intervalos de 7 dias, e verificou-se que nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* o grupo GTH1 apresentou peso menor (média de 135,3 g) ($p < 0,001$) do que os demais grupos (média de 172,1 g) ($p < 0,01$). Em *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* não houve diferença significativa no peso dos animais.

Quando avaliado a evolução clínica da doença, observou-se que nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* houve redução contínua no volume do focinho dos grupos GTH1 (56%) e GTH2 (49%), ao final da experimentação foi observado uma resposta similar ao grupo GTG (57%) e não apresentou diferença significativa para os grupos GINF e GNI, demonstrando que esses animais estavam em processo de redução do volume do focinho.

Em *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* foi observado uma redução de volume dos focinhos até em média o 45º dia de tratamento e após isso foi observado novamente um aumento para os grupos de tratamento GTG, GTH1 e GTH2, ao final da experimentação observou diferença significativa para o grupo GNI ($p < 0,001$) embora sem diferença significativa para o grupo GINF. Em *L. (V.) guyanensis* animais tratados com o grupo GTH1 reduziu em 41% o volume do focinho e em *L. (V.) braziliensis* grupo GTH2 reduziu em 29%, ambos sem diferença ao grupo GTG (Figura 23).

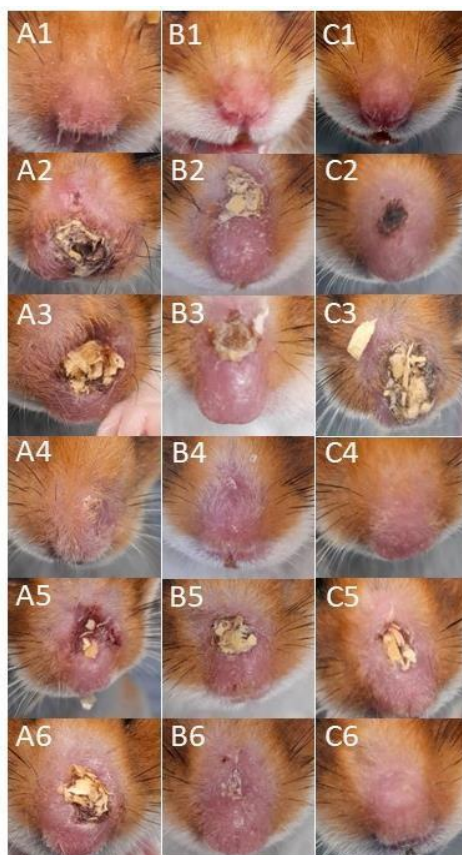
FIGURA 16. Volume do focinho de *hamsters* infectados com *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). *Hamster* não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha lilás), infectado e tratado com placebo (linha amarela), infectado e tratado com 1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia de Glucantime® (linha azul), infectado e tratado com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina (verde escuro) e infectado e tratado com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina (verde claro).



Todos os animais infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram edema com lesão aparente, nos grupos GINF e GTP esses sinais foram intensificados a partir do 30° que resultou ao final do tratamento no maior volume do focinho e lesões ulceradas quando comparado aos outros grupos experimentais. Após o 15° dia de tratamento os grupos GTH1 e GTH2 progrediram para lesões ulceradas exacerbadas, seguido de formação de escaras e consequente redução do edema, sem cura clínica. O grupo tratado com Glucantime® apresentou cicatrização a partir do 30° dia e consequente cura clínica dos animais.

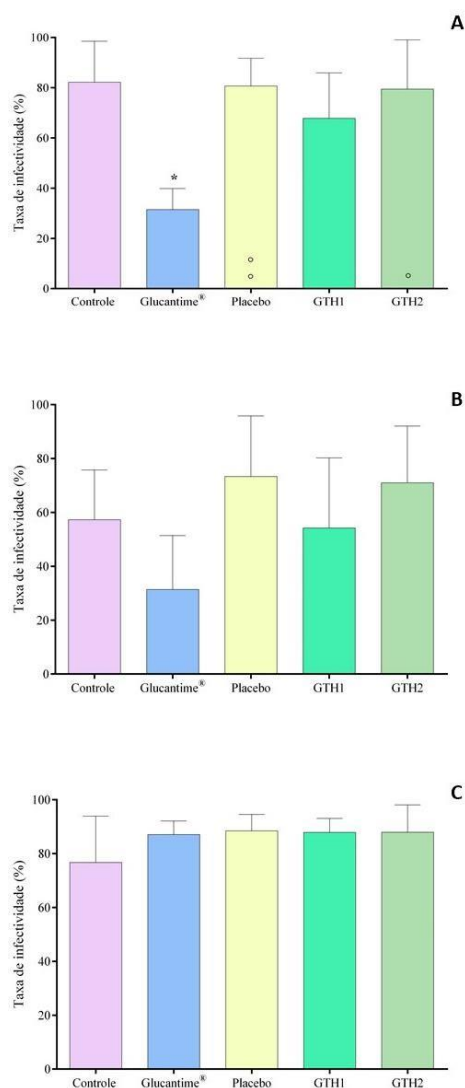
Nos grupos infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, os animais apresentaram formação de nódulo com lesão pequena e escaras, expressos nos grupos GINF e GTP de forma progressiva. Apenas no grupo tratado com Glucantime® houve cura clínica de todos os animais. Nos grupos tratados com GTH2 para a espécie de *L. (V.) braziliensis* metade do grupo apresentou cura clínica (Figura 24).

FIGURA 17. Aspecto clínico das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C) no 60° dia de experimentação. 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 placebo. A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com Glucantime® (1,15 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia). A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina. A6, B6, C6 - animal infectado e tratado com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina



Após o tratamento, a viabilidade parasitária foi determinada por meio de diagnóstico direto utilizando cultura NNN e aposição em lâmina, revelando a presença de parasitas flagelados viáveis nas culturas de fragmentos da lesão e fígado em todos os grupos e a taxa de infectividade demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento em todas as espécies testadas. Apenas o Glucantime® apresentou baixa infectividade dos macrófagos, com diferença significativa para o GTH2 em *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,05$) (Figura 25)

FIGURA 18. Taxa de infectividade em macrófagos contada pela impressão em lâmina de fragmentos de lesões de *hamsters* infectados com *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). Animais infectados e não tratados (barra rosa), animais infectados e tratados com 1,15 mg/kg/dia de Glucantime® (barra azul), animais infectados e tratados com placebo (barra amarela), animais infectados e tratados com 1,15 mg.mL⁻¹ da hesperidina (barra verde escuro) e animais infectados e tratados com 4 mg.mL⁻¹ da hesperidina (barra verde claro). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes.



Quanto a avaliação do peso dos órgãos (fígado, baço e rim) e parâmetros leucocitários não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em todas as espécies testadas.

DISCUSSÃO

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que busca descobrir novas aplicações para um fármaco já aprovado no mercado de forma mais rápida e com menor custo, sendo assim, esse estudo teve como objetivo investigar o reposicionamento da hesperidina e avaliar a atividade antileishmania e a citotoxicidade da mesma em comparação ao Glucantime[®], que é o tratamento de primeira linha para LT no Brasil;

Este estudo é um relato inédito da atividade antileishmania da hesperidina para LC e devido à escassez de informações na literatura, os resultados obtidos serão discutidos sob a ótica da atividade antileishmania da hesperidina frente a uma espécie causadora de Leishmaniose Visceral (LV) e de outras substâncias da classe dos flavonoides para LC já documentado.

Nesse estudo a hesperidina apresentou citotoxicidade moderada e viabilidade celular (61,3% a 80%), semelhantes aos observado em diferentes flavonoides como quercetina (50% a 100%) (Caetano *et al.*, 2019) e cynaroside (20% a 50%) (Tabrez *et al.*, 2021); diferentemente desses resultados um flavonoide ligado a amina não apresenta citotoxicidade a macrófagos (Chan *et al.*, 2021)

Nos testes de atividade antileishmania foi observado uma resposta dose-dependente, em que as maiores concentrações da hesperidina (9 e 4,5 mg.mL⁻¹) foram mais eficazes para inibição de promastigotas e amastigotas, de acordo com silva (2016) é necessário avaliar através do CI₅₀ e taxa de infecção se o fármaco em estudo está apresentando atividade biológica antileishmania ou indutora de toxicidade celular, levando em consideração as diferentes espécies e subgêneros que respondem de formas diferentes ao tratamento.

Em *L. (L.) amazonensis*, a hesperidina conseguiu inibir formas promastigotas (> 75% - IC₅₀ < 0.56 mg) e amastigotas em 72 horas (> 50% - IC₅₀ 3.06 mg) com maior eficácia que o Glucantime[®]. Esses resultados corroboram os de Chan *et al.* (2021) com o flavonóide FM09h frente a formas amastigotas (90%) e Gervazone, Gonçalves e almeida (2018) com o flavonoide 2HF em promastigotas (79% - CI₅₀ 20,9 µM) e amastigotas (90% - CI₅₀ 3,09 µM). Ambos os autores descrevem que após o período de tratamento com os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, foi possível observar redução das formas amastigotas intracelulares sem destruição do macrófago, quando analisado quantitativamente.

Na espécie de *L. (V.) braziliensis* a hesperidina foi mais efetiva contra formas promastigotas (< 50% - CI₅₀ 3,7 mg) com maior eficácia que o Glucantime[®] do que em amastigotas (CI₅₀ 7,66 mg). Diferente de Chan *et al.*, (2021) e Cataneo *et al.*, (2019)

descrevem uma eficácia para ambas as formas evolutivas contra a espécie de *L. (V.) braziliensis*.

Em *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* verificou-se que a hesperidina conseguiu reduzir as formas promastigotas e a taxa de infecção por amastigotas, no entanto sem diferença significativa em relação ao Glucantime[®], até onde sabemos, não há estudos na literatura que avaliem a atividade antileishmania de substância da classe dos flavonóides para essas espécies, sendo este o primeiro relato.

Conforme esperado, neste estudo cada espécie de *Leishmania* apresentou respostas diferentes ao tratamento *in vitro* com a hesperidina, no entanto, quando analisadas as espécies de acordo com o subgênero é possível observar padrões de resposta semelhantes. O subgênero *Leishmania* apresentou melhor susceptibilidade ao tratamento com eficácia em ambas as formas evolutivas superior ao Glucantime[®], quanto ao subgênero *Viannia* embora o tratamento tenha induzido a redução de ambas as formas evolutivas, não apresentou diferença significativa ao Glucantime[®], com exceção da espécie *L. (V.) braziliensis* em promastigotas. O único relato da hesperidina quanto a atividade antileishmania foi descrito por Tabres (2021) que apresentou eficácia contra promastigotas e amastigota de *L. (Leishmania) donovani* causadora de LV, por ser uma espécie causadora de uma doença com manifestações clínicas tão distintas da LC, também apresenta diferente resposta ao tratamento, no entanto quando levado em consideração o subgênero *Leishmania* há semelhança quanto a susceptibilidade do padrão de resposta.

Com relação a citotoxicidade em macrófagos, sugere-se que pode ter ocorrido uma maior citotoxicidade em questão das células estarem infectadas, Silva (2008) relata que células infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, apresentam maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos de compostos do que células não infectadas, e conforme sugerido por Quintana *et al.*, (2010) isso pode ocorrer devido células parasitadas apresentarem alterações de membrana ocasionadas pelo parasita, sendo assim, sugere-se que isso possa ter ocorrido nos ensaios biológicos com a hesperidina. Diante desse fato é importante que novos estudos visem investigar o mecanismo de ação em células infectadas e não infectadas e dessa forma determinar a citotoxicidade da substância.

Atualmente os medicamentos utilizados no tratamento da LC estão associados a numerosos efeitos colaterais e adversos, alta toxicidade, resistência aos medicamentos e administração parental, segundo Drugs for Neglected Diseases initiative é um tratamento de difícil administração, frente a essas dificuldades o tratamento intralesional permite a entrega direta de medicamentos nas lesões cutâneas, dessa forma os efeitos adversos da terapia

sistêmica seriam evitados ou minimizados o que pode levar a redução da toxicidade, além de custo benefício (NASSIF et al., 2017, FRANCO 2017)

Nesse sentido, este estudo adotou o uso tópico da hesperidina com abordagem intralesional, os resultados indicaram que nenhum dos nossos tratamentos alcançou cura clínica (cicatrização e reepitelização da pele) e cura parasitológica (eliminação dos parasitas) dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Em animais infectados com *L. (V.) braziliensis* houve cura clínica de 50% dos animais tratados com GTH2 e não houve cura parasitológica. Por outro lado, animais tratados com Glucantime® a cura clínica ocorreu em todos os animais, embora, sem cura parasitológica. A evolução clínica da lesão é um parâmetro importante para determinar a cura da LC que segundo o MS ocorre cura clínica quando observado “reepitelização das lesões quando ulceradas, e a regressão total da infiltração e eritema” (BRASIL, 2017).

Poucos estudos avaliaram o efeito *in vivo* de flavonoides na busca de novas alternativas de tratamento para LC, dentre eles o estudo de Gervazone, Gonçalves e Almeida (2018) e Chan *et al.* (2021), sugerem um efeito leishmanicida promissor do 2HF (50 mg/kg/dia – por via oral) e FM09h (10 mg/kg/dia – via intralesional) respectivamente contra *L. (L.) amazonensis* em camundongos, no qual apenas o 2HF mostrou diferença significativa em relação ao Glucantime®. Esses autores não observaram alterações significativas no peso dos animais, ou alterações no tamanho, peso e aparência dos órgãos, nem no leucograma, assim como reações tóxicas nos animais sugerindo que não causou toxicidade aparente aos animais.

Sabe-se que é característico do subgênero *Leishmania* apresentar uma evolução da infecção mais exacerbada com grandes lesões, provocando maiores ulcerações em alguns casos, diante desse quadro, animais tratados com a hesperidina apresentaram pouca resposta ao tratamento, demonstrando assim dificuldade no controle do tamanho das lesões. Já no subgênero *Viannia* é característico a presença de nódulos, com lesões pequenas e controladas, e devido a isso, os animais tratados foram mais responsivos ao tratamento como demonstrado em *L. (V.) brasiliensis* resultando na cura clínica.

Vale ressaltar que não existe um modelo animal validado para os testes *in vivo* com *Leishmania*, sendo possível observar a diversidade de modelos animais geralmente utilizados. O uso do hamsters (*Mesocricetus auratus*) neste estudo é justificado por ser um dos mais promissores modelos experimentais para estudo da Leishmaniose (Moreira, 2012), devido à alta suscetibilidade que essa espécie apresenta a patologias dermatópicas (Goto e Lindoso,

2004; Dea-Ayuela et al. 2007) e por apresentar evolução clínica com sinais semelhantes ao observado em humanos (Robledo et al. 2012).

Portanto, este trabalho encoraja novos estudos para avaliar a eficácia da hesperidina utilizando um novo esquema de tratamento experimental, com ênfase nas concentrações do princípio ativo, tempo de tratamento, espécies de *Leishmania* envolvidas, vias de administração, além de buscar elucidar possíveis mecanismos de ação frente as espécies causadoras da LC

CONCLUSÃO

A hesperidina mostrou atividade promissora em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em contrapartida, nos testes *in vivo* a hesperidina induziu a cura clínica de 50% dos animais infectados com *L. (V.) brasiliensis* tratados via intralesional com GTH2, embora não tenha conduzido a cura parasitológica, os resultados encorajam a progressão de estudos adicionais para avaliar a eficácia da hesperidina com outras vias de administração, em diferentes doses, bem como elucidar o mecanismo terapêutico.

REFERÊNCIAS

ATTIA, G.; H.; MOEMEN, I. S.; YOUNS, M.; IBRAHIM, A. M.; ABDOL, R.; EL REY, M. A. Nanopartículas de óxido de zinco antivirais mediadas por hesperidina e estudo de comparação *in silico* entre antivirais fenólicos como anti-SARS-CoV-2. *Coloides e superfícies B: biointerfaces*. 2021; 203.

BERKOZ; M.; YALIN, S.; OZKAN-YILMAZ, S.; OZKAN-YILMAZ, A.; KROZNIAK, M.; FRANCIK, R.; YUNUSOGLU, O.; ADIYAMAN, A.; GEZICI, H.; YIGIT, A.; UNAL, S.; VOLKAN, D.; YILDIRIM, M. Protective effect of myricetin, apigenin, and hesperidin pretreatments on cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* . 2021; 43(3): 353-369.

BLANCO, V.R; NASCIMENTO-JÚNIOR,N.M .2017. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com adoença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Revista Virtual de Química*, 3:816-876.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2017. [citado em 28 abr. 2021]. 189 p. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BUSTAMANTE, C.; OCHOA, R. ASELA, C.; MUSKUS, C. Repurposing of known drugs for leishmaniasis treatment using bioinformatic predictions, in vitro validations and pharmacokinetic simulations. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2019; 33:845–854.

CATANEO, A. H. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; ASSOLINI, J. P.; PANIS, C.; KIAN, D.; YMAUCHI, L. M.; SIMÃO, A. N. C.; CASAGRANDE, R.; PINGE-FILHO, P.; COSTA, I. NI.; VERRI-JR, W. A.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; Quercetin promove o efeito antipromastigote aumentando a produção ros e anti-amastigote, aumentando a expressão Nrf2/HO-1, afetando a disponibilidade de ferro. *Biomed. E Farmacot.* 2019; 13.

CHAN, C. F.; LIU, Z.; WONG, I. L. K.; ZHAO, X.; YANG, Z.; ZHENG, J.; LEE, M. M., CHAN, M. K. CHAN, T. H.; CHO, L. M. C. Amine-Linked Flavonoids as Agents Against Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021.

DNDi. **Tratamentos atuais.** 2018. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/>. Acesso em: 05 jan. 2019.

FILHO, R. A. S. OLIVEIRA, D. R.; DUTRA, V. B. P.; MEIRELES, N. M.; ANJOS, L.; MOURA, G. M. R. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. *Ver. Liber.accesm*, 2020; 3 (1): 1–14.

FRANCO AMR, GRAFOVA I, SOARES FV, GENTILE G, WYREPKOWSKI CDC, BOLSON MA, *et al.* Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 2016; 11: 11 6771–6780.

GERVAZONE, L. F.; OZÓRIO, G. G.; AMARAL, E. E. A. 2'-Hydroxyflavanone activity in vitro and in vivo against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. *Neglect. Trop. Diseases*. 2018.

GLANS, H.; DOTEVALL, L.; SOBIRK, S. K.; FARNERT, A.; BRADLEY, M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996-2016: A retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *BMC Infect. Diseases*. 2018; 18 (1): 1–10.

GOMES, M. N.; MURATOV, E. N.; PEREIRA, M.; PEIXOTO, J. C.; ROSSETO, L. P.; CRAVO, P. V.; ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J. Chalcone derivatives: promising starting points for Drug design. *Molecules*. 2017; 22 (8): 1210.

Hager- Theodorides, A. L.; Massouras, T; Simitzis, P. E.; Moschou, K.; Zoidis, E.; Sfakianaki, E.; Politi, K.; Charismiadou, M.; Golioumytus, M.; Deligeorges, S. Hesperidin and Naringin Improve Broiler Meat Fatty Acid Profile and Modulate the Expression of Genes Involved in Fatty Acid β -oxidation and Antioxidant Defense in a Dose Dependent Manner. *Foods*. 2021; 10: 739.

HOLANDA, V. N.; SILVA, W. V.; NASCIMENTO, P. H.; OLIVEIRA, R. N.; LIMA, V. L. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Challenges and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniasis: Review. *Ver. Interf.: Saúde, Hum. e Tecnol*. 2018; 6 (17): 140–157.

NASSIF, P. W.; MELLO, T. F. P.; NAVASCONI, T. R.; MOTA, C. A.; DEMARCHI, I. G.; ARISTIDES, S. M. A.; Lonardoni, M. V. C.; Teixeira, J. J. V.; Silveira, T. G. V. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *parasitology*, 2017; v. 144, p. 995-1004.

PANDEY, P.; KHAN, F.; MAURYA, P. Targeting Jab1 using hesperidin (dietary phytochemical) for inducing apoptosis in HeLa cervical cancer cells. *J Food Biochem*. 2021.

TABREZ, S.; RAHMAN, F.; ALI, R.; ALOUFFI, A. S.; AKAND, S. K.; ALSHERHI, B. M.; ALSHAMMARY, F. A.; ALAM, A.; ALAIDAROUS, M. A.; BANAWAS, S.; DUKHYIL, A. A. B.; RUB, A. Cynaroside inhibits *Leishmania donovani* UDP-galactopyranose mutase

and induces reactive oxygen species to exert antileishmanial response. *Biosci. Reports*. 2021; 41.

TELES, G.B.C.; RODRIGUES, S.M.; MEDEIROS, M.G.; ET AL. 2016. Phlebotomine sandfly (Diptera:Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian with Peru and Bolívia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111 (7): 423-432.

Capítulo 2

Tratamento experimental de nanopartículas de antimônio pentavalente para o tratamento da Leishmaniose Cutânea.

CAPÍTULO 2

Tratamento experimental de nanopartículas de antimônio pentavalente para o tratamento da Leishmaniose Cutânea.

Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}; João Roberto de Figueiredo Lopes²; Rayane Tapudima Matsuhi²; Theodora Maria de Paiva dos Santo²; Ana Flávia da Silva Chagas^{1,2}; Andriy Grafov³; Antonia Maria Ramos Franco².

¹ Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e doenças de Chagas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³ Departamento de química, Universidade de Helsinque – Helsinque, Finlândia.

*Autor correspondente: mayzabrazil@gmail.com

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma antroponose considerada um problema de saúde pública, caracterizada como uma doença negligenciada de caráter infeccioso e não contagioso. Os fármacos utilizados para o tratamento da LTA no Brasil apresentam eficácia limitada, nesse sentido, nanopartículas de antimônio pentavalentes (NPSb⁵⁺) desenvolvida e testada por Franco e colaboradores apresentaram atividade antileishmania frente à espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* de NPSb⁵⁺. Foram testadas quatro espécies dermatólicas de *Leishmania* sendo elas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) naiffi* frente as NPSb⁵⁺ e sua eficácia determinada através da viabilidade parasitária, taxa de infectividade e a citotoxicidade. Para os testes *in vivo*, os hamsters foram infectados e as lesões tratadas intralésionalmente com a suspensão das NPSb⁵⁺ mediante dois protocolos distintos, a eficácia foi avaliada medindo o diâmetro do inóculo/focinho e determinando a carga parasitária. Os resultados demonstraram que não houve toxicidade a macrófagos peritoneais murinos e que a resposta *in vitro* foi promissora contra as formas evolutivas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. No estudo *in vivo* induziram a cura clínica dos animais infectados com *L. (V.) guyanensis* (protocolo 1 e 2) e *L. (V.) braziliensis* (protocolo 1) e não apresentou sinais clínicos indicativos de toxicidade. Contudo, esses resultados indicaram que as NPSb⁵⁺ podem ser consideradas como um agente quimioterápico promissor para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.

Palavras chaves: nanomedicina, tratamento experimental, leishmaniose cutânea, intralésional.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an anthroponosis considered a public health problem, characterized as a neglected infectious and non-contagious disease. The drugs used for the treatment of ACL in Brazil have limited efficacy, in this sense, pentavalent antimony nanoparticles (NPSb⁵⁺) developed and tested by Franco and collaborators showed antileishmania activity against the species *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Therefore, this study aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of NPSb⁵⁺. Four dermatropic species of *Leishmania* were tested: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) naiffi* against NPSb⁵⁺ and their efficacy determined through parasite viability, infectivity rate and the cytotoxicity. For the *in vivo* tests, the hamsters were infected and the lesions treated intralesionally with the suspension of NPSb⁵⁺ through two different protocols, the effectiveness was evaluated by measuring the diameter of the inoculum/snout and determining the parasite load. The results demonstrated that there was no toxicity to murine peritoneal macrophages and that the *in vitro* response was promising against the evolutionary forms of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*. In the *in vivo* study, they induced clinical cure in animals infected with *L. (V.) guyanensis* (protocol 1 and 2) and *L. (V.) braziliensis* (protocol 1) and did not show clinical signs indicative of toxicity. However, these results indicated that NPSb⁵⁺ can be considered as a promising chemotherapeutic agent for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: nanomedicine, experimental treatment, cutaneous leishmaniasis, intralesional.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical, ocasionada por protozoários intracelulares da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Viannia* e *Leishmania* nos quais se distribuem sete espécies patológicas causadoras da LTA, são elas: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) linderbergi* e *L. (L.) amazonensis* (TELES et al. 2016, BLANCO e NASCIMENTO, 2017).

Atualmente, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) no Brasil inclui cinco fármacos, o Antimoniato de N-metil Glucamina (Glucantime[®]), Anfotericina B (Albce[®]), Anfotericina B lipossomal, Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat[®]) e miltefosina, tais fármacos são prescritos quando há informações precisas quanto ao caso clínico do paciente, que inclui identificar a espécie causadora, manifestação clínica e local onde ocorreu a infecção (BRASIL, 2017). Embora os atuais fármacos apresentem eficácia comprovada, estes possuem alta toxicidade e muitos efeitos adversos, tratamento longo com

via de administração parenteral, custo elevado e resistência parasitária, (AFRIN, 2018; AMAZONAS, 2018).

Nesse cenário a busca por novos medicamentos para o tratamento da LTA se faz necessário e surge como uma alternativa a nanotecnologia, que é uma ciência que desenvolve sistemas, estruturas e dispositivos em escala nanométrica com dimensões entre 1 e 100 nanômetros. Tem sua aplicação reconhecida na nanomedicina, principalmente através de nanopartículas, capazes de direcionar e entregar os fármacos com mais precisão, segurança e eficácia (LIMA e ROCHA 2016; SILVA et al., 2017; AFRIN, 2018).

As nanopartículas (NPs), são aglomerados de moléculas com distribuições de tamanho em nanoescala. Dentre as de interesse farmacológico, destacam-se as nanopartículas metálicas, assim definidas por possuírem um ou mais átomos metálicos em sua composição e apresentam propriedades óticas e eletrônicas diferenciadas decorrentes de sua estruturação, podem atuar como carreadores de drogas e agentes (CANCINO et al., 2014; TAMÁS, 2016).

Dentre os metais estudados há o antimônio (Sb), conhecido no latim como *Stibium*, classificado na tabela periódica como um metalóide encontrado no grupo 15, possui aplicações industriais na produção de semicondutores e detectores de infravermelho, assim como também aplicações médicas, sendo utilizado há mais de 50 anos no tratamento da leishmaniose. Seu mecanismo de ação não é comprovado e se resume em teorias em relação a sua especificidade (SIQUEIRA, 2013).

O médico brasileiro Gaspar Vianna em 1912 foi o primeiro a relatar a eficácia do Sb na sua forma trivalente (Tártaro emético) para o tratamento da leishmaniose, porém estes se mostraram muito tóxicos apesar da sua eficácia comprovada, ocorrendo a sua substituição pelas formas pentavalentes, sendo os mais recentes utilizados: Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio (SIQUEIRA, 2013).

A partir das modificações estruturais de nanopartículas de antimônio pentavalente, observou-se que estas variações possuem diversas propriedades biológicas e estão descritas atualmente as atividades: Antibacteriano (SALEEM, 2018), anticâncer (SRIRANJANI et al., 2016), antioxidante (SRIRANJANI et al., 2016) e antileishmania (FRANCO et al., 2016).

Franco e colaboradores (2016), desenvolveram nanopartículas de antimônio pentavalentes (NPSb^{5+}) e estudaram frente à espécie *L. (L.) amazonensis* alcançando resultados promissores. Com base nesses dados, este estudo descreve a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* das NPSb^{5+} em diferentes espécies de *Leishmania* spp. e os efeitos de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos.

METODOLOGIA

Síntese e caracterização de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPsSb⁵⁺)

As nanopartículas de antimônio pentavalente (NPsSb⁵⁺) foram sintetizadas conforme descrito anteriormente no estudo de Franco et al. (2016) e caracterizadas através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) no equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Filadelfia, PA) para medições de tamanho das nanopartículas e potencial Zeta (ζ), essas aferições foram repetidas no intervalo de 4 anos. O antimoniato de meglumina (Glucantime[®]; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) e o N-metil-D-glucosamina (NMGA - Sigma aldrichTM) foram utilizados como controle.

Parasitas

As espécies/cepas utilizadas nesse estudo foram *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/2904) e *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), cultivadas no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina (Novafarma, Brasil), incubado a 25 °C.

Comitê de ética

Esse estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia para os testes *in vitro* (CEUA/INPA: 014/2015) e para os testes *in vivo* (CEUA/INPA: 029/2020).

Ensaio de citotoxicidade

Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em placas de 96 poços (100 $\mu\text{L/poço}$) na concentração de 10^5 células. mL^{-1} em meio RPMI sem indicador de pH/vermelho fenol (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SFBi e tratados com diferentes concentrações das NPSb⁵⁺ (4; 2; 1; 0,5 e 0,25 $\text{mg.Sb}^{5+} .\text{mL}^{-1}$), Glucantime[®] (8; 4; 2; 1 e 0,5 $\text{mg.Sb}^{5+} .\text{mL}^{-1}$) e NMGA (0,101; 0,050; 0,025; 0,012 e 0,006 mg.mL^{-1}). Poços com célula sem tratamento e poços sem células/apenas meio de cultivo, foram mantidos como

controle. As culturas foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ a 37° C (Forma Série II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Scientific, USA) e a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando Alamar Blue® (Sigma Aldrich™, EUA) no período de 24, 48 e 72 horas com a adição de 10 µL de solução de estoque de sal de resazurina sódica (4 mg.mL⁻¹ em solução salina tamponada com fosfato) em cada poço, as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas a 37 °C, após esse período foram submetidas a leitura por espectrofotômetro Elx800™ (BIO-TEK®, Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 590 nm (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológico com formas promastigotas

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo e promastigotas na concentração de 2×10^6 promastigotas.mL⁻¹ tratadas com diferentes concentrações das NPSb⁵⁺ (4; 2; 1; 0,5 e 0,25 mg.Sb⁵⁺ .mL⁻¹), Glucantime® (8; 4; 2; 1 e 0,5 mg.Sb⁵⁺ .mL) e NMGA (0,101; 0,050; 0,025; 0,012 e 0,006 mg.mL⁻¹). Poços com parasitas sem tratamento foram mantidos como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis no período de 24, 48 e 72 horas em câmara de Neubauer por meio do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos pela concentração inibitória máxima /CI₅₀ (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológico com formas amastigotas

Macrófagos peritoneais murinos na concentração de 10^4 células.mL⁻¹ foram cultivados em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFBi, e submetidos a infecção com promastigotas de *Leishmania* spp. na concentração de 10^5 promastigotas.mL⁻¹ por duas horas em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Os macrófagos infectados foram tratados com as NPSb⁵⁺, Glucantime® e NMGA nas mesmas concentrações utilizadas em ensaios de promastigota, durante 24, 48 e 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Células infectadas e não tratadas foram mantidas como controles. Em seguida, as lamínulas foram fixadas e coradas a cada 24 horas pelo método Panótico Rápido (Laborclin®, Paraná, Brasil) para posterior análise, as quais foram quantificados macrófagos infectados e não infectados por meio de contagem aleatória de 100 macrófagos através de observação em microscópio óptico e foi determinada a concentração inibitória máxima (CI₅₀) (Chagas *et al.*, 2021).

Ensaio biológicos *in vivo*

Foram utilizados neste trabalho 156 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), macho, pesando aproximadamente 180 gramas, idade de 90 dias, proveniente do Biotério Central do INPA local onde foram mantidos em condições de alimentação e água *ad libitum* e livre de patógenos. Os animais foram submetidos a dois protocolos de tratamento, o protocolo 1 nas espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e o protocolo 2 com a espécie *L. (V.) guyanensis* e testes de toxicidade em animais saudáveis.

No protocolo 1, os animais foram divididos em 3 grupos de 36 animais para procedimento de infecção experimental, cada grupo referente a uma espécie de *Leishmania* estudada (Grupo 1, 2 e 3), cada grupo contendo 36 animais foram separados em 6 grupos de tratamento (contendo 6 animais por grupo) sendo cinco grupos compostos por animais infectados e um grupo composto por animais não infectados que compuseram os grupos controles.

Os animais foram submetidos à infecção por inóculo na região do focinho de $0,1 \text{ mL}^{-1}$ de promastigotas (10^6 promastigotas. mL^{-1}) de *L. (V.) guyanensis* (Grupo 1), *L. (L.) amazonensis* (Grupo 2), *L. (V.) braziliensis* (Grupo 3). Após o surgimento de lesão aparente os animais foram tratados por 60 dias, as aplicações foram feitas por via intralesional, com intervalos de 15 dias por aplicação, totalizando 4 aplicações, conforme o MS para tratamento intralesional. Os grupos experimentais foram identificados da seguinte forma: I) Grupo não infectado (GN1); II) Grupo infectado e não tratado (GI1); III) Grupo infectado e tratado com solução salina (placebo) (GP1); IV) Grupo infectado e tratado com $1,15 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{Kg.dia}$ de Glucantime® 1 (GG1); V) Grupo infectado e tratado com $1,15 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{Kg.dia}$ das NPSb⁵⁺ (GSb1); VI) Grupo infectado e tratado com $4 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{Kg.dia}$ das NPSb⁵⁺ (GSb2).

No protocolo terapêutico 2, os animais foram divididos em 2 grupos, o grupo 1 para estudo da atividade biológica das NPSb⁵⁺ e o grupo dois para estudo de toxicidade (todos os animais saudáveis), ambos submetidos ao tratamento com Glucantime® ($4 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{Kg.dia}^{-1}$) e NPSb⁵⁺ ($4 \text{ mg.Sb}^{5+}.\text{Kg.dia}$) e demais grupos controles conforme descrito anteriormente, os animais foram tratados por 30 dias, por via intralesional, os grupos placebo e NPSb⁵⁺ com intervalos de 48 horas por aplicação e o Glucantime® com intervalos de 5 dias baseados em dados do MS. Após esse período três animais por grupo foram mantidos por mais 30 dias em observação para análises pós-tratamento.

Devido ao não desenvolvimento de lesões cutâneas macroscopicamente visíveis por *L. (V.) naiffi*, o estudo dos efeitos *in vivo* não foi realizado nessa espécie.

Avaliação do tratamento experimental

Durante o período de experimentação foi realizado semanalmente o acompanhamento do volume total da lesão através da mensuração do focinho com o uso de paquímetro digital (Zaas precision[®]), fotodocumentação do focinho para análise morfológica macroscópica e pesagem dos animais em balança semi-analítica (Toledo[®]) para observação do ganho ou perda de peso (COMANDOLLI-WYREPKOWKI *et al.*, 2017).

Eutanásia dos animais

Todos os animais foram anestesiados (Ketamina e Xylazina) e eutanasiados por via intramuscular de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação. No segundo protocolo de tratamento proposto os animais foram eutanasiados de forma seriada: após o tratamento sendo três animais por grupo (1º eutanásia) e ao fim do pós-tratamento três animais de cada grupo (2º eutanásia). Após o procedimento de eutanásia foi realizada a coleta de material biológico (fragmentos de lesão, fígado, baço, rins e sangue); os órgãos foram pesados em balança de precisão.

Avaliação parasitológica, hematológica e de toxicidade.

Fragmentos de tecido coletados da área da lesão dos animais, foram usados para confeccionar esfregaços por aposição em lâmina (*imprint*) com auxílio de uma pinça, que posteriormente foram corados com o Kit Panótico Rápido. A quantificação de células infectadas foi determinada pela contagem de 25 campos ao acaso em microscópio óptico com aumento de 1000x.

As lesões e o fígado fragmentados e desinfetados foram cultivados em meio NNN, por 7 dias a 25 °C e então foi avaliado a presença ou ausência de promastigotas, sendo considerado positivo quando pelo menos uma forma do parasita era isolada no meio de cultivo (COMANDOLLI-WYREPKOWKI *et al.*, 2017).

Esfregaço de sangue dos animais foram confeccionados em lâminas e em seguida foram corados pelo método Panótico Rápido. A análise foi feita através da contagem de 100 células por lâmina com diferenciação e quantificação de células leucocitárias em microscópio óptico com aumento de 400x.

Para análise da toxicidade animais não infectados e tratados foram avaliados quanto ao peso dos animais e dos órgãos (fígado, baço e rim), presença de sinais clínicos como inflamação, edema e integridade tecidual no local da aplicação, mobilidade, vitalidade e letalidade frente as concentrações propostas no tratamento.

Análise estatística

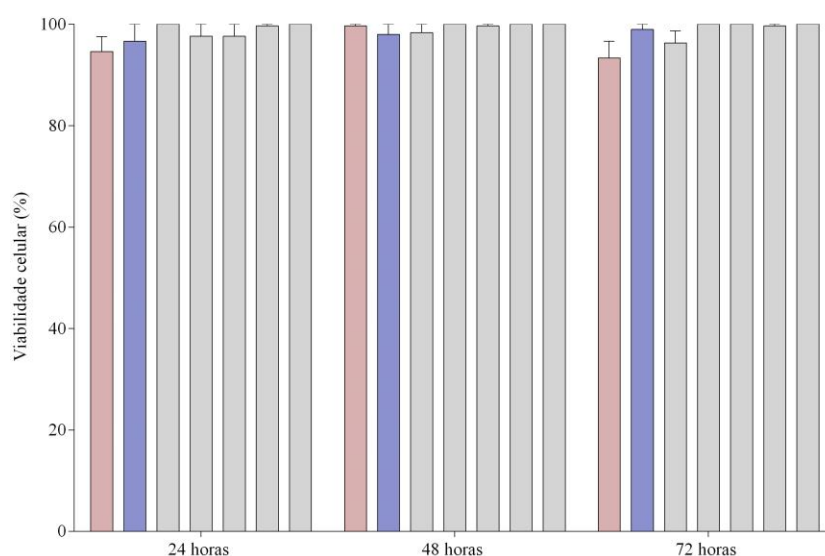
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (Versão 6.0) e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de cada grupo de tratamento e controles. As análises foram realizadas através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança.

RESULTADOS

A NPSb⁵⁺ foram sintetizadas e em seguida caracterizadas para avaliar a estabilidade e tamanho das nanopartículas, através de mensurações com intervalo de 4 anos. Dessa forma, quanto ao tamanho médio das NPSb⁵⁺ foi possível constatar tamanhos de 32,89 nm e 46,7 respectivamente, e quanto a estabilidade foi observado através do potencial zeta -13,7 mV e -0,5 mV, respectivamente.

A suspensão das NPSb⁵⁺ foi submetida a avaliação de citotoxicidade, no qual em todo o período de incubação, observou-se que a média da viabilidade celular foi superior a 90%, demonstrando que as NPSb⁵⁺ não apresentaram citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos, esses resultados são similares ao observado com Glucantime[®] e NMGA (Figura 13).

Figura 19 - Efeito citotóxico das NPSb⁵⁺ (4 – 0,25 mg/Sb⁵⁺/mL) em cinza, em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas, em comparação aos controles Glucantime® em verde (8 mg/ Sb⁵⁺/mL) e NMGA em azul (0,101 mg/mL).



Os dados da tabela 2 mostram o CI₅₀ das NPSb⁵⁺ e Glucantime® frente as formas promastigotas de *Leishmania* spp. no período de 24, 48 e 72 horas.

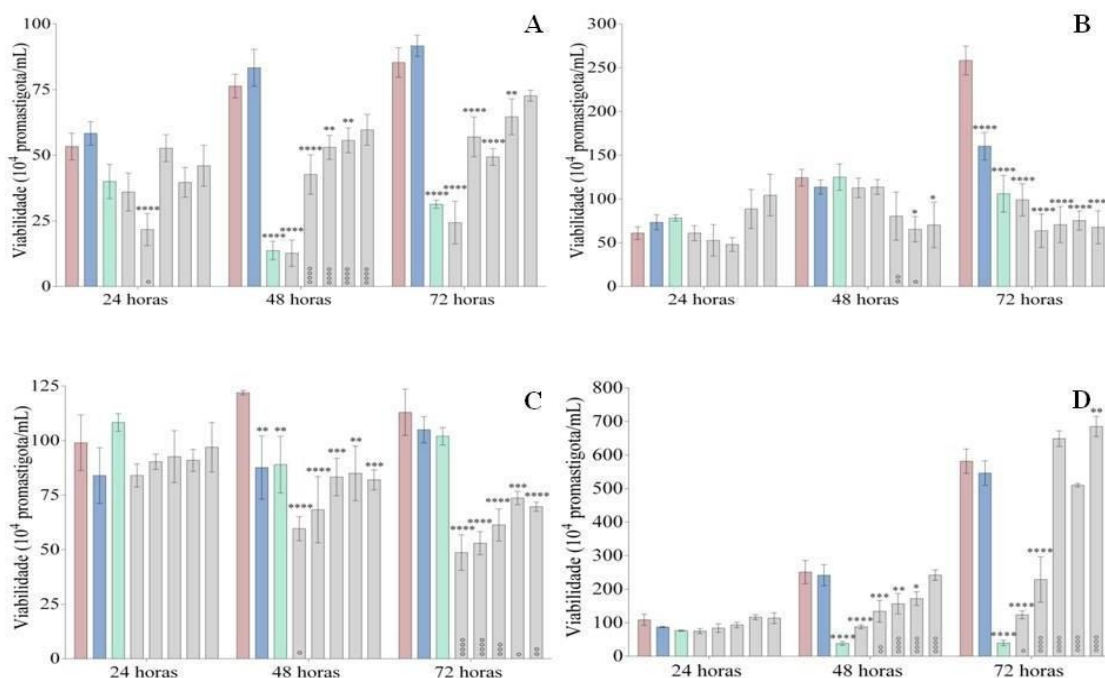
Tabela 4- Concentração inibitória (CI₅₀ mg±SD) das NPSb⁵⁺ e Glucantime® em formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Espécies	Tempo	NPSb ⁵⁺	Glucantime®
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	2,1 ± 7,52	10,1 ± 4,96
	48 h	1,97 ± 6,51	0,56 ± 3,48
	72 h	2,3 ± 6,87	3,3 ± 4,95
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	2,41 ± 19,4	11,0 ± 9,79
	48 h	0,24 ± 17,5	10,1 ± 12,06
	72 h	2,16 ± 17,5	2,92 ± 32,82
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	5,1 ± 7,41	11,6 ± 5,89
	48 h	2,6 ± 9,28	6,3 ± 9,55
	72 h	1,8 ± 5,1	5,2 ± 4,90
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	3,9 ± 10,4	5,7 ± 17,0
	48 h	2,2 ± 20,7	3,2 ± 14,3
	72 h	3,2 ± 14,3	0,3 ± 29,34

As NPSb⁵⁺ apresentaram em todo o período de incubação CI₅₀ inferior ao observado no Glucantime[®], com exceção de *L. (V.) naiffi* em 72 horas (3,2 mg) e *L. (L.) amazonensis* em 48 horas. (1,97 mg).

A análise dos diferentes tratamentos mostrou que para *L. (L.) amazonensis* as NPSb⁵⁺ induziram em 24 horas a diminuição significativa da viabilidade parasitária em relação a ambos os controles na concentração de 2 mg/Sb⁵⁺/mL⁻¹ e em 48 e 72 horas a concentração 4 mg/Sb⁵⁺/mL⁻¹ com relação ao controle negativo e eficácia semelhante ao Glucantime[®] (Figura 14A); enquanto que em *L. (V.) braziliensis* é observado diminuição significativa em 48 horas na concentração 4 mg/Sb⁵⁺/mL⁻¹ e 72 horas em todas as concentrações testadas (Figura 14C). A espécie *L. (V.) guyanensis* expressa redução significativa em 72h com similaridade ao Glucantime[®] (Figura 14B) e a espécie *L. (V.) naiffi* mostrou que não houve diferença significativa com todas as concentrações em todo período de incubação (Figura 14D).

Figura 20. Atividade das NPs Sb⁵⁺ em cinza (4 – 0,25 mg/Sb⁵⁺/mL) frente às formas promastigotas de (A): *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, (B): *Leishmania (Viannia) guyanensis*, (C): *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (D): *Leishmania (Viannia) naiffi* no período de 24, 48 e 72 horas em comparação ao controle negativo em rosa, NMGA em azul (0,101 mg/mL) e Glucantime[®] em verde (8 mg/ Sb⁵⁺/mL). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey (p<0,05). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey (p<0,05).



O CI₅₀ das NPSb⁵⁺ e Glucantime[®] contra as formas amastigotas de *Leishmania* spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos no período de 24, 48 e 72 horas, é mostrado na tabela 3.

Tabela 5 Concentração inibitória (CI₅₀ mg±SD) das NPSb⁵⁺ e Glucantime® em formas amastigotas de *Leishmania* spp.

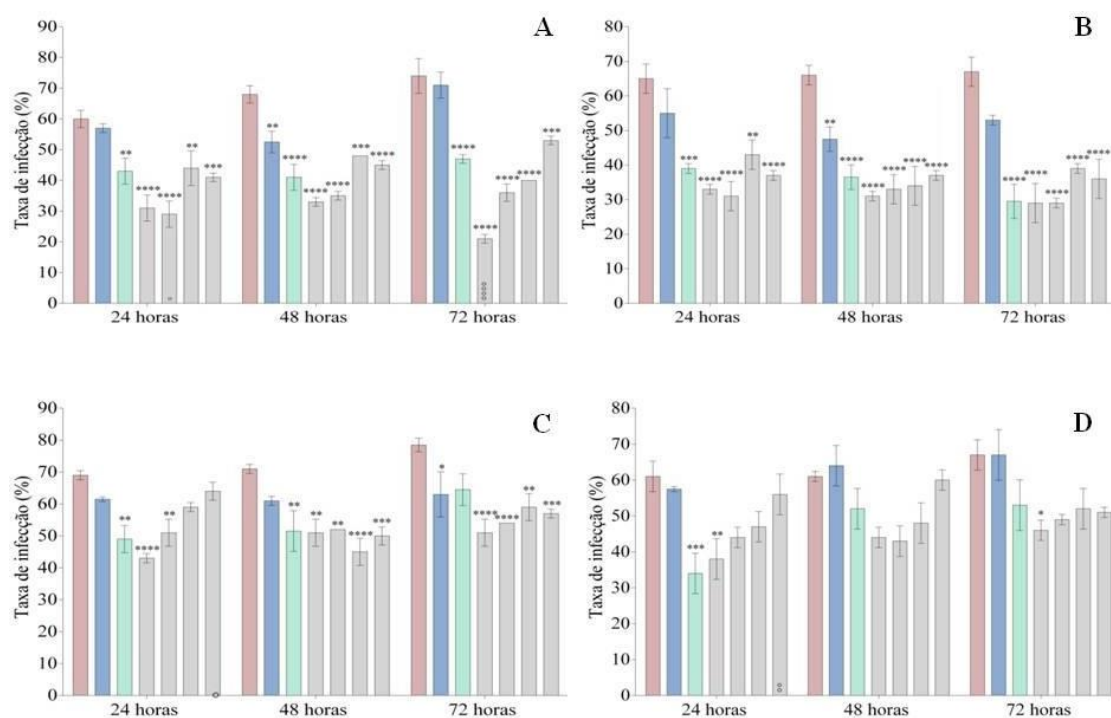
Espécies	Tempo	NPSb ⁵⁺	Glucantime®
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	2,54 ± 3,88	10,73 ± 2,82
	48 h	2,99 ± 0,53	9,53 ± 1,23
	72 h	1,87 ± 0,70	9,92 ± 1,59
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	2,02 ± 4,59	9,5 ± 1,76
	48 h	2,09 ± 1,76	3,29 ± 5,12
	72 h	1,84 ± 8,21	4,24 ± 4,94
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	4,94 ± 1,23	>8 ± 3,53
	48 h	>4 ± 1,41	>8 ± 2,12
	72 h	6,59 ± 2,17	>8 ± 1,23
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	4,32 ± 2,29	7,44 ± 3,88
	48 h	4,10 ± 2,12	9,29 ± 4,24
	72 h	5,70 ± 1,59	8,96 ± 2,82

As NPSb⁵⁺ apresentaram resultados promissores contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* com CI₅₀ inferior ao observado no Glucantime® em todas as espécies e períodos testados.

Conforme observado nas formas promastigotas, as NPSb⁵⁺ apresentaram eficácia na espécie *L. (L.) amazonensis* (Figura 15A), induzindo uma redução superior a 50% na taxa de infecção ao longo de todo o período de incubação com destaque para as concentrações 4 e 2 mg/Sb⁵⁺/mL⁻¹, além disso, observa-se que não houve diferença significativa para células tratadas com Glucantime®. Resultados semelhantes são observados em *L. (V.) guyanensis* (Figura 15B) em todo o período de incubação.

Ao contrário destes, em *L. (V.) braziliensis* (Figura 15C) existe uma redução significativa no número de macrófagos peritoneais murinos infectados apenas em 48 horas e 72 horas e a espécie *L. (V.) naiffi* mostrou que não houve diferença significativa com todas as concentrações em todo período de incubação. Observou-se que nessa forma evolutiva do parasita as NPSb⁵⁺ apresentaram eficácia semelhante ao Glucantime®.

Figura 21. Efeito das NPs Sb^{5+} em cinza (4 – 0,25 mg/ Sb^{5+} /mL) em amastigotas intracelulares de (A): *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, (B): *Leishmania (Viannia) guyanensis*, (C): *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (D): *Leishmania (Viannia) naiffi* em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação ao controle negativo em rosa (macrófagos infectados e não tratados), NMGA em azul (0,101 mg/mL) e Glucantime® em verde (8 mg/ Sb^{5+} /mL). (*) representa diferença estatística comparada ao controle negativo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). (°) representa diferença estatística comparada ao controle positivo segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

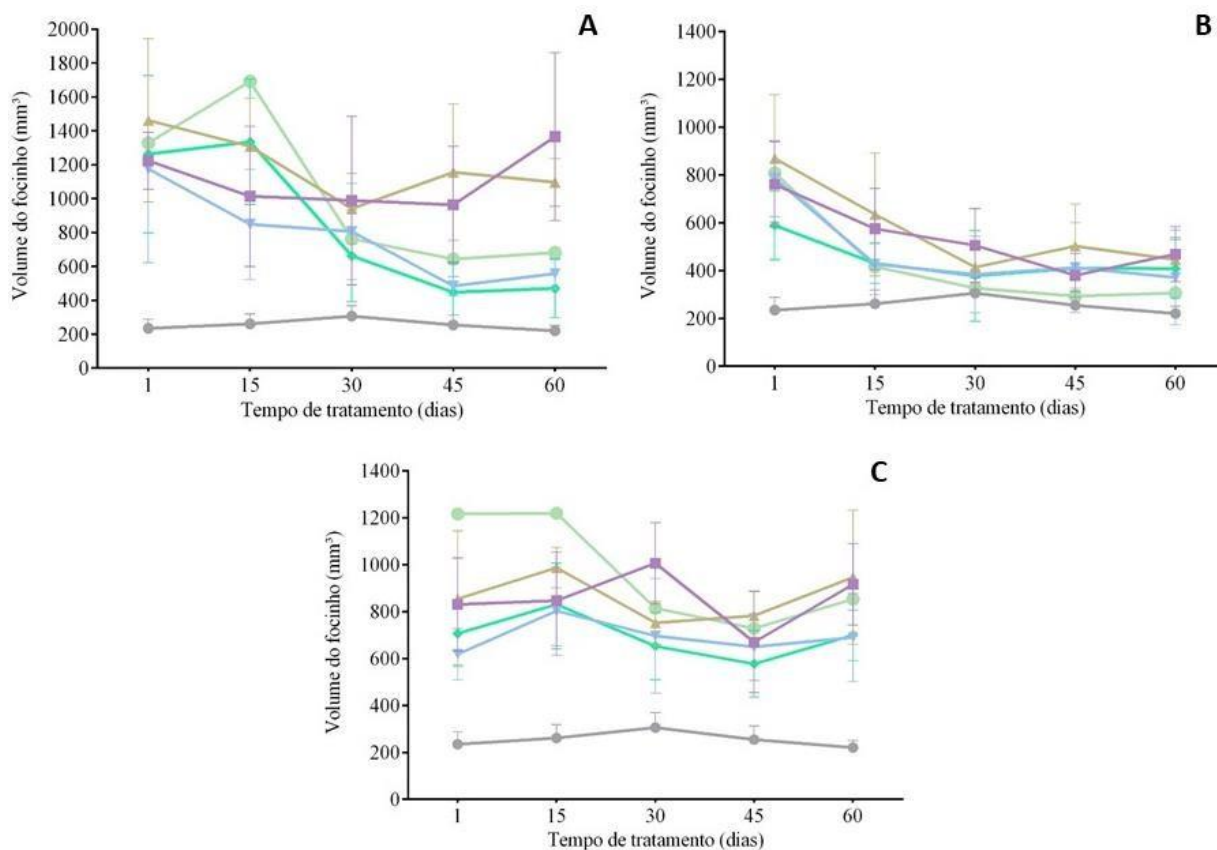


No tratamento experimental com o protocolo 1, os hamsters foram pesados com intervalos de 7 dias, e verificou-se que não houve diferença significativa no peso dos animais entre os grupos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*.

Quanto a evolução clínica da doença, animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com as NPS Sb^{5+} apresentaram redução do volume do focinho para os grupos GSb1 (66,4%) e GSb2 (52,4%) com diferença significativa em relação aos grupos infectado não tratado e placebo. No Grupo tratado com Glucantime® a redução foi de 61,7% com diferença significativa em relação ao GSb2 (Figura 16A). Em *L. (V.) guyanensis*, o grupo GSb2 (62,5%) apresentou redução contínua do volume do focinho superior ao observado em GSb1 (23,4%), sem diferença significativa em relação ao Glucantime® (51,3%) e grupos não infectados (Figura 16B).

Em *L. (V.) braziliensis* os Grupos GSb1e GSb2 apresentam redução volume do focinho no 30°, no entanto não progressivo até o final do tratamento, sendo observado um novo aumento ao final de 60° dias, sem diferença significativa nos diferentes grupos tratados, com diferença apenas ao grupo não infectado (Figura 16C).

Figura 22. Volume do focinho de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C). Hamster não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha roxa), infectado e tratado com placebo (linha amarela), infectado e tratado com 1,15 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime® por via intralesional (linha azul), infectado e tratado com 1,15 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de GSb1 por via intralesional (cor verde claro) e infectado e tratado com 4,0 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de GSb2 por via intralesional (linha verde escuro).

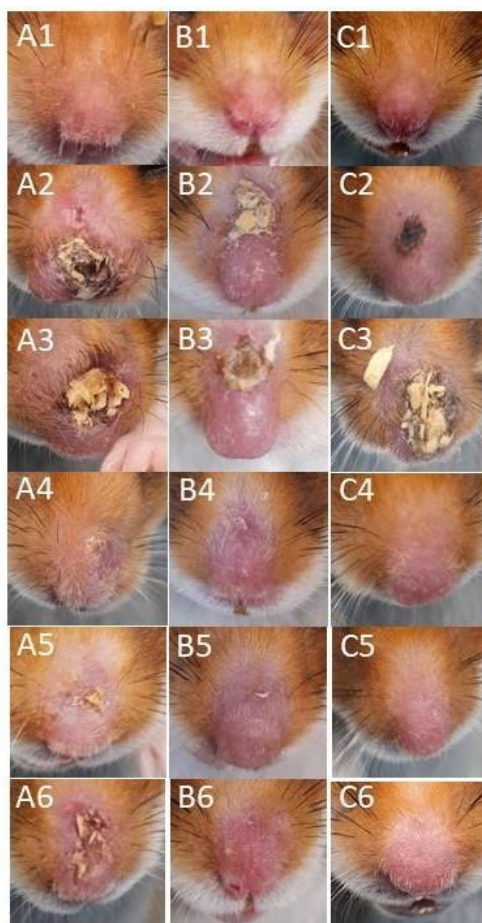


Em todos os grupos infectados com *L. (L.) amazonensis* observou-se que esses animais apresentaram maior volume no focinho quando comparados às demais espécies durante todo o período de experimentação com formação de nódulo, edema e lesões exacerbadas, após o 30º dia de tratamento os grupos GSb1 e GSb2 e Glucantime® apresentaram redução do edema e presença de lesões com crosta e início de reepitelização das lesões, no entanto nenhum dos grupos evoluíram para cura clínica ao final do tratamento experimental realizado neste estudo.

Os grupos infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, apresentaram formação de nódulos com lesões delimitadas e formação de crosta. Os animais tratados com GSb1 e GSb2 para a espécie de *L. (V.) guyanensis* apresentaram 50% e 84% de cura clínica com cicatrização das feridas, respectivamente, e na espécie de *L. (V.) braziliensis* tanto GSb1 como GSb2 induziram 50% de cura clínica dos animais, no entanto, todos os animais apresentaram edema de focinho até o 60º dia de tratamento. Os grupos que foram tratados

com Glucantime® ambas as espécies obtiveram 100% e 66% de cura clínica, respectivamente (Figura 17).

Figura 23. Aspecto clínico das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (V.) guyanensis* (B) e *L. (V.) braziliensis* (C) no 60º 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 solução salina (placebo). A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com 1,15 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime®. A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 1,15 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de GSb1 por via intralesional. A6, B6, C6 - animal infectado e tratado com 4,0 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de GSb2 por via intralesional.



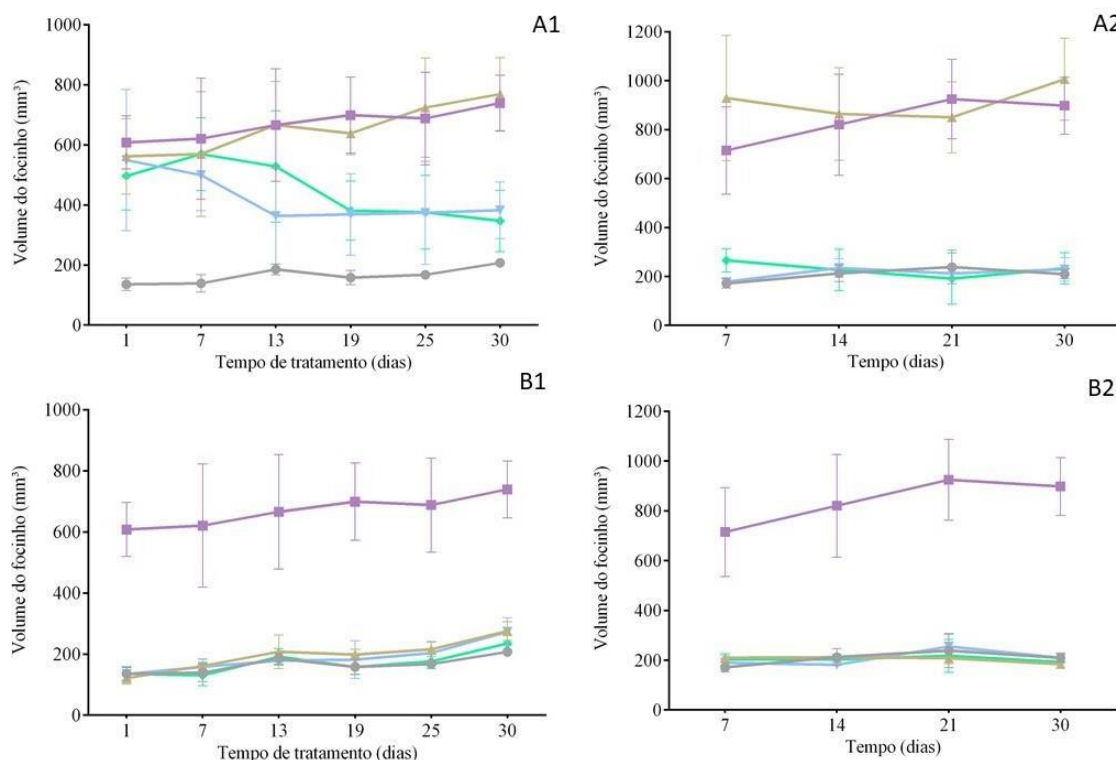
Após o tratamento, a viabilidade parasitária foi determinada por meio de diagnóstico direto utilizando cultura NNN e revelou a presença de parasitas flagelados viáveis nas culturas de fragmentos da lesão e fígado em todos os grupos. A taxa de infectividade avaliada por aposição em lâmina demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento em todas as espécies testadas. Apenas o Glucantime® apresentou baixa infectividade dos macrófagos, com diferença significativa para o GSb2 em *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,05$). Quanto a avaliação do peso dos órgãos (fígado, baço e rim) e parâmetros leucocitários não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em todas as espécies testadas.

Por fim, após aplicação do protocolo 1, verificou-se que a espécie que apresentou melhor resposta ao tratamento foi *L. (V.) guyanensis* com capacidade de induzir a redução do volume do focinho seguido de cura clínica das lesões. Sendo esta, a espécie utilizada na aplicação do protocolo 2.

Na evolução clínica da doença, os grupos tratados com Glucantime[®] e NPSb⁺⁵, após 30 dias de tratamento demonstraram redução do volume do focinho no 19º ao 30º dias de 31% e 24%, respectivamente. Esses animais foram mantidos em observação por 30 dias após o tratamento, sendo observado progressiva redução do volume do focinho de mais 12% e 24%, respectivamente, que ao final desse período mostrou-se inferior ao observado no fim do tratamento para os grupos Glucantime[®] e NPSb⁺⁵. Em todo o período de 60 dias de experimentação (tratamento e observação) os grupos de tratamento apresentaram diferença significativa em relação aos grupos placebo e grupo infectado e não tratado (Figura 18A).

Foi avaliada a toxicidade em animal das NPSb⁺⁵, e ao final de 60 dias de experimentação não houve diferença significativa entre o volume do focinho, peso dos animais dos grupos tratados (Glucantime[®], NPSb⁺⁵ e placebo) em relação ao grupo de animais saudáveis (Figura 18B).

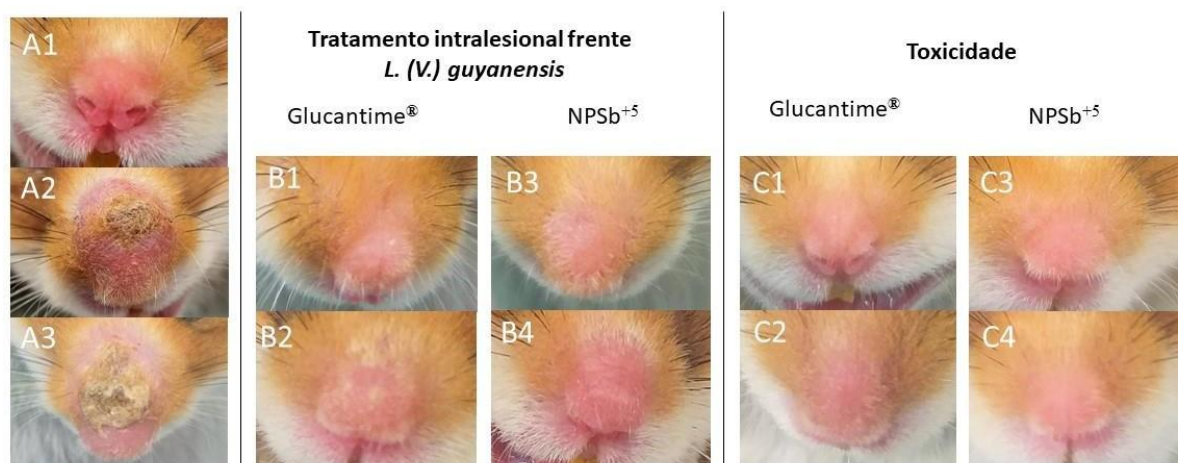
Figura 24 -Volume do focinho de hamsters infectados com *L. (V.) guyanensis* durante o tratamento (A1) e período de observação A2 e hamsters não infectados para avaliação de toxicidade durante o tratamento (B1) e período de observação (B2). Hamster não infectado e não tratado (linha cinza), infectado e não tratado (linha roxa), infectado e tratado com solução salina placebo (linha amarela), infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime[®] por via intralesional (linha azul), infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de NPSb⁵⁺ por via intralesional(linha verde escuro).



Os animais infetados com *L. (V.) guyanensis* apresentaram formação de nódulos dérmicos, edema, lesões ulceradas delimitadas e formação de escaras. Após 30 dias de tratamento, os animais tratados com Glucantime[®] e NPSb⁵⁺ apresentaram 71% e 57% de cura clínica, respectivamente. Esses animais foram mantidos em observação por mais 30 dias, evoluindo para 100% de cura clínica com redução de edema, não sendo observado o aparecimento de novas lesões. Os grupos infectados não tratados e placebo permaneceram em constante evolução clínica em todo o período testado (Figura 19B).

Quanto a toxicidade das NPSb⁵⁺, sinais clínicos não foram identificados durante todo o período de experimentação nos animais, uma vez que apresentavam integridade tecidual do focinho, ausência de edema e sinais inflamatório, animais com aspecto saudável, mobilidade e vitalidade preservadas e o percentual de letalidade foi nulo (Figura 19C).

Figura 25 - Aspecto clínico do focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *L. (V.) guyanensis* e tratados com NPSb⁵⁺ (B) e análises de toxicidade em focinho *Mesocricetus auratus* não infectados e tratados com NPSb⁵⁺ (C). A-Grupos controles: A1- animal não infectado e não tratado, A2- animal infectado e não tratado, A3 - animal infectado e tratado com solução salina (placebo). B1 e B3: Animal infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime® e NPSb⁵⁺ após 30 dias de tratamento. B2 e B4: 30° de observação pós-tratamento. C1 e C3: Animal não infectado e tratado com 4 mg.Sb⁵⁺.Kg.dia de Glucantime® e NPSb⁵⁺ após 30 dias de tratamento. C2 e C4: 30° de observação pós-tratamento.



A viabilidade parasitária revelou a presença de parasitas flagelados viáveis após 30 dias de tratamento, no qual o grupo tratado com placebo obteve índices de promastigotas viáveis superiores aos grupos tratados com Glucantime® e NPSb⁵⁺, no entanto, após o período de observação todos os grupos apresentaram crescimento parasitário, sugerindo que após o tratamento nenhuma das substâncias em teste é capaz de reduzir a quantidade de promastigotas viáveis. A taxa de infectividade demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados após o tratamento e período de observação. Quanto a avaliação do peso dos órgãos (fígado, baço e rim) e parâmetros leucocitários não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

DISCUSSÃO

A nanomedicina estuda o desenvolvimento de fármacos em nanoescala, as nanopartículas (NPs) são os principais componentes, sendo idealizadas como sistemas de entrega de medicamentos, podendo ser funcionalizadas para transportar e liberar o princípio ativo de forma controlada, direcionando para locais específicos do corpo, reduzindo os efeitos colaterais e melhorando a eficácia terapêutica (SALEEM, 2019).

As nanopartículas metálicas tem sido amplamente utilizada em estudos para leishmaniose cutânea e mucocutânea, e podem apresentar propriedades diferenciais, ou seja, forma isolada, agregada ou dissolvida e essas transições podem ocorrer no processo de

síntese, devido à natureza da superfície das nanopartículas e às condições ambientais como pH, força iônica, presença de matéria orgânica, dessa forma é necessário compreender as propriedades fundamentais das NPs como tamanho e estabilidade (DE SOUZA et al. 2019).

A caracterização das propriedades físicas e químicas dos nanomateriais é essencial para a compreensão do comportamento dos NPs em diferentes condições. A análise do potencial zeta descreve a carga elétrica na superfície das partículas dispersas em solução, logo um alto potencial zeta indica uma carga repulsiva na superfície, evitando a agregação das partículas, enquanto um baixo potencial zeta sugere uma menor repulsão eletrostática, tornando as partículas propensas à aglomeração (HONARY; ZAHIR, 2013). As NPSb⁵⁺ apresentaram dimensão em escala nanométrica dentro dos parâmetros esperados (1-100 nm) e potencial zeta na magnitude de -13,7 mV e -0,5 mV, sugerindo um possível risco de instabilidade dentro do intervalo de 4 anos.

Neste estudo as NPSb⁵⁺ não apresentaram citotoxicidade celular (>90%) a macrófagos peritoneais murinos, semelhante ao observado no tratamento com Glucantime[®]. Em resultados apresentados para diferentes nanopartículas de antimônio pentavalente demonstrou citotoxicidade mínima para as lipossomas nanodeformáveis (NDLs) de stibogluconato de sódio (DAR, DIN e KHAN, 2018) e nanocapsulas de antimoniato de meglumina (COSCO et al, 2021) frente a macrófagos MJ774.

Nas formas promastigota e amastigota, as NPSb⁵⁺ apresentaram menor CI₅₀ ao longo do período de incubação quando comparado ao Glucantime[®], mas as espécies responderam de forma diferente aos tratamentos. Em *L. (L.) amazonensis*, as NPSb⁵⁺ conseguiram inibir formas promastigotas (> 50% - IC₅₀ 1,9 mg) sendo mais efetiva em amastigotas em 72 horas (> 50% - IC₅₀ 1,8 mg) com maior eficácia que o Glucantime[®]. Esses resultados corroboram os de Franco *et al.* (2016) com NPs de antimônio pentavalente frente a formas promastigotas (100% eficiência- CI₅₀ 0,11 mg). Soares (2016), ao testar três suspensões de NPs de antimônio em promastigotas (CI₅₀ 4,17 mg; 1,05 mg e 8,74 mg) e amastigotas em 72 horas e Gelvés *et al.* (2018) ao testar nanocompósitos funcionalizados com NPs de prata e Glucantime[®] conseguiram inibir formas promastigota (53%) sem diferença aos grupos controles e amastigotas (77%).

Na espécie de *L. (V.) braziliensis* as NPSb⁵⁺ foram mais efetiva contra formas promastigotas (< 50% - CI₅₀ 1,8 mg) com maior eficácia que o Glucantime[®] em 48h e 72 horas do que em amastigotas (CI₅₀ 6,59 mg). Em resultados apresentados por Bezerra *et al.* (2022) ao estudarem nanopartículas metálicas, duas NPs de prata distintas foram testadas contra formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, e apresentaram efeitos opostos, a NPAgAA

não apresentou atividade antileishmania enquanto que a NPAgCD embora tenha apresentado capacidade de reduzir a taxa de infecção não foi considerado significativo devido a toxicidade celular da substância.

Até onde sabemos, não há estudos na literatura que avaliem a atividade antileishmania de nanopartículas metálicas para *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi*, sendo este o primeiro relato. Nossos resultados indicam que as NPSb⁵⁺ induzem a redução de promastigotas (72 h) e amastigotas de *L. (V.) guyanensis* sem diferença significativa em relação ao Glucantime[®], enquanto que em *L. (V.) naiffi* não foi observado resposta significativa.

Os antimoniais pentavalentes ainda são considerados os pilares do tratamento da leishmaniose cutânea (LC) com administração por via sistêmica (EV) apesar de sua alta toxicidade, no entanto, outras abordagens terapêuticas, têm sido propostas como uma alternativa tão eficaz quanto a via sistêmica, dentre elas a administração local por abordagem intralesional de derivados de antimônio pentavalente (BRITO et al., 2019). A OMS recomendou o tratamento intralesional em 2010 (OMS, 2010), a OPAS também incluiu em suas diretrizes em 2013 (PAHO, 2013) e a partir de 2017 passou a ser recomendado pelo Ministério da Saúde ambos com restrições (BRASIL, 2017).

Nesse sentido, este estudo adotou o uso local das NPSb⁵⁺ com abordagem intralesional frente a protocolos diferente quanto a concentração e tempo de aplicação. Os resultados obtidos no tratamento *in vivo* para o protocolo 1 demonstraram que as NPSb⁵⁺ não induziram a cura clínica e parasitológica de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. Em animais infectados com *L. (V.) braziliensis* houve cura clínica de 50% dos animais tratados com GSb1 (1,15 mg) e GSb2 (4 mg) e em *L. (V.) guyanensis* houve cura clínica de 50% e 84% dos animais tratados com GSb1 (1,15 mg) e GSb2 (4 mg) respectivamente embora sem cura parasitológica. Enquanto que no protocolo 2, realizado em *L. (V.) guyanensis* em 30 dias de tratamento as NPSb⁵⁺ induziram a cura clínica (57%), ao final de 30 dias de observação evoluiu para 100% de cura clínica, sem cura parasitológica ou aparecimento de novas lesões.

Franco et al. (2016) sugere um efeito leishmanicida promissor das NPs de antimônio pentavalente (4mg/Kg/dia, via intralesional) contra com *L. (L.) amazonensis*, em modelo de infecção cutânea *in vivo* (*Mesocricetus auratus*) com aplicação diária que induziu a cura clínica em 30 dias de tratamento, por sua vez Horoiwa et al. (2020), testou nanocarreadores coloidais poliméricos contendo antimoniató de meglumina (5 um, via tópica) durante 7 semanas com aplicações a cada 7 dias e induziu redução do tamanho da lesão com propriedades cicatrizantes superior ao Glucantime[®].

Esses resultados não corroboram com os nossos achados para *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que para essa espécie as aplicações ocorram em intervalos menores para que haja o controle da infecção, isso porque é característico do subgênero *Leishmania* a evolução da infecção de forma exacerbada com grandes lesões, provocando maiores ulcerações em alguns casos (BRASIL, 2017).

As espécies do subgênero *Viannia* testadas neste trabalho, apresentaram resultados similares ao observado por Franco et al. (2016) com destaque para *L. (V.) guyanensis* com eficácia em ambos os protocolos propostos, mantendo o controle da infecção mesmo após o tratamento, não sendo observados reincidivas em 30 dias de observação, desta forma, sugerindo que as NPSb⁵⁺ apresentam eficácia frente a espécies dos diferentes subgêneros considerando tempo de duração, concentrações e intervalos de aplicações diferentes.

É importante ressaltar que estudos com nanopartículas associado a tratamentos convencionais como os antimoniais permite o uso de drogas que apresentam alta toxicidade, isso porquê o emprego dessa tecnologia modifica a biodistribuição, biodisponibilidade e reduz a toxicidade, permite atravessar barreiras biológicas e eliminar o parasita dentro do macrófago, aumentando a concentração intracelular, melhorando a eficácia e consequentemente reduzindo efeitos sistêmicos (SOUZA et al., 2018). Em nosso estudo de toxicidade não foram observadas alterações clínicas e de órgãos (tamanho, peso e aparência), como baço, rim e fígado, e nenhum óbito foi observado, dados similares foram descritos por Franco et al. (2016).

Portanto, este trabalho permitiu verificar o efeito das NPSb⁵⁺ *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies de *Leishmania*, demonstrando que é uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

CONCLUSÃO

As NPSb⁵⁺ apresentaram atividade *in vitro* promissora contra as formas evolutivas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Em contrapartida nos estudos pré-clínico, induziram a cura clínica dos animais infectados com *L. (V.) guyanensis* (protocolo 1 e 2) e *L. (V.) braziliensis* (protocolo 1), com tratamento local por abordagem intralesional. Embora não tenha conduzido a cura parasitológica, os resultados encorajam a progressão de estudos adicionais para avaliar a eficácia das NPSb⁵⁺ utilizando diferentes concentrações e o período de tempo de tratamento, bem como elucidar o mecanismo terapêutico.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, T. T.; ALMEIDA, M. O.; LIMA, N. M. A.; RODRIGUES, N. L. C.; RIBERA, V. G. P.; TEIXEIRA, M. J.; CARBONE, L.; MELE, G.; LOMONACO, D.; MAZZETO, S. E. In vitro antileishmanial activity of sustainable anacardic acid and cardol based silver nanoparticles on *L. braziliensis*. *Int J Pharm* 2022. 10;619:121698. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35337904/>.

BLANCO, V.R; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M. 2017. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Revista Virtual de Química*, 3:816-876.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília. 2017. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 22 abr. 2021.

AMAZONAS, Fundação de Vigilância em Saúde. 2018 . Manual de vigilância das Leishmanioses no Amazonas. 1 ed. FVS, Manaus, 103 p.

BRITO, N. C.; ASSIS, T. S. M.; RABELLO, A.; COTA, G. Infiltração intralesional versus uso parenteral de antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose cutânea: uma análise de custo-efetividade. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019. v.5. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007856#references>.

CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTTI, V. 2014. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Química Nova*, 3(37): 521-526.

COSCO, D.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; PULEIO, R.; BONACCI, S.; PROCOPIO, A.; BRITTI, D.; FRESTA, M.; VITALE, F.; PAOLINO, D. Meglumine antimoniate-loaded aqueous-core PLA nanocapsules: old drug, new formulation Against Leishmaniasis related diseases. *Macromol Biosci*. 2021 Jul;21(7):e2100046. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34117834/>.

CHAGAS, A. F. S. Avaliação da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos de cobre. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5132>. Acesso em: 03 out. 2020.

DAR, M. J.; DIN, F. U.; KHAN, G. M.; Sodium stibogluconate loaded nano-deformable liposomes for topical treatment of leishmaniasis: macrophage as a target cell. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):1595-1606. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30105918/>

DE SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUJUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENDERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 547, n. 1-2, p. 421–431. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29886097/>. Acesso em: 11 mar. 2020.

FRANCO, MR. A; GRAFOVA, I; SOARES, F; GENTILE, G; WYREPKOWSKI, DC. C; BOLSON, A.M; SARGENTINI, E; CARFAGNA, C; LESKELA, M; GRAFOV, A. 2016. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 6771-6780.

GELVÉZ A. P. C.; FARIAS, L. H. S.; PEREIRA, V. S.; SILVA, I. C. M.; COSTA, A. C.; DIAS, C. G. B. T.; COSTA, R. M. R.; SIVA, S. H. M.; DRUMMOND, A. P. *Nanomedicine*. 2018 Feb;13(4):373-390. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29338557/>.
HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 265-273. 2013. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>.
Acesso em: 23 mai. 2020.

LIMA, A. X.; ROCHA, M.S. 2016. Nanotecnologia aplicada à área da saúde: Mercado de regulação. *Revista acadêmica Oswaldo Cruz*, 16
OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório de uma reunião do Comitê de Especialistas da OMS sobre o Controle da Leishmaniose, Genebra, Suíça, 22–26 de março de 2010." WHO Tech Rep Ser. World Health Organization; 2010; 949.
PAHO, Leishmaniose nas Américas: recomendações para o tratamento. Órgão. Panam. La Saúde, 2013.

SALEEM, L; ALTAF, A.A; BADSHAH, A; RAUF, K.M; WASEEM, A; DANISH, M; AZAM, S.S; ARSHED, N.M; ASIRI, M.A; GUL, R.A.S. 2018. Structural investigations, anti-leishmanial, antibacterial and docking studies of new pentavalent antimony carboxylates. *Inorganica Chimica Acta*, 148-155.

SALEEM, k; KHURSHEED, Z.; HANO, C.; ANJUM, I.; ANJUM, S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recente advances challenges. *Nanomaterials*. 9:1749. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955954/>

SILVA, M.M.P.; AGUIAR, M.I.F.; RODRIGUES, A.B.; MIRANDA, M.D.; ARAÚJO, M.A.M.; ROLIM, I.L.T.P, et al. 2017. Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática. *Revista da escola de enfermagem da USP*, 51: e03272.
SIQUEIRA, G.R. 2013. Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos dos elementos pnictogênicos Sb(III) e Bi(III) com ligantes ditiois multifuncionais. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 123 p.

SOUZA, A; MARINS, D. S. S. MATHIAS, S. L. MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N. ; SCARIM, C. B.; LODENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.018. Acesso em: 1 out. 2020.

SRIRANJANI, R; SRINITHYA, B; VELLINGIRE, V; BRINDHA, P; ANTHONY, P.S; ARAVIND, S. 2016. Silver nanoparticle synthesis using *Clerodendrum phlomidis* leaf extract and preliminary investigation of its antioxidant and anticancer activities. *Jornal of Molecular Liquids*, 926-930.

TAMÁS, M.J. 2016. Cellular and mollecular mechanism of antimony transport, toxicity and resistance. *Enviromental Chemistry*, 13 (6): 955-962.

TELES, G.B.C.; RODRIGUES, S.M.; MEDEIROS, M.G.; et al. 2016. Phebotomine sandly (Diptera: Psychodidae) diversity and their Leishmania DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian with Peru and Bolívia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 111 (7): 423-432.

Capítulo 3

Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil em 2022

Submetido a *Peer Review* em 03/05/2023 e aceito em 05/06/2023.

CAPÍTULO 3

Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil em 2022

Anny Maiza Vargas Brasil^{1,2*}; Antonia Maria Ramos Franco Pereira¹.

¹Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 69067-375, Amazonas, Brasil.

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

*Autor correspondente: Anny Maíza Vargas Brasil. Email: mayzabrasil@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença tropical negligenciada que afeta milhares de pessoas em várias regiões do mundo, considerada um problema de saúde pública significativo no Brasil. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo descrever o perfil epidemiológico de casos de leishmaniose Tegumentar no Brasil. Realizou-se uma avaliação epidemiológica a partir dos dados secundários disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS) referentes ao ano de 2022. Os resultados demonstraram que a LTA é uma doença endêmica no Brasil com 14.271 casos registrados em 2022, com maior notificação ocorrendo na região norte (3.070 casos). Tradicionalmente, o principal grupo etário afetado pela doença é adulto entre 29 a 39 anos (5.370 casos) e sexo masculino (10.563 casos). Em relação ao tipo de entrada verificou-se que foram notificados 13.044 casos novos; o diagnóstico laboratorial foi realizado em 10.718 casos, além disso, constatou-se que a taxa de cura foi de 49,3% (7.45 casos) e abandono 1,6% (238 casos). O Brasil ainda é uma área endêmica para a LT, tendo a região norte como a mais acometida pela doença principalmente, por conta de desmatamento, atividade extrativista e crescimento urbano não planejado.

Palavras-chave: Epidemiologia; Vigilância Epidemiológica; Diagnóstico; Leishmaniose.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a neglected tropical disease that affects thousands of people in various regions of the world, considered a significant public health problem in Brazil. Therefore, this study aimed to describe the epidemiological profile of Tegumentary Leishmaniasis cases in Brazil. An epidemiological evaluation was carried out based on secondary data provided by SINAN/MS for the year 2022. The results showed that ATL is an endemic disease in Brazil with 14,271 cases registered in 2022, with the highest notification occurring in the northern region (3,070 cases). Traditionally, the main age group affected by the disease is adults between 29 and 39 years old (5,370 cases) and males (10,563 cases). Regarding the type of entry, it was found that 13,044 new cases were notified; laboratory diagnosis was performed in 10,718 cases, in addition, it was found that the cure rate was 49.3% (7.45 cases) and abandonment 1.6% (238 cases). Brazil is still an endemic area for TL, with the northern region being the most affected by the disease, mainly due to deforestation, extractive activity and unplanned urban growth.

Keywords: Epidemiology; Epidemiological monitoring; Diagnosis; Leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças infecciosas que acometem principalmente as regiões tropicais e subtropicais e representam um desafio significativo para a saúde global, pois atingem milhões de pessoas em todo o mundo e tendem a afetar principalmente populações marginalizadas, com acesso limitado a saneamento básico, água potável e serviços de saúde. A falta de atenção a essas doenças resulta em altos índices de morbidade e mortalidade, perpetuando o ciclo de pobreza e desigualdade (ANDRADE, 2015; FERES *et al.*, 2016).

Entre as doenças tropicais negligenciadas mais comuns está a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) endêmica em mais de 85 países, com maior incidência nas Américas, principalmente Bolívia, Peru e Brasil (BRUSCHI; GRADONI, 2018; WHO, 2020). A LTA é uma doença ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitida pela picada da fêmea de flebotomíneos infectados, podendo causar diferentes manifestações clínicas, sendo classificada em leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (ZIGMUNDO *et al.*, 2020).

Atualmente, no Brasil um total de sete espécies patogênicas são as causadoras da doença, destacando-se a *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* devido à ampla distribuição e manifestações clínicas que podem variar de lesões simples na pele à destruição de tecido mucoso (TELES *et al.*, 2016).

O diagnóstico da LTA envolve a combinação de diferentes métodos, em geral baseia-se nas manifestações clínicas do paciente, conhecimento epidemiológico da região e testes laboratoriais, dentre eles, análise de amostras de tecido, testes sorológicos e testes moleculares. A combinação de diferentes métodos diagnósticos é essencial para aumentar a sensibilidade e especificidade, no entanto a seleção do método a ser utilizado geralmente baseia-se na infraestrutura e recursos disponíveis (HANDLER *et al.*, 2015).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo realizar um levantamento epidemiológico por meio do sistema de tabulação TABWIN da plataforma do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) de casos notificados de LTA no Brasil, visando avaliar aspectos epidemiológicos como o tipo de entrada, raça, idade, sexo, métodos de diagnósticos utilizados, taxa de cura e abandono e manifestação clínica no Brasil em 2022.

METODOLOGIA

Este é um estudo epidemiológico de caráter descritivo e retrospectivo, com análise de dados secundários que utilizou do banco de dados fornecido publicamente pelo Ministério da Saúde.

As informações coletadas para esse estudo foram obtidas mediante a busca no banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os dados foram obtidos por meio do sistema de tabulação TABWIN da plataforma do DATASUS no período de 12 a 15 de maio de 2023.

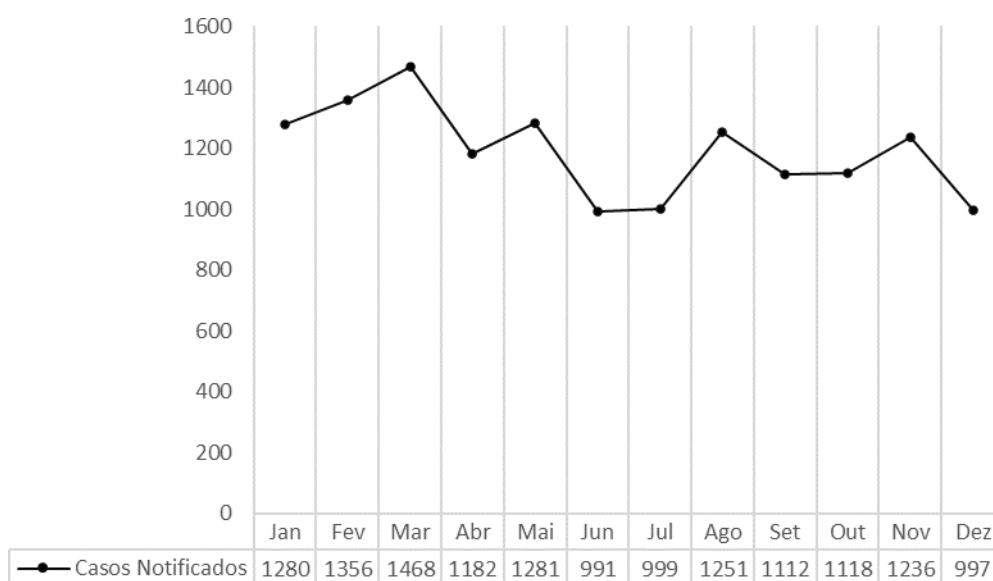
A população de estudo foi composta por casos notificados de LTA no Brasil em 2022. Os dados coletados foram casos notificados de LTA no Brasil e Unidades Federativas (UF), tipo de entrada, distribuição da doença por faixa etária, sexo, raça, critério de confirmação, evolução do caso e manifestação clínica. Após a realização da coleta de dados, os mesmos foram transcritos para o programa Microsoft Excel e tabulados para posterior realização da análise descritiva.

RESULTADOS

Segundo o levantamento de dados realizado nesse estudo observou-se que em 2022 o Brasil apresentou 14.271 casos notificados de LTA, os períodos do ano com maiores notificações foram nos meses de fevereiro (1356 casos) e março (1468 casos) e com menores

notificações foram os meses junho (991 casos), julho (999 casos) e dezembro (997 casos). Quando observados por regiões do Brasil a maior notificação foi na região norte (6.860 casos), seguido das regiões nordeste (3.728 casos), região centro-oeste (1.842 casos), sudeste (1.611 casos) e sul (230 casos); demonstrando que 48,06% dos casos registrados no país estão localizados na região norte (Figura 26).

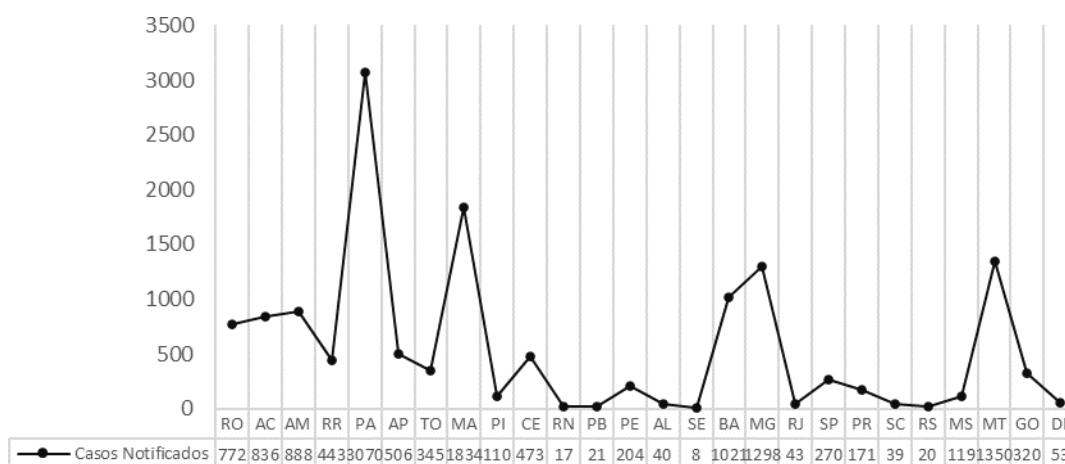
Figura 26 - Casos notificados no Brasil em 2022 no período de janeiro a dezembro por Leishmaniose Tegumentar.



Além disso, observou-se que os estados que apresentaram maior registro de casos notificados foram Pará (3.070 casos), Maranhão (1.834 casos) Bahia (1.021 casos), Amazonas (888 casos), Acre (836 casos), Rondônia (772 casos) e Amapá (506 casos), enfatizando que os estados da região norte apresentam a maior concentração de casos.

No mesmo período os estados que apresentaram menor registro para LTA foram Sergipe (8 casos), Rio Grande do Norte (17 casos), Rio Grande do Sul (20 casos), Paraíba (21 casos), Santa Catarina (39 casos), Alagoas (40 casos), Rio de Janeiro (43 casos) e Distrito Federal (53 casos) (Figura 27).

Figura 27- Casos notificados em Unidades Federativas de infecção por Leishmaniose Tegumentar em 2022.



Considerando todos os casos notificados no Brasil, quando observados em relação a raça, observou-se que 67,57% dos casos notificados ocorreram na raça parda (9.644 casos) seguido com 16,99% na branca (2.245 casos). Quando observado em relação ao sexo 74,01% ocorreram no sexo masculino (10.563 casos) conforme demonstrado na Tabela 6.

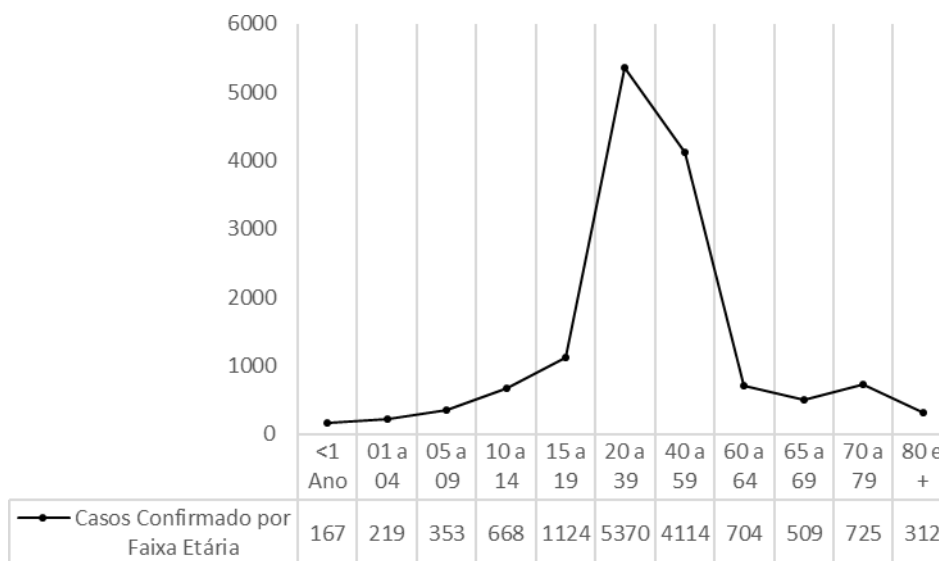
Tabela 6- Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar por raça e sexo no Brasil em 2019

Distribuição dos casos de LTA por raça						
Ano	Branca	Preta	Amarela	Parda	Indígena	Ignorado
2022	2.425	1.145	80	9.644	465	512

Distribuição dos casos de LTA por sexo			
Ano	Masculino	Feminino	Ignorado
2022	10.563	3.732	3

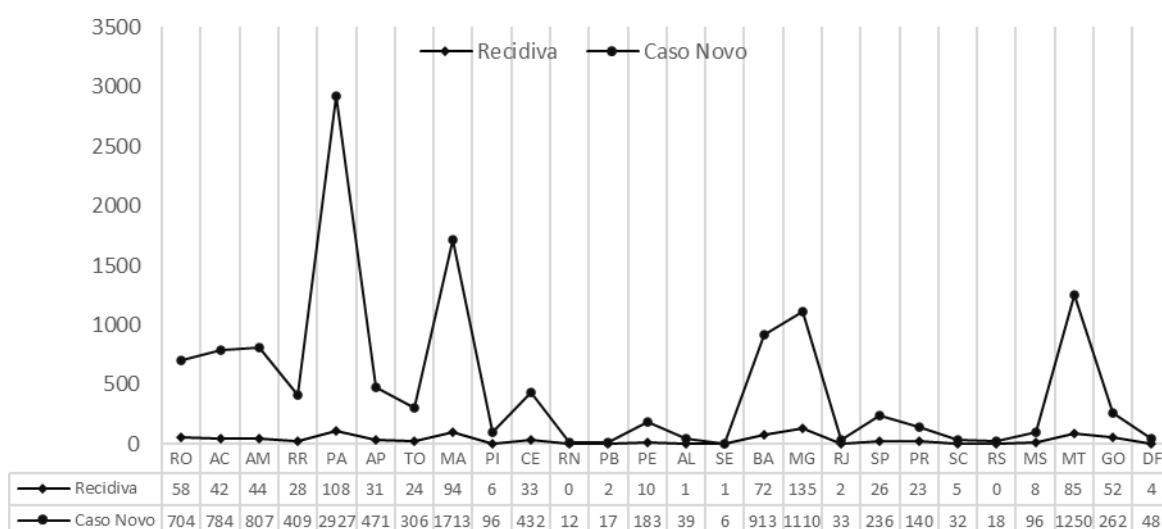
Em relação aos casos notificados de acordo com a faixa etária foram mais acometidos por LTA 37,6% dos adultos entre 29 – 39 anos (5.370 casos) e 28,8% entre 40 a 59 anos (4.114 casos), respectivamente, embora em menor proporção também foram observados casos em crianças, sendo de 1,17% (167 casos) em crianças abaixo de 1 ano, 1,53% (219 casos) entre 1 a 4 anos e 2,47% (353 casos) entre 5 a 9 anos (Figura 28).

Figura 28 - Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar por sexo no Brasil em 2022.



Em 2022, foram notificados no Brasil 13.044 novos casos (91,4%), enquanto que somente 894 casos (6,26%) corresponderam à situação de recidiva e nos estados que ocorreram foi inferior ao número de casos novos, ressaltando que os estados do Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul não apresentam nenhum caso notificado de recidiva. (Figura 29).

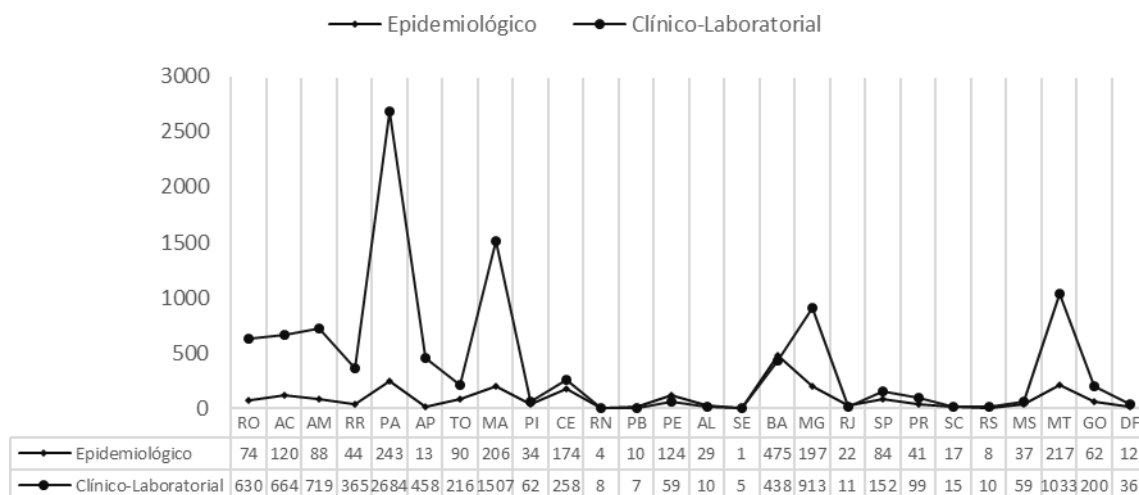
Figura 29 - Tipo de entrada (caso novo ou recidiva) de Leishmaniose Tegumentar no Brasil em 2022.



A partir do levantamento de dados referentes ao critério de confirmação (laboratorial ou clínico-epidemiológico) observou-se que no Brasil 75,1% (10.718 casos) dos diagnósticos foram realizados de forma laboratorial e 16,9% (2.426 casos) foram realizados considerando

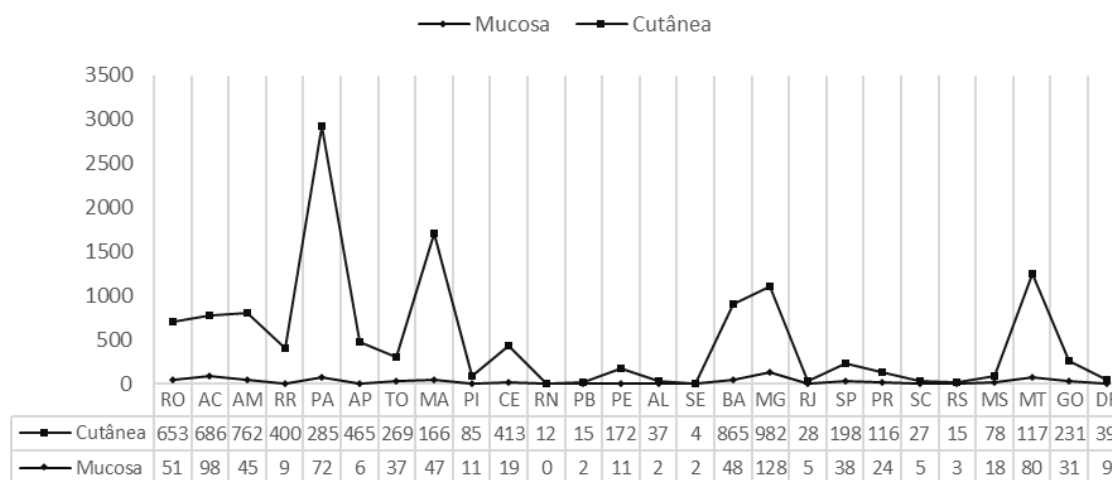
critério clínico-epidemiológico. Na maioria dos estados (73%), observa-se que a utilização do critério laboratorial é superior ao clínico-epidemiológico, com exceção dos estados de Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Rio de Janeiro e Mato Grosso (Figura 30).

Figura 30 - Critério de confirmação de casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil em 2019.



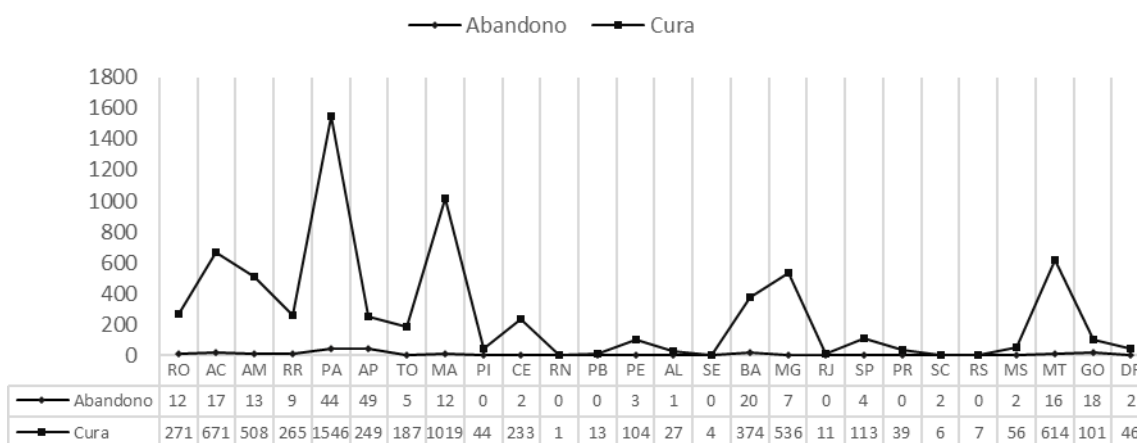
Em relação aos casos notificados de acordo com a manifestação clínica da LTA, observou-se que 85,7% (14.243 casos) dos casos ocorreram na forma cutânea. Sabe-se que essa manifestação clínica pode se expressar de forma localizada, disseminada e difusa, porém essas informações não foram determinadas no banco de dados, enquanto que 5,61% dos casos ocorreram na forma mucosa, sendo que 8,7% (1.227 casos) não continha a determinação da manifestação clínica (Figura 31).

Figura 31 - Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar por manifestação clínica.



Quanto à evolução dos casos, observou-se que apenas 49,3% (7.045 casos) correspondeu à cura clínica, 1,6% (238 casos) corresponderam a casos de abandono ao tratamento e 48,95% (6.988 casos) corresponderam a casos que tiveram essa informação ignorada, ou transferida para outra unidade de atendimento (Figura 32).

Figura 32- Evolução dos casos de Leishmaniose Tegumentar quanto a cura e abandono



DISCUSSÃO

A LTA é uma doença endêmica em diversos países das Américas. No Brasil, em particular, é um importante problema de saúde pública, com registros de casos em várias regiões do país, que neste estudo, apresentou para o ano de 2022 um total de casos (14.271) inferior ao notificado em 2021 (15.023) pela Organização Pan-americana da Saúde, segundo este boletim o Brasil tem apresentado um decréscimo no número de casos (OPAS, 2022).

Segundo Vasconcelos *et al* (2018), esta doença tem uma maior incidência em áreas onde há uma vegetação densa, por isso observa-se que a região norte do país apresenta maior notificação de casos.

A Leishmaniose Tegumentar silvestre surge em surtos epidêmicos relacionados ao desmatamento, como construção de estradas e estabelecimento de povoados em áreas pioneiras, além da exploração descontrolada das florestas, incluindo extração de madeira, agricultura e mineração. Esses surtos são comuns na região amazônica (BASANO; CAMARGO, 2004). Tal condição afeta a interface homem-animal-ambiente tornando homens que realizam tais atividades vulneráveis, corroborando para os perfis identificados no presente estudo.

Em um estudo, destaca-se que o estado do Pará, em série histórica entre os anos de 2008 e 2017, manteve registros elevados com total de 34.609 casos confirmados de LTA, com uma incidência de 43,89 casos por 100.000 habitantes. Em 2017 o total registrado foi de 3.259 casos, enquanto que em 2022 o número foi de 3.070 casos totais, apontando redução. A forma cutânea da doença foi a mais comum, representando 97,39% dos casos, e cerca de 72,19% dos pacientes se recuperaram completamente (ABRAÃO, *et al.* 2020).

Quanto aos índices demográficos para as variáveis sexo, faixa etária e raça, foi observado no Brasil a maior taxa de acometimento no sexo masculino, na faixa etária entre 20 a 39 anos e 40 a 59 anos, na população parda, similar ao descrito por Abraão *et al* (2020) esse perfil sugere um padrão de contágio relacionado a atividades laborais, devido a entrada em regiões de mata, que possibilita uma transmissão extradomiciliar. A ocorrência em mulheres e crianças menores de 10 anos sugere um padrão de transmissão domiciliar e peridomiciliar, no qual casas de madeiras com frestas são propícios para o desenvolvimento do vetor (OPAS, 2022).

A doença se manifesta classicamente em duas formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. No Brasil, a Leishmaniose Cutânea é a forma mais prevalente da doença e costuma ser menos grave, porém, tornou-se uma preocupação dermatológica que requer maior atenção, devido a sua ampla distribuição em todas as regiões do país, conforme demonstrado neste estudo. A Leishmaniose mucosa é menos prevalente, porém são mais difíceis de tratar e apresentam maior tendência a recidiva (ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, 2022).

Em relação ao critério de confirmação dos casos de LTA no Brasil, observou-se a predominância dos diagnósticos realizados de forma laboratorial. A utilização de métodos baseados nesse tipo de diagnóstico pode proporcionar informações epidemiológicas relevantes através da identificação da espécie circulante (BRASIL, 2018), uma vez que a base do diagnóstico laboratorial consiste sobretudo na detecção de parasitas em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa (BASANO; CAMARGO, 2004).

Esse diagnóstico é composto, essencialmente, por três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRASIL, 2018). Destes, os imunológicos e moleculares, tais como a imunofluorescência, ELISA, aglutinação direta e a reação em cadeia de polimerase (PCR), são realizados em laboratórios de complexidade elevada, o que configura um valor limitado na prática diagnóstica em regiões endêmicas, apesar dos seus resultados efetivos (BASANO; CAMARGO, 2004). O diagnóstico pode ser feito ainda de forma indireta por meio da intradermoreação de Montenegro, o qual é baseado na avaliação

da resposta imunológica celular de hipersensibilidade obtida por meio da injeção intradérmica de antígenos do protozoário causador da *Leishmania*, sendo este exame o mais empregado na prática, juntamente com a detecção direta dos protozoários (BASANO; CAMARGO, 2004).

Já em relação ao critério clínico-epidemiológico, o qual foi responsável por 16,9% dos casos de Leishmaniose diagnosticados no Brasil, pode-se inferir que ele ocorre essencialmente quando o paciente apresenta lesões características da leishmaniose e tem histórico de residência em áreas endêmicas ou exposição em locais onde a doença é conhecida (VASCONCELOS, 2018). Um exemplo de lesão típica da leishmaniose é a úlcera cutânea, que geralmente ocorre em áreas expostas da pele, apresentando um formato ovalado e variando em tamanho de alguns milímetros a alguns centímetros, sendo que a base desta úlcera é avermelhada com apresentação de infiltração (BRASIL, 2018). No entanto, é recomendável que esse tipo de diagnóstico clínico-epidemiológico seja complementado por exames laboratoriais para obtenção de resultados mais precisos, especialmente devido à existência de outras doenças que podem ter sintomas semelhantes à LTA (VASCONCELOS, 2018).

Apenas 49,3% dos casos notificados evoluíram para cura, sendo que não há informações disponíveis sobre o desfecho final do tratamento em cerca de 48,95% dos casos, possivelmente devido à falta de registros dos pacientes, ou ainda casos de abandono ao tratamento e transferências para outras unidades de atendimento. Segundo a OPAS (2022), em 25% dos registros referentes a 2021 não constava essas informações, agravando o problema por conta da subnotificação.

CONCLUSÃO

Os dados epidemiológicos de 2022 revelam que a leishmaniose tegumentar americana continua sendo um desafio para a saúde pública. No Brasil, a região Norte e Nordeste foram as mais afetadas, com destaque para os estados do Pará, Maranhão, Bahia e Amazonas, com maior ocorrência na população parda, sexo masculino na faixa etária entre 29 e 39 anos, apresentando principalmente a forma cutânea da doença.

Apresenta variações significativas na prevalência e na distribuição geográfica, tornando-se crucial os esforços de orientações de prevenção e tratamento e estratégias que minimizem a perda de informações no sistema.

REFERÊNCIAS

- ABRAAO, Luciano Sami de Oliveira et al . Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 11, e202000612, 2020 . Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232020000100022&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 18 maio 2023. Epub 18-Nov-2020. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000612>.
- ANDRADE, B. L. A. **A produção do conhecimento em doenças negligenciadas no brasil: uma análise bioética dos dispositivos normativos e da atuação dos pesquisadores brasileiros**. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/18316>.
- BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/rX8bfw89BwD8qQZfvfs6x3B/?lang=pt&format=html>
- BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer. ISBN 978-3-319-72386-0. 2018. Disponível em: <https://www.springer.com/gp/book/9783319723853>.
- ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. Boletim epidemiológico: Leishmaniose Tegumentar Americana.2022. Disponível em: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_LT_2023_Final.pdf.
- FERES, M. V. C.; SILVA, L. A.; CUCO, P. H. O.; SILVA, A. R. A contradição entre a regulamentação existente e a complexidade dos fatos reais no caso das drogas para doenças negligenciadas. **Revista Brasileira de Políticas Públicas**, v. 6, n. 3, p. 193-208. 2016.
- HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, p. 911-926. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019096221401915X>.
- OPAS. Organização Panamericana da Saúde. Leishmanioses. 2022. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEV220021_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

TELES, G.B.C. et al. Phebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian with Peru and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1678-8060. 2016. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762016000700423&script=sci_abstract.

VASCONCELOS, Jailra Maria *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *RBAC*, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/artigos/leishmaniose-tegumentar-americana-perfil-epidemiologico-diagnostico-e-tratamento/#:~:text=O%20diagn%C3%B3stico%20cl%C3%ADnico%20de%20epidemiol%C3%B3gico%20%C3%A9,pela%20resposta%20terap%C3%A9utica%20do%20paciente>

WHO. World Health Organization, **Leishmaniasis**. 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

ZIGMUNDO, G. C. O.; CRUZ, K. P.; HERPICH, T. L.; GABRIEL, K. U. H. L.; RIVERO, L. F. R.; MARTINS, M. A. T.; MARTINS, M. D. American Tegumentary Leishmaniasis: report of a case. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. e201. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212440320305873>

5 DISCUSSÃO GERAL

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças infecciosas que afetam principalmente as populações mais pobres e marginalizadas em regiões tropicais e subtropicais. Essas doenças recebem pouca atenção da comunidade médica e dos órgãos de saúde pública, resultando em recursos limitados para pesquisa, prevenção e tratamento (HERNANDEZ et al., 2019).

A negligência em relação a essas doenças ocorre devido a vários fatores, como falta de investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, falta de acesso a serviços de saúde adequados, pobreza, falta de educação em saúde e falta de visibilidade política. Entre essas doenças se encontram a leishmaniose, que causam uma enorme carga de morbidade em áreas endêmicas, prejudicando o desenvolvimento socioeconômico das comunidades afetadas (YAMEY et al., 2018).

No entanto, nos últimos anos, houve um aumento do interesse e dos esforços para enfrentar essas doenças. Iniciativas globais e parcerias entre governos, organizações não governamentais e setor privado têm trabalhado para melhorar o acesso aos diagnósticos, medicamentos e medidas preventivas, além de promover a conscientização e a pesquisa científica (OMS/OPAS, 2019).

Os antimoniais pentavalentes são considerados o padrão ouro na terapia sistêmica, no entanto apresentam varias falhas como uma série de efeitos colaterais e adversos, toxicidade, necessidade de administração a longo prazo, alto custo, além de apresentarem um progressivo aumento de resistência parasitária as drogas preconizadas (BRASIL, 2017). Sendo assim, umas das principais alternativas em inovação para tratamento da leishmaniose é o reposicionamento de fármaco, que de baseia em investigar medicamentos já conhecido e utilizado clinicamente frente a novas formulações ou como possível tratamento para outras doenças, consequentemente reduzindo o tempo e custo produção de novos fármacos (SILVAa, 2015; SILVAb, 2015).

Essa estratégia é amplamente utilizada na terapêutica da leishmaniose, tendo fármacos reposicionados preconizados pelo Ministério da Saúde como é o caso da anfotericina B (antibiótico antifúngico), paramomicina (antibiótico aminoglicosídeo) e mais recentemente a miltefosina (antineoplásico), sendo esta uma prática comum, viável e mais rápida para o descobrimento de um novo medicamento, seguindo todos os critérios de validações e análises (SILVAb, 2015).

Ainda em busca de melhorar o atual cenário do tratamento da leishmaniose tegumentar, novas vias de administração têm sido extensivamente estudadas como no caso da administração do medicamento no local da lesão (intralesional), essa estratégia reduz a toxicidade sistêmica e permite maior concentração do princípio ativo no local da infecção. Essa via de administração é recomendada pela OMS, OPAS e MS com o uso de derivados de antimônio para casos em que o paciente apresente lesão única ou poucas lesões (BRITO et al., 2019; BRASIL, 2017).

Sendo assim, o tratamento da LT segue sendo um grande desafio da prática clínica, o modelo de um medicamento ideal seria aquele que conseguisse apresentar eficácia em doses mínimas com resposta terapêutica independente da espécie, baixo custo, sem contra indicações, livre de efeitos colaterais e/ou adversos, sem necessidade de hospitalização, não teratogênico e que não induza a resistência dos parasitas, até agora nenhum dos medicamentos utilizados no tratamento da LT cumprem todos os esses critérios (DNDi, 2016; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

As informações resultantes nesse estudo servem como embasamento para próximas pesquisas fundamentadas no reposicionamento de fármacos (hesperidina) com aplicação de uma tecnologia de entrega direcionada de drogas (nanopartículas de antimônio pentavalente) e com utilização de administração local do medicamento. A continuidade desse estudo é necessária de modo a avaliar outros parâmetros, considerando as NPSb⁵⁺ como fortes candidatas ao tratamento da leishmaniose tegumentar com eficácia superior ao observado no tratamento com a hesperidina.

6 CONCLUSÕES FINAIS

- A síntese da NPSb⁵⁺ apresentou características ideais de tamanho e estabilidade;
- As NPSb⁵⁺ e a hesperidina apresentaram resultados promissores para todas as espécies testadas embora com comportamento diferente em ambas as formas evolutivas do parasita nas diferentes concentrações;
- As NPSb⁵⁺ apresentaram atividade antileishmania contra formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* com efeito imediato se mantendo durante todo o tratamento e *L. (V.) braziliensis* com efeito a longo prazo; contra formas amastigotas as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* apresentaram atividade imediata se mantendo durante todo o tratamento em quanto que *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* apresentaram atividade tardia;
- As NPSb⁵⁺ não apresentaram citotoxicidade frente a macrófagos peritoniais murinos;
- No estudo pré-clínico induziram a cura clínica dos animais infectados com *L. (V.) guyanensis* (protocolo 1 e 2) e *L. (V.) braziliensis* (protocolo 1) e não apresentou sinais clínicos indicativos de toxicidade.
- A hesperidina apresenta atividade antileishmania contra formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* com efeito imediato se mantendo durante todo o tratamento e *L. (V.) guyanensis* com efeito tardio. Contra formas amastigotas as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram atividade imediata se mantendo durante todo o tratamento em quanto que *L. (V.) naiffi* apresentaram atividade tardia;
- A hesperidina apresentou citotoxicidade moderada aos macrófagos peritoniais murinos nas concentrações de 9,00 – 1,12 mg/mL;
- No estudo pré-clínico a hesperidina induziu a cura clínica de 50% dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* tratados com GTH2.
- Os dados epidemiológicos de 2022 revelam que no Brasil, a região Norte e Nordeste foram as mais afetadas, com destaque para os estados do Pará, Maranhão, Bahia e Amazonas, com maior ocorrência na população parda, sexo masculino na faixa etária entre 29 e 39 anos, apresentando principalmente a forma cutânea da doença.

REFERÊNCIAS

ABAMOR, E. S.; ALLAHVERDIYEV, A. M. A nanotechnology based new approach for chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TIO₂AG nanoparticles - Nigella sativa oil combinations. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 150–163, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.04.008. Acesso em: 05 jan. 2018

AEDO, J. R. N. **Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis***. 2007 (Dissertação) - Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da cidade de São Paulo, São Paulo, 2007. DOI: 10.11606/D.42.2007.tde-09012008-161146. Acesso em: 05 jan. 2018.

ANFOTERICINA B. São Paulo: União Química Farmacêutica Nacional S/A Farm. Resp.: Florentino Jesus Krencas CRF-SP nº 49136. **Bula de remédio**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9032052015&pIdAnexo=2892182. Acesso em: 05 jan. 2018.

AHMAD, S. T.; ARJUMAND, W.; NAFEES, S.; SETH, A.; ALI, N.; RASHID, S.; SULTANA, S. Hes-peridin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. **Toxicol. Lett.** 205:149–161, 2012. DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.10.023. Acesso em: 19 mar. 2020.

ALLAHVERDIYEV, A.; ABAMOR, E.Ş.; BAGIROVA, U. C. B.; KAYA, K.; R. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **Int. J. Nanomedicine** 6, 2705–2714. 2011. DOI: 10.2147/IJN.S23883. Acesso em: 19 mar. 2020.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n.3, p. 497-506. 2011. DOI: S0365-05962011000300012. Acesso em: 22 jun. 2020.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombiana. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853-882, set./dez. 2003. DOI: 10.1590/S0104-59702003000300004. . Acesso em: 14 set. 2020.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3. 2016. DOI: DOI: 10.1371/journal.pntd.0004349. Acesso em: 05 jan. 2020.

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, n. January, p. 86–90, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.04.029. Acesso em: 05 jan. 2020.

ANTUNES, M. S. **Avaliação dos fatores comportamentais e neuroquímicos associados ao efeito da hesperidina em modelos da doença de parkinson e de depressão em camundongos**. 176 f. 2017. 2017. (Tese) Universidade Federal do Pampas, Itaqui. 2017.

ARANGANATHAN S, S. J. P.; NALINI, N. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on bacterial enzymes and carcinogen-induced aberrant crypt foci in colon cancer rats: A dose-dependent study. **J Pharm Pharmacol**, 60: 1385-92, 2008. DOI: 10.1211/jpp.60.10.0015. Acesso em: 05 jan. 2020.

AROKIYARAJ, S., SARAVANAN, M., BHARANIDHARAN, R., ISLAM, V.I.H., BOUOUDINA, M., VINCENT, S.. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Compounds and Their Applications, Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering. **IGI Global**. 2016. DOI: 10.4018/978-1-4666-9811-6.ch001. Acesso em: 05 jan. 2020.

ASHUTOSH; S. S.; GOYAL, N. N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. PART 2, p. 143–153, 2007. DOI: 10.1099/jmm.0.46841-0. Acesso em: 05 jan. 2020.

BAIOCCO, P. I, A.; CECI, P. O. S.; GRAMICCIA, M. M, T.; COLOTTI, G. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. **ACS Med. Chem. Lett.** 2, 230–233. 2011. DOI: 10.1021/ml1002629. Acesso em: 05 jan. 2020.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Revista Química Nova.** Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.679- 688, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300012. Acesso em: 05 jan. 2020.

BASANO, S. D. A.; CARMARGO, L. M. ARANHA. Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004. DOI: 10.1590/S1415-790X2004000300010. Acesso em: 05 jan. 2020.

BASTOS, T. S. A. Estudos introdutórios sobre flebotomíneos. **Ciência Animal. Goiás**, 2012.

BEHESHTI, N., SOFLAEI, S., SHAKIBAIE, M., YAZDI, M.H., GHAFARIFAR, F., DALIMI, A., SHAHVERDI, A.R.. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: In vitro and in vivo studies. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 27, 203–207. 2013. DOI: 10.1016/j.jtemb.2012.11.002. Acesso em: 05 jan. 2020.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob Agents Chemother** 27, 916–920. 1985. DOI: 10.1128/aac.27.6.916. Acesso em: 05 jan. 2020.

BLUM, J.A.; HATZ, C.F. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers. **Journal of travel Medicine**, v.16, n.2, p.123-131, 2009. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2008.00286.x. Acesso em: 05 jan. 2020.

BOLZANI, S.V.; JUNIOR, C.V. Os produtos naturais e a química medicinal moderna . **Química Nova**, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000200025. . Acesso em: 05 jan. 2020.

BORBOREMA, S.E.T. **Desenvolvimento e Farmacocinetica de Antimonio encapsulado em Lipossomas de Fosfatilserina utilizando radioisotopos em Leishmaniose experimental**, in **Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares**. 167 f. 2010. (Tese) Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010. DOI: 10.11606/T.85.2010.tde-29082011-131053. Acesso em: 05 jan. 2020.

BORTOLON, F.F. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo fração flavonoídica enriquecida com diosmina e hesperidina em hidrogeis para a aplicação tópica cutânea visando tratamento de doenças venosas crônicas**. 159 F. 2018. (Tese) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília. 2017. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 22 abr. 2019.

BULA PENTOXIFILINA: Pentoxifilina. Manaus: Novamed fabricação de produtos farmacêuticos Ltda. Bula de remédio. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16049072016&pIdAnexo=3357861. Acesso em: 22 abr. 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)33046-0. Acesso em: 22 abr. 2019.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98-106, 2008.

CANCINO, J; MARAGONI, S.V; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, 0100-4042. 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140086. Acesso em: 22 abr. 2019.

CARIDHA, D.; VESELY, B.; BOCXLAER, K. V.; ARANA, B.; MOWBRAY, C. E.; RAFATI, S.; ULIANA, S.; REGUERA, R.; KREISHMANN-DEITRICK, M.; SCIOTTI, M.; BUFFET, P.; CRODT, S. L. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 11, n. May, p. 106–117, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.06.003. Acesso em: 22 abr. 2019.

CARVALHO, A. U. C. **Avaliacao do Uso de Tecnicas de MMGBSA na Triagem Virtual de Bibliotecas de Ligantes para o Desenvolvimento de Farmacos contra Leishmania amazonensis e Leishmania chagasi**. 2011 (Dissertação). Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba. 2011.

CASTELLANO, R. L. C. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms. *Parasite*, p. 1–19, 2005. Acesso em: 22 abr. 2019.

CDC. Parasites. **Leishmaniasis**. 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. acesso em 28.05.2020.

CHAGAS, A. F. S. **Avaliação da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos de cobre**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5132>. Acesso em: 03 out. 2020.

COELHO, L. I. A. R. C. **Caracterização de leishmania spp em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região Norte, Brasil**. 2010. 108 f. (Tese) - Saúde pública, Fundação Oswaldo Cruz Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 2010.

CORREA, E. A. **Aspectos epidemiológico e clínico-laboratoriais da Lesihmaniose Tegumentar Americana nos subespaços de 07 e 08 no estado de Rondônia - Brasil**. 77 f. 2007 (Dissertação) - curso em Ciências da saúde, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2007.

COSTA, J. M. L. Leishmaniose Tegumentar Americana: origens e histórico no Brasil. **Acta Amazonica** 22: 71-77, 1992. DOI: 10.1590/1809-43921992221077. Acesso em: 03 out. 2020.

DAS, S., ROY, P., MONDAL, S., BERA, T., MUKHERJEE, A., 2013. One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. **Colloids Surfaces B Biointerfaces** 107, 27–34. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.061. Acesso em: 03 out. 2020.

DIMASI, H. G. Grabowski Cost to Develop and Win Marketing Approval for a New Drug Is \$ 2.6 Billion. Tufts Center for the Study of Drug Development, 2014. Disponível em: http://csdd.tufts.edu/news/complete_story/pr_tufts_csdd_2014_cost_study. Acessado em: 10/04/2020.

DOMINGOS, P. R.C. **Avaliação da eficácia de diamidínicos fluorados e nanopartículas metálicas na leishmaniose cutânea**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2018. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6600>. Acesso em: 20 abr. 2020.

DNDi, **Boletim informativo da redeLEISH**. 1. ed., pg 1-12, 2016. https://dndi.org/wp-content/uploads/2016/06/DNDi_Infoleish_Newsletter_1_PORTUGUESE_160510.pdf. Acesso em: 20 abr. 2020.

DONATO, F. **Estudo dos mecanismos associados ao efeito tipo antidepressivo dos polifenóis hesperidina e mangiferina em camundongos**. 142 F. 2017. (Tese) Universidade Federal do Pampa. 2017. Disponível em: <http://dspace.unipampa.edu.br:8080/jspui/handle/riu/4629>. Acesso em: 20 abr. 2020.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. “Nanotecnologia”. São Paulo, **Art Liber**: 1-201, 2006.

EL-ON, J.; SNEIER, R.; ELIAS-E. *Leishmania major*. Bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. **Isr J Med Sci** 28: 847-851, 1992.

FAGUNDES SILVA, G. A. et al. Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 110(6): 797-800, 2015. Doi: 10.1590/0074-02760150128. Acesso em: 20 abr. 2020.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, 2014.

FERREIRA, P.M.P. et al. Folk uses and pharmacological properties of Casearia sylvestris: a medicinal review. **An Acad Bras Cienc**, 83: 1373-1384, 2011. DOI: 10.1590/S0001-37652011005000040. Acesso em: 20 abr. 2020.

FERREIRA, C.C.; MAROCHIO, G.G.; PARTATA, A.K. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com enfoque na farmacoterapia. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, 5(4), 2012.

FIGUEIRA, L. DE P. **Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional**. 180 f. 2013. (Tese) - Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/4362>. Acesso em: 20 abr. 2020.

FILELLA, M.; BALZILE, N.; CHEN, Y.W. Antimony in the environment: a review facused on natural Waters. **Eath Science Reviews**, v. 57, p. 125-176, 2002. DOI: 10.1016/S0012-8252(02)00089-2. Acesso em: 20 abr. 2020.

FILHO, R. A. S. OLIVEIRA, D. R.; DUTRA, V. B. P.; MEIRELES, N. M.; ANJOS, L.; MOURA, G. M. R. TRATAMENTO DAS LESÕES CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. **Revista Liberum accessum**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2020.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A.; SARGENTINI, É. J. R.; CARFAGNA, C.; LESKELÄ, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 11 6771–6780. 2016. DOI: 10.2147/IJN.S121096. Acesso em: 1 out. 2020.

FRÉZARD, F. SCHETTINI, D. lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000300025. Acesso em: 1 out. 2020.

FRÉZARD F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules.**, 30;14(7):2317-36, 2009. DOI: 10.3390/molecules14072317. Acesso em: 1 out. 2020.

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração Para O Conhecimento Do Histórico Da Leishmaniose Tegumentar Americana No Brasil : Possíveis Casos Entre Escravos Na Vila De Vassouras-Rj , Nos Anos 1820 a 1880. v. 43, n. 1, p. 7–25, 2014. DOI: 10.5216/rpt.v43i1.29366. Acesso em: 1 out. 2020.

GLANS, H.; DOTEVALL, L.; SOBIRK, S. K.; FARNERT, A.; BRADLEY, M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996-2016: A retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1186/s12879-018-3539-1. Acesso em: 1 out. 2020.

GOMES, et al. Chalcone derivatives: promising starting points for Drug design. **Molecules**. 22: 1210, 2017. DOI: 10.3390/molecules22081210. Acesso em: 1 out. 2020.

GUIMARÃES, L. H.; QUEIROZ, A.; SILVA, J. A.; SILVA, S. C.; MAGALHÃES, v.; LAGO, E. L.; MACHADO, P. R. L.; BACELLAR, O.; WILSON, M. E.; BEVERLEY, S. M.; CARVALHO, E. M.; SCHRIEFER, A. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005100. Acesso em: 1 out. 2020.

HERNANDEZ, H. W; SOEUNG, M.; ZORN, K. M.; ASHOURA, N.; MOTTIN, M.; ANDRADE, C.H.; CAFFREY, C. R., SIQUEIRA-NETO, J.L.; EKIND, S. High Throughput and Computational Repurposing for Neglected Diseases. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 2, 2019.

HIRATA, A.; MURAKAMI, Y.; SHOJI, M. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. **Anticancer Res.** 25:3367-74, 2005.

HOLANDA, V. N.; SILVA, W. V.; NASCIMENTO, P. H.; OLIVEIRA, R. N.; LIMA, V. L. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Challenges and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniasis: Review. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 6, n. 17, p. 140–157, 2018. DOI: 10.1590/s1678-9946201860003. Acesso em: 1 out. 2020.

HOU M.; MAN M.; MAN W.; ZHU W.; HUPE M.; PARK K. et al. Topical hesperidin improves epidermal permeability barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin. **Exp Dermatol**; 21: 337-40, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01455.x. Acesso em: 1 out. 2020.

HWANG, S. L.; YEN, G. C. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. **J. Agric. Food Chem.** 56:859–864, 2008. DOI: 10.1021/jf072826r. Acesso em: 1 out. 2020.

JAGANATAH, I. B.; CROZIER, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds in: Plant Phenolics and Human Health, Fraga, C.G. (Ed.). In: Fraga, C.G. (Ed.). **John Wiley & Sons Inc.**, Hoboken, NJ. 1–50, 2010. DOI: 10.1002/9780470531792.ch1. Acesso em: 1 out. 2020.

JAIN, G.K. et al. Microscopic and spectroscopic evaluation of novel PLGA-chitosan Nanoplexes as an ocular delivery system. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, vol. 82, n.2, p. 397-403, 2011. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.09.010. Acesso em: 1 out. 2020.

JEBALI, A.; KAZEMI. B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicol In Vitro.**, 27(6):1896-904, 2013.

KAMBOH, A. A.; ARAIN, M. A.; MUGHAL, M. J.; ZAMAN, A.; ARAIN, Z. M.; SOOMRO, A. H. Flavonoids: health promoting phytochemicals for animal production – a review. **J. Anim. Health Prod.** 3:6–13, 2015. DOI: 10.14737/journal.jahp/2015/3.1.6.13. Acesso em: 1 out. 2020.

LAISON R, SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Dendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine, Biology and Epidemiology, **Academy Press**, London, 1-20, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.Y. Cutaneous *Leishmaniasis* of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, 65: 282-284, 1990.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LEE, K. H.; YEH, M. H.; KAO, S. T.; HUNG, C. M.; YEH, C. C. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kB in human hepatocellular carcinoma cells. **Toxicol. Lett.** 194:42–49, 2010. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.01.021. Acesso em: 1 out. 2020.

LI; YVONE; JONES, Steven JM. Drug repositioning for personalized medicine. **BioMed Central Genome Medicine** 2012. DOI: 10.1186/gm326. Acesso em: 1 out. 2020.

LIMA, G. S. **Estudo da Atividade Tripanossomicida e Leishmanicida de Extrato , Frações e Terpenos** de. 75 f. 2014. (Tese) Ciência, Tecnologia e Inovação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.2014.

KALANGI, S.K., DAYAKAR, A., GANGAPPA, D., SATHYAVATHI, R., MAURYA, R.S., NARAYANA RAO, D. Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. **Exp. Parasitol.** 170, 184–192. DOI: [10.1016/j.exppara.2016.09.002](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.002).2016. Acesso em: 1 out. 2020.

MATSUBARA, T. C. M. **Estudo sobre a determinação de antimônio em amostras ambientais pelo método de análise por ativação de nêutrons. Validação da metodologia e determinação da incerteza de medição.** 146 f. 2011. (Dissertação) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2011.

MAIA, J. A.; MONTE, M. G. ADVERSE REACTIONS OF N-METHYLGLUCAMINE PRESENTED DURING THE. **Dê ciência em foco**, v. 3, n. 1, p. 54–64. 2019.

MARZOCHI, Mauro Célio de A.; MARZOCHI, Keyla Belízia F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 10, supl. 2, p. S359-S375, 1994. DOI: 10.1590/S0102-311X1994000800014. Acesso em: 1 out. 2020.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. No 3, Maio, 2001.

MENEZES, J. P. B.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. O. A.; FRAGA D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2015. DOI: 10.1155/2015/815023. Acesso em: 1 out. 2020.

MIRANDA, L.F.C. **Sensibilidade ao Antimonial Pentavalente in vitro de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica**. Dissertação (Mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas), 2011.

MONTEIRO, C. M. C. C. **Leishmaniose Tegumentar Americana: uma abordagem farmacológica**.(Dissertação) - Desenvolvimento em tecnologia Farmacéutica, Goiânia. Goiás. 2009.

NAIFF, R.D.; FREITA, R. A.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R.; BARRER, T. V.; HOMEM, H.; GRIMALDI JUNIOR, G. Epidemiological and nosological aspects of **leishmania naiffi** lainsou e shaw 1989. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V 86(3). 1991. DOI: 10.1590/S0074-02761991000300006. Acesso em: 1 out. 2020.

NASCIUTTI, P. R. Desenvolvimento De Novos Fármacos. 2012.

NEVES, D. P. *Parasitologia dinâmica*. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055. Acesso em: 1 out. 2020.

NII-TREBI, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/5245021. Acesso em: 1 out. 2020.

OMS – **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE**. Report of the Fifth Consultative ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2012. <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en>. Acesso em: 1 out. 2020.

.

OMS/OPAS – **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION**. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis, nº 8, 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51738>. Acesso em: 1 out. 2020.

OURIVES-NEVES, L. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimonio de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, 86(6):1092-101. 2011. DOI: 10.1590/S0365-. Acesso em: 1 out. 2020.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEE, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. **Phytotherapeutic Res.** 29:323–331, 2015. DOI: 10.1002/ptr.5256. Acesso em: 1 out. 2020.

PEREIRA, L. I. D. A. **Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar Americana**. 103 f (Tese) - Medicina Tropical em Saúde Pública, Goiânia. Goiás. 2012.

PIVA, H. M. T. **Caracterização da Interação dos Flavonoides Hesperidina e Hesperetina com a Proteína M2-1 do Vírus Sincicial Respiratório Humano**. 70 f. 2019. (Tese) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2019.

RANGEL, E.; LAINSON, Ralph. *Flebotomíneos do Brasil*. (org.). Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003. 368 pp.

RATH, S. TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003. DOI: 10.1590/S0100-40422003000400018. Acesso em: 1 out. 2020.

RIBEIRO - GOMES, F.L; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Cellular and infection microbiology**, v. 2.2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00059. Acesso em: 1 out. 2020.

RODRIGUES, B. C. **estudo de coorte retrospectivo comparativo sobre o uso da nmetilglucamina intralesional e sistêmica no tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana com predominância de *L. (V.) Braziliensis***. 81 f. 2020. (Dissertação). Universidade de Brasília, Brasília. 2020.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 60(2), 54-57. 2008.

ROZ, A. L.; LEITE, F. L.; FERREIRA, M.; JUNIOR, O. N. O. *Nanoestruturas princípios e aplicações*. Editora Elsevier, 1 ed. Rio de Janeiro. 2015.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061296. Acesso em: 1 out. 2020.

SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAISSI, A., LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes.

Antimicrob Agents Chemother, v. 45 (7), p. 2064-9, 2001. DOI: 10.1128/AAC.45.7.2064-2069.2001. Acesso em: 1 out. 2020.

SIEFERT, A.L., EHRLICH, A., CORRAL, M.J., GOLDSMITH-PESTANA, K., MCMAHON-PRATT, D., FAHMY, T.M. Immunomodulatory nanoparticles ameliorate disease in the *Leishmania (Viannia) panamensis* mouse model. **Biomaterials** 108, 168–176. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.004. Acesso em: 1 out. 2020.

SILVAa, L. D. A. **Reposicionamento in silico de fármacos para doenças negligenciadas com ênfase no metabolismo energético de *Leishmania* spp e apicoplasto de *Plasmodium falciparum***. 97 f. 2015.(Tese) Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015.

SILVAb, G.C. **Estratégias em reposicionamento de fármacos**. 76 f. 2015.(Tese) Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

SILVA-JUNIOR, I. A. S. **Avaliação da metaciclologênese in vitro de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis***. 2013 (Dissertação) Universidade Federal de Goiás, 2013.

SIQUEIRA, G. R. **Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos dos elementos pnictogênicos Sb(III) e Bi(III) com ligantes ditiois multifuncionais**. 123 f. 2013. (Dissertação) Universidade Federal de Minas Geral, Belo Horizonte. 2013.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americanana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina** .V.22 (1), 2008.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2017**. [Internet]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/LT-Casos.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2018.

SINGH, O. M. P.; SINGH, B; CHAKRAVARTY, J; SUNDAR, S. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty** 5:19, 2016. DOI: 10.1186/s40249-016-0112-2. Acesso em: 1 out. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L., et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**. 130(1): 7-12, jan., 2004. DOI: 10.1016/s0021-9975(03)00063-x. Acesso em: 1 out. 2020.

SOUZA, A; MARINS, D. S. S. MATHIAS, S. L. MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LODENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.018. Acesso em: 1 out. 2020.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2028-5. Acesso em: 1 out. 2020.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**. 16(2):237-52, 2015. DOI: 10.1517/14656566.2015.973850. Acesso em: 1 out. 2020.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017. DOI: 10.1098/rsob.170165. . Acesso em: 1 out. 2020.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania, Fundação CECIERJ. 1 ED. Rio de Janeiro. 2013.

TELLA, M.; POKROVSKI, G.S. Antimony(III) complexing with O-bearing organic ligands in aqueous solution: An X-ray absorption fine structure spectroscopy and solubility study. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 73(2): p. 268-290.2009.

THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies**, 2004.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da related to the origin, expansion and etiology . **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, 2005.DOI: 10.1590/S0365-05962005000400015. Acesso em: 1 out. 2020.

VASCONCELOS, J. M; OMES, C. G.; SOUSA, A.; LIMA, J. M. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800722. Acesso em: 1 out. 2020.

VILLA, M.F.L. **New pharmacological strategy based in nanotechnology against cutaneous leishmaniasis in Ecuador**. Tesis de grado (Magister en Microbiología) Universidad San Francisco de Quito. 2010.

WYREPKOWSKI, C.D.C., et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta. Amazônica**, v. 47, (4), 2017. DOI: 10.1590/1809-4392201700871. Acesso em: 1 out. 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea (2013). Disponível em http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em: 1 out. 2020

YAMEY, G.; BARSOM,A.; KILMARX, P. H.;YOTEBIENG, M. Funding innovation in neglected diseases. **BMJ** (Online), v. 360, n. March, p. 1–2, 2018. DOI: 10.1136/bmj.k1182. Acesso em: 1 out. 2020

ANEXO - A

03/06/2020



INPA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARQUE NACIONAL DE MCTI

SELMCTI - 5744995 - Parecer Técnico



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade antileishmaniana de nanopartículas de antimônio pentavalente e da hesperidina *in vitro* e *in vivo*, e estudo de formulação tópica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana", registrada com o nº 029/2020, SEI 01280.000999/2020-11, sob a responsabilidade de Anny Maiza Vargas Brasil - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 27/07/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 01/10/2020 a Final: 31/03/2022
Espécie/inhagem/raça:	<i>Mus musculus</i> / Balb C e <i>Mesocricetus auratus</i> / Golden
Número de animais:	100 <i>Mus musculus</i> e 384 <i>Mesocricetus auratus</i>
Peso/idade:	<i>Mus musculus</i> 15g / 12 semanas e <i>Mesocricetus auratus</i> 100g / 12 semanas
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério Central do INPA
Jejum:	Não
Inoculação:	Leishmania (<i>Leishmania</i>) amazonensis, Leishmania (<i>Viannia</i>) guyanensis e Leishmania (<i>Viannia</i>) braziliensis; Nanopartículas de antimônio pentavalente; Hesperidina; Antimoniato meglumina - Glucantime; Salina estéril

Data de liberação do Parecer: 30.07.2020



Documento assinado eletronicamente por Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia, em 30/07/2020, às 22:45 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador 5744995 e o código CRC 349ECF86.

Referência: Processo nº 01280.000999/2020-11

SEI-INPA nº 5744995

http://sei.mctic.gov.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=6461174&info_xslt... 1/1