

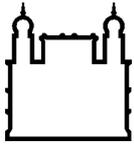
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EFEITO DA 2'-HIDROXIFLAVANONA EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA RESISTENTE AO ANTIMÔNIO,
TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA

LUIZA GERVAZONI FERREIRA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Maio de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

Efeito da 2'-hidroxiflavanona em modelo murino de leishmaniose cutânea resistente ao antimônio, toxicidade e farmacocinética.

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador (es): Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral
Prof. Dr. Edezio Ferreira da Cunha Júnior

RIO DE JANEIRO

Maio de 2021

Gervazoni Ferreira de Oliveira, Luiza .

EFEITO DA 2'-HIDROXIFLAVANONA EM MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA RESISTENTE AO ANTIMÔNIO, TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA / Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2021.

128 f.; il.

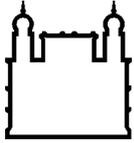
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

Co-orientador: Edezio Ferreira da Cunha Júnior.

Bibliografia: f. 98-110

1. Leishmaniose. 2. Flavonoides. 3. Resistência. 4. Farmacocinética. 5. Toxicologia. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LUIZA GERVAZONI FERREIRA DE OLIVEIRA

EFEITO DA 2'-HIDROXIFLAVANONA EM MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA RESISTENTE AO ANTIMÔNIO, TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral
Prof. Dr. Edézio Ferreira da Cunha Júnior**

Aprovada em: 27 / 05 / 2021

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Paula Mello De Luca (IOC/FIOCRUZ) - Presidente
Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro (CDTS/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Bartira Rossi Bergmann (UFRJ)
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Suzana Guimarães Leitão (UFRJ)

Rio de Janeiro, 27 de maio de 2021

Ao meu pai que, mesmo não estando mais nesse plano, estará sempre comigo. "I carry your heart. I carry you in my heart" (adpt E.E. Cummings). Ao Carlos Araújo, nosso Carlitos, o amigo das conversas científicas e ideias mais loucas. Um cientista brilhante que nos deixou de maneira prematura. Essa tese é dedicada aos dois, com muito carinho e saudade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo incentivo de uma vida dedicada aos estudos. Por todo o sacrifício de uma vida para que eu tivesse as oportunidades que vocês não tiveram. Pela semente que plantaram em mim me fazendo entender que a educação é o caminho libertador. A minha mãe que, nos últimos 6 anos, mesmo com todas as dificuldades, me apoiou e me incentivou, me permitindo seguir meu sonho acadêmico.

Agradeço infinitamente aos membros da banca pela honra de poder aprender com cada sugestão e correção que possam trazer à tese. A Dra. Paula Mello De Luca, meu carinho e agradecimento pela revisão minuciosa da tese, pelas dicas e correções e por estar acompanhando minha vida acadêmica desde o mestrado, futuramente se tornando uma colaboradora caso saia a bolsa de Pós Doc.

Agradeço também a pós-graduação pela paciência e pelo apoio nesses 5 anos. Em especial à Rita, a quem tanto perturbei e sempre estive de prontidão para me ajudar nos questionamentos.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPERJ e IOC/FIOCRUZ que foram essenciais para a realização desta tese.

A toda equipe do biotério do pavilhão 26 cujo passei alguns anos do doutorado frequentando diariamente. Por sempre me tratarem com carinho, me deixarem à vontade e me ensinarem a rotina para que eu pudesse trabalhar sem atrapalhar o funcionamento. Em especial, agradeço as veterinárias Isabel e Mônica pelos ensinamentos de técnicas e pelo auxílio nas coletas.

A toda equipe do SEFAR que nos acolheu e auxiliou na parte de farmacocinética da tese, agregando toda expertise e aparelhagem, dando robustez a esta etapa. Ao Douglas, Aline e Gabriel por todas as reuniões de planejamento onde decidimos os próximos passos, discutimos os resultados e aprendemos com vocês um pouco mais desse campo.

Ao Dr. Marcelo Pelajo por abrir as portas de seu laboratório (LabPat) para que eu pudesse aprender e realizar as análises histológicas da tese. A Dra. Jackline Ayres por todos ensinamentos, coletas, pela revisão da parte histológica e paciência nas manhãs de análises das lâminas, sempre me mostrando os destaques e as

diferenças para que entendesse o que estava observando. Ao João por ter me ensinado na prática desde a fixação, emblocamento, corte até a coloração de todo o material. Por ter sido um bom ouvinte dos meus casos e por ter me ensinado tanto sobre tantas coisas da vida.

As amigas Alessandra, Erika, Iane e Nathalia, por dividirem essa jornada desde 2009.2 comigo. Nenhuma distância física será grande o suficiente para desfazer os laços dessa amizade. Obrigada por todo amor, companheirismo, apoio e vídeo-chamadas de fofocas dentro do fuso horário complicado de cada uma. A Nat em particular, agradeço pelas sessões remotas de Yoga com belas risadas, conversas e incentivo nas pedaladas que me fizeram mais leve nos tempos difíceis.

Agradeço também a Ingrid e Maria Fernanda por serem minha sanidade mental no meio dessa pandemia. Já são 20 anos de uma amizade de outras vidas. De sempre, para sempre!

Aos meus companheiros de laboratório, agradeço por terem me aturado esses anos todos cantando nos seus ouvidos, fazendo paródias, reclamando da bagunça do lab e colocando todos para arrumarem os armários. Vocês tornaram esses 11 anos de LBqT divertidos e me fizeram sentir em casa.

A Gabriella e a Taiana por terem sido meu braço direito nesses anos todos. Vocês moraram no biotério comigo, me ajudaram nos experimentos mais difíceis e demorados, me deram apoio quando eu mais precisei e o principal, cultivaram uma amizade fora do lab que vamos levar para vida toda.

As Dras. Leonor Leon e Marilene Cavalheiro, chefes eméritas do LBqT que eu tive o prazer de conviver e conhecer um pouco da história. Fizeram parte da minha vida no laboratório, sempre com elogios, críticas construtivas e muito carinho. Levarei para sempre o exemplo de ambas e me sinto muito honrada.

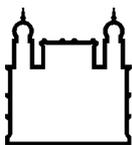
Ao Dr. Caio, chefe atual do LBqT, por ter feito parte da minha vida acadêmica desde que eu entrei, me auxiliando nos estudos, sempre à disposição para dúvidas e conselhos científicos. Obrigada pelo carinho de sempre.

Aos meus orientadores, Elmo e Edézio. Sou muito grata e muito honrada de dizer que fui aluna de vocês. Vocês são exemplos dentro e fora do lab para mim. Nesses 11 anos, tive como exemplo diário a humildade de ambos, o conhecimento e a

disponibilidade de ensinar a qualquer hora que fosse necessário. Se eu carregar um pouco que seja de vocês dois, eu serei eternamente grata, pois passarei uma bela mensagem aos meus alunos futuros. Obrigada pelo apoio e pela confiança depositada em mim. Por terem me acolhido e me dado abertura para discutir e opinar em tudo e principalmente pela autonomia na escrita e experimentos que tanto me fez amadurecer.

Acredito que nessa vida nós não podemos ignorar as chances concedidas. Cada pessoa que passa por nós tem o potencial de nos deixar um ensinamento. Nesses 11 anos, estive rodeada e pude aprender com cada um de vocês, mesmo sem perceber. Fiz do LBqT um porto seguro e amei e amo o laboratório como se fosse minha casa. Encerro mais um ciclo muito feliz da minha vida, com altos e baixos inerentes que transformaram a Luiza de 18 anos, jovem e cheia de esperanças na Luiza de 29 anos, repleta de belos ensinamentos que espero poder passar adiante.

Governos passam. A ciência é para sempre.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

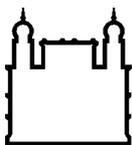
Efeito da 2'-hidroxiflavanona em modelo murino de leishmaniose cutânea resistente ao antimônio, toxicidade e farmacocinética

RESUMO

TESE DE DOUTORADO em Biologia Parasitária

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

As leishmanioses merecem atenção, devido à grande variedade de manifestações clínicas associadas e a sua elevada incidência anual. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem por ano, cerca de 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 30 mil casos de leishmaniose visceral no mundo, entre eles, 20 mil chegam a óbito. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais difundida pelo mundo. Mesmo não levando ao óbito, a LC é considerada um risco uma vez que as lesões provocadas podem ser incapacitantes e causar problemas psicológicos devido ao estigma social. O Brasil é o país que concentra mais casos de leishmaniose dentro da América latina, chegando a 87% de casos para LC e 97% de LV. O tratamento atual para a leishmaniose visceral, apresenta alguns problemas como, falha terapêutica, alta toxicidade e o alto custo, além do surgimento de casos de resistência em diversas partes do mundo. Dentre a busca por novas alternativas no combate desta doença, estão o reposicionamento, a associação de fármacos e a busca por novos medicamentos a partir de fontes naturais. Estudos demonstram o efeito leishmanicida de flavonoides, uma classe de metabólitos secundárias presentes em plantas que possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória descritas em diversas doenças. A 2'-hidroxiflavanona, é uma flavanona, atualmente conhecida por sua atividade em células tumorais. Neste estudo, avaliou-se o efeito da 2HF *in vitro* e *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea resistente ao antimônio, bem como a toxicidade e farmacocinética da 2HF em modelo murino. No ensaio anti-amastigota, a 2HF foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente amastigotas resistentes ao antimônio, com um IC₅₀ de 3,63 µM muito similar ao IC₅₀ obtido para amastigotas sensíveis, 3,09 µM, com índices de seletividade de 26,2 e 28,5 respectivamente. No estudo *in vivo*, a 2HF demonstrou ser capaz de diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária de camundongos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao antimônio não demonstrando toxicidade. No estudo pré-clínico de toxicidade aguda e subaguda, a 2HF se mostrou segura, não demonstrando mortalidade e alterações no ganho de peso e consumo de água e ração. Pequenas alterações bioquímicas e histopatológicas são observadas, destacando principalmente possíveis efeitos renais e hepáticos. Porém, a estrutura dos órgãos permanece preservada e camundongos do controle demonstram alterações basais. Um método analítico seletivo e sensível foi desenvolvido para detecção e quantificação da 2HF por LC-MS/MS. Este método foi validado demonstrando estar de acordo com os parâmetros propostos pela RDC nº 27 da ANVISA, determinando a seletividade, linearidade, estabilidade, efeito matriz, precisão e acurácia do método. Para determinação do perfil farmacocinético, camundongos BALB/c receberam uma dose única de 2HF e foi realizada a coleta de sangue total via plexo orbital em diferentes tempos. As amostras obtidas foram processadas e analisadas utilizando o método validado, determinando assim a curva de concentração plasmática x tempo da 2HF. A partir de modelo matemático não compartimental, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos da 2HF. A 2HF demonstrou um T_{máx} de 5 minutos e um T_½ de 97,52 minutos. A C_{máx} da 2HF foi de 185,86 ng/mL. Outros fatores como Asc_{0-t}, ASC-inf, Ke e Vd/F foram calculados, apresentando valores de 5120,98 min*ng/mL, 5524,54 min*ng/mL, 0,00711 1/min e 5093,53 mL, respectivamente. Juntos, estes resultados pontuam a 2HF como possível alternativa para ao tratamento da Leishmaniose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

2'-hydroxyflavanone effects in a murine model of antimony-resistant cutaneous leishmaniasis, toxicity and pharmacokinetics

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITIC BIOLOGY

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

Leishmaniasis deserves attention, due to the wide variety of associated clinical manifestations and their high annual incidence. According to the World Health Organization (WHO), about 1 million cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and 30,000 cases of visceral leishmaniasis (VL) occur worldwide each year, among them, 20,000 reach death. Cutaneous leishmaniasis (LC) is the most widespread clinical form in the world. Even without leading to death, CL is considered a risk since the injuries caused can be disabling and cause psychological problems due to social stigma. Brazil is the country that concentrates more cases of leishmaniasis within Latin America, reaching 87% of cases for CL and 97% of VL. The current treatment for visceral leishmaniasis has some problems, such as therapeutic failure, high toxicity and high cost, in addition to the emergence of resistance cases in different parts of the world. Among the search for new alternatives to fight this disease, there are the repositioning, the drug combination and the search for new medicines from natural sources. Studies demonstrate the leishmanicidal effect of flavonoids, a class of secondary metabolites present in plants that have antioxidant and anti-inflammatory activity described in several diseases. 2'-hydroxyflavanone, is a flavanone, currently known for its activity in tumor cells. In this study, the effect of 2HF *in vitro* and *in vivo* in an antimony-resistant cutaneous leishmaniasis model was evaluated, as well as the toxicity and pharmacokinetics of 2HF in a murine model. In the anti-amastigote assay, 2HF was able to inhibit antimony-resistant amastigotes in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} of 3.63 μ M very similar to the IC_{50} obtained for sensitive amastigotes, 3.09 μ M, with selectivity indexes of 26.2 and 28.5 respectively. In the *in vivo* study, 2HF was shown to be able to decrease the lesion size and the parasitic burden of mice infected with *L. amazonensis* antimony-resistant promastigotes without demonstrating toxicity. In the preclinical study of acute and subacute toxicity, 2HF proved to be safe, showing no mortality and changes in weight gain and consumption of water and food. Small biochemical and histopathological changes were observed, highlighting mainly possible renal and hepatic effects. However, the organ structure remains preserved and control mice demonstrated baseline changes. A LC-MS/MS selective and sensitive analytical method was developed for 2HF detection and quantification. This method was validated demonstrating to be in accordance with the parameters proposed by ANVISA's RDC No. 27, determining the selectivity, linearity, stability, matrix effect, precision and accuracy of the method. To determine the pharmacokinetic profile, BALB/c mice received a single dose of 2HF and the collection of whole blood via the orbital plexus was performed at different times. The samples obtained were processed and analyzed using the validated method, thus determining the plasma concentration x time curve of the 2HF. 2HF pharmacokinetic parameters were calculated from a non-compartmental mathematical model. 2HF demonstrated a T_{max} of 5 minutes and a $T_{1/2}$ of 97.52 minutes. The C_{max} of 2HF was 185.86 ng / mL. Other factors such as Asc_0-t , $ASC-inf$, K_e and V_d / F were calculated, with values of 5120.98 min * ng / mL, 5524.54 min * ng / mL, 0.00711 1 / min and 5093.53 mL, respectively. Together, these results point to 2HF as a possible alternative for the treatment of Leishmaniasis.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças negligenciadas	1
1.2 Leishmaniose	4
1.2.1 Histórico.....	4
1.2.2 Agente etiológico, transmissão e ciclo biológico.....	7
1.2.3 Manifestações clínicas.....	13
1.2.4 Epidemiologia.....	22
1.2.5 Tratamento.....	27
1.3 Desenvolvimento de fármacos e os produtos naturais	32
1.3.1 Flavonoides.....	36
1.4 Justificativa	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Fármacos e reagentes	41
3.2 Parasitas	41
3.3 Animais	41
3.4 Efeito da 2HF em leishmania sensível e resistente ao antimônio	42
3.4.1 Atividade <i>in vitro</i>	42
3.4.2 Citotoxicidade da 2HF em macrófagos murinos.....	42
3.4.3 Atividade <i>in vivo</i>	43
3.5 Avaliação da toxicidade de 2HF em modelo roedor	44
3.5.1 Toxicidade aguda (método up and down).....	44
3.5.2 Toxicidade subaguda.....	45
3.5.3 Parâmetros clínicos.....	45
3.5.4 Parâmetros bioquímicos.....	45
3.5.5 Análises histológicas.....	46

3.6	Desenvolvimento e validação do método de detecção da 2HF por LC-MS/MS	47
3.6.1	Desenvolvimento do método bioanalítico	47
3.6.2	Validação do método	49
3.7	Determinação do Perfil farmacocinético da 2HF	51
3.7.1	Protocolo de dosagem	51
3.7.2	Coleta de amostras	51
3.7.3	Obtenção e cálculo dos parâmetros farmacocinéticos	51
3.8	Cálculos e análises estatísticas	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Efeito da 2HF em leishmania sensível e resistente ao antimônio	53
4.1.1	Atividade <i>in vitro</i>	53
4.1.2	Atividade <i>in vivo</i>	56
4.2	Avaliação da toxicidade da 2HF em modelo murino	60
4.2.1	Toxicidade aguda	60
4.2.2	Toxicidade subaguda	64
4.3	Desenvolvimento do método, validação e determinação do perfil farmacocinético da 2HF	75
5	DISCUSSÃO	88
6	PERSPECTIVAS	96
7	CONCLUSÕES	97
8	REFERÊNCIAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 General Sir William Boog Leishman e Major Charles Donovan.....	6
Figura 1.2 Taxonomia de Leishmania.....	8
Figura 1.3 Formas evolutivas de Leishmania.....	10
Figura 1.4 Vetores da leishmaniose.....	11
Figura 1.5 Ciclo biológico da leishmaniose.....	13
Figura 1.6 Leishmaniose cutânea localizada (LCL).....	15
Figura 1.7 Leishmaniose cutânea-difusa (LCD).....	16
Figura 1.8 Leishmaniose cutânea disseminada (LD).....	17
Figura 1.9 Leishmaniose recidiva-cútis (LRC).....	18
Figura 1.10 Leishmaniose mucocutânea.....	19
Figura 1.11 Leishmaniose Visceral.....	20
Figura 1.12 Leishmaniose dérmica pós-calazar.....	21
Figura 1.13 Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo.....	23
Figura 1.14 Endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo.....	23
Figura 1.15 Número de novos casos mundiais de LC (a) e LV (b) por região no ano de 2015.....	24
Figura 1.16 Casos de Leishmaniose visceral (LV) por UF de infecção no ano de 2019.	25
Figura 1.17 Casos de Leishmaniose tegumentar por UF de infecção no ano de 2019..	25
Figura 1.18 Distribuição mundial de casos de co-infecção Leishmania/HIV.	26
Figura 1.19 Estrutura básica dos flavonóides e seus subgrupos.....	37
Figura 1.20 Estrutura química da 2'-hidroxiflavanona.....	38
Figura 4.1 Efeitos da 2HF e antimoniato de meglumina sobre macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> sensível e resistente.....	54
Figura 4.2 Fotomicrografias ilustrativas do efeito de 2HF em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> sensível e resistente.....	55
Figura 4.3 Citotoxicidade da 2HF em macrófagos peritoneais murinos.....	56
Figura 4.4 Efeito <i>in vivo</i> de 2HF e antimoniato de meglumina em camundongos infectados por <i>L. amazonensis</i> sensível e resistente ao antimônio.....	57
Figura 4.5 Confirmação da resistência em promastigotas recuperadas de lesão.....	59
Figura 4.6 Toxicidade aguda da 2'-hidroxiflavanona: avaliação de peso corporal e consumo de água e ração.....	61
Figura 4.7 Toxicidade subaguda da 2'-hidroxiflavanona.....	65
Figura 4.8 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do coração.....	69
Figura 4.9 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do fígado.....	70
Figura 4.10 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do pulmão.....	72

Figura 4.11 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do baço.....	73
Figura 4.12 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do rim.....	74
Figura 4.13 Espectro de massas representativo da detecção e o perfil de fragmentação da 2HF (A) e do PI (B).....	76
Figura 4.14 Cromatogramas representativos do tempo de retenção da 2HF (A) e PI (B).....	77
Figura 4.15 Relação entre a razão das áreas de 2HF e PI por concentração.....	79
Figura 4.16 Linearidade da 2HF. Representação dos valores da curva de calibração com os coeficientes com a ponderação escolhida (modelo $1/x^2$).....	80
Figura 4.17 Perfil farmacocinético da 2HF. Concentração média x tempo.....	85
Figura 4.18 Espectro de massas da 2HF por espectrometria de tempo de voo.....	86
Figura 5.1 Possível metabólito da 2HF.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Doenças tropicais negligenciadas.....	1
Tabela 1.2 Espécies causadoras das formas clínicas das Leishmanioses e sua distribuição.....	14
Tabela 3.1 Condições cromatográficas.....	48
Tabela 3.2 Condições do espectrômetro de massas.....	48
Tabela 3.3 Parâmetros individuais dos íons (MRM).....	48
Tabela 4.1 Comparativo de IC50 obtidos por 2HF e antimoniato de meglumina em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> sensível e resistente ao antimônio.....	54
Tabela 4.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	58
Tabela 4.3 Comparativo de IC50 do antimonial (SBIII) sobre promastigotas recuperadas de lesão <i>in vivo</i>	60
Tabela 4.4 Toxicidade aguda da 2HF: peso relativo dos órgãos.....	62
Tabela 4.5 Toxicidade aguda da 2HF: parâmetros clínicos e mortalidade.....	62
Tabela 4.6 Toxicidade aguda da 2HF: parâmetros bioquímicos.....	63
Tabela 4.7 Toxicidade subaguda da 2HF: peso relativo dos órgãos (M).....	66
Tabela 4.8 Toxicidade subaguda da 2HF: peso relativo dos órgãos (F).....	66
Tabela 4.9 Toxicidade subaguda da 2HF: parâmetros clínicos.....	67
Tabela 4.10 Toxicidade subaguda da 2HF: parâmetros bioquímicos (M).....	67
Tabela 4.11 Toxicidade subaguda de 2HF: parâmetros bioquímico (F).....	68
Tabela 4.12 Teste de seletividade da 2HF.....	78
Tabela 4.13 Teste de efeito residual da 2HF.....	79
Tabela 4.14 Precisão e exatidão intra-dia de 2HF.....	81
Tabela 4.15 Precisão e exatidão intercorridas (inter dias) da 2HF.....	82
Tabela 4.16 Cálculo do efeito matriz normalizado pelo PI.....	83
Tabela 4.17 Registros de temperatura dos ciclos de congelamento e descongelamento da 2HF.....	84
Tabela 4.18 Curva de calibração da 2HF após ciclo de congelamento e descongelamento.....	84
Tabela 4.19 Parâmetros farmacocinéticos da 2HF.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2HF – 2'-hiroxiflavanona

a.C. – Antes de Cristo

ADP – Adenosina difosfato

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agencia nacional de vigilância sanitária

AQP1 – Aquaporina 1

ATP – Adenosina trifosfato

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

CC50 – Concentração que mata 50% das células

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

COBEA – Conselho brasileiro de experimentação animal

CV – Coeficiente de variância

DMSO – Dimetilsulfoxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNDi – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas

DTNS – Doenças tropicais negligenciadas

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELL – Extração liquido-liquido

EPR – Erro padrão relativo

ER – Erro relativo

ESI- Eletronebulização negativa

FDA – Foods and Drugs administration

G-FINDER - Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPLC – Cromatografia liquida de alta resolução

IC₅₀ – Concentração testada que inibe 50%

ISG – Iniciativa de saúde global

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LC-MS/MS – Cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série

LD – Leishmaniose disseminada
LDA – Diluição limitante
LDPC – Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LRC – Leishmaniose recidiva cútis
LV – Leishmaniose visceral
MRM – Monitoramento de reações múltiplas
MSF – Médicos sem fronteiras
ODM – Objetivos do milênio
OECD – Organização para cooperação e desenvolvimento econômico
OMS – Organização mundial da saúde.
ONU – Organização das nações unidas
PAHO – Organização pan-americana de saúde
PBS – Tampão fosfato-salino
PI – Padrão interno
PNUD – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento.
PRL – Programa Regional para Leishmaniose
RDC – Resolução da diretoria colegiada
RNA – Ácido ribonucleico
Sb³⁺ – Antimônio trivalente
SFB – Soro fetal bovino
SUS – Sistema Único de Saúde
TDR – Programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais
TOF – Tempo de voo
UNICEF – Fundo das nações unidas para infância

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças negligenciadas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) formam o grupo denominado de doenças tropicais negligenciadas (DTNs), doenças transmissíveis, prevalentes em clima tropical e subtropical, predominantes em 149 países que afetam, majoritariamente, populações residentes de áreas rurais ou zonas de conflito de países em desenvolvimento, sobreviventes em meio à pobreza e carência de saneamento básico (WHO, 2020). São 20 doenças consideradas atualmente DTNs pela OMS, sendo estas: malária, tuberculose, doença de Chagas, tripanosomíase humana africana (conhecida popularmente como doença do sono), leishmaniose, dengue, chikungunya, raiva, hanseníase entre outras (Tabela 1.1)

Tabela 1.1 Doenças tropicais negligenciadas

Grupo causador	Doença
Protozoários	Tripanosomíase africana
	Doença de chagas
	Leishmaniose
Helmintos	Teníase/Cisticercose
	Dracunculíase
	Equinococose
	Trematodioses de origem alimentar
	Filariose linfática
	Oncocercose
	Esquistossomose
Geohelmintoses	
Vírus	Dengue/Chikungunya
	Raiva
Bactéria	Úlcera de Buruli
	Cólera
	Hanseníase/Lepra
	Leptospirose
Tracoma	
Fungos	Mycetoma/Cromoblastomicoses/Micoses profundas
Ectoparasitas	Escabiose

Segundo Gavin Yamey, professor de saúde global e políticas públicas, as DTNs, fazendo jus ao nome negligenciadas, são incapazes por si só de atrair investimentos da indústria farmacêutica, fazendo-se necessário a junção de investimento público, privado e filantrópico (Yamey *et al.* 2018). Essa necessidade se evidencia na revisão sistemática de Pedrique *et al.* (2013) entre os anos 2000 e 2011, na qual destacou-se que, dentre os 850 novos produtos terapêuticos aprovados, somente 37 (4%) foram destinados às DTNs, sendo 25 deles produtos já conhecidos, porém com nova indicação ou formulação. Considerando as novas entidades químicas – de acordo com o FDA, um medicamento cuja parte ativa não tenha sido aprovada para outro uso – apenas 1% foram aprovadas durante este período, porcentagens bem abaixo do que é esperado e desenvolvido para outras doenças (Pedrique *et al.* 2013).

Em uma pesquisa mais atualizada, de 2019, dados mostram que entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, apenas 8 dos 256 novos fármacos aprovados foram designados para DTNs (Ferreira & Andricopulo 2019). O autor correlaciona ainda o aumento da porcentagem de novas entidades químicas entre o estudo de 2000 a 2011 e o de 2012 a 2018. Entretanto, esse aumento parece direcionado para doenças específicas, como a malária, e não para as DTNs como um todo, permanecendo o alerta da necessidade de um esforço contínuo nessa área.

Alinhando-se a ideia da necessidade de investimentos, organizações foram criadas ao longo das últimas décadas no intuito de aumentar a visibilidade das DTNs e angariar fundos para as mesmas. As Iniciativas em Saúde Global (ISGs) são programas, organizações ou parcerias, governamentais ou não, criadas com intuito de acelerar o desenvolvimento científico-tecnológico e solucionar os problemas enfrentados pelos países afetados pelas DTNs (Zicker *et al.* 2015).

Considerado uma das iniciativas pioneiras, o Programa Especial de Investigação e Capacitação no Domínio das Doenças Tropicais (Training in Tropical Diseases – TDR), foi criado em 1975 em uma parceria entre a UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento) e Banco Mundial e administrado pela OMS. Seguindo o exemplo, outras ISGs de grande importância como a Fundação Bill e Melinda Gates, a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), dentre outras foram criadas ou redirecionaram projetos contemplando as DTNs.

Ainda nesse contexto, a Organização das Nações Unidas (ONU), dando continuidade aos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODMs), criou a Agenda

30. Os ODMs consistiam em 8 objetivos a serem realizados entre os anos de 2000 e 2015, dentre eles a interrupção da disseminação do HIV/AIDS, redução da pobreza extrema e educação primária universal (United Nations, 2000). Em 2012, a ONU realizou a conferência RIO +20, sediada no Brasil, onde o compromisso com os ODMs foi reafirmado e a discussão de mais objetivos foi iniciada. Como resultado, em 2015 a ONU então determinou 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS), baseados nos 8 ODMs, e 169 metas globais para o ano de 2030, assim denominando de Agenda 30 (United Nations, 2012, 2015a; PAHO, 2020). Dentre os objetivos estão a erradicação da pobreza e diminuição das desigualdades, além da erradicação ou controle de doenças - dentre elas as DTNs - que contribuam para desigualdade social e estejam presentes em áreas em que se tenha pouco ou nenhum acesso aos serviços de saúde (Zicker *et al.* 2018).

Segundo relatórios anuais do Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas, o G-FINDER, o financiamento global para pesquisa básica e desenvolvimento de produtos para DTNs tem batido recordes a cada ano. Em 2018, 262 organizações foram capazes de cobrir o investimento necessário para 36 doenças consideradas negligenciadas (além das 20 determinadas pela OMS), entre fármacos, vacinas, produtos de controle vetorial entre outros (G-FINDER, 2018). Contudo, os investimentos continuam direcionados, como em anos anteriores, para HIV/AIDS, Tuberculose e Malária. Assim como a discussão mencionada acima de Ferreira e Andricopulo (2019), o relatório do G-FINDER também demonstra a disparidade entre o investimento para as doenças negligenciadas. Usando ainda o relatório referente ao ano de 2018 como base, enquanto o HIV/AIDS teve um total de 1,45 bilhão de dólares investido, compondo 36% do investimento total para DTNs computado para o relatório, doenças causadas por parasitos da ordem trypanosomatida tiveram um aporte de apenas 149 milhões de dólares, somente 4% do total investido. Dentre as doenças causadas por estes parasitos, temos a Leishmaniose, definida pela OMS como um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem pela picada do inseto vetor, flebotomíneo (WHO, 2020).

1.2 Leishmaniose

1.2.1 Histórico

Embora o termo *Leishmania* tenha surgido somente em 1903, existem relatos da doença datados de 2500 a.C. O DNA mitocondrial de *Leishmania donovani* foi encontrado em 4 antigas múmias egípcias na região da Núbia em 1500 a.C (Zink *et al.* 2006). Em antigas escrituras egípcias, são encontradas descrições do que foi traduzido para o inglês como “Nile pimple” (em tradução literal para o português, espinha do Nilo). O termo se refere a possíveis lesões causadas pela forma cutânea da Leishmaniose (Maspero, 1910).

A partir da idade média, no norte do Afeganistão, relatos de um médico e filósofo Perso sobre a denominada úlcera de Balakh, sugerem lesões de pele causadas por *L. tropica* (Manson-Bahr, 1996). Por volta do século V, cerâmicas pré-colombianas retratavam sequelas faciais características da Leishmaniose cutânea mucosa (Steverding, 2017). Em 2009, foram encontrados 4 crânios femininos na região de São Pedro do Atacama, Chile. Datados do século XI, continham lesões altamente destrutivas nas regiões do nariz e boca, sugerindo infecções por *Leishmania*, o que foi confirmado em análise molecular, onde fragmentos de DNA de *Leishmania* foram encontrados (Costa *et al.* 2009).

Ao longo dos séculos, diversas descrições de lesões cutâneas similares à infecção por *Leishmania* foram feitas e diferentes termos foram usados para denominá-las. O termo uta foi utilizado por índios peruanos na América enquanto botão do oriente, era usado em países da região do Mediterrâneo (Lainson, 2010). Embora haja uma extensa lista de descrições de lesões similares à forma cutânea da Leishmaniose, segundo Steverding (2017), não há relatos convincentes da forma visceral da doença antes do século 19. Em 1827 e 1832, William Twining, publicou artigos que relatavam sintomas como febre intermitente, anemia, baço aumentado, pele seca e escamosa em pacientes residentes de Bengala, Índia. Os sintomas poderiam ser facilmente confundidos com outras doenças e por um bom tempo, a leishmaniose visceral (LV) foi considerada uma “má forma de malária” e denominada por muitos como “caquexia malárica” (Dutta, 2008). Todavia, Twining parecia discordar, relatando a diferença post-mortem de coloração e textura do baço, indicando ser uma doença diferente. Reunindo os relatos de Twining e outros, é possível observar que houve um surto da doença, denominada então de Kal-azar,

na Índia, chegando a uma mortalidade de 30% (Gibson, 1983). Assim como a forma cutânea teve diferentes nomes atribuídos às suas lesões, a forma visceral também era conhecida por diferentes nomenclaturas. Os termos “Kal-azar” (Calazar), “Dum-Dum fever” (febre de Dum-Dum) e “Black fever” (febre negra) são os mais conhecidos.

Os primeiros relatos de um possível agente etiológico da leishmaniose cutânea surgiram em 1885 e 1898. Em 1885, D.D. Cunningham descreveu a presença do que denominou de “organismos parasitas peculiares”, corpos nucleóides agrupados observados em secções de úlceras fixadas em álcool e corados com violeta de genciana. Em 1898, Piotr Borovsky, um médico do exército que estudava a “oriental/sart sore” (úlceras orientais/delicadas), publicou um artigo demonstrando a análise do “suco” de uma úlcera, encontrando pequenos corpúsculos ovais, esféricos ou fusiformes. Em cada um, era possível observar um único núcleo e sua localização intra e extracelular. Assim, Borovsky determinou em seu artigo que a úlcera oriental não era causada por bactérias, sendo o pioneiro em denominar que o causador da doença era um organismo unicelular e pertencente a uma classe de protozoários (Hoare, 1938; Steverding 2017).

Em 1903, William Boog Leishman (figura 1.1), um patologista escocês descreveu em publicação pequenos corpos ovoides observados em esfregaços de baço de um soldado britânico falecido por febre de Dum-Dum em 1900 perto de Calcuta, Índia. Leishman então sugeriu que os corpos ovoides eram tripanosomas degenerados e a febre Dum-Dum portanto, uma tripanossomíase (Leishman, 1903). Ao mesmo tempo e sem conhecimento da pesquisa de Leishman, Charles Donovan (figura 1.1), professor Irlandês de fisiologia, observou corpos ovoides similares em amostras de baço, coletados em vida e post-mortem de indianos apresentando febre e esplenomegalia (Donovan, 1903). Ainda em 1903, Ronald Ross, médico britânico que investigava o Kal-azar na Índia, publicou um artigo comentando os achados de Leishman e Donovan, sugerindo então que os corpos ovoides não eram um tripanosoma degenerado e sim um novo protozoário, denominando-os como corpos Leishman-Donovan e o novo parasito, *Leishmania donovani* (Ross, 1903). Também em 1903, James Homer Wright descreveu organismos idênticos aos achados por Cunningham e Borovsky, classificando-os como *Helcosoma tropicum*, nome que foi posteriormente trocado por *Leishmania tropica*. Em 1908, Charles Jules Henry Nicolle isolou parasitos de *Leishmania* de crianças que sofriam de anemia esplênica na Tunísia, descrevendo assim a espécie *Leishmania infantum*. Também foi Nicolle

quem descreveu a presença de parasitos de *Leishmania* em cachorros, sendo estes considerados desde então como importantes reservatórios (Dutta, 2008; Akhoundi *et al.* 2016; Steverding, 2017).



Figura 1.1 General Sir William Boog Leishman e Major Charles Donovan; Leishman (esq.) e Donovan (dir.), responsáveis pela primeira descrição do gênero *Leishmania* (1903); Fonte: Steverding 2017.

Até o ano de 1908, todos os relatos conhecidos sobre leishmaniose faziam referência ao velho mundo (África, Ásia e Europa). Foi somente a partir de 1909 que lesões cutâneas foram associadas a parasitos do gênero *Leishmania* no novo mundo (Américas). Em publicações independentes e quase simultâneas, Lindenberg, Carini e Paranhos demonstraram corpúsculos Leishman-Donovan presentes em lesões de indivíduos acometidos pela conhecida “ulcera de Bauru” no estado de São Paulo (Laison, 2010). Em 1911, Gaspar Vianna observou diferenças morfológicas entre a *L. tropica* descrita no velho mundo com a espécie de *Leishmania* que ele observava em pacientes de Além Paraíba, Minas Gerais, Brasil, descrevendo uma nova espécie, a *Leishmania brasiliensis*, que foi corrigida posteriormente por Matta (1916) para *Leishmania braziliensis*.

Foi na década de 1930 que ocorreram os primeiros relatos de Leishmaniose visceral na América Latina. Enquanto Henrique Penna descreveu a doença na Amazônia, em 1934, Evandro Chagas e Aristides Cunha não foram capazes de infectar animais de laboratório com parasitos retirados de pacientes diagnosticados

com Leishmaniose visceral (LV). Considerando então uma possível diferença entre o parasito causador da LV no velho e novo mundo, Chagas e Cunha descreveram a *Leishmania chagasi* como uma nova espécie causadora de LV no Brasil (Cunha & Chagas 1937). No ano seguinte, Cunha revelou o sucesso alcançado ao infectar animais com a então recém descrita *L. chagasi*, admitindo que esta poderia ser então, a *L. infantum* anteriormente descrita. Até os dias de hoje existe uma divergência de opiniões sobre a *L. chagasi*. Silveira e Corbett (2010) através de estudos moleculares sugeriram então que *L. chagasi* fosse denominada então *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), devido a semelhança genotípica, porém, ainda há uma extensa discussão sobre o tema.

Ao longo dos anos, diversas novas espécies foram descritas e mais estudos sobre morfologia, formas, infecção, sintomas entre outras, foram aumentando o conhecimento sobre a Leishmaniose. Algumas descrições antigas da doença já sugeriam picadas de “sand flies” (tradução literal, moscas de areia) como possível forma de transmissão, o que foi reforçado por estudos paleontológicos. Em 1921, dois irmãos biólogos franceses demonstraram a formação de lesões similares a botões do oriente em voluntários após a exposição dos mesmos a uma nuvem de moscas (Sergent *et al.* 1921; Steverding, 2017). Porém, o experimento não foi aceito como prova da transmissão. A prova concreta de transmissão da Leishmaniose foi descrita em 1941 por Saul Adler, parasitologista, quando o mesmo infectou experimentalmente moscas com *L. tropica*. Cinco voluntários serviram de cobaia e foram picados, desenvolvendo lesões, provando assim a transmissão (Adler & Ber 1941; Steverding, 2017). Outros estudos foram conduzidos, comprovando que não só a forma cutânea, mas a forma visceral da doença também era transmitida pelas “moscas”.

1.2.2 Agente etiológico, transmissão e ciclo biológico

Após a descoberta dos corpúsculos Leishman Donovan que levaram à definição da primeira espécie, *Leishmania donovani*, diversos estudos foram conduzidos e diferentes novas espécies causadoras da doença, identificadas. Atualmente, existem mais de 22 espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Leishmania* (PAHO, 2019). O parasito *Leishmania* pertence ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* dividido atualmente em quatro subgêneros:

Leishmania e *Vianna* – que abrigam as principais espécies causadoras das formas da leishmaniose – subgênero *Mundinia* – sugerido recentemente por Espinosa em 2016 - e *Sauroleishmania* - subgênero que abriga espécies patogênicas de répteis (Ryan *et al.* 1987; Lainson, 2010; Espinosa *et al.* 2016). Este último gera divergências taxonômicas, sendo considerado por alguns autores como um gênero *Sauroleishmania* e não subgênero (Figura 1.2A e 1.2B).

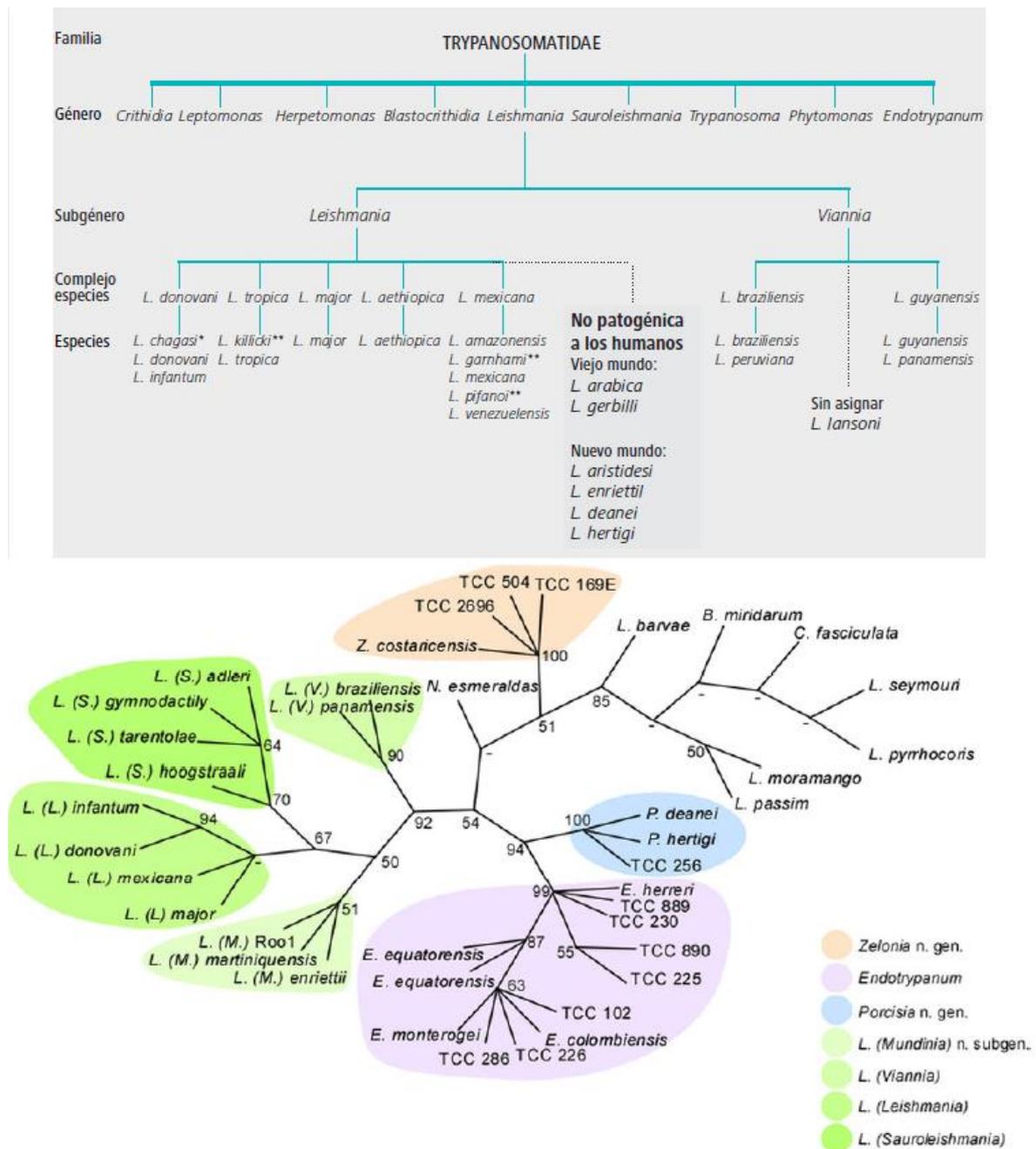


Figura 1.2 Taxonomia de Leishmania. A: Classificação mais difundida, demonstrando os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Fonte: OMS, 2010; B: Classificação de *Sauroleishmania* como subgênero e *Mundinia* como novo subgênero. Fonte: Espinosa *et al.*, 2016;

Os protozoários parasitas do gênero *Leishmania* são eucariotos unicelulares compostos por uma mitocôndria única. Como pertencente da classe Kinetoplastea, apresenta a característica exclusiva à classe, o cinetoplasto, estrutura anexa à mitocôndria composta por um material genético diferenciado, o kDNA, uma rede organizada em mini e maxicirculos que se interligam. Dentre suas principais características, o protozoário se apresenta ainda sob duas formas evolutivas, a forma promastigota e a forma amastigota (Figura 1.3A e 1.3B). A forma promastigota é extracelular e possui morfologia alongada, medindo de 12 a 20 μM , com cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo livre único que emerge de uma bolsa flagelar localizada na região anterior da célula. A forma amastigota é intracelular obrigatória, encontrada majoritariamente em vacúolos parasitóforos no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Sua morfologia é ovoide e apresenta bolsa flagelar, porém, não possui flagelo livre (Vannier-Santos *et al.* 2002; Neves, 2005; Torres-Guerrero *et al.* 2017). Como particularidade, a forma promastigota tem a capacidade de assumir dois estágios, o procíclico, estágio não infectivo com parasitos volumosos de tamanho em torno de 3 a 12 μM e flagelo curto, capazes de se multiplicar de forma logarítmica, e o metacíclico, estágio infectivo, com parasitos afinados de tamanho entre 5 a 10 μM e flagelo longo. O processo de transformação da forma procíclica para a forma metacíclica é chamado de metaciclogênese, processo este que inclui alterações de tamanho e forma, onde o corpo do parasito se torna mais fino e alongado e o flagelo assume um tamanho maior, conferindo a forma metacíclica uma maior motilidade. Alterações moleculares também são observadas como o aumento de expressão de moléculas de superfície tais quais LPGs (lipofosfoglicanos) e gp63 (metaloproteases). A metaciclogênese permite que a *Leishmania* se torne mais apta para que possa escapar do sistema imune do hospedeiro e obter sucesso na infecção (Muskus & Marin Vila, 2002; Neuber, 2008).

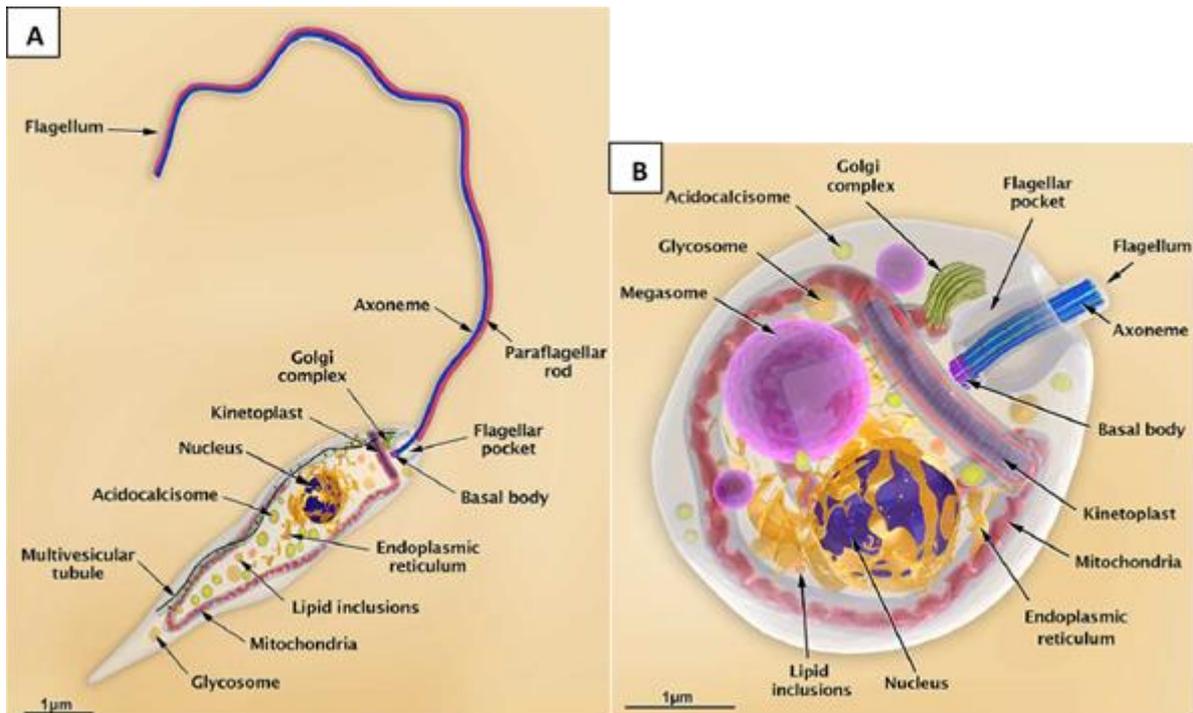


Figura 1.3 Formas evolutivas de Leishmania. A figura aponta organelas importantes como o cinetoplasto, mitocôndria, núcleo e flagelo. A: forma promastigota; B: forma amastigota. Fonte: Teixeira *et al*, 2013.

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico, o que a faz o protozoário um parasita obrigatório de dois tipos de hospedeiros distintos, um invertebrado – o flebotomíneo, inseto hematófago aonde são encontradas as formas promastigotas - e um vertebrado – mamíferos, aonde se encontram as formas amastigotas, tendo humanos como principais acometidos, além de outros hospedeiros como cães, roedores, marsupiais, lobos e raposas, muitas vezes assintomáticos, servindo como reservatórios da doença. Assim, a doença pode ser classificada como antroponótica ou zoonótica, dependendo do seu hospedeiro (Neuber, 2008; WHO, 2016; Torres-Guerrero *et al.* 2017).

Conhecido vulgarmente como Mosquito-Palha ou Birigui, o flebotomíneo, hospedeiro invertebrado da *Leishmania*, é o responsável pela transmissão do parasito. São pequenos insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidea, subfamília Phlebotominae. Dois gêneros são conhecidamente transmissores da leishmaniose, o gênero *Phlebotomus*, responsável pela transmissão no velho mundo e o gênero *Lutzomyia* no novo mundo (Figura 1.4A e 1.4B). Existem em torno de 800 espécies de flebotomíneos e somente 98 são descritas como transmissoras da leishmaniose, sendo 42 do gênero *Phlebotomus* e 56 do gênero *Lutzomyia* (WHO, 2010). Os flebótomos se alimentam de seiva vegetal ou mel, captando carboidrato

necessário para sobrevivência. O estágio adulto mede cerca de 2 a 3 mm e possui o corpo coberto de pelos. São habitantes de locais úmidos e escuros, extremamente propensos para sua reprodução e metamorfose. Apenas as fêmeas são transmissoras da doença, uma vez que necessitam de ao menos uma refeição sanguínea par completar sua oviposição, sendo então hematófagas, característica exclusiva do gênero (killick-kendrick, 1999; Maroli *et al.* 2013).

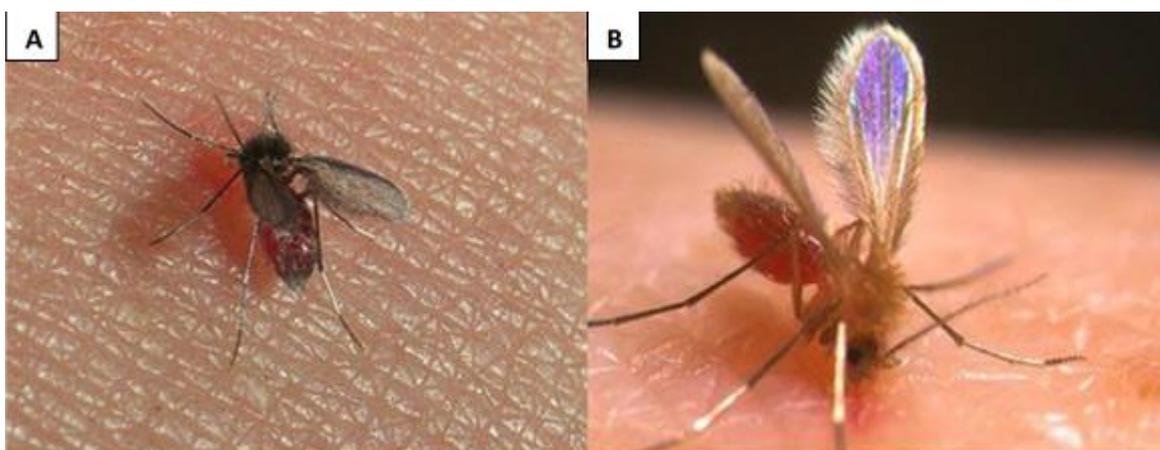


Figura 1.4 Vetores da leishmaniose. A: *Lutzomyia* sp. Novo mundo; B: *Phlebotomus* sp. Velho mundo. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>.

O ciclo biológico da *Leishmania* se inicia quando o hospedeiro invertebrado sadio realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo uma mistura de sangue e células parasitadas (Figura 1.5 etapas 1-5). Uma vez dentro do hospedeiro, essas células serão lisadas, liberando as formas amastigotas. Nesta etapa, o parasito precisa sobreviver à digestão do inseto e para isso alguns mecanismos de evasão são descritos. A *Leishmania* é capaz de modular a expressão de enzimas digestivas do vetor, interferindo em sua atividade, causando indigestão. Outra barreira encontrada é a matriz peritrófica, membrana semipermeável composta por glicoproteínas e quitina, responsável por isolar o bolo digestivo do epitélio intestinal uma vez que a degradação do sangue ingerido leva a liberação de subprodutos tóxicos para o vetor. Uma vez ingerida juntamente com o sangue, a *Leishmania* vai para dentro da matrix peritrófica, estando sujeita a sofrer os danos provocados por estes subprodutos. Estudos relatam, porém, que o parasito é capaz de secretar quitinases, capazes de perfurar a matriz peritrófica e permitir sua passagem ao epitélio, obtendo sucesso na colonização do intestino médio (Hegedus *et al.* 2009; Telleria *et al.* 2018).

Já localizadas no intestino do inseto, amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas. A promastigota procíclica, forma não infectiva, se multiplica via divisão binária de maneira logarítmica. Alcançada a fase estacionária, as formas procíclicas migram para a probóscide do inseto, onde se transformam, via metaciclogênese, em metacíclicas. A metaciclogênese também é considerada de suma importância para a sobrevivência do parasito dentro de ambos os hospedeiros (Bates, 2008). Posteriormente, ao realizar um novo repasto sanguíneo (Figura 1.5 etapas 6-9), o inseto vetor infectado tem sua alimentação dificultada uma vez que há uma grande quantidade de *Leishmania* em sua válvula esofágica. O flebotomíneo insere seu aparato bucal do tipo picador-sugador diversas vezes no hospedeiro, dilacerando a pele e formando pequenas poças de sangue. O inseto regurgita sua saliva liberando as promastigotas que estavam no aparelho digestório. A saliva do vetor, repleta de anticoagulantes e vasodilatadores, provoca o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, células do sistema imune inato que são responsáveis pelo combate imediato a inflamações (Brazil & Brazil, 2003). De maneira concomitante, as promastigotas sofrem ação do sistema complemento, um complexo de proteínas que são ativadas por clivagem em cascata e um dos principais meios de combate extracelular à agentes estranhos. As modificações de ocorridas na metaciclogênese, como o aumento de expressão de moléculas de superfície, dificultam a ligação das proteínas do sistema complemento à *Leishmania* (Puentes *et al.* 1990; Castellano, 2005). Para escapar do sistema complemento, as promastigotas interagem com neutrófilos e macrófagos “provocando” sua fagocitose mediada por receptor, processo importante uma vez que a *Leishmania* precisa disparar mecanismos na célula para a formação de um fagossoma. Como processo celular natural de eliminação de antígenos, o lisossomo é recrutado e se funde com o fagossomo, dando origem ao fagolisossomo. Devido as condições internas de pH e temperatura, a *Leishmania* consegue se diferenciar em amastigota já no fagolisossomo, onde sobrevive e se multiplica, estabelecendo assim a infecção no hospedeiro.

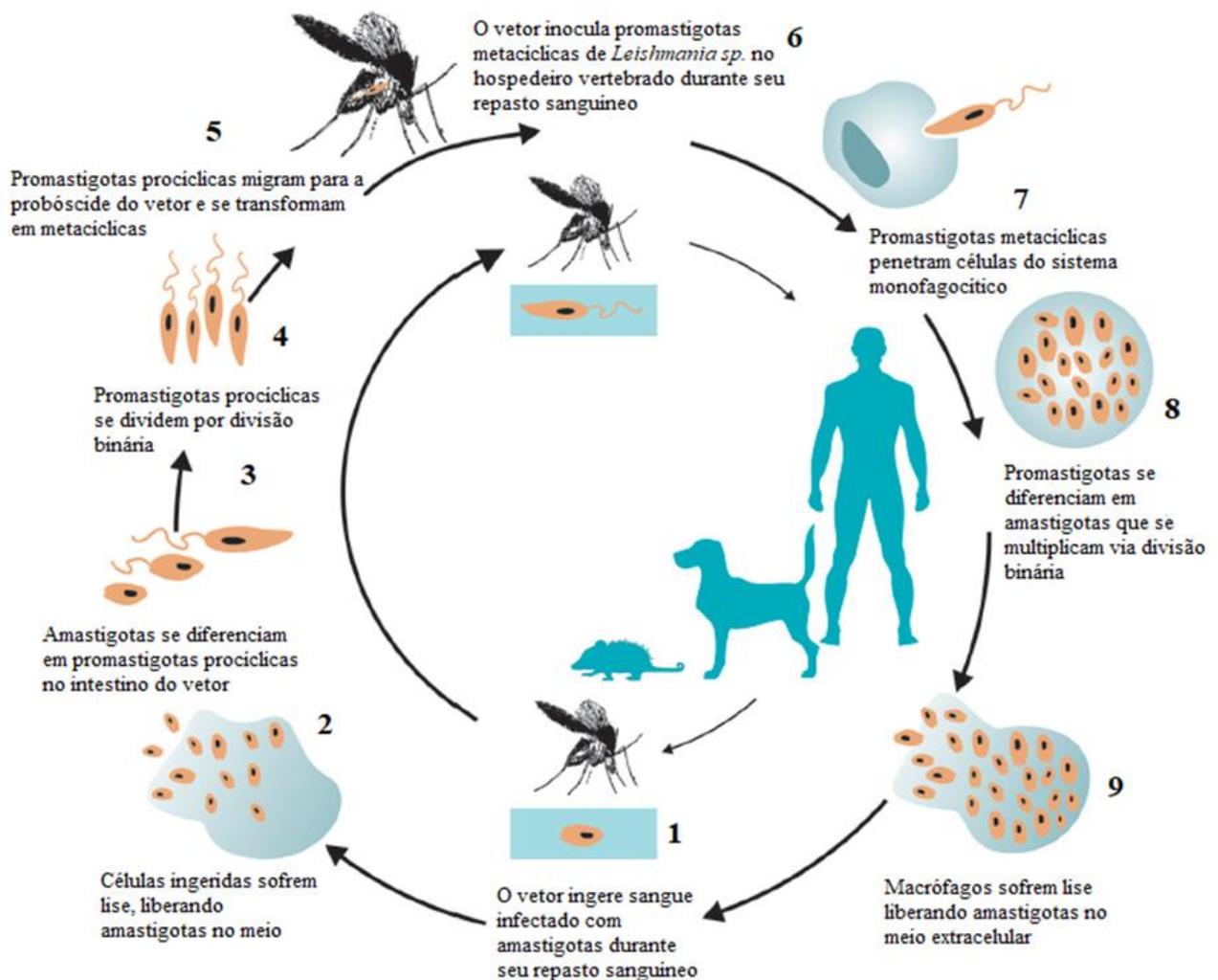


Figura 1.5 Ciclo biológico da leishmaniose. Etapas 1-5: hospedeiro invertebrado; Etapas 6-9: hospedeiro vertebrado; Fonte: Adaptado de PAHO, 2019.

1.2.3 Manifestações clínicas

Existem duas diferentes formas clínicas atribuídas à leishmaniose. São elas a tegumentar (LT), forma mais comum e a visceral (LV), forma mais severa que pode levar ao óbito. A leishmaniose tegumentar é subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD), recidiva-cútis (LRC) e leishmaniose mucocutânea (LMC), forma considerada incapacitante. A OMS atualmente usa como classificação das formas clínicas a LV, LC (englobando a LCL, LCD e LRC) e a LMC (WHO, 2020). Cada manifestação clínica possui uma relação direta com a espécie de *Leishmania* infectante e com a resposta imune do hospedeiro (Nagle *et al.* 2014). Na tabela 1.2, estão descritas as espécies causadoras de cada tipo de forma clínica da doença, que serão melhor explicadas abaixo.

Tabela 1.2 Espécies causadoras das formas clínicas das Leishmanioses e sua distribuição (adaptada de Nagle *et al.* 2014)

Subgênero	Espécie	Velho/Novo mundo	Forma clínica	Distribuição
Leishmania	<i>L. aethiopica</i>	VM	LCL; LCD	Etiópia e Quênia
	<i>L. amazonensis</i>	NM	LCL; LCD; LMC	Brasil, Venezuela, Bolívia
	<i>L. donovani</i>	VM	LV; LDPC	África central, Sul da Ásia, Oriente médio, Índia e China
	<i>L. infantum</i>	NM e VM	LV; LC	África do Norte e Europa, Oriente médio, Ásia central, México, Venezuela, Brasil e Bolívia
	<i>L. major</i>	VM	LC;	África do Norte e central, Oriente médio, Ásia central;
	<i>L. mexicana</i>	NM	LCL; LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru
	<i>L. tropica</i>	VM	LCL; LV	África do Norte e central, oriente médio, Ásia central e Índia
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LCL	Norte da América do sul, Venezuela
	<i>L. waltoni</i>	NM	LCD	Republica dominicana
Viannia	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL; LMC	Guatemala, Venezuela, Brasil, Bolívia e Peru
	<i>L. guyanensis</i>	NM	LCL; LMC	Guiana Francesa, Suriname, Brasil e Bolívia
	<i>L. lainsoni</i>	NM	LCL	Brasil, Bolívia e Peru
	<i>L. lindenbergi</i>	NM	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	NM	LCL	Brasil e Guiana francesa
	<i>L. panamensis</i>	NM	LCL; LMC	Panamá, Colômbia, Venezuela e Brasil
	<i>L. peruviana</i>	NM	LCL; LMC	Peru e Bolívia
	<i>L. shawi</i>	NM	LCL	Brasil
Mundínea	<i>L. martiniquensis</i>	VM e NM	LCL; LV	Martinique, Tailândia

LCL – Leishmaniose cutânea localizada; LMC – Leishmaniose mucocutânea; LCD – Leishmaniose cutâneo-difusa; LV – Leishmaniose visceral; LDPC – Leishmaniose dérmica pós-calazar;

1.2.3.1 Leishmaniose cutânea localizada (LCL)

As regiões corporais mais envolvidas na forma clínica cutânea da leishmaniose são aquelas acessadas mais facilmente pelos flebotomíneos como braços, pernas, rosto e até orelhas (David & Craft, 2009; Torres-Guerrero *et al.* 2017). Após a realização do repasto sanguíneo, o tempo de incubação parasitária até o aparecimento da lesão pode levar de 2 a 4 semanas. O primeiro indício de lesão aparece em forma de pápula avermelhada, assintomática, com um diâmetro que varia entre 1 a 10 mm. Pode haver aumento de temperatura e inchaço local. (Goto & Lindoso 2012; Nagle *et al.* 2014; Maxfield & Crane, 2020). Com a evolução da doença, a pápula avermelhada se torna nodular, evoluindo posteriormente a úlcera com bordas limitadas, podendo ser granulosa e causar sangramentos caso seja irritada. Em 90% dos casos de LCL, a lesão é auto resolutiva, desaparecendo em 3 a 5 meses ou podendo levar até 15 a 20 anos. Porém, 10% dos casos tendem a evoluir cronicamente (Burza *et al.* 2018; Gurel *et al.* 2019). É importante ressaltar que mesmo com a cura clínica, não há cura parasitológica. Relatos de caso e estudos demonstram ainda que dependendo da espécie causadora da LCL e da resposta imune do hospedeiro, pode haver a evolução da LCL para outra manifestação clínica (Goto & Lindoso 2012).

As principais espécies causadoras da LCL são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, do velho mundo (África, Ásia e Oriente Médio); *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, do novo mundo (Américas, destacando a grande participação do Brasil) (Goto & Lindoso 2012; Nagle *et al.* 2014; Burza *et al.* 2018; Gurel *et al.* 2019). Alguns estudos mostram ainda *L. infantum* e *L. donovani* como possíveis causadoras de LCL.



Figura 1.6 Leishmaniose cutânea localizada (LCL). Fonte: PAHO, 2019

1.2.3.2 *Leishmaniose cutânea difusa (LCD)*

A LCD é considerada uma forma rara da LC. É caracterizada por múltiplas lesões papulares ou nodulares. Diferente da LCL, as lesões não possuem tendência ulcerativa. A não sensibilidade característica das lesões pode muitas vezes levar a um erro diagnóstico uma vez que a LCD pode ser confundida com lesões de hanseníase (Bari 2012; Burza *et al.* 2018). A LCD é considerada uma manifestação anérgica, ou seja, o sistema imune do hospedeiro é incapaz de produzir uma resposta imune celular para combater as lesões, o que permite a o aparecimento de múltiplas lesões (Goto & Lindoso 2012; Torres-Guerrero *et al.* 2017).

As espécies causadoras da LCD são *L. aethiopica* (velho mundo), *L. amazonensis* e *L. mexicana* (novo mundo). No Brasil, a *L. amazonensis* é a espécie causadora da LCD (Ministério da Saúde, 2007).

As lesões causadas pela LCD podem se espalhar por braços, pernas, mãos e pés, nariz, lábios e orelhas. É comum encontrar uma carga parasitária altíssima nas lesões. Além de aparente imunossupressão, a co-infecção *Leishmania-HIV* pode estar relacionada aos casos LCD (Gurel *et al.* 2019; Mokni, 2019).



Figura 1.7 *Leishmaniose cutânea-difusa (LCD)*. Fonte: Torres-guerrero *et al.*, 2017;

1.2.3.3 *Leishmaniose cutâneo disseminada (LD)*

A LD é outro caso raro de LC. Muito confundida com a LCD, a LD é caracterizada por 10 ou mais lesões mistas muito similares as lesões de LCL, pápulas ulcerativas ou acneiformes, encontradas em duas ou mais partes do corpo (Goto & Lindoso, 2012; Burza *et al.*, 2018; Gurel *et al.* 2019). Diferente da LCD, a carga parasitária encontrada nas lesões é baixa, e a disseminação das lesões parece ter o envolvimento sanguíneo. A resposta inflamatória também é uma diferença entre a LCD e a LD. Diferente da falta de resposta celular que ocorre na LCD, a resposta imune celular da LD é muito potente, com alta produção de citocinas. Em mais de 40% dos casos de LD pode haver comprometimento da mucosa (Scorza *et al.* 2017; Gurel *et al.* 2019).

A ocorrência da LD se dá majoritariamente na América Latina. Embora seja rara, há relatos de que no estado da Bahia, Brasil, a LD vem superando a incidência de LM. A principal espécie relacionada com a LD é a *L. braziliensis*. (Schriefer *et al.* 2008; Scorza *et al.* 2017).



Figura 1.8 Leishmaniose cutânea disseminada (LD). Fonte: Mokni, 2019;

1.2.3.4 Leishmaniose recidiva-cútis (LRC)

Outra forma rara e crônica de leishmaniose tegumentar, a recidiva é caracterizada por uma lesão ativa que após um tempo aparece no mesmo local ou muito próxima ao local de uma lesão de LC curada. A razão desse fenômeno ainda é desconhecida, porém, acredita-se que uma pequena porção parasitária sobreviva no local da infecção primária ou próximo, e por algum estímulo desencadeiam recidivas da doença (Goto & Lindoso, 2012; Scorza *et al.* 2017). Diferente da LCL, as lesões são pápulas ou nódulos não ulcerativos e possuem um elevado número de linfócitos infiltrados no local (Burza *et al.* 2018; Maxfield & Crane, 2020).

As espécies implicadas na LRC são majoritariamente a *L. tropica* no velho mundo e *L. mexicana* com alguns casos destacados no novo mundo.



Figura 1.9 Leishmaniose recidiva-cútis (LRC). Fonte: Goto e Lindoso, 2012;

1.2.3.5 Leishmaniose mucocutânea (LMC)

Caracterizada por lesões destrutivas de lábios, septo nasal e palato, e uma resposta imunológica exacerbada, cerca de 10% dos casos de LMC progridem a partir da LCL, ocorrendo de forma concomitante. Comumente, a LMC se apresenta de 6 meses até 2 anos após a cura da LCL. Os sintomas podem variar entre incômodos na região nasal e febre. A doença se apresenta com pequenas úlceras que evoluem destrutivamente, perfurando todo o septo nasal, chegando ao palato (Goto & Lindoso, 2012; Torres-Guerrero *et al.* 2017; Mokni, 2019).

Embora não seja causadora direta de óbitos, a LMC é classificada como perigo potencial de vida, uma vez que suas lesões causam desfiguração da face,

estigmatizando socialmente os pacientes por ela acometidos. O isolamento social pode causar danos psicológicos severos, levando ao suicídio (Scorza *et al.* 2017; Burza *et al.* 2018; Gurel *et al.* 2019).

As espécies implicadas na LMC são *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*, sendo a *L. braziliensis* a principal causadora e a maioria dos casos localizados na América do Sul em países como Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru (PAHO, 2019).



Figura 1.10 Leishmaniose mucocutânea. Fonte: Burza *et al.*, 2018;

1.2.3.6 Leishmaniose visceral (LV)

Também conhecida como Calazar, a LV é considerada a forma mais grave da leishmaniose. Diferente da LT, a LV como o próprio nome indica, acomete as vísceras (órgãos), principalmente o baço e o fígado, podendo acometer também a medula óssea. Seu período de incubação pode levar de 2 semanas a 6 meses. Os pacientes acometidos por essa forma podem ser assintomáticos ou apresentam febre persistente e irregular, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia e perda de peso (PAHO, 2020; WHO, 2020).

A LV é causada por duas espécies no velho mundo, a *L. donovani* e a *L. infantum*. A *L. infantum* porém, também é causadora da LV no novo mundo. Existem ainda alguns casos relatados de visceralização de formas crônicas de LC causadas por *L. tropica* e *L. amazonensis* nas Américas (Torres-Guerrero *et al.* 2017; Burza *et al.* 2018).

A LV tem por característica o acometimento de crianças até 5 anos e adultos com problemas nutricionais ou infecções causadoras de imunossupressão, como o HIV. Quando não tratada, a LV leva à óbito 95% dos pacientes por sepse, anemia severa e outros fatores graves (Gurel *et al.* 2019; PAHO, 2019).

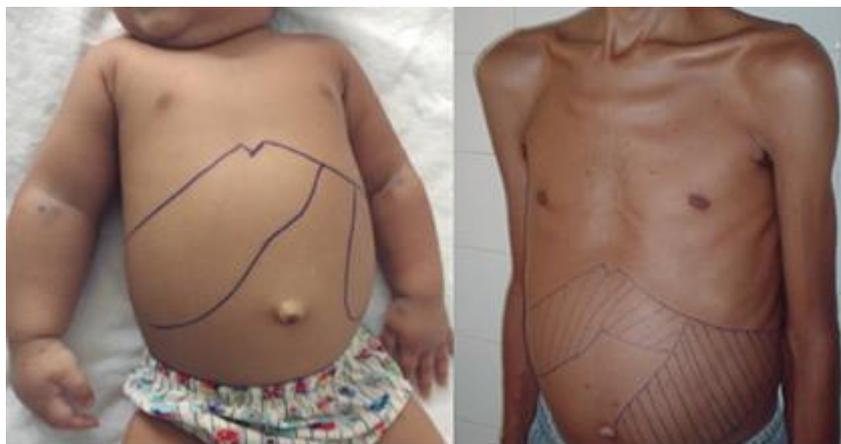


Figura 1.11 Leishmaniose Visceral. Fonte: PAHO, 2019;

1.2.3.7 Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC)

Descrita como uma complicação, sequela ou consequência da LV, a LDPC desenvolve lesões do tipo maculas hiperpigmentadas ou erupções maculopapulares que podem aparecer em um primeiro momento no torso ou rosto e se espalhar rapidamente para outras partes do corpo. Curiosamente, os casos de lesões maculares estão concentrados no leste do continente africano enquanto as do tipo erupções são descritas na Ásia, mais precisamente no subcontinente indiano (Burza *et al.* 2018; Gurel *et al.* 2019).

Majoritariamente causada pela *L. donovani*, são raros os casos descritos de LDPC por *L. infantum* (Scorza *et al.* 2017; Maxfield & Crane, 2020). Segundo a OMS, a LDPC demanda vigilância uma vez que são encontrados parasitos nas lesões, tornando o paciente um reservatório residual que, se alvo de flebotomíneo, torna contínua a transmissão antroponótica da LDPC (WHO, 2013).



Figura 1.12 Leishmaniose dérmica pós-calazar. Fonte: Mokni, 2019;

1.2.3.8 Papel do HIV nas formas clínicas da leishmaniose

O sistema imunológico é um dos principais desafios no controle/tratamento/combate à leishmaniose. As diferentes formas clínicas apresentam diferentes respostas imunológicas, variando entre anergia e exacerbação, sendo a imunossupressão um fator determinante.

Os primeiros relatos de uma possível co-infecção *Leishmania*-HIV ocorreram na década de 1990 no sul da Europa, em dependentes químicos que tinham por hábito compartilhar seringas, o que levou a um aumento de casos de LV na região (Torres-Guerrero *et al.* 2017; Burza *et al.* 2018).

Em termos de mecanismo imunopatológico, *Leishmania* e HIV possuem um *modus operandis* similar, que envolve macrófagos e células dendríticas (Gurel *et al.* 2019). A imunossupressão causada pelo HIV facilita a progressão da leishmaniose, agravando condições como a LV e a LMC. A LDPC causada por *L. infantum* está diretamente relacionada com a co-infecção por HIV. A queda acentuada de células T CD4 causada pelo HIV aumenta a chance e o número de recidivas da leishmaniose. O HIV se comporta ainda como oportunista, dificultando ou mascarando o diagnóstico de leishmaniose. Também pode haver falha do tratamento da leishmaniose provocada pelo HIV. Em contrapartida, a infecção por *Leishmania*

acelera a replicação viral e a progressão da doença (Badirzadeh *et al.* 2013; PAHO, 2019; WHO, 2020).

1.2.4 Epidemiologia

A década de 2000 é um marco importante para a Leishmaniose. Devido a um aumento considerável de casos observados a partir dos anos 2000, foram aprovadas resoluções de estreitamento de vigilância e controle para a doença, como a medida WHA.6013, aprovada pelos membros da Assembleia Mundial de Saúde e a medida CD49-19 aprovada pela OMS/OPAS. Desde então as organizações se esforçam na coleta de dados e atualizações da doença, e na criação de programas de suporte e controle para os países endêmicos (Maia-Elkhoury *et al.* 2017; WHO 2017c).

De acordo com a OMS, em 2018, 98 países/territórios são endêmicos para Leishmaniose, sendo 9 deles endêmicos para LC, 21 para LV e 68 para ambas. Cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e estima-se que anualmente ocorram aproximadamente 30 mil casos de LV e 1 milhão de casos de LC. O número de territórios endêmicos aumentou expressivamente para LV e LC sendo contabilizados, até janeiro de 2020 56 países endêmicos para LV e 59 para LC. Do total de casos globais de LV, 90% estão concentrados em 7 países. São eles: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália e Sudão do Sul. Já para LC, 85 % dos casos estão concentrados no Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe Síria e Tunísia (WHO 2019; WHO 2020).

Nas figuras 1.13 e 1.14 observa-se o status de endemicidade mundial da LV e LC, respectivamente.

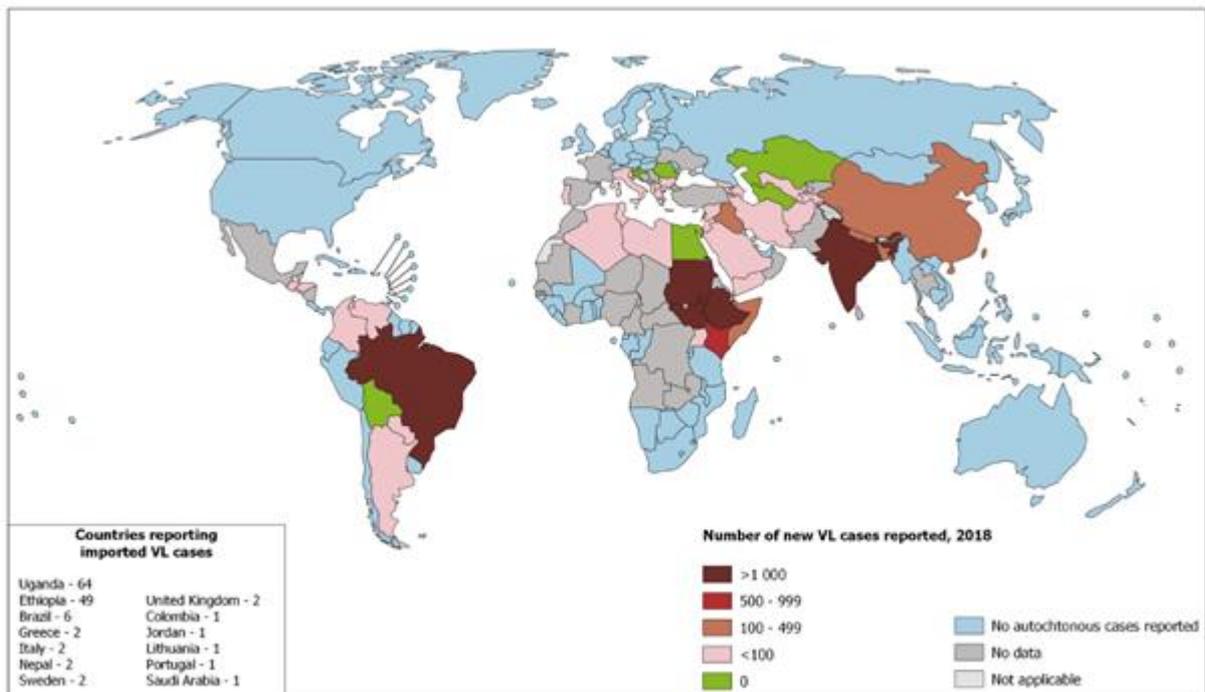


Figura 1.13 Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo. Fonte: WHO, 2019

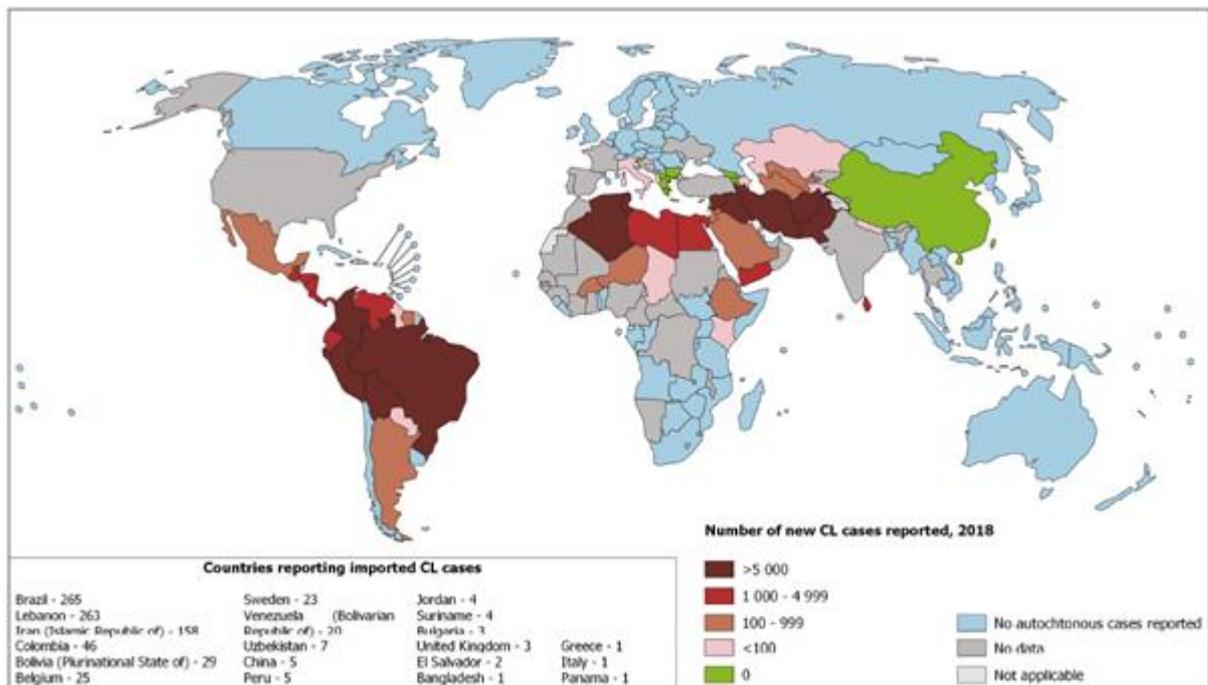


Figura 1.14 Endemicidade da Leishmaniose cutânea (LCL, LCD e LRC) no mundo. Fonte: WHO, 2019;

Em uma análise regional utilizando como base ano de 2015, foram reportados 197.311 casos de LC mundialmente. Dentre eles, 70% foram registrados na região do Mediterrâneo oriental, seguidos por 23% registrados na região das Américas (Figura 1.15 a). Para LV, foram registrados 23.804 novos casos sendo as regiões do

Sudeste asiático (39%) e a região Africana (24%) as mais afetadas (Figura 1.15 b). Há uma disparidade evidente na distribuição de LV e LC. Enquanto a LV se distribui de maneira mais equilibrada entre as regiões, a LC se mostra mais concentrada em duas regiões (WHO 2017).

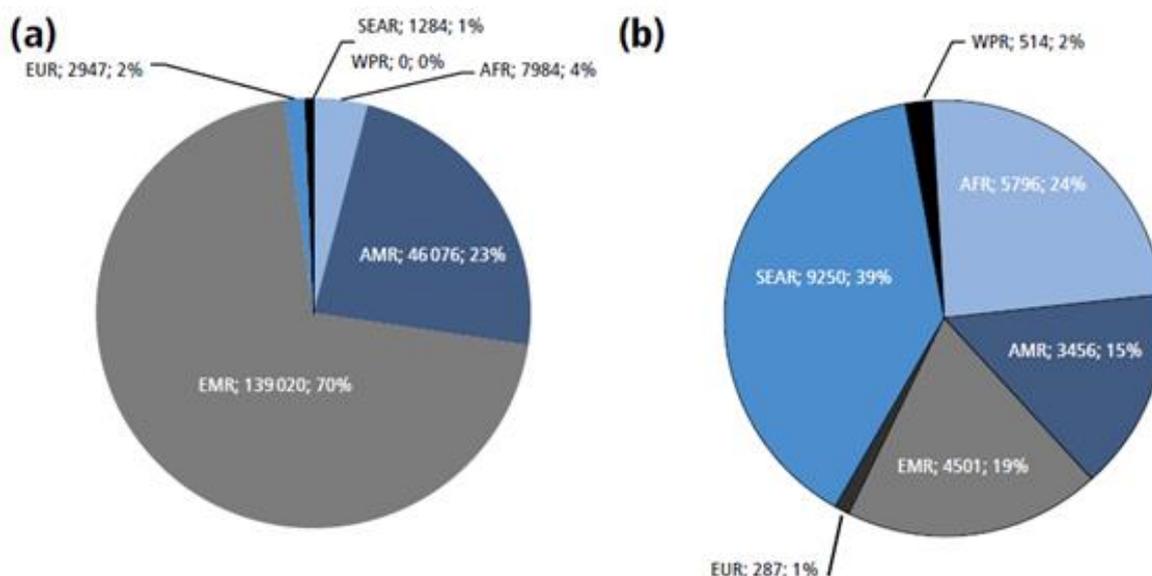


Figura 1.15 Número de novos casos mundiais de LC (a) e LV (b) por região no ano de 2015; AFR – região da África; AMR – região das Américas; EMR – região do Mediterrâneo oriental; EUR – região da Europa; SEAR – região do sudeste da Ásia; WPR- região do Pacífico Ocidental; Fonte: WHO, 2017c.

Observando os dados mundiais, é possível perceber o grande envolvimento das Américas nos casos reportados de LC e LV, o que gerou um alerta para a região. Em 2011, em uma iniciativa OMS/OPAS, foi instituído nas Américas o Programa Regional para Leishmaniose (PRL), uma tentativa de controlar a doença e dar suporte aos países endêmicos das Américas. Em 2012, foi criado o Sistema de Informação Regional da Leishmaniose, o SisLeish, um sistema simples que conta com o esforço dos países endêmicos para sua atualização (Maia-Elkhoury *et al.* 2017; PAHO 2019).

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS/PAHO), nas Américas, 18 países são endêmicos para LC e 11 para LV. Segundo o SisLeish, em 2018 foram reportados 46.041 novos casos entre LC e LMC, enquanto para LV foram reportados 3562 casos. Dos casos totais, o Brasil se destaca com um número de 16.432 casos (87%) de LC/LMC e 3.446 casos (97%) para LV, resultados bastante alarmantes para o país (PAHO, 2019). Nas figuras 1.16 e 1.17 observa-se a distribuição dos casos de LV e LC respectivamente no Brasil.

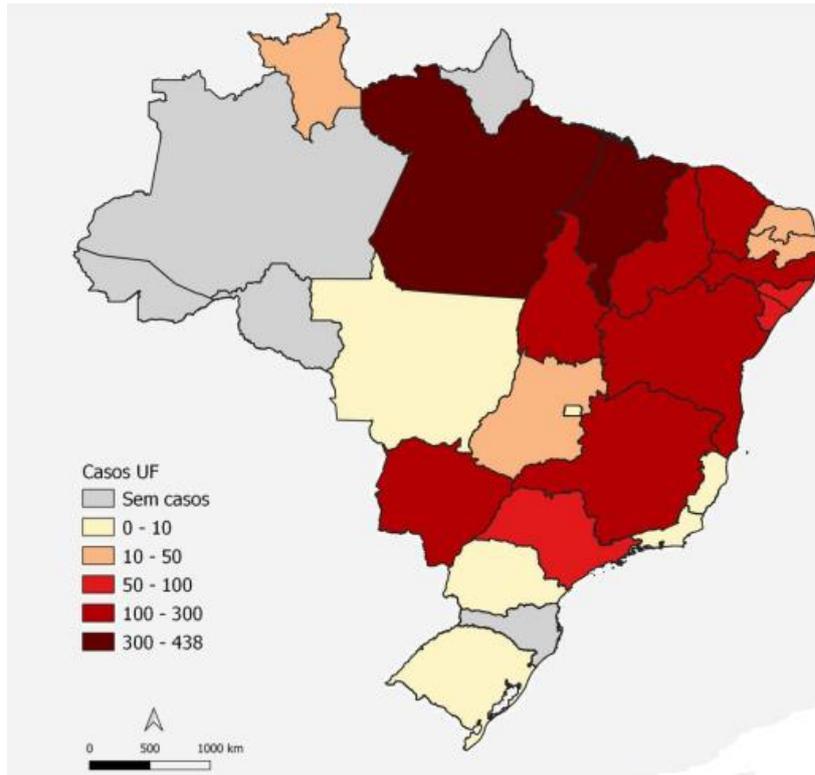


Figura 1.16 Casos de Leishmaniose visceral (LV) por UF de infecção no ano de 2019. Fonte: SVS/MS, 2019.

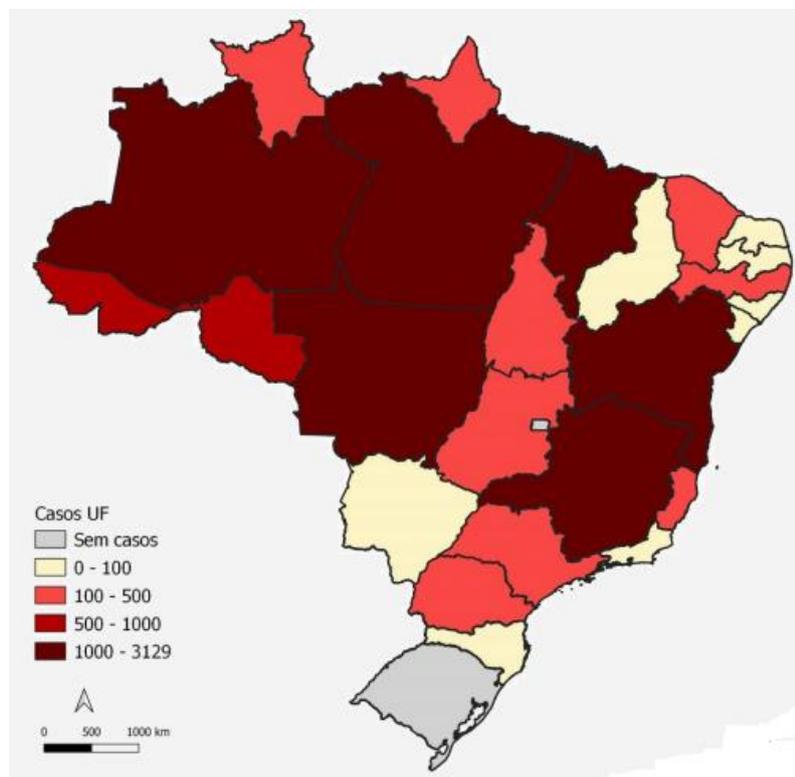


Figura 1.17 Casos de Leishmaniose tegumentar por UF de infecção no ano de 2019; Fonte: SVS/MS, 2019

Em dados de 2019, o Ministério da Saúde apontou uma incidência de 8,44 e 1,98 casos por 100.000 habitantes de LC e LV respectivamente. A região Norte aparece como maior detentora de casos para LC, concentrando 44,7% dos casos. Já para LV, a região Nordeste apresentou 44,5% dos casos (Ministério da Saúde, 2019).

Como abordado no item anterior, a co-infecção *Leishmania*/HIV tem impacto muito grande no desenvolvimento de ambas doenças para o paciente. Segundo a OMS, cerca de 35 países são responsáveis por relatos de casos de co-infecção, sendo a maioria pertencente ao sul Europeu (WHO, 2020). Entre 2009 e 2011, a organização não governamental Médicos Sem Fronteiras (MSF) relatou diversos casos de LV em pacientes HIV positivos nos países Sudão do Sul, Sudão, Quênia e Etiópia (Diro *et al.* 2014). Nas Américas, em 2018 foram reportados 250 casos de LV/HIV sendo 246 pertencentes ao Brasil (PAHO, 2019). Uma vez que o HIV pode mascarar o diagnóstico da Leishmaniose, suspeita-se que o número de casos de co-infecção seja muito maior.

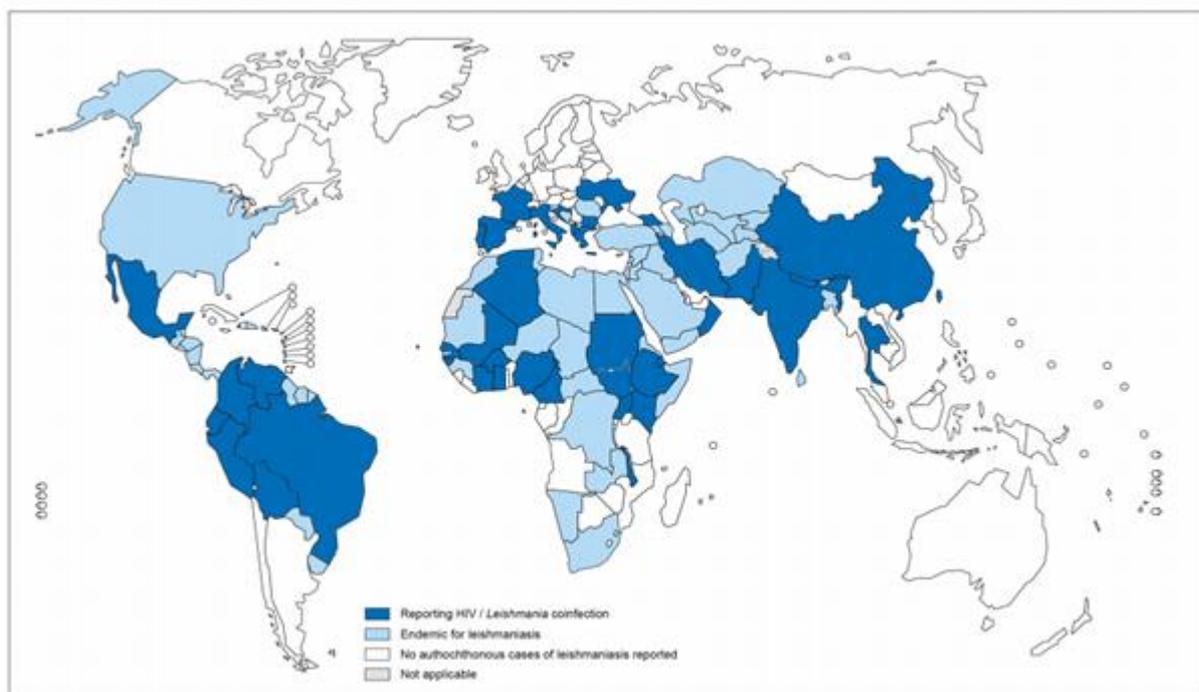


Figura 1.18 Distribuição mundial de casos de co-infecção *Leishmania*/HIV. Fonte: WHO, 2020;

1.2.5 Tratamento

1.2.5.1 Antimoniais pentavalentes

A primeira descrição do uso dos antimoniais para o tratamento da leishmaniose foi publicada no Brasil em 1914 por Gaspar Vianna. Médico e pesquisador do Instituto de Patologia Experimental de Manguinhos (atual Instituto Oswaldo Cruz), Vianna sugeriu o antimônio trivalente (Sb^{3+}) também conhecido como tártaro emético, para o tratamento de LC recém diagnosticada em São Paulo na época (Vianna, 1914). Diversos relatos de efeitos tóxicos provocados pelo tártaro emético impulsionaram estudos sobre modificações do mesmo. Foi na década de 1920, na Índia, que se deu início ao uso da formulação pentavalente dos antimoniais (Sb^{5+}), diminuindo significativamente os efeitos tóxicos do tratamento, permitindo que este fosse, por décadas, o tratamento unânime de primeira escolha para Leishmaniose (Uliana *et al*, 2018).

Existem hoje duas formulações comerciais do antimônio pentavalente, o estibogluconato de sódio (Pentostam), formulação não comercializada no Brasil, e o antimoniato de meglumina (Glucantime). São medicamentos injetáveis, podendo ser administrados por via endovenosa, intramuscular ou intralésional. Em publicação no ano de 1984, a OMS recomendava o uso de 10mg/kg/dia de antimônio pentavalente, por um período de 20 dias (WHO,1984). Porém, relatos de falha no tratamento em pacientes da Índia forçaram um aumento de dose, e regime terapêutico, levando ao surgimento de resistência generalizada, forçando o país a abandonar o uso do medicamento (Chakravarti & Sundar 2019). O regime mais comumente adotado hoje em dia é de 20mg/kg/dia por 28-30 dias e a baixa eficácia do tratamento em pacientes de LV co-infectados com HIV, retirou os antimoniais da primeira escolha nesses casos (Sundar & Sing, 2019).

A ação leishmanicida do antimônio pentavalente consiste na sua redução da forma pentavalente a trivalente. Porém, acredita-se que o medicamento atue inibindo diversas enzimas essenciais do parasito, principalmente da via glicolítica, causando um desbalanço na oxidação de ácidos graxos e impedindo a fosforilação do ADP em ATP (Berman, 1988; Franco *et al*. 1995). O antimônio tem ainda o potencial de diminuir os níveis de tiol do parasito, formando complexos antimônio-tiol, diminuindo as defesas antioxidantes do parasito (Kaur & Rajput 2014).

Por ser um medicamento injetável, é necessário que o paciente se locomova diariamente à unidade de saúde ou que permaneça internado dependendo da gravidade. Esses fatores, junto com a longa durabilidade do regime terapêutico geram desconforto e elevam o custo do tratamento. Adicionalmente, os vários efeitos colaterais, como náusea, dor abdominal, mialgia, nefrotoxicidade, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, levam à redução ou abandono do tratamento (Gasser *et al.* 1994; Sundar *et al.* 1998; Ministério da Saúde, 2013).

1.2.5.2 Anfotericina B

Descoberta em 1955 por sua ação antifúngica, a anfotericina B, pertencente à classe dos poliênicos, teve seu efeito leishmanicida descrito por Furtado e Lacaz, em 1960, na tentativa de tratamento de casos LMC não responsivos ao antimonial (Sampaio *et al.* 1960). Foi utilizada também para substituir os antimoniais na Índia, quando o uso dos mesmos causou uma onda de resistência generalizada, sendo regulamentada por lei até os dias de hoje como medicamento de primeira escolha no país (Uliana *et al.* 2018; Chakravanti & Sundar, 2019).

Seu mecanismo de ação está relacionado à sua afinidade por esteróis, especialmente ao ergosterol, principal componente da membrana dos tripanossomatídeos, diferente dos mamíferos, cujo esterol membranar é majoritariamente o colesterol, destacando assim sua seletividade ao parasito. Os efeitos colaterais observados em pacientes são: reações à infusão (na maioria dos pacientes), nefrotoxicidade, miocardite, hipocalcemia e morte ocasional.

O regime terapêutico mais utilizado para anfotericina B é 1mg/kg, infusão intravenosa, variando de duração de 20 dias (para casos de LV), até 4 meses (em casos de LDPC), tempos longos de hospitalização para o paciente. A duração do tratamento junto aos efeitos colaterais requer um acompanhamento rigoroso e o alto custo deste medicamento é um fator limitante para os países mais pobres (Sundar & Sing 2020).

No Brasil, a anfotericina B é usada como primeira escolha em casos de pacientes co-infectados com HIV e gestantes, sendo também uma opção para pacientes não responsivos ao tratamento com antimonial ou que sejam do grupo de risco para o uso do mesmo (Ministério da saúde, 2013).

A fim de diminuir os efeitos colaterais da anfotericina B, formulações lipídicas foram desenvolvidas para o tratamento antifúngico e reposicionadas para leishmaniose, substituindo o desoxicolato por lipídeos que facilitam sua biodistribuição e prolonga o tempo de meia-vida. As formulações disponíveis hoje são: anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (Mishra *et al.* 2009; Sing *et al.* 2012). No Brasil, a anfotericina B lipossomal é utilizada com o regime de dose total de 25 a 40mg, dependendo da forma clínica da doença e da resposta do paciente, por via endovenosa (Ministério da saúde 2013). Embora tenham reduzido os efeitos colaterais da anfotericina B convencional e sejam muito aceitas e utilizadas como primeira escolha em diversos países, as formulações lipídicas ainda são extremamente caras, dificultando seu uso em países de terceiro mundo.

1.2.5.3 Miltefosina

Em 1987, Croft e colaboradores demonstraram o efeito de fosfoclinas, originalmente antineoplásicas, em *Leishmania donovani*, destacando a miltefosina (hexadecilfosfocolina), como promissora (Croft *et al.* 1987). Seu primeiro registro de uso aconteceu na Índia, em 2002, onde foi aprovada como primeiro medicamento para uso oral para LV, com uma taxa de cura de 94% (Chakravarti & Sundar, 2019). O regime terapêutico provado foi de 50 a 100 mg/dia durante 28 dias. Após ser registrada como primeira escolha em países como Índia, Nepal e Bangladesh, sua eficácia para o tratamento de LV foi diminuindo ao longo dos anos, e seu uso foi substituído no subcontinente indico pela anfotericina B lipossomal, sendo hoje alvo de estudos de possíveis combinações (Uliana *et al.* 2018). A miltefosina ainda é recomendada no subcontinente indico para o tratamento de LDPC (WHO, 2010).

Seu mecanismo de ação parece estar ligado à interação do fármaco com a membrana plasmática do parasito (modulação de receptores de superfície), levando a alteração do metabolismo, resultando em apoptose (Mohapatra, 2014). Os efeitos colaterais observados em pacientes são distúrbios gastrointestinais, como vômito e diarreia, hepato e nefrotoxicidade ocasionais e teratogenicidade, sendo proibido o seu uso em gestantes. Sua longa meia vida aumenta as chances de resistência (Sundar & Sing 2020).

A miltefosina só é licenciada no Brasil para uso veterinário no tratamento de LV em cães, como o milteforan (Ministério da agricultura, 2016). Para uso humano, a miltefosina foi incorporada ao SUS como primeira linha de tratamento da leishmaniose tegumentar humana em 2018 pelo Ministério da saúde (Portaria nº56 – 30/10/2018), entrando para a lista de substâncias sujeitas a controle especial, na qual, cumprido os pré-requisitos propostos pela ANVISA, um fármaco pode ser comercializado e incluído em regimes terapêuticos (atualização do Anexo I da Portaria SVS/MS nº 344/1998). Em estudos clínicos realizados no Brasil e publicados em 2010, a miltefosina demonstrou bons resultados para LC causada por *L. braziliensis*, comparando ao antimoniato de meglumina (Machado *et al.* 2010). Por ser um fármaco administrado por via oral, ele se tornou uma opção necessária para uso em áreas mais pobres no país e no mundo, uma vez que seu custo é mais baixo e não requer a internação ou deslocamento do paciente.

1.2.5.4 Paromomicina

Em 1968, Neal e colaboradores descreveram os efeitos de um aminoglicosídeo, com efeitos antibióticos já descritos, em LC experimental (Neal 1968). Em 1985 e 1990, foi sugerida para o tratamento de LC por via tópica e via parenteral para LV, respectivamente (Uliana *et al.* 2018). Em 2006, foi aprovada para uso via parenteral na Índia, com um regime terapêutico de 11mg/kg/dia que alcançou em estudo de fase III uma taxa de cura de 95% (Chakravarti & Sundar, 2019).

Seu mecanismo de ação consiste em inibir a síntese proteica, uma vez que ela se liga à subunidade 30S ribossomal impedindo o início do processo de tradução. Estudos *in vitro* apontam que ela induz a perda do potencial de membrana mitocondrial em *L. donovani*, sugerindo que a mitocôndria seja a organela alvo deste fármaco (Maltezou, 2010; Sundar & Sing 2020). Os efeitos adversos mais comuns são inchaço na área de injeção e irritação na pele causada pela formulação tópica.

Impulsionada pelo baixo custo, a paromomicina se torna uma opção especial para países mais pobres. Assim, mesmo com sua baixa eficácia em estudos clínicos em diversas regiões da África, seu efeito sinérgico foi observado quando em combinação com outros fármacos. Consequentemente, a associação Paramomicina/Estibogluconato de sódio já foi aprovada para uso no leste da África, promovendo uma diminuição de doses e de tempo de duração do tratamento. A

combinação Paromomicina/Miltefosina também tem se destacado e está em fase clínica como alternativa de tratamento para o continente africano (Hendrickx *et al.* 2017; DNDi 2020).

1.2.5.5 Pentamidina

Sintetizada no final da década de 1930, a pentamidina foi utilizada em meados de 1980 para LV refratária na Índia. Entretanto, por conta de efeitos colaterais e diminuição de sua eficácia, seu uso foi desencorajado (Sundar & Sing, 2020). Dentre os efeitos colaterais mais sérios estão diabetes, hipoglicemia, hipotensão e hipercalemia, insuficiência renal aguda e arritmias cardíacas (Chakravarti & Sundar 2017).

No Brasil, a dose proposta de pentamidina é de 4mg/kg, em dias alternados, não ultrapassando 2g, administrado por via endovenosa ou intramuscular, dependendo da forma clínica (Ministério da Saúde 2013). Em alguns países, é recomendada como segunda escolha para LV/HIV. Alguns casos de resistência a este fármaco já foram relatados (Bray *et al.* 2003).

Existem duas formulações disponíveis de pentamidina, Isotionato (di-hidroxietilsulfonato) de pentamidina e mesilato (di-hidroximetilsulfonato) de pentamidina. No Brasil, somente o isotionato é comercializado. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de enzimas da via de síntese de poliaminas, via essencial ao parasito, além da Topoisomerase II, levando o parasito à apoptose (Kaur & Rajput 2014).

1.2.5.6 Resistência

Um dos problemas recorrentes do tratamento da Leishmaniose é a falha terapêutica. Além da não responsividade direta observada em pacientes, a diminuição da eficácia dos diferentes fármacos licenciados em regiões ao longo dos anos, levanta um questionamento importante sobre o futuro da quimioterapia da leishmaniose (Uliana *et al.* 2017; Chakravarti & Sundar 2019; Sundar & Sing 2020).

Diversos fatores parecem estar ligados à falha terapêutica. Pacientes imunodeficientes ou portadores de doenças imunocomprometedoras, respondem de maneira diferente a certos fármacos. A virulência da cepa infectante de *Leishmania*

ou a presença do vírus de RNA infectante de *Leishmania* podem alterar a resposta a um medicamento (Ponte-Sucre *et al.* 2017).

Diferente do que se pensava ser somente falha terapêutica, baseada nos fatores citados acima, cada vez mais estudos tem relatado o surgimento de resistência do parasito a medicamentos licenciados. A pentamidina por exemplo, tem estudos demonstrando a modulação de bombas de efluxo de droga, como a PRP1, caracterizada em *L. infantum* (Kaur & Rajput, 2014).

No subcontinente Índico, a resistência adquirida ao antimonial foi confirmada em isolados de *L. donovani*, após a percepção da diminuição da eficácia do fármaco na região nos anos 1980 (Sundar, 2002; Uliana *et al.* 2018). Desde então, diversos trabalhos demonstraram a seleção de parasitos resistentes ao antimonial por pressão de droga *in vitro* (Papadopoulou *et al.* 1994; Haimeur *et al.* 2000; Monte-Neto *et al.* 2011; Monte-Neto *et al.* 2015).

Alguns mecanismos moleculares de resistência ao antimônio são descritos, entre eles a inibição da conversão de Sb⁵⁺ para Sb³⁺ através de enzimas intracelulares como a ACR2 (arsenato redutase) ou a TDR1 (redutase dependente de tiol); a diminuição da expressão da enzima AQP1 (aquaporina 1), que leva a consequente diminuição da captação do fármaco para dentro da célula. Transportadores ABC e a superexpressão de enzimas da síntese da tripanotona também parecem estar envolvidos (Kaur & Rajput 2014; Uliana *et al.* 2018; Ponte-sucre *et al.* 2017).

Um fato intrigante em relação a resistência aos antimoniais vem sendo estudado em Bihar, na Índia, onde a eficácia do tratamento com antimonial diminui ostensivamente ao longo do tempo. Foi sugerida então uma resistência cruzada, provocada pelo arsênio presente na água ingerida pelos habitantes da região. Estudos em camundongos demonstraram a resistência ao antimonial após a exposição dos mesmos ao arsênico, além de demonstraram um estudo retrospectivo de pacientes com LV da região, comparando a água ingerida (Perry *et al.* 2015).

1.3 Desenvolvimento de fármacos e os produtos naturais

A quimioterapia da leishmaniose sofre com diversos efeitos adversos que dificultam ainda mais o tratamento, problemas esses que não são exclusivos da leishmaniose. Doenças como malária, HIV/AIDS, câncer e até hipertensão ou

diabetes melitus possuem medicamentos licenciados para seu tratamento, sejam eles 100% eficazes ou não, mas continuam apresentando uma mortalidade significativa. Assim, a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o tratamento dessas doenças se torna contínua (Thomford *et al.* 2018). Para o tratamento da leishmaniose, o desafio é ainda maior, uma vez que, além de ter efeitos colaterais diminuídos ou abolidos, um novo medicamento precisa driblar a falha terapêutica e uma possível resistência adquirida pelo parasito.

O FDA, órgão controlador da liberação de medicamentos dos EUA, respeitado mundialmente, considera que o processo de descobrimento/desenvolvimento de um medicamento se dá em 5 etapas. São estas: descobrimento/desenvolvimento, pesquisa pré-clínica, pesquisa clínica, revisão e monitoramento (FDA, 2020). As etapas englobam desde um estudo sobre o possível mecanismo de ação, propriedades farmacocinéticas e via de administração, passando por estudos de toxicidade em diferentes espécies de animais, até chegar às etapas finais de estudo em humanos.

Ainda na parte de desenvolvimento de um novo fármaco são utilizadas duas grandes abordagens, a abordagem baseada em alvo e a abordagem fenotípica. Como o próprio nome já diz, a abordagem baseada em alvo vem sendo utilizada há muitos anos na ciência, na qual um alvo já conhecido e estudado é selecionado e servirá de etapa limitante para o *screening* de novos compostos em potencial, pequenas moléculas que serão desenvolvidas a partir do alvo proposto. Por já partir de um alvo determinado, esta abordagem leva certa vantagem sobre a abordagem fenotípica em termos de custo e tempo. Com o avanço da tecnologia, ferramentas moleculares e de bioinformática, como o docking molecular por exemplo, vêm auxiliando mais ainda neste tipo de abordagem. Porém, a complexidade molecular dos alvos e de suas interações bem como a não abordagem do organismo como um todo, são etapas limitantes do processo (Swinney, 2013; Guido *et al.* 2010).

A abordagem fenotípica, diferente da abordagem citada acima, não parte de um alvo específico, porém se baseia na interação do composto com o organismo por inteiro, havendo a necessidade de entender suas vias de ação e seus alvos. Esta abordagem é caracterizada por um processo mais longo e mais caro, uma vez que precisa da realização de mais ensaios para o seu entendimento. Segundo Brindha *et al.* (2021), a abordagem fenotípica se faz necessária uma vez que analisa o organismo como um todo, destacando problemas como absorção/efluxo celular e permeabilidade de membrana. Assim como na abordagem fenotípica, novas

tecnologias vêm surgindo para abrandar as problemáticas trazidas pelo ensaio fenotípico. É o caso do *High-throughput Screening* que conta com o auxílio da automação para acelerar o rastreio de bibliotecas de possíveis novos compostos.

A etapa de pesquisa pré-clínica aborda o efeito do possível fármaco em animais, estudando os possíveis efeitos tóxicos do composto (ensaios de toxicidade) bem como o caminho do composto pelo organismo (farmacocinética). Os ensaios pré-clínicos abrangem uma infinidade de possíveis ensaios, regulamentados pelas agências de saúde dos países. A OECD e o FDA, usados como modelos mundiais, tem diversos protocolos regulamentados, que vão desde o uso de diferentes espécies de animais para atestar a segurança do composto, até métodos para a diminuição do uso dos mesmos, visando a proteção animal. Aqui no Brasil, a ANVISA se baseia nos manuais da OECD e FDA para ensaios toxicológicos e possui normas bem determinadas para a detecção de compostos (farmacocinética; RDC n°27).

Uma vez atestada a segurança do composto, dá-se início a fase clínica que é dividida em quatro fases (FDA, 2020). A fase I promove o teste do composto em poucos voluntários ou pacientes (20 a 100), visando testar a dosagem e segurança do composto agora em humanos, tendo a sua duração variada em meses. A partir de resultados positivos na fase I o composto é encaminhado para a fase II, sendo aumentado o número de pessoas, agora pacientes da doença/condição (200 a 400), onde é determinada a dose eficaz do composto, fase essa que pode levar de meses até 2 anos. A fase III já parte para um número maior (300 a 3000) de pacientes, visando a segurança e eficácia bem como monitoramento de efeitos adversos. Já na fase IV, o número de pacientes atinge a casa dos milhares e é chamada de farmacovigilância. As fases III e IV são as mais longas podendo levar até 4 anos no caso da fase III ou mais (fase IV). Assim, o composto que chega até a fase IV do estudo pode ser aprovado pelo órgão controlador e virar uma nova alternativa para o tratamento de doenças.

A existência de muitas etapas e a dificuldade das etapas pré-clínica e clínica, determinam que a duração do processo leve de 10 a 15 anos, um tempo considerado muito longo em se tratando de doenças que não diminuem sua velocidade de prejuízo e mortalidade. Além disso, o número de novos medicamentos aprovados pelo FDA apresentou uma queda constatada a partir de 1996, o que pode indicar a falta de interesse de indústrias farmacêuticas e governos em financiar

grupos de pesquisa que trabalhem como “caçadores de novos medicamentos” (Malik, 2008; Knutsen, 2011; Mullard, 2011).

A fim de diminuir o tempo entre as etapas e facilitar o processo de desenvolvimento de fármacos, novas estratégias têm sido empregadas. Dependendo do que se conhece de uma doença, do composto e da biologia do patógeno, pode-se aplicar uma triagem fenotípica ou uma triagem baseada em alvo. Ferramentas computacionais estão intrinsecamente ligadas nos processos uma vez que sua aplicação em triagens virtuais se faz cada vez mais presente e necessária. O reposicionamento de fármacos e a síntese de moléculas, modificadas ou não, baseadas em produtos naturais, tem sido estratégias amplamente utilizadas (Manly *et al.* 2008; Swinney & Anthony, 2011; Neves *et al.* 2018).

Produtos naturais por sua vez são grandes aliados da química medicinal. São encontrados em toda a natureza passando por oceanos e florestas, até microrganismos que os produzem. O uso de folhas e ervas na tentativa de uma melhora ou cura de doenças se entrelaça pela história do desenvolvimento das civilizações, sendo a medicina Egípcia, a Greco-Romana e a Chinesa as mais tradicionalmente reconhecidas (Viegas *et al.* 2006). Ao exemplo daqueles que ainda são encontrados no Brasil, povos indígenas também são conhecidos por seu extenso saber em plantas medicinais, além de dominarem técnicas de coloração e essências repelentes (Li & Weng, 2017).

O sucesso das plantas na química medicinal se dá por substâncias que garantem sua sobrevivência no ambiente. Por serem imóveis e diariamente enfrentarem ataques de animais e desbalanços ambientais, as plantas desenvolveram mecanismos de produção de substâncias que promovem sua manutenção no ambiente, como colorações e fragrâncias, que atraem animais polinizadores, e ao mesmo tempo podem ser tóxicas para sua proteção (Thomford *et al.* 2018). Essas substâncias são moléculas bioativas provenientes do chamado metabolismo secundário e são classificados de acordo com sua via metabólica em chalconas, lignanas, alcaloides, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenoides e outros, e são amplamente estudadas na química medicinal moderna (Salem & Werbovetz, 2006; Nunes *et al.* 2020).

Ao longo da evolução, com o avanço de técnicas químicas, o estudo sobre plantas e seus metabólitos evoluiu. Em 1804, Sertürner isolou, a partir da papoula, a morfina, um opióide analgésico amplamente utilizado na medicina. Em 1929 Fleming identificou as propriedades antibacterianas da penicilina, abrindo espaço para os

produtos naturais também no campo dos antibióticos (Yuan *et al.* 2016; Beutler, 2020). Assim, o avanço tecnológico permitiu que os produtos naturais se tornassem uma base para os processos de desenvolvimento/descobrimto de fármacos. Segundo estudos publicados, entre 1981-2014, ao menos um terço das drogas aprovadas pelo FDA para uso terapêutico são produtos naturais, derivados de produtos naturais ou compostos sintéticos que possuem ou mimetizam farmacóforos naturais (Newman, 2003; 2010; 2016; Thomford *et al.* 2018). A rosuvastatina é um exemplo de droga sintética que mimetiza o farmacóforo da mevastatina, extraída do fungo *Penicillium citrinum* (Rodrigues *et al.* 2016). Atualmente, a lista de produtos naturais licenciados é extensa e inclui fármacos aprovados para as mais diversas doenças como hipertensão, diabetes, malária, câncer e outras (Patrige *et al.*, 2016).

No campo das doenças causadas por protozoários, onde se inclui a Leishmaniose, segundo Schmidit *et al.* (2012), mais de 900 metabólitos secundários possuem atividade antiprotozoária descrita. Porém, apenas uma pequena porcentagem desses compostos ultrapassa a primeira fase do processo de desenvolvimento de fármacos uma vez que a dificuldade de isolamento de moléculas bioativas e a complexidade das estruturas naturais que dificultam sua síntese, tornam o processo de desenvolvimento de produtos naturais ainda mais lento (Schmidt *et al.* 2012 a e b; Thomford *et al.* 2018; Beutler, 2020).

1.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grande complexo de metabólitos secundários consumidos em grande escala pelo homem uma vez que estão presentes em frutas, vegetais, especiarias, chás, café e vinho. Estruturalmente, flavonoides possuem sua denominação por apresentarem 2 anéis aromáticos ligados a um núcleo flavana, apresentando assim uma estrutura C6-C3-C6 (Figura 1.19). Dependendo das substituições feitas em seus anéis, são subdivididos em flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, isoflavanas, isoflavanonas, flavanois, isoflavanois, neoflavonoides, dihidroflavonol, flavan-3-ol, flavan-4-ol, rotenoides e pterocarpanos (Hoensech & Oertel, 2012; Kumar *et al.* 2013; Gervazoni *et al.*, 2020).

Os efeitos causados pelos flavonoides nos organismos vivos vão desde a coloração atrativa de flores e frutos e proteção das plantas contra herbivoria, ataque de fungos e bactérias, ao forte potencial antioxidante estudado na dieta humana e

seu poder anti-inflamatório, auxiliando no controle da diabetes, doenças cardiovasculares, cânceres e diversas outras doenças (Panche *et al.* 2016; Tauchen *et al.* 2020). A atividade antileishmania de diversos flavonoides vem sendo descrita. A quercetina, apigenina, epigallocatequina 3-O-galatto, Flavokavaina B são alguns exemplos de flavonoides com efeitos leishmanicida promissores (Gervazoni *et al.* 2020).

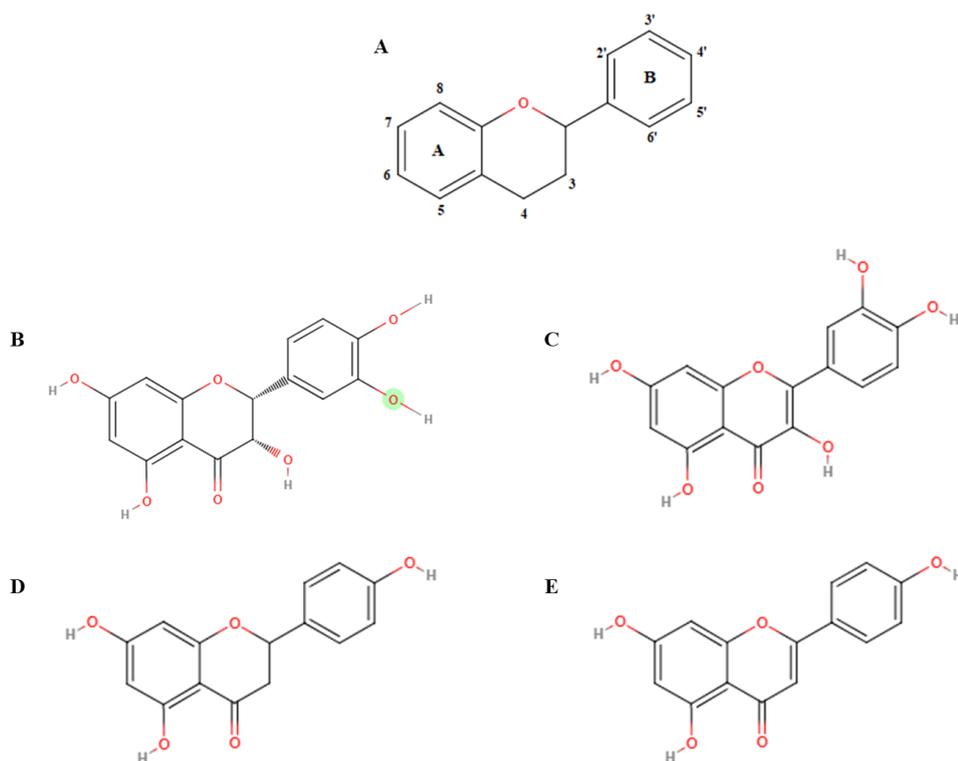


Figura 1.19 Estrutura básica dos flavonóides e seus subgrupos. A- Esqueleto flavonoide destacando os anéis aromáticos A e B e o núcleo flavan no meio; B a E - Exemplos de compostos dos subgrupos: B- Flavanonol (Taxifolina); C- Flavanol (Quercetina); D- Flavanona (Narigenina); E- Flavona (Apigenina);

1.3.1.1 2'-hidroxiflavanona

Pertencente à classe flavanona, a 2HF é encontrada em sua maioria em cascas e sementes de frutas cítricas, além de folhas, caules e raízes de diversas plantas (Figura 1.20). Um amplo estudo da 2HF vem sendo conduzido na área oncológica na qual a flavanona se mostrou promissora no tratamento de diferentes tipos de câncer como o de mama, próstata, pâncreas, rim, pulmão, cólon, pele e ossos, demonstrando variados mecanismos de ação como a indução de apoptose ou supressão da sinalização de vias inflamatórias como a JAK/STAT, sendo capaz

de impedir a proliferação e vascularização de tumores e até a diferenciação de mutantes tumorais (Nagaprashanta *et al.* 2011; 2018; 2019; Hsiao *et al.* 2007; Shin *et al.* 2012; Singhal *et al.* 2015; Bose *et al.* 2019; Yue *et al.* 2020).

Em relação a leishmaniose, dados prévios demonstram o efeito *in vitro* e *in vivo* da 2HF em *L. amazonensis*, sendo a 2HF capaz de diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária quando comparado ao controle e ao fármaco de referência em modelo murino de leishmaniose cutânea, não demonstrando sinais bioquímicos e hematológicos de toxicidade.

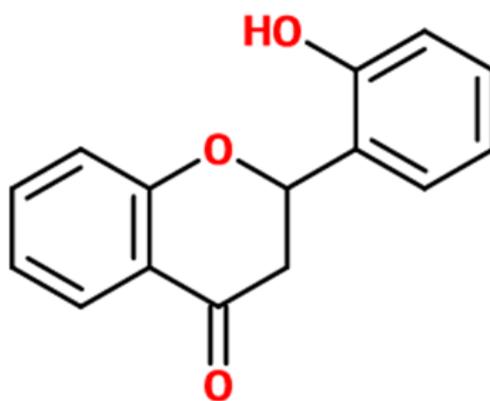


Figura 1.20 Estrutura química da 2'-hidroxiflavanona

1.4 Justificativa

Considerando o cenário epidemiológico no Brasil, país que concentra um alto índice de LV e LC dentro da América Latina, e no mundo, com países como a Índia que sofre com sérios problemas de resistência e falha terapêutica, as Leishmanioses constituem um grande problema de saúde pública, problema esse enfatizado pela economia dos países afetados, pela falta de vacinas licenciadas e por todos os problemas inerentes à quimioterapia atual abordados nos tópicos acima. Neste cenário, é importante a busca por alternativas à quimioterapia atual. Para desenvolver um novo fármaco, são necessárias diversas etapas desde o seu

descobrimiento até o estudo clínico, passando por etapas importantes como a etapa pré-clínica de toxicidade e a etapa de farmacocinética.

Flavonoides vem sendo estudados nas últimas décadas, demonstrando um potencial leishmanicida muito favorável, agregado ao fato de serem produtos naturais que visam diminuir o custo, a toxicidade e os efeitos colaterais. A 2HF é uma flavanona, classe dos flavonoides que tem apresentado bons resultados no combate a tumores. Em *Leishmania*, no trabalho publicado por Gervazoni *et al.* (2018), demonstrou-se os efeitos *in vitro* e *in vivo* da 2HF em modelo murino de leishmaniose cutânea experimental. Visto que a resistência é um problema a ser solucionado na quimioterapia da Leishmaniose, este trabalho visa demonstrar os efeitos da 2HF em modelo murino de leishmaniose cutânea resistente além de dar início as etapas pré-clínica e farmacocinética do composto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar o efeito *in vitro* e *in vivo* da 2HF em *L. amazonensis* resistente ao Sb+3, bem como desenvolver e validar um método analítico para doseamento da 2HF e avaliar o perfil farmacocinético e toxicológico da 2HF por via oral em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito *in vitro* da 2HF em macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* sensíveis e resistente ao Sb+3 em comparação ao antimoniato de meglumina;

Demonstrar o efeito *in vivo* da 2HF em camundongos infectados por *L. amazonensis* sensíveis e resistentes ao Sb+3 em comparação ao antimoniato de meglumina;

Demonstrar a manutenção da resistência em promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao Sb+3 diferenciadas *in vitro* a partir de amastigotas recuperadas de lesão;

Avaliar a toxicidade aguda e subaguda da 2HF por via oral em modelo de roedor (murino), determinando os parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos;

Estabelecer o perfil farmacocinético da 2HF em modelo murino;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos e reagentes

A 2'-hidroxiflavanona ($\geq 98\%$ de pureza, lote SLBT8413), Narigenina ($\geq 95\%$ de pureza, lote BCBB6396), meios de cultura Schneider e RPMI-1640, tartarato de antimônio e potássio hidratado (Sb^{+3}) e Dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidas comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soro fetal bovino foi obtido da Cultilab (Campinas, Brasil). A acetonitrila e metanol foram obtidos comercialmente da Tedia (Fairfield, EUA). O ácido fórmico PA foi obtido comercialmente da J.T.Baker (New Jersey, EUA). O terc-butilmetiléter (TBME) foi obtido da Scharlab (Barcelona, Espanha). O antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), utilizado como fármaco de referência no experimento *in vivo*, foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ).

3.2 Parasitos

As promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa MHOM/BR/77/LTB0016, foram cultivadas em meio Schneider pH7.2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich). Passagens foram feitas a cada 3 ou 4 dias para manutenção dos parasitos e estes foram armazenados em estufa de 26°C BOD (Biochemical Oxygen Demand). Promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao tartarato de antimônio e potássio foram obtidas de acordo com Liarte *et al.* (2011).

3.3 Animais

Camundongos de linhagem BALB/c (fêmeas, 8 a 10 semanas de idade, 20g) e Swiss Webster (machos e fêmeas, 5 a 6 semanas de idade, 25g), mantidos sob controle de temperatura (23 ± 2 °C) e em ciclo claro/escuro seguindo regras do setor, durante 7 dias para ambientação, com livre acesso à água e alimento, foram fornecidos pelo Instituto Ciências e Tecnologia em Biomodelos, ICTB/FIOCRUZ). Todos os experimentos utilizando animais foram realizados no biotério do pavilhão

Leônidas Deane, campus Mangueiras/IOC/Fiocruz e seguiram as recomendações do Guia de cuidado e uso de animais de laboratório do Conselho Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), aprovados pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC, número da licença: L-11/2017).

3.4 Efeito da 2HF em leishmania sensível e resistente ao antimônio

3.4.1 Atividade *in vitro*

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidos via lavagem peritoneal em meio RPMI-1640 gelado, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A concentração de macrófagos foi ajustada para 2×10^6 e a solução foi depositada em câmaras LAB-TEKS (Nunc, Nova Iorque, EUA), 400 μ L por poço. Após uma hora de aderência em estufa a 37°C e 5% de CO₂ o meio foi trocado por uma solução contendo promastigotas de *L. amazonensis*, sensíveis e resistentes ao Sb+3, ajustadas a uma proporção infectiva de 5:1 (cinco promastigotas para um macrófago). O tempo de infecção inicial utilizado foi de 3 horas, sendo posteriormente realizada uma lavagem com meio RPMI-1640 em temperatura ambiente para retirada de promastigotas e macrófagos não aderentes. Após mais 18 horas de infecção, macrófagos infectados foram incubados com diferentes concentrações de 2HF (0 μ M – 48 μ M) e antimoniato de meglumina (0 μ M - 200 μ M) por 72 horas. Nos poços controle, foi adicionado o veículo da 2HF, DMSO (0,2% v/v). As lâminas foram coradas com panótico rápido Instant Prov (NewProv, Curitiba, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem direta em microscópio óptico, estabelecendo um mínimo de 200 macrófagos/poço contados. O resultado foi expresso por índice de infecção (%macrófagos infectados x número de amastigotas / número total de macrófagos).

3.4.2 Citotoxicidade da 2HF em macrófagos murinos

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidos via lavagem peritoneal em meio RPMI-1640 gelado, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A concentração de macrófagos foi ajustada para 2×10^6 células/ml e a solução foi depositada em câmaras LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, EUA), 400 μ L por poço. Após uma hora de aderência em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de

CO₂ o meio foi trocado por uma solução contendo diferentes concentrações de 2HF (0 a 96µM). Após 72 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de conversão da resazurina forma não fluorescente, solúvel e de cor azulada, que a medida que vai sendo reduzida pela atividade mitocondrial da célula, vai sendo transformada em em resorufina, molécula fluorescente de cor rosa. A viabilidade foi obtida através da mensuração da fluorescência de resorufina formada. A fluorescência foi mensurada pelo aparelho SpectraMax M2—Molecular Devices, Silicon Valley, USA, usando os comprimentos de onda de 560nm para emissão e 590 para excitação.

3.4.3 Atividade *in vivo*

Para avaliar o efeito *in vivo* da 2HF em células sensíveis e resistentes, camundongos BALB/c, 5 por grupo, foram infectados, na orelha direita, com promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao Sb+3 (4x10⁶ células em 10 µL). O tratamento foi iniciado após 7 dias de infecção com 50mg/kg/dia de 2HF, via ora. L. A 2HF foi solubilizada em DMSO (veículo, 0,2% v/v) e solução de suspensão OraPlus. O tratamento oral foi realizado via gavagem (sonda orogástrica), com 100 µL de solução. O grupo controle recebeu somente o veículo DMSO solubilizado em OraPlus. Como controle positivo, o antimoniato de meglumina (antimonial pentavalente) foi utilizado via intraperitoneal, 100mg/kg/dia solubilizado em PBS. O tamanho da lesão foi mensurado por paquímetro, duas vezes por semana. Após 35 dias pós infecção, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, após anestesia com cetamina (200µg/kg) e xilazina (16µg/kg).

3.4.3.1 Avaliação da carga parasitária

Após a eutanásia, a orelha infectada foi coletada, pesada e macerada em meio Schneider completo com 10% de SFB. A suspensão resultante foi ajustada para concentração de 10mg de tecido/mL (calculado a partir do peso da orelha infectada por volume de suspensão) e plaqueada para análise de diluição limitante (LDA), diluída em série em base 2, 200µL/poço. A carga parasitária foi estimada a partir da maior diluição onde foi observado o crescimento de promastigotas após 7 dias de incubação a 26°C em estufa BOD.

3.4.3.2 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Antes da eutanásia os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com 100µL de solução contendo cetamina (200µg/kg) e xilazina (16µg/kg). O sangue foi coletado via punção cardíaca e dividido em tubos contendo EDTA para análises hematológicas ou centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos para separação do soro para análises bioquímicas. Todas as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas pela Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fiocruz (PDTIS/ICTB).

3.4.3.3 Confirmação da resistência

Após os 7 dias de análise da LDA, promastigotas recuperadas de cada grupo (veículo, tratadas com 2HF e tratadas com antimoniato de meglumina) foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB. As promastigotas foram incubadas com Sb+3 (0,3µM - 5000µM) por 72 horas em placa de 96 poços. A viabilidade celular foi avaliada utilizando a resazurina e mensurada via fluorimetria, utilizando os comprimentos de onda de 560nm para emissão e 590nm para excitação. Promastigotas de *L. amazonensis* sensíveis foram utilizadas como controle comparativo.

3.5 Avaliação da toxicidade de 2HF em modelo roedor

Os ensaios de toxicidade foram adaptados das diretrizes n° 425 (aguda) e n° 407 (subaguda), da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 2008).

3.5.1 Toxicidade aguda (método up and down)

Camundongos Swiss Webster fêmeas e machos (separadamente), foram divididos em dois grupos, 6 animais cada. O consumo de água e ração e o peso corporal foi avaliado diariamente desde o primeiro dia de aclimação até a eutanásia. Após 7 dias, iniciou-se o tratamento com 175mg/kg, dose única, de 2HF solubilizada em DMSO (veículo 10% v/v) e água filtrada (180µL), via oral. Após um

intervalo de 24 horas, não ocorrendo óbito, os camundongos receberam uma dose de 550 mg/kg de 2HF, seguindo a etapa up do método descrito pela OECD, com um aumento de dose em progressão de valor 3,14 ($\pi - \text{Pi}$). Seguindo outro intervalo de 24 horas sem óbitos, foi administrada a terceira dose de 2HF de 1750mg/kg. O grupo controle seguiu o protocolo do tratado recebendo somente o veículo (DMSO) e água. Os grupos foram observados por 14 dias contados a partir da primeira dose.

3.5.2 Toxicidade subaguda

Camundongos Swiss Webster fêmeas e machos (separadamente), foram divididos em grupos, 6 animais cada. O consumo de água e ração e o peso corporal foi avaliado diariamente desde o primeiro dia de aclimação até a eutanásia. Após 7 dias, iniciou-se o tratamento diário com diferentes doses de 2HF, usando o fator 10 para progressão da dosagem. As doses de 2HF escolhidas consistiram em 5 mg/kg/dia, 50 mg/kg/dia e 500 mg/kg/dia, via oral, solubilizadas em DMSO (10% v/v) e água filtrada (180 μL). A duração do tratamento foi de 28 dias.

3.5.3 Parâmetros clínicos

Os camundongos de ambos os experimentos, toxicidade aguda e subaguda, foram observados diariamente, durante 21 dias e 35 dias, respectivamente, respeitando um horário padrão coincidente com a administração do composto para observação de possíveis efeitos colaterais. Os parâmetros clínicos analisados foram: prostração ou agressividade, respiração anormal, pele, pelos, olhos e mucosas, coloração da urina e consistência das fezes. A mortalidade também foi avaliada.

3.5.4 Parâmetros bioquímicos

Ao final de cada experimento, antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com 100 μL de solução contendo cetamina (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e xilazina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}$). O sangue foi coletado via punção cardíaca e dividido em tubos contendo EDTA para análises hematológicas ou centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos para separação do soro para análises bioquímicas. Todas as

análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas pela Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fiocruz (PDTIS/ICTB).

3.5.5 Análises histológicas

3.5.5.1 Fixação e processamento

Após a eutanásia em cada experimento, órgãos selecionados – fígado, baço, coração, pulmão, rins e estômago - foram coletados, pesados e fixados por um mínimo de 7 dias em formalina de Millonig modificado por Carson (Carson *et al.* 1973). A seguir, o material foi clivado, processado com banhos em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 90% e 100%), etapa de desidratação, e três banhos de xilol, etapa de diafanização. Por último, os órgãos foram banhados e incluídos em parafina para obtenção de cortes de 5µM de espessura em lâminas albuminizadas.

3.5.5.2 Coloração

A técnica de hematoxilina-eosina foi escolhida para observação de um aspecto morfológico geral de cada tecido. Os cortes foram desparafinizados com três banhos de xilol, seguindo para hidratação por concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 70%). Após lavagem com água destilada foi feita a coloração por hematoxilina de Mayer por 20 minutos. A seguir, os cortes foram banhados em álcool etílico a 70% e corados com eosina-floxina por 30 segundos. Os cortes foram lavados com álcool 90% e desidratados em álcool 100%, e clarificados com xilol. Uma vez corados, os cortes foram montados em lamínula utilizando Goma de Damar.

3.5.5.3 Análise dos cortes

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio AxioObsever Z1 (Zeiss, Alemanha), equipado com lentes objetivas: Plan-NEOFLUAR 10X/0,3; ACROPLAN 20X/0,45; Plan-NEOFLUAR 40X/1,3 oil DIC; ACHROPLAN 40X/0,65; Plan-APOCHROMAT 63X/1,4 oil (Zeiss). As fotomicrografias foram obtidas com câmera digital AxioCam mRc5 ou HRC (Carl Zeiss Vision, Alemanha), em

colaboração com a Dra. Jacline de Paula Ayres da Silva do Laboratório de Patologia, IOC, Fiocruz.

3.6 Desenvolvimento e validação do método de detecção da 2HF por LC-MS/MS

3.6.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

A faixa de concentração estabelecida para o método foi de 1,00 até 250,00 ng/mL. O analito, 2'OH-flavanona (2HF) e o padrão interno (PI) naringenina (NRG) foram extraídos do sangue de camundongo por extração líquido-líquido empregando como solução de extração terc-butil-metil-éter (TBME) 100%. Após a extração e centrifugação uma alíquota de 1,00 mL da fase orgânica foi transferida para um microtubo de polipropileno limpo. Após esta etapa, a amostra foi evaporada sob um fluxo de N₂ gasoso e a amostra foi reconstituída em seguida com 0,300mL de solução de diluição composta por B: acetonitrila: metanol (80:20 - v/v) e A: solução aquosa contendo ácido fórmico 0,1% com composição final de 80 B:20 A – (v/v), sob agitação vigorosa. Uma alíquota de 0,300 mL foi transferida para um frasco (vial contendo insert) e analisada por cromatografia líquida, em uma coluna Zorbax Eclipse C18 5µm x 150 mm x 4,6 mm i.d., com detecção por espectrometria de massas em modo sequencial com ionização por electrospray negativo (ESI-) usando o modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Tabela 3.1 Condições cromatográficas

Parâmetros	Descrição
Coluna analítica	Zorbax Eclipse C 18 5µm x 150 mm x 4.6 mm id
Fase móvel	A: 35% / B: 65%
Fluxo	0,800 mL/min
Pressão do sistema	96 bar
Temperatura do forno de coluna	40°C
Temperatura do autosampler	10°C
Volume de injeção	20µL
Tempo de corrida	5,50 min
Temperatura do laboratório	22 ± 2 °C
Umidade relativa do ar	45 ± 2 °C
Tempos de retenção	2HF: 3,74 min / PI: 2,23 min
Tempo total de corrida	5,50 min

Tabela 3.2 Condições do espectrômetro de massas

Parâmetro	Descrição
Modo de ionização ESI	Negativo
Voltagem do ionspray	- 4500 V
Temperatura da fonte	500 °C
Cad gas	6 (CAD)
Curtain gas	15 (CUR)
Ion source 1	45 (GS1)
Ion source 2	45 (GS2)

Tabela 3.3 Parâmetros individuais dos íons (MRM)

Parâmetros	2HF	PI
Ion precursor (m/z)	239.094 m/z	270.980 m/z
Ion produto (m/z)	119.000 m/z	151.000 m/z
Tempo (msec)	250 msec	250 msec
DP (V)	- 70 V	- 75 V
CE (V)	- 23 V	- 26 V
EP (V)	-10 V	-10 V
CXP (V)	- 1 V	- 9 V
EM (V)	2400 V	2400 V

3.6.2 Validação do método

3.6.2.1 Teste de seletividade

Neste ensaio foram utilizadas as condições cromatográficas descritas acima. Foram analisadas amostras da matriz biológica, isentas de padrão interno e do analito, obtidas de 6 (seis) fontes distintas. Foram comparadas as respostas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção do analito que se apresentaram inferiores a 20% (vinte por cento) em relação as amostras processadas do LIQ (limite inferior de quantificação). As respostas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção do PI apresentaram-se inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI.

3.6.2.2 Teste de efeito residual

Foram realizadas, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ. Os resultados foram comparados com as amostras já processadas.

3.6.2.3 Teste de linearidade – curva de calibração

A faixa de linearidade contemplando o limite inferior de quantificação (LIQ) e o maior nível de concentração da curva de calibração (LSQ) foi definida no desenvolvimento do método bioanalítico. O modelo de regressão linear utilizado foi o heterocedástico, demonstrando o aumento do desvio padrão em função do aumento da concentração plasmática calculada. Utilizou-se para este teste a razão das áreas do analito e do padrão interno referentes a primeira curva de calibração da validação bioanalítica. A escolha do fator de ponderação mais adequado foi realizada de acordo com o método que apresentou o menor valor da soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva (% ER). As amostras da curva de calibração foram, inicialmente, adicionadas do padrão do analito e do padrão interno e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação. O Método ponderado escolhido foi 1/x².

3.6.2.4 Teste de efeito matriz

Para este estudo, em específico, a matriz biológica utilizada foi o sangue de camundongo, o que considerou em suas análises 6 (seis) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais e duas lipêmicas. Para cada amostra foi obtido o fator matriz normalizado por PI (FMN). Foram analisadas as respostas em área obtidas das amostras de branco de matriz biológica submetidas ao processo de extração e adicionadas, posteriormente, de analito e de padrão interno para verificação do efeito de matriz biológica assim como amostras isentas de matriz biológica (amostras 100% em solução). O fator matriz normalizado foi calculado a partir da fórmula:
$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz} / \text{resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução} / \text{resposta do PI em solução}}$$

3.6.2.5 Teste de precisão e exatidão

Os testes de precisão e exatidão incluíram testes de diluição das amostras em matriz biológica para a possível validação da quantificação de amostras com valores de concentração acima do maior nível da curva de calibração (LSQ). A diluição das amostras prosseguiu empregando 90% da matriz biológica sangue de camundongo, isento de analito e padrão interno, e 10% da matriz biológica sangue de camundongo adicionada do analito a ser diluído. Após a mistura dos volumes especificados, realizou-se a agitação para a homogeneização da mistura e posterior aliquotagem do volume de trabalho. Ao final da aliquotagem adicionou-se padrão interno, seguido do processo de extração das amostras.

3.6.2.6 Teste de estabilidade em matriz biológica

Os estudos de estabilidade foram iniciados e concluídos antes do início da análise das amostras em estudo. A estabilidade em matriz biológica foi avaliada através dos testes de ciclos de congelamento e descongelamento. Todos os ensaios foram realizados com oito réplicas para cada nível de concentração das amostras. Para a realização dos testes de estabilidade foi realizado o teste de quantificação

inicial (TQI), de acordo com o artigo 34 da Resolução-RDC nº 27/2012. Neste teste foram analisadas amostras de CQB (baixa) e CQA (alta), e a concentração foi determinada por meio de uma curva de calibração recém-preparada. O número de réplicas a serem analisadas em cada controle foi o mesmo empregado nos testes de estabilidade.

3.7 Determinação do Perfil farmacocinético da 2HF

3.7.1 Protocolo de dosagem

Camundongos BALB/c, 5 por grupo, em condições descritas no item 3.3, receberam 10mg/kg de 2HF, dose única, solubilizada em DMSO (2%) e suspensa em Oraplus. A administração foi feita por via oral utilizando agulha de gavagem.

3.7.2 Coleta de amostras

Para análises farmacocinéticas, foi utilizado o sangue total, coletado via plexo orbital. Para anestesia, foi utilizado o cloridrato de tetracaína, sendo administrada uma gota no orbital escolhido, 5 minutos antes da coleta. A coleta foi realizada com pipetas pasteur heparinizadas, previamente autoclavadas, e o sangue foi transferido para microtubos de 1,5 mL também heparinizados. Os tempos de coleta determinados foram: 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 30, 45, 60,90, 120 e 240 minutos pós administração do composto.

3.7.3 Obtenção e cálculo dos parâmetros farmacocinéticos

Para obter os parâmetros farmacocinéticos, foi estabelecido um método de quantificação da 2HF em sangue total de camundongos BALB/c por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) com ionização por eletronebulização negativa (ESI-) pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A Narigenina foi utilizada como padrão interno do experimento. A cromatografia líquida foi realizada em modo isocrático e sua fase móvel consistiu em uma mistura de metanol:acetonitrila (80:20) e uma solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico (65:35, v/v). A 2'-hidroxiflavanona e o

padrão interno (Narigenina) foram extraídos do sangue de camundongo por extração líquido-líquido (ELL), utilizando o TBME. As análises foram realizadas no SEFAR (Serviço de Equivalência e Farmacocinética /Fiocruz) sob supervisão do Dr. Douglas Pereira Pinto. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos por modelagem matemática compartimental no programa Phoenix WinNonlin® 8.1 (CERTARA) a partir dos valores gerados pelas análises de LC-MS/MS.

3.8 Cálculos e análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados sob um n mínimo de 3, com triplicatas independentes quando aplicável. Todos os cálculos de IC₅₀ foram realizados por regressão logarítmica utilizando o programa GraphPad Prisma 6 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). O teste t de Student e análises de variância ANOVA foram realizadas utilizando o programa destacado acima. Significância foi considerada a partir de $p \leq 0,05$. Resultados são expressos por média e erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da 2HF em leishmania sensível e resistente ao antimônio

4.1.1 Atividade *in vitro*

Seguindo os resultados prévios promissores da 2HF em promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao Sb^{+3} , o passo seguinte seria analisar o efeito do composto sob a forma intracelular de *L. amazonensis*, a forma amastigota. Sendo assim, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* sensíveis e resistentes e incubados com 2HF. A fim de demonstrar que a resistência não foi perdida durante o processo de transformação em amastigotas dentro do macrófago, o efeito do antimoniato de meglumina também foi avaliado. O antimoniato de meglumina foi capaz de inibir o índice de infecção tanto em células sensíveis quanto resistentes de maneira dose dependente (Figuras 4.1A e 4.1B), demonstrando um IC_{50} de $9,3\mu M$, para sensíveis, e IC_{50} de $35,73\mu M$, para resistentes. Observa-se uma diferença entre os valores de IC_{50} destacando uma resistência alcançada aproximadamente de 4 vezes. A 2HF também foi capaz de inibir ambos os índices de infecção, de maneira concentração dependente (Figuras 4.1C e 4.1D), demonstrando valores de IC_{50} de $3,09\mu M$ para as células sensíveis e $3,36\mu M$ para as células resistentes. 2HF alcançou porcentagens de inibição de 99,7% (sensíveis) e 99,6% (resistentes) em sua maior concentração utilizada ($48\mu M$). Os valores comparativos estão expostos na Tabela 4.1.

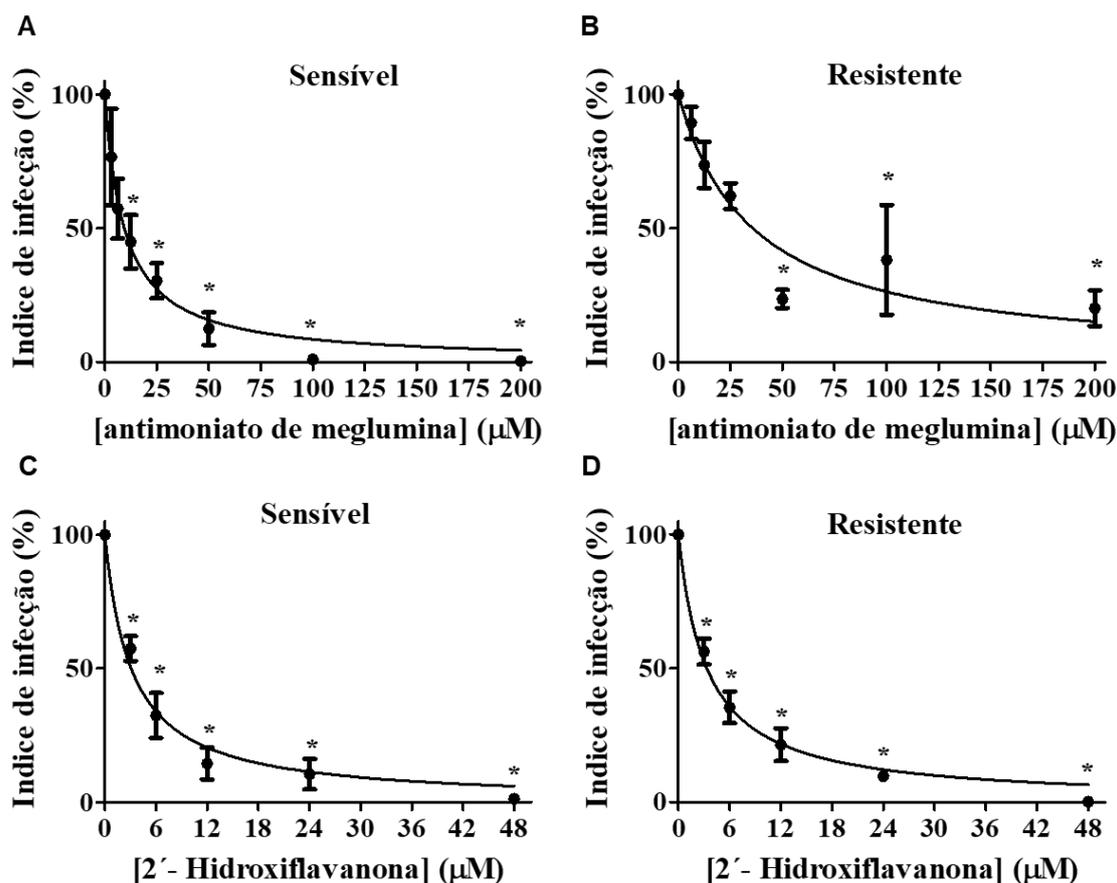


Figura 4.1 Efeitos da 2HF e antimoniato de meglumina sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis* sensível e resistente. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com promastigotas sensíveis ou resistentes de *L. amazonensis* a 37°C e 5% de CO₂. Após 3 horas de infecção, as promastigotas remanescentes foram removidas em lavagem com meio RPMI a temperatura ambiente. Após 18 horas, os macrófagos infectados foram incubados na presença ou ausência de concentrações crescentes de 2HF (3 a 48 μM) ou antimoniato de meglumina (3,125 a 200 μM) em duplicata, por 72 horas. O índice de infecção foi determinado por contagem direta em microscópio óptico. Pelo menos 200 macrófagos foram contados em cada campo. Os controles foram incubados com os respectivos veículos (0,2% DMSO - 2HF e PBS - antimoniato de meglumina). A e B: Infecção por promastigotas sensíveis e resistentes, respectivamente, tratadas com antimoniato de meglumina. C e D: Infecção por promastigotas sensíveis e resistentes, respectivamente, tratadas com 2HF. Os valores nos gráficos representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes. O IC₅₀ foi calculado por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 6.0. * indica diferença significativa relativa ao controle (p < 0,05).

Tabela 4.1 Comparativo de IC₅₀ obtidos por 2HF e antimoniato de meglumina em macrófagos infectados por *L. amazonensis* sensível e resistente ao antimônio

	Antimoniato de meglumina		2HF	
	S	R	S	R
Valor do IC ₅₀	9,37 μM	39,38 μM	3,09 μM	3,36 μM

S: sensível; R: resistente

O efeito da 2HF também pode ser observado na Figura 4.2 em fotomicrografias representativas das lâminas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* sensíveis (4.2A) ou resistentes (4.2B), que demonstram as mudanças morfológicas dos macrófagos e evidenciam a redução do índice de infecção provocada pela 2HF.

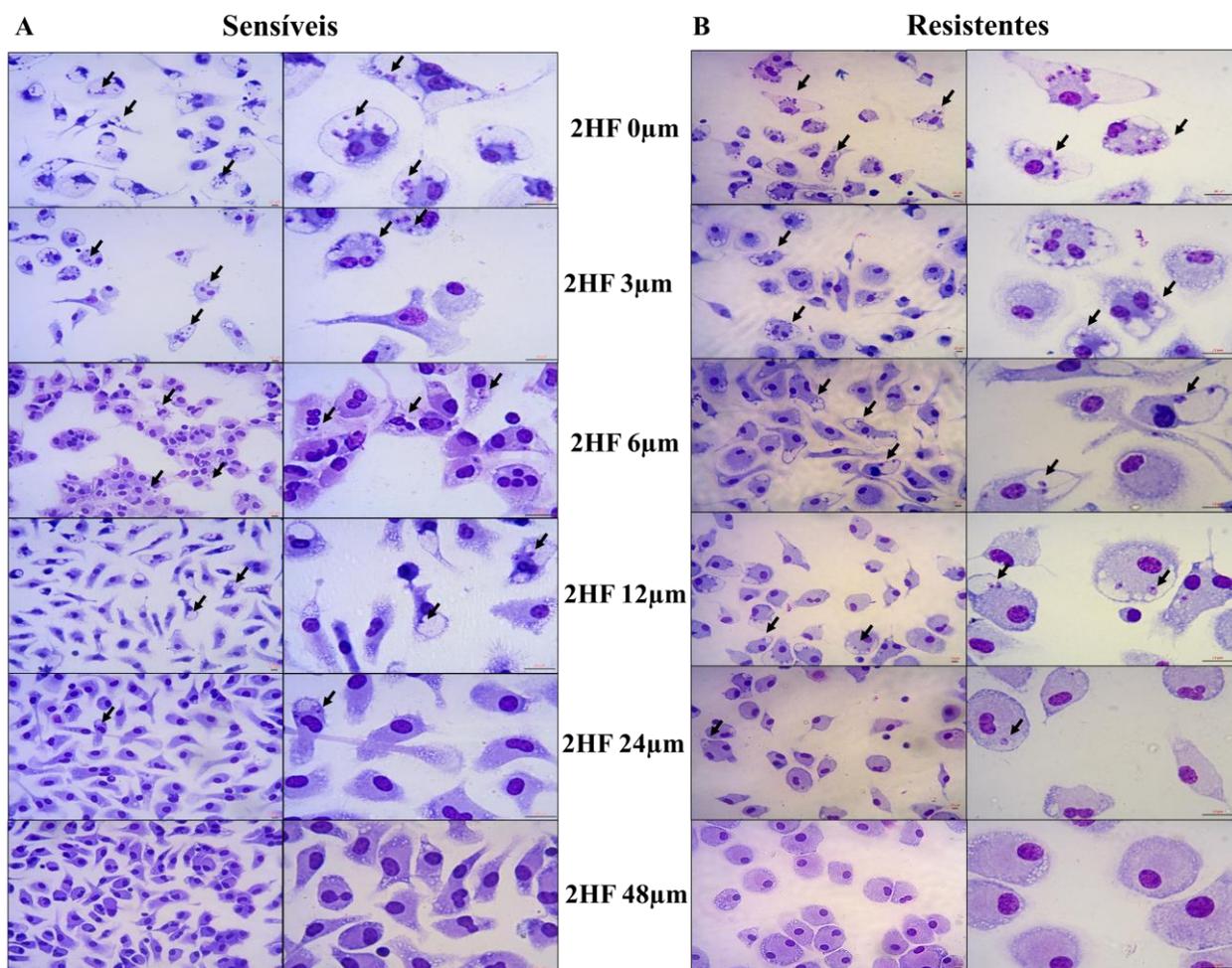


Figura 4.2 Fotomicrografias ilustrativas do efeito de 2HF em macrófagos infectados por *L. amazonensis* sensível e resistente. Macrófagos peritoneais murinos infectados por promastigotas sensíveis (Painel A) e promastigotas resistentes ao antimoniato de meglumina (Painel B), tratadas com diferentes concentrações de 2HF. Escalas correspondem a 10µm. Setas pretas indicam a presença de amastigotas.

Para determinar a citotoxicidade da 2HF, macrófagos peritoneais de BALB/c foram plaqueados e incubados com diferentes concentrações do composto (0 a 96 µM) por 72 horas. Como demonstrado na figura 4.3 2HF foi capaz de inibir viabilidade celular somente na sua maior concentração utilizada (96 µM). O valor de CC₅₀ obtido foi de 88,15 µM, e o índice de seletividade (IS) foi calculado tanto para células sensíveis (IS = 28,5) quanto para resistentes (IS = 26,2), demonstrando a seletividade e segurança das concentrações utilizadas.

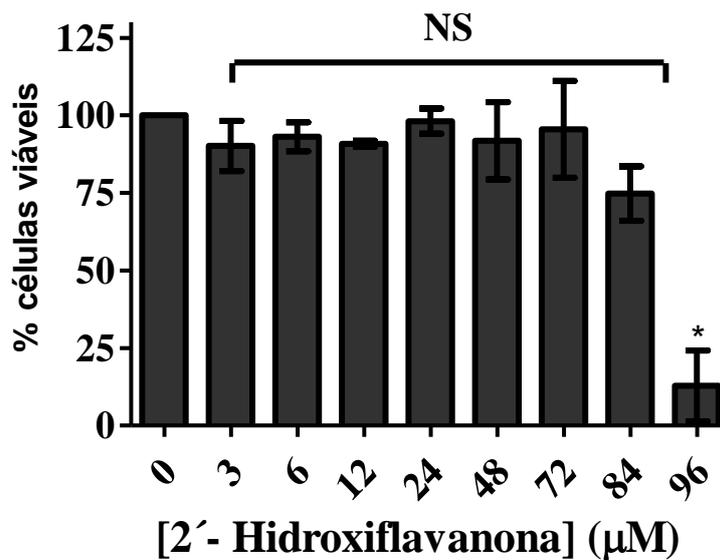


Figura 4.3 Citotoxicidade da 2HF em macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram incubados na ausência ou na presença de 2HF (3 a 96µM) por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de resazurina em resorufina. A leitura foi realizada por espectrofluorímetro (SpectraMax M2—Molecular Devices, Silicon Valley, USA). Excitação/emissão: 560/590 nm. Os valores representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes. O IC₅₀ foi calculado por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 6.0. * indica diferença significativa relativa ao controle (p < 0,05).

4.1.2 Atividade *in vivo*

Para avaliar o efeito da 2HF *in vivo*, em modelo murino de leishmaniose cutânea utilizando parasitos resistente ao antimônio, camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao Sb⁺³ e 7 dias após a infecção, os camundongos foram tratados com 2HF (50mg/kg/dia) por via oral ou antimoniato de meglumina (100mg/kg/dia) por via intraperitoneal. Na figura 4.4, painel A, observa-se que a 2HF foi capaz de diminuir o tamanho da lesão significativamente a partir do dia 25 comparado ao controle tratado com veículo do composto (DMSO) enquanto o antimoniato de meglumina não demonstrou nenhum efeito significativo no tamanho da lesão (figura 4.4, painel B). Na avaliação da carga parasitária, a 2HF demonstrou uma redução de 99% em comparação ao controle e ao antimoniato de meglumina, que não demonstrou redução estatisticamente significativa (Figura 4.4C).

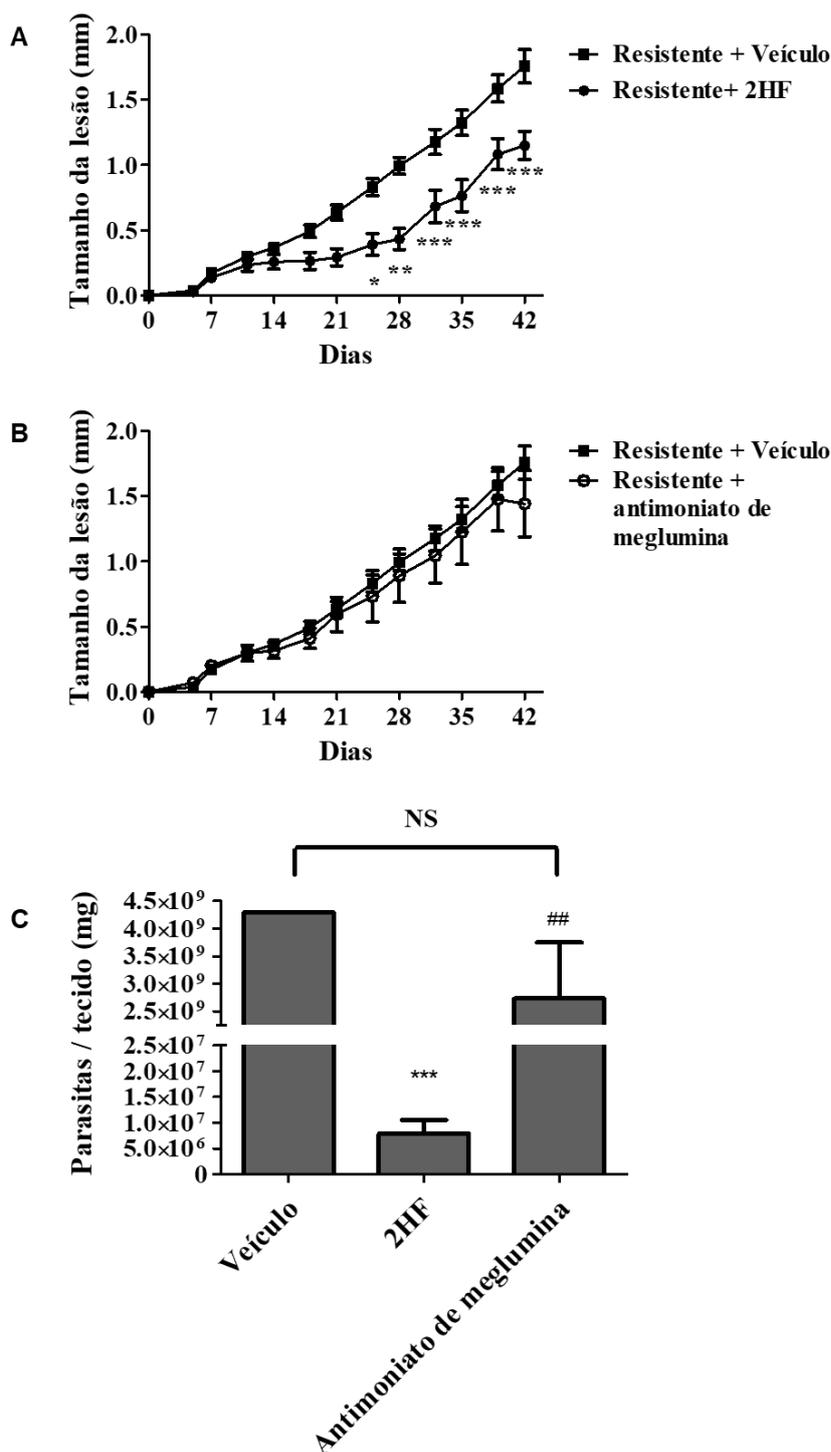


Figura 4.4 Efeito in vivo de 2HF e antimoniato de meglumina em camundongos infectados por *L. amazonensis* resistente ao antimônio. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha direita por promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao antimônio. A: Progressão do tamanho da lesão do tratamento por via oral com 50 mg/kg/dia de 2HF. B: Progressão do tamanho da lesão do tratamento por via intraperitoneal com 100 mg/kg/dia de antimoniato de meglumina. O grupo controle recebeu suspensão oral com DMSO (0,2% v/v – veículo da 2HF). O tratamento foi iniciado após 7 dias de infecção e foi administrado uma vez ao dia, 7 dias por semana até o fim do experimento (42º dia). C: Carga parasitária determinada por ensaio de diluição limitante. Os valores representam a média ± erro padrão de um experimento contendo 5 camundongos por grupo (n=5). *, ** and *** indicam diferença significativa relativa ao grupo controle ($p < 0,05$; $p < 0,01$ and $p < 0,001$, respectivamente) e ## indica diferença significativa relativa a 2HF ($p < 0,01$); 2HF = 2'-Hidroxi-flavanona; ns = não significativo.

Precedente à eutanásia, o sangue dos camundongos foi coletado e separado para realização de exames hematológicos e bioquímicos (Tabela 4.2). Não foi observada nenhuma alteração tanto no hemograma, quanto na avaliação bioquímica pelos parâmetros de ALT, AST e creatinina, parâmetros esses importantes para determinar função renal e hepática e principalmente sinais de toxicidade aguda e crônica no tratamento.

Tabela 4.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

	Controle	2HF	Antimoniato de meglumina
Hematológico			
RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^2$)	9.97 \pm 0.005	10.06 \pm 0.10	9.48 \pm 0.16
Hemoglobina (g/dL)	14.35 \pm 0.05	14.20 \pm 0.14	14 \pm 0.26
Hematócrito (%)	48.90 \pm 0.60	48.30 \pm 0.57	47.60 \pm 0.80
MCV (fm^3)	49 \pm 0.60	48.50 \pm 0.26	49.70 \pm 0.20
MCH (pg)	14.35 \pm 0.05	14.30 \pm 0.06	14.60 \pm 0.08
MCHC (g/dL)	29.35 \pm 0.25	29.40 \pm 0.06	29.40 \pm 0.06
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)			
	1192 \pm 50	1178 \pm 57.46	1104 \pm 77.45
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)			
	8.85 \pm 0.35	5.90 \pm 0.16	4.80 \pm 0.83
Bioquímica			
Creatinina (mg/dL)	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02
ALT (U/L)	47.50 \pm 2.12	46.50 \pm 2,02	52 \pm 4.49
AST (U/L)	110.5 \pm 17.25	78 \pm 10.40	89 \pm 8.15

RBC: red blood cells (células vermelhas do sangue); MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase;

Uma vez que a ineficácia do antimoniato de meglumina (Glucantime) no controle da lesão e carga parasitária sugere a resistência dos parasitos presentes na lesão, para confirmar esta hipótese, promastigotas foram recuperadas das orelhas infectadas de cada grupo tratado (veículo, 2HF e antimoniato de meglumina). Utilizando promastigotas de *L. amazonensis* sensíveis como comparativo, um teste de resistência ao Sb+3 foi realizado seguindo o protocolo descrito em Liarte *et al.* (2011). Enquanto as promastigotas sensíveis ao antimônio trivalente demonstraram um IC₅₀ de 25,33 μM (figura 4.5A), promastigotas recuperadas do grupo tratado apenas com veículo obtiveram um IC₅₀ de 157,9 μM (figura 4.5B), apontando uma

resistência de 6,2 vezes. Promastigotas recuperadas do grupo tratado com 2HF exibiram um IC₅₀ de 212 µM (figura 4.5C), 8,4 vezes resistentes ao Sb⁺³ seguidas pelas promastigotas recuperados do grupo tratado com o antimoniato de meglumina, que demonstraram um IC₅₀ de 122 µM (figura 4.5D), comprovando estarem 5 vezes resistentes comparadas às sensíveis. Os valores comparativos de IC₅₀ e resistência são apresentados na Tabela 4.3.

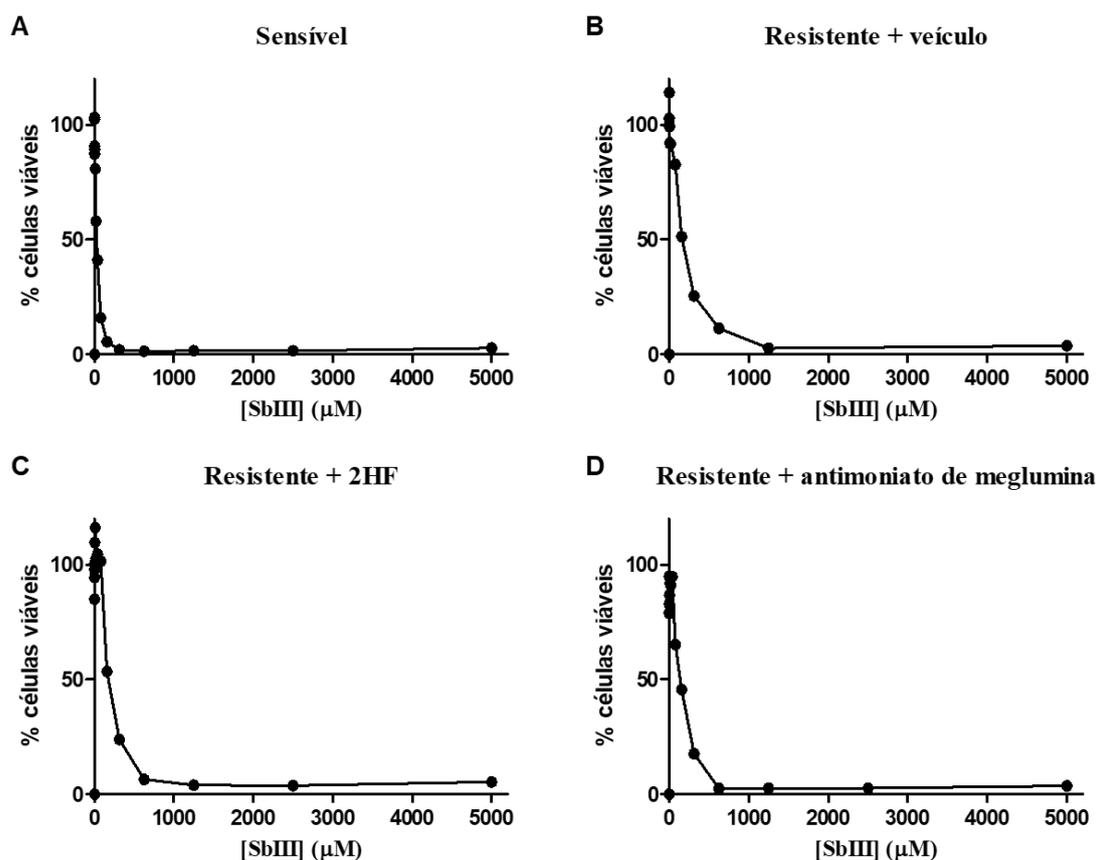


Figura 4.5 Confirmação da resistência em promastigotas recuperadas de lesão. Promastigotas de *L. amazonensis* foram recuperadas de cada grupo do ensaio de diluição limitante realizado ao final do experimento *in vivo* e cultivadas em meio Schneider. Células foram incubadas na ausência ou presença de tartarato de antimônio e potássio (Sb⁺³) (0,3 a 5000µM) por 72 horas. A viabilidade foi mensurada por ensaio de redução de resazurina em resorufina e a leitura foi realizada por espectrofluorímetro (SpectraMax M2—Molecular Devices, Silicon Valley, USA). Os IC₅₀ obtidos para confirmação de resistência foram calculados por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os valores representam a média ± erro padrão de dois experimentos independentes. A: Promastigotas sensíveis. B: Promastigotas recuperadas do controle tratado com veículo. C: Promastigotas recuperadas do grupo tratado com 2HF. D: Promastigotas recuperadas do grupo tratado com antimoniato de meglumina.

Tabela 4.3 Comparativo de IC₅₀ do antimonial (SBIII) sobre promastigotas recuperadas de lesão *in vivo*

	S	R + veículo	R + 2HF	R + A
IC₅₀	25,33 µM	157,9 µM	212 µM	122 µM
Resistência (vezes)	-	6.2	8.4	5

S: sensível; R: resistente; A: antimoniato de meglumina; 2HF: 2'-hidroxiflavanona

4.2 Avaliação da toxicidade da 2HF em modelo murino

4.2.1 Toxicidade aguda

Experimentos de toxicidade em modelos não humanos são extremamente necessários para o desenvolvimento de um novo fármaco. Para primeira etapa pré-clínica da 2'-hidroxiflavanona, o primeiro protocolo a ser seguido foi o protocolo de toxicidade aguda, método "up and down", adaptado no manual n° 425 da OECD (OECD, 2008).

O tratamento foi feito utilizando doses únicas "up" de 2HF por via oral, com intervalo de 24 horas entre as doses e seguindo a progressão preconizada no método (dose inicial x 3,2). Camundongos tratados com a 2HF via oral não demonstraram nenhuma diferença significativa ao veículo em relação ao peso corporal (Figura 4.6, painel A e C) e ao consumo de ração e água (Figura 4.6, painel B e D) para ambos os gêneros em nenhuma dose utilizada, 175mg/kg, 550 mg/kg e 1750 mg/kg. A 2HF também não demonstrou alterar significativamente o peso relativo dos órgãos coletados ao final do experimento (Tabela 4.4). Vale ressaltar que o método up foi utilizado somente até a dose de 1750 mg/kg respeitando a dose máxima do estudo de 2000 mg/kg e o método down não foi realizado uma vez que a taxa de mortalidade da 2HF foi de 0%.

Ao longo do experimento, os camundongos foram observados de uma a duas vezes ao dia para acompanhamento de parâmetros clínicos, sendo eles prostração ou agressividade, edemas de pele, perda de pelos, alterações oculares e de mucosas, respiração irregular, alterações da coloração da urina e espessura e coloração de fezes. Nenhum camundongo apresentou nenhum desses sintomas e todos os animais sobreviveram ao tratamento com a 2HF por via oral (Tabela 4.5).

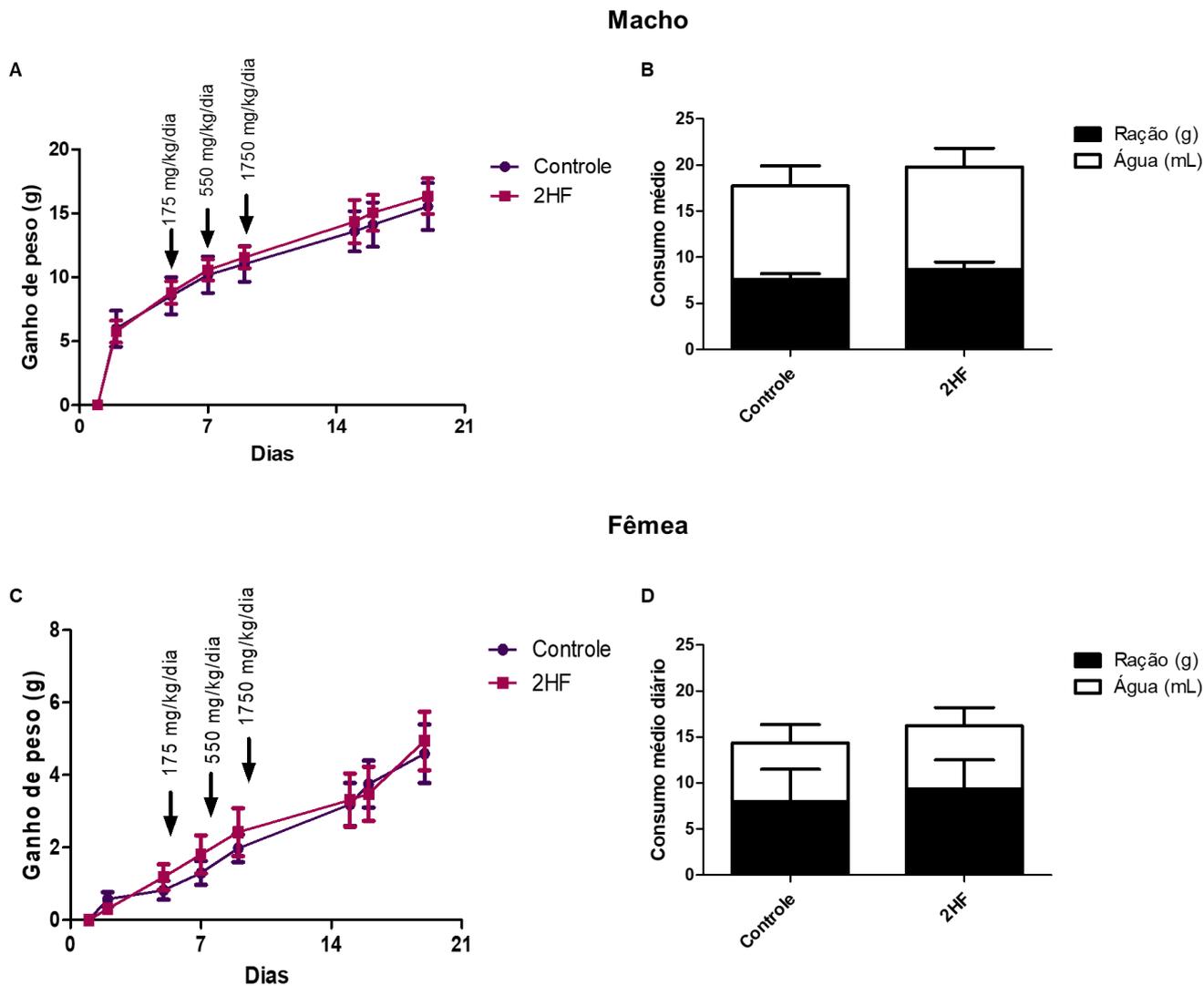


Figura 4.6 Toxicidade aguda da 2'-hidroxiflavanona: avaliação de peso corporal e consumo de água e ração. Camundongos swiss webster (6 por grupo), machos (painel A e B) e fêmeas (painel C e D) foram observados e tratados de acordo com o guia n° 425 da OECD, método up and down. O tratamento foi feito via oral com 3 doses únicas com intervalos de 24 horas/dose, aumentando em progressão 3,2 (175 mg/kg, 550 mg/kg e 1750 mg/kg). O grupo controle foi tratado com o veículo da 2HF (DMSO + água). Os camundongos foram observados por 14 dias após a primeira dose. Ganho de peso (A e C) e consumo de água/ração (C e D) foram mensurados diariamente. Gráficos representam a média de 2 experimentos independentes (machos e fêmeas) com n de 6 camundongos/grupo cada.

Tabela 4.4 Toxicidade aguda da 2HF: peso relativo dos órgãos

Peso relativo dos órgãos (mg/g) *				
Órgão	Macho		Fêmea	
	Controle	2HF	Controle	2HF
Baço	4,42 ± 0,28	4,25 ± 0,26	5,79 ± 0,27	5,40 ± 0,26
Fígado	54,14 ± 1,10	54,38 ± 1,50	48,09 ± 1,54	47,03 ± 1,42
Rins	13,62 ± 0,70	13,15 ± 0,59	10,84 ± 0,38	11,09 ± 0,40
Estômago	16,45 ± 1,70	18,7 ± 1,38	22,92 ± 2,54	20,29 ± 1,18
Pulmão	5,85 ± 0,37	5,68 ± 0,43	6,55 ± 0,25	6,28 ± 0,21
Coração	5,32 ± 0,18	5,51 ± 0,26	5,31 ± 0,25	4,82 ± 0,19

*Peso relativo dos órgãos foi calculado como peso do órgão (mg) dividido pelo peso final do animal (g). Valores representam a média ± erro padrão de 2 experimentos independentes/gênero.

Tabela 4.5 Toxicidade aguda da 2HF: Parâmetros clínicos e mortalidade

	Controle	2HF
Pele/Pelo	NA	NA
Mucosa	NA	NA
Olhos	NA	NA
Respiração	NA	NA
Agressividade	NA	NA
Prostração	NA	NA
Urina	NA	NA
Fezes	NA	NA
Mortalidade total	0/12 (M) 0/12 (F)	0/12 (M) 0/12 (F)

NA: nenhuma alteração; M: macho;

F: fêmea

Os parâmetros determinados para avaliação bioquímica foram: sódio, potássio, cálcio, ferro, glicose, colesterol, proteínas totais, albumina, ureia, alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, fosfatase alcalina, creatinina quinase, ácido úrico e bilirrubina total. São observadas diferenças significativas em três parâmetros para machos, onde o tratamento com a 2HF

provocou um leve aumento de albumina e proteínas totais e uma diminuição dos níveis de ácido úrico. Em contrapartida, no tratamento de fêmeas, as alterações observadas nos machos não se repetiram, demonstrando apenas um aumento nos níveis de creatinina quinase em relação ao controle, porém, sem significância estatística ($p=0,0572$) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Toxicidade aguda da 2HF: parâmetros bioquímicos

	Macho		Fêmea		Valores de referência
	Controle	2HF	Controle	2HF	
Sódio (mEq/L)	146,5 ± 2,05	149,60 ± 1,08	144,50 ± 1,19	142,80 ± 0,86	124,0 – 174,0
Potássio (mEq/L)	3,40 ± 0,11	3,41 ± 0,17	3,15 ± 0,15	3,00 ± 0,28	4,6 – 8,0
Cálcio (mg/dL)	8,53 ± 0,09	8,79 ± 0,14	8,73 ± 0,06	8,62 ± 0,17	5,9 – 9,4
Ferro (mg/dL)	231,3 ± 11,18	249,00 ± 8,4	191,50 ± 13,52	212,80 ± 9,56	130,0 – 134,0
Glicose (mg/dL)	304,6 ± 21,95	359,00 ± 23,58	334,00 ± 17,85	345,3 ± 19,06	90,0 – 192,0
Colesterol (mg/dL)	82,88 ± 4,12	91,10 ± 5,1	79,25 ± 5,02	69,00 ± 6,58	36,0 – 96,0
PTNs totais (g/dL)	3,81 ± 0,04	3,96 ± 0,04*	4,10 ± 0,11	3,98 ± 0,11	3,6 – 6,6
Albumina (g/dL)	1,89 ± 0,02	2,00 ± 0,05*	2,05 ± 0,09	2,00 ± 0,05	2,5 – 4,8
Ureia (mg/dL)	45,51 ± 1,84	40,45 ± 1,63	40,60 ± 1,55	37,05 ± 4,45	18,0 – 29,0
AST (U/L)	91,14 ± 6,60	94,63 ± 3,05	50,50 ± 3,51	50,75 ± 2,75	59,0 – 247,0
ALT (U/L)	60,63 ± 3,90	63,33 ± 6,01	27,67 ± 2,40	31,00 ± 2,16	28,0 – 132,0
Creatinina (mg/dL)	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,2 - 0,8
Fosf. alcalina (U/L)	168,1 ± 11,47	166,7 ± 15,00	73,33 ± 11,62	95,40 ± 7,68	62,00 – 209,0
Creat. quinase (U/L)	94,43 ± 5,35	81,86 ± 7,79	46,50 ± 11,98	107,30 ± 22,92*	68,0 – 1070,0
Ácido úrico (mg/dL)	0,38 ± 0,7	0,22 ± 0,01*	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,00	1,7 – 5,4
Bilirrub total (mg/dL)	0,54 ± 0,02	0,60 ± 0,07	0,45 ± 0,03	0,50 ± 0,00	0,1 – 0,9

* representa a diferença significativa em relação ao controle. $p<0,05$ (teste t). Valores representam a média ± erro padrão de 2 experimentos independentes/gênero.

4.2.2 Toxicidade subaguda

Após a avaliação da toxicidade aguda da 2HF, foi realizado o protocolo de toxicidade subaguda (doses repetidas), utilizando o protocolo de 28 dias de doses repetidas, nº 407 da OECD (OECD, 2008). Seguindo o protocolo, 3 doses de 2HF por via oral foram determinadas. Como dose central, selecionamos a dose de 50 mg/kg/dia, que já demonstrou efeito *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea experimental (Figura 4.4). Utilizando uma progressão de fator 10, foram determinadas uma dose abaixo da central, 5mg/kg/dia e uma acima, 500 mg/kg/dia, não ultrapassando o limite de dose máxima do protocolo (2000 mg/kg).

Observando o ganho de peso, não houve variação significativa entre veículo e as doses de 2HF nos experimentos realizados em machos (Figura 4.7 A). Curiosamente nas fêmeas, observa-se uma leve, porém não significativa diferença ($p=0,4236$) no ganho de peso do grupo que recebeu 500mg/kg da 2HF (Figura 4.7 C). Essa diferença não foi observada quando analisados o consumo de ração e água, uma vez que nenhum grupo demonstrou diferença significativa em ambos os gêneros (Figura 4.7 B e D). Observando o peso relativo dos órgãos, ambos os gêneros demonstram diferença entre os grupos (Tabelas 4.7 e 4.8) porém somente o grupo tratado com 500mg/kg/dia de 2HF provocou alteração considerada significativa ($p \leq 0,05$) no tamanho do fígado de machos (Tabela 4.7).

O tratamento de 28 dias com a 2HF não foi capaz de provocar nenhuma alteração nos parâmetros clínicos citados no protocolo de toxicidade aguda, também analisados nesse estudo. A taxa de mortalidade foi nula para todas as doses utilizadas (Tabela 4.9).

As análises bioquímicas demonstraram diferenças entre os gêneros. Em camundongos machos, as 3 doses de 2HF levaram a uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de alanino aminotransferase (ALT) (Tabela 4.10). Já para fêmeas, o tratamento com a 2HF provocou um aumento dos níveis de sódio sérico para a dose de 50 mg/kg/dia, além de um aumento dos níveis de creatinina quinase para as doses de 50 e 500 mg/kg/dia (Tabela 4.11), resultado que acompanha a alteração vista em fêmeas na toxicidade aguda (Tabela 4.6).

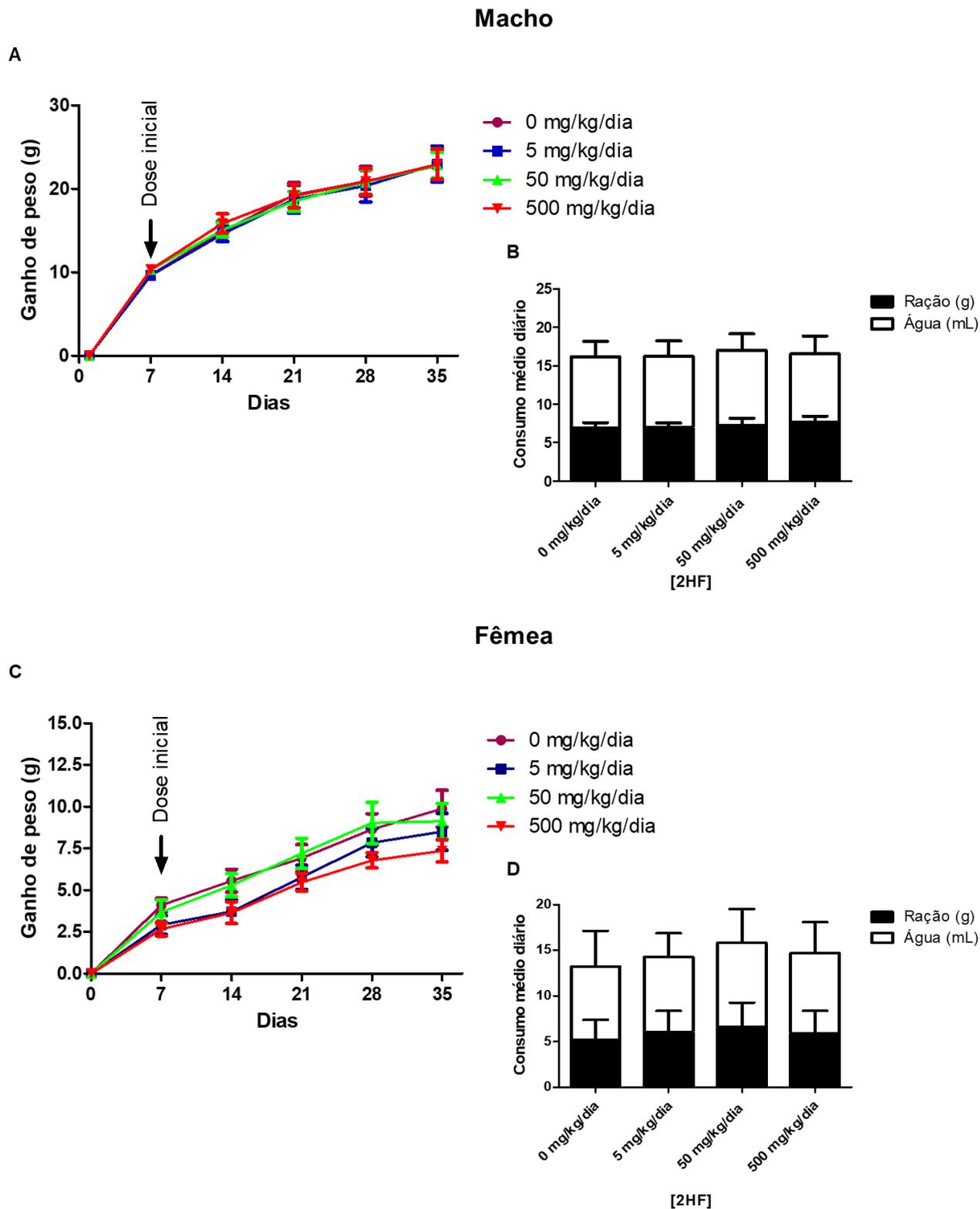


Figura 4.7 Toxicidade subaguda da 2'-hidroxiflavanona. Camundongos swiss webster (6 por grupo), fêmeas (A e B) e machos (C e D), foram observados e tratados de acordo com o manual de doses repetidas de 28 dias da OECD (n° 407). Camundongos foram tratados via oral com veículo (controle) ou três diferentes doses de 2HF (5 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg) diariamente durante 28 dias. Ganho de peso (A e C) e consumo de água/ração (B e D) foram mensurados diariamente. Gráficos representam a média e erro padrão (machos e fêmeas) com n de 6 camundongos/grupo cada.

Tabela 4.7 Toxicidade subaguda da 2HF: peso relativo dos órgãos (M)

Peso relativo dos órgãos (mg/g)*				
Macho				
Órgão	Controle	5mg/kg	50mg/kg	500mg/kg
Baço	4,31 ± 0,36	4,35 ± 0,51	4,20 ± 0,21	3,95 ± 0,25
Estômago	14,47 ± 0,45	15,90 ± 0,42	15,60 ± 1,22	15,47 ± 0,73
Fígado	51,11 ± 1,37	54,04 ± 1,00	48,10 ± 0,80	46,32 ± 1,23 #
Coração	4,61 ± 0,17	4,88 ± 0,24	4,34 ± 0,19	4,51 ± 0,22
Rins	14,70 ± 0,89	14,98 ± 0,52	14,29 ± 0,32	14,37 ± 0,50
Pulmão	7,13 ± 0,42	7,87 ± 1,04	8,83 ± 0,30	8,17 ± 0,52

*Peso relativo dos órgãos foi calculado como peso do órgão (mg) dividido pelo peso final do animal (g). Valores representam a média ± erro padrão. n = 6 . # alteração significativa estatisticamente.

Tabela 4.8 Toxicidade subaguda da 2HF: peso relativo dos órgãos (F)

Peso relativo dos órgãos (mg/g)*				
Fêmea				
Órgão	Controle	5mg/kg	50mg/kg	500mg/kg
Baço	5,98 ± 0,81	5,87 ± 0,80	5,31 ± 0,42	5,04 ± 0,30
Estômago	22,31 ± 1,65	20,96 ± 1,01	20,41 ± 1,74	19,64 ± 2,95
Fígado	57,15 ± 2,99	51,55 ± 1,85	53,54 ± 0,52	50,73 ± 0,61
Coração	5,41 ± 0,38	4,98 ± 0,16	4,98 ± 0,30	4,92 ± 0,15
Rins	12,12 ± 0,78	11,91 ± 0,32	11,51 ± 0,39	11,70 ± 0,43
Pulmão	7,17 ± 0,51	6,33 ± 0,12	6,31 ± 0,21	5,90 ± 0,23

*Peso relativo dos órgãos foi calculado como peso do órgão (mg) dividido pelo peso final do animal (g). Valores representam a média ± erro padrão. n = 6

Tabela 4.9 Toxicidade subaguda da 2HF: parâmetros clínicos

	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
Pele/Pelo	NA	NA	NA	NA
Mucosa	NA	NA	NA	NA
Olhos	NA	NA	NA	NA
Respiração	NA	NA	NA	NA
Agressividade	NA	NA	NA	NA
Prostração	NA	NA	NA	NA
Urina	NA	NA	NA	NA
Fezes	NA	NA	NA	NA
Mortalidade total	0/6 (M) 0/6 (F)	0/6 (M) 0/6 (F)	0/6 (M) 0/6 (F)	0/6 (M) 0/6 (F)

NA: nenhuma alteração; M: macho; F: fêmea; M: macho

Tabela 4.10 Toxicidade subaguda da 2HF: parâmetros bioquímicos (M)

Macho				
Parâmetros	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
Sódio (mEq/L)	125,7 ± 1,45	123,7 ± 0,61	127,4 ± 0,51	127,2 ± 0,49
Potássio (mEq/L)	2,87 ± 0,23	2,62 ± 0,08	2,55 ± 0,32	2,43 ± 0,13
Cálcio (mg/dL)	9,50 ± 0,21	10,78 ± 0,16	10,53 ± 0,13	9,43 ± 0,49
Ferro (mg/dL)	179,5 ± 18,50	245,8 ± 17,69	241,3 ± 11,76	234,8 ± 12,63
Glicose (mg/dL)	290,0 ± 21,50	278,3 ± 35,02	170,5 ± 13,76	223,0 ± 29,52
Colesterol (mg/dL)	83,67 ± 3,93	80,00 ± 5,04	77,75 ± 5,80	79,17 ± 5,83
PTNs totais (g/dL)	4,2 ± 0,00	3,92 ± 0,06	4,16 ± 0,12	3,98 ± 0,12
Albumina (g/dL)	1,70 ± 0,00	1,55 ± 0,05	1,68 ± 0,04	1,63 ± 0,08
Ureia (mg/dL)	47,90 ± 5,64	43,84 ± 1,94	46,70 ± 1,77	45,77 ± 2,28
AST (U/L)	116,0 ± 22,00	84,33 ± 7,88	78,33 ± 14,52	72,33 ± 9,06
ALT (U/L)	55,00 ± 2,52	45,67 ± 2,35*	43,40 ± 1,91*	44,60 ± 1,03*
Creatinina (mg/dL)	0,1 ± 0,0	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,1 ± 0,0
Fosf. Alcalina (U/L)	180,5 ± 17,50	157,8 ± 10,51	206,0 ± 28,54	145,4 ± 10,45
Creat. quinase (U/L)	130,5 ± 54,5	72,6 ± 9,92	103,7 ± 1,46	70,00 ± 11,15
Ácido úrico (mg/dL)	0,80 ± 0,06	0,73 ± 0,05	1,65 ± 1,12	0,52 ± 0,03
Bilirrub total (mg/dL)	0,70 ± 0,10	0,62 ± 0,01	0,68 ± 0,07	0,57 ± 0,02

* representa a diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,05$ (teste t). Valores representam a média ± erro padrão. n = 6

Tabela 4.11 Toxicidade subaguda de 2HF: parâmetros bioquímicos (F)

Fêmea				
Parâmetros	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	500 mg/kg
Sódio (mEq/L)	146,3 ± 0,89	147,3 ± 1,45	154,8 ± 3,135*	149,2 ± 1,46
Potássio (mEq/L)	2,68 ± 0,09	3,08 ± 0,22	3,46 ± 0,26	3,36 ± 0,24
Cálcio (mg/dL)	8,33 ± 0,08	8,65 ± 0,19	8,28 ± 0,34	8,72 ± 0,17
Ferro (mg/dL)	162,8 ± 20,00	188,6 ± 25,50	220,8 ± 17,50	219,8 ± 9,73
Glicose (mg/dL)	325,0 ± 25,63	310,7 ± 17,86	296,0 ± 14,16	329,4 ± 17,22
Colesterol (mg/dL)	51,8 ± 3,02	55,0 ± 1,83	59,67 ± 4,91	59,4 ± 5,85
PTNs totais (g/dL)	4,0 ± 0,04	3,94 ± 0,02	4,05 ± 0,12	4,02 ± 0,08
Albumina (g/dL)	1,85 ± 0,02	1,85 ± 0,02	1,90 ± 0,08	1,86 ± 0,05
Ureia (mg/dL)	46,84 ± 2,25	40,32 ± 1,20	39,30 ± 2,23	40,63 ± 2,35
AST (U/L)	76,5 ± 5,97	70,00 ± 8,04	100,5 ± 10,12	95,6 ± 8,43
ALT (U/L)	60,6 ± 3,70	63,0 ± 1,46	65,00 ± 5,03	58,25 ± 2,72
Creatinina (mg/dL)	0,10 ± 0,0	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,0
Fosf. Alcalina (U/L)	148,0 ± 20,97	142,2 ± 11,96	127,8 ± 7,37	148,0 ± 8,40
Creat. quinase (U/L)	90,25 ± 12,39	158,0 ± 15,81	210,6 ± 12,88*	222,0 ± 40,02*
Ácido úrico (mg/dL)	0,47 ± 0,07	0,50 ± 0,10	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,03
Bilirrub total (mg/dL)	0,54 ± 0,02	0,62 ± 0,06	0,58 ± 0,02	0,62 ± 0,08

* representa a diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,05$ (teste t). Valores representam a média ± erro padrão . n = 6

Para investigar possíveis danos teciduais, órgãos foram coletados, fixados e processados para análises histológicas. Na figura 4.8 são observados cortes de coração em dois aumentos diferentes. As fibras musculares cardíacas encontram-se preservadas em todos os grupos. Pequenos agregados inflamatórios são observados desde o grupo controle até a maior dose de 2HF. Pequenas vesículas características de deposição de gordura foram encontradas pontualmente na dose de 50mg/kg (Figura 4.8, painel E e painel F).

Na figura 4.9 observamos cortes de fígado do grupo controle, nos quais foram observados pontos focais de agregados de células inflamatórias e observa-se uma esteatose microvesicular sugerindo já haver um recrutamento inflamatório e depósito de gordura basais nos animais utilizados (Figura 4.9A e 4.9B). Ambas alterações foram observadas nos grupos tratados com a 2HF, demonstrando um leve aumento, tanto dos agregados linfóides quanto das vesículas de gordura, destacando ainda

um aumento das células de Kupfer presentes no tecido. Megacariócitos foram observados desde o controle até a maior dose de 2HF.

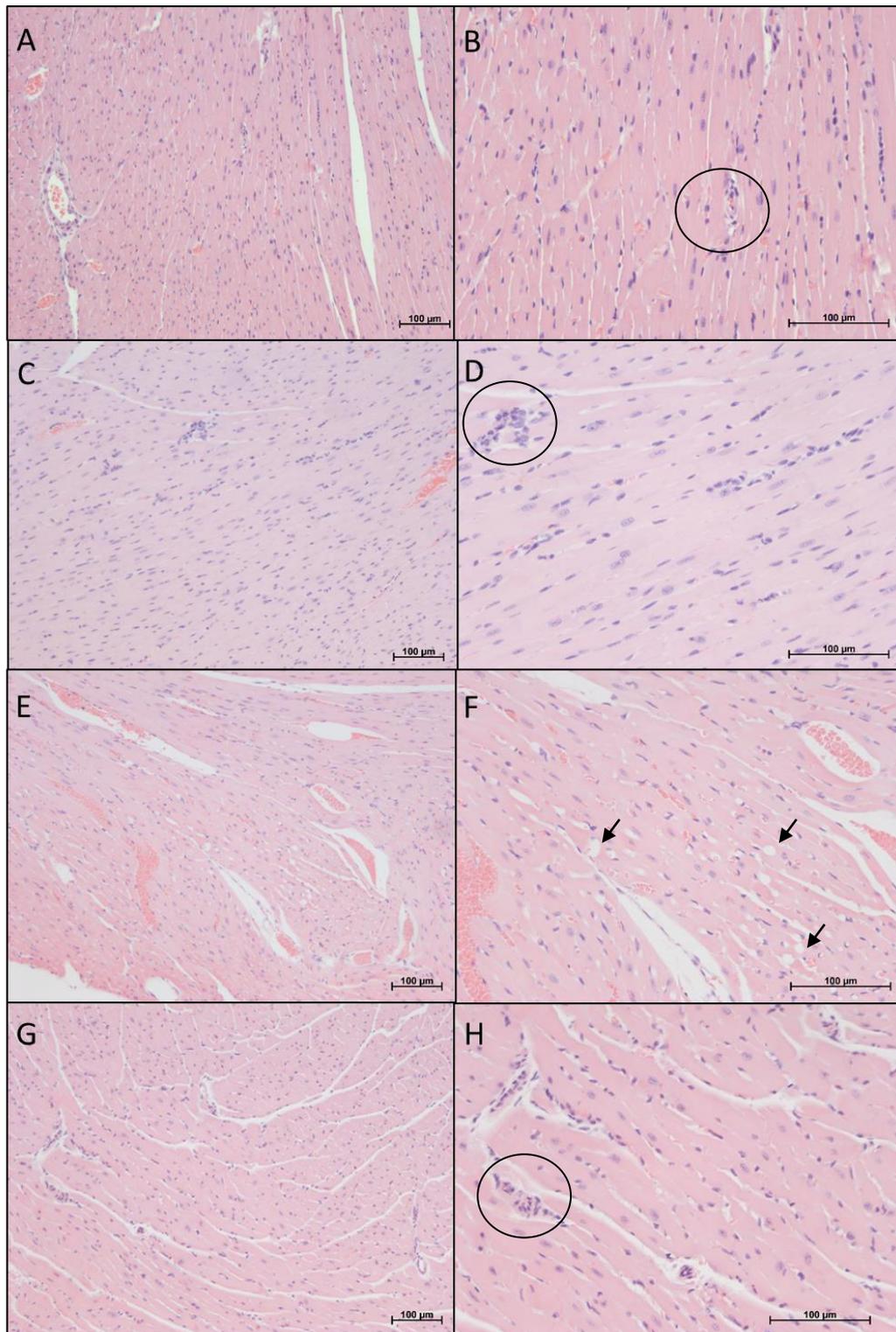


Figura 4.8 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do coração. Camundongos Swiss Webster fêmeas foram tratadas durante 28 dias por via oral com A e B: veículo; C e D: 5 mg/kg/dia; E e F: 50 mg/kg/dia; G e H: 500 mg/kg/dia. Escala = 100µM. A, C, E e G – aumento de 10 x; B, D, F e H – aumento de 20x. Coloração: Hematoxilina e eosina.

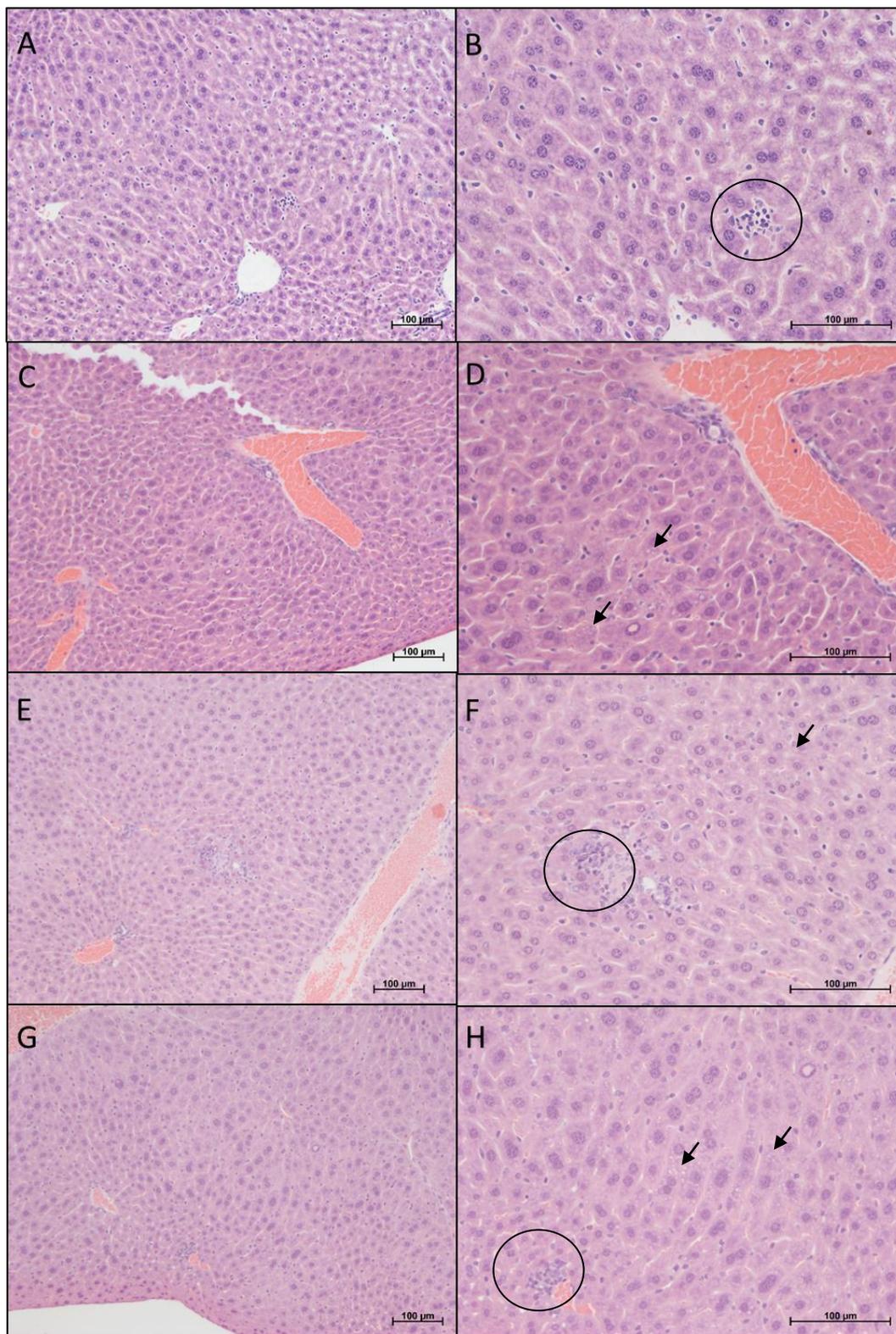


Figura 4.9 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do fígado. Camundongos Swiss Webster fêmeas foram tratadas durante 28 dias por via oral com A e B: veículo; C e D: 5 mg/kg/dia; E e F: 50 mg/kg/dia; G e H: 500 mg/kg/dia. Escala = 100μM. A, C, E e G – aumento de 10 x; B, D, F e H – aumento de 20x. Coloração: Hematoxilina e eosina.

Em cortes de Pulmão (Figura 4.10), bronquíolos e epitélio respiratório estão preservados. O grupo controle apresenta retração dos alvéolos (áreas de atelectasia), hemorragia, e presença de poucos agregados inflamatórios. Dos grupos tratados com a 2HF, há uma diminuição dose dependente da retração alveolar. A razão entre as áreas de atelectasia e as áreas de alvéolos preservados são constantes entre as doses. Os agregados inflamatórios também são pequenos em tamanho e número, sendo observados em todas as doses testadas.

Em cortes de baço, (figura 4.11) observa-se, já no controle, a presença de infiltrados inflamatórios e uma quantidade basal de megacariócitos, aspectos que se apresentam também nas 3 doses de 2HF. Observa-se ainda nos grupos tratados um aumento de hemorragia presente na polpa vermelha que aparenta aumentar levemente de maneira dose-dependente. É possível observar ainda o aparecimento de áreas de diferenciação eritróide nos grupos que receberam as doses de 2HF. No geral, a 2HF parece provocar um desbalanço no tamanho polpa branca/ polpa vermelha, provocando um aumento da vermelha e consequente diminuição (acompanhada por ativação) da polpa branca.

Na figura 4.12 observamos os cortes dos rins. O grupo controle apresenta infiltrados inflamatórios ao longo do córtex e da medula renal, aspecto que também se apresenta nos grupos tratados. Em todas as doses de 2HF, é possível observar pontos de depósito de gordura, mais aparentes na medula do que no córtex renal. Na maior dose utilizada (500mg/kg/dia), é possível observar pequenos pontos de hemorragia.

Apesar de todos os pontos observados na histologia, a 2HF não demonstrou causar danos tóxicos a ponto de prejudicar o funcionamento dos órgãos de alguma maneira, ou danos vitais para o camundongo de maneira geral (considerando a taxa nula de mortalidade e as alterações bioquímicas).

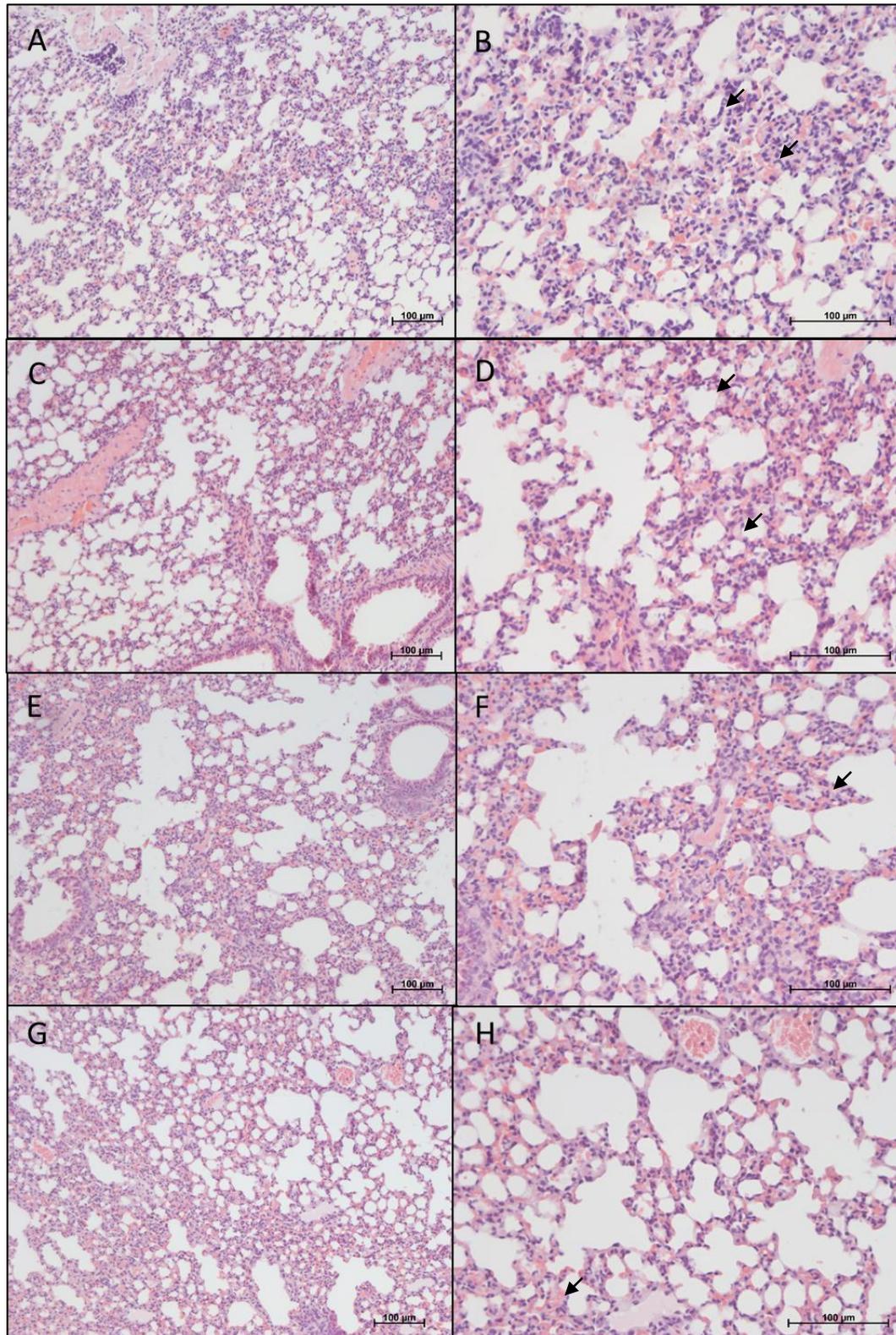


Figura 4.10 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do pulmão. Camundongos Swiss Webster fêmeas foram tratadas durante 28 dias por via oral com A e B: veículo; C e D: 5 mg/kg/dia; E e F: 50 mg/kg/dia; G e H: 500 mg/kg/dia. Escala = 100µM. A, C, E e G – aumento de 10 x; B, D, F e H – aumento de 20x. Coloração: Hematoxilina e eosina.

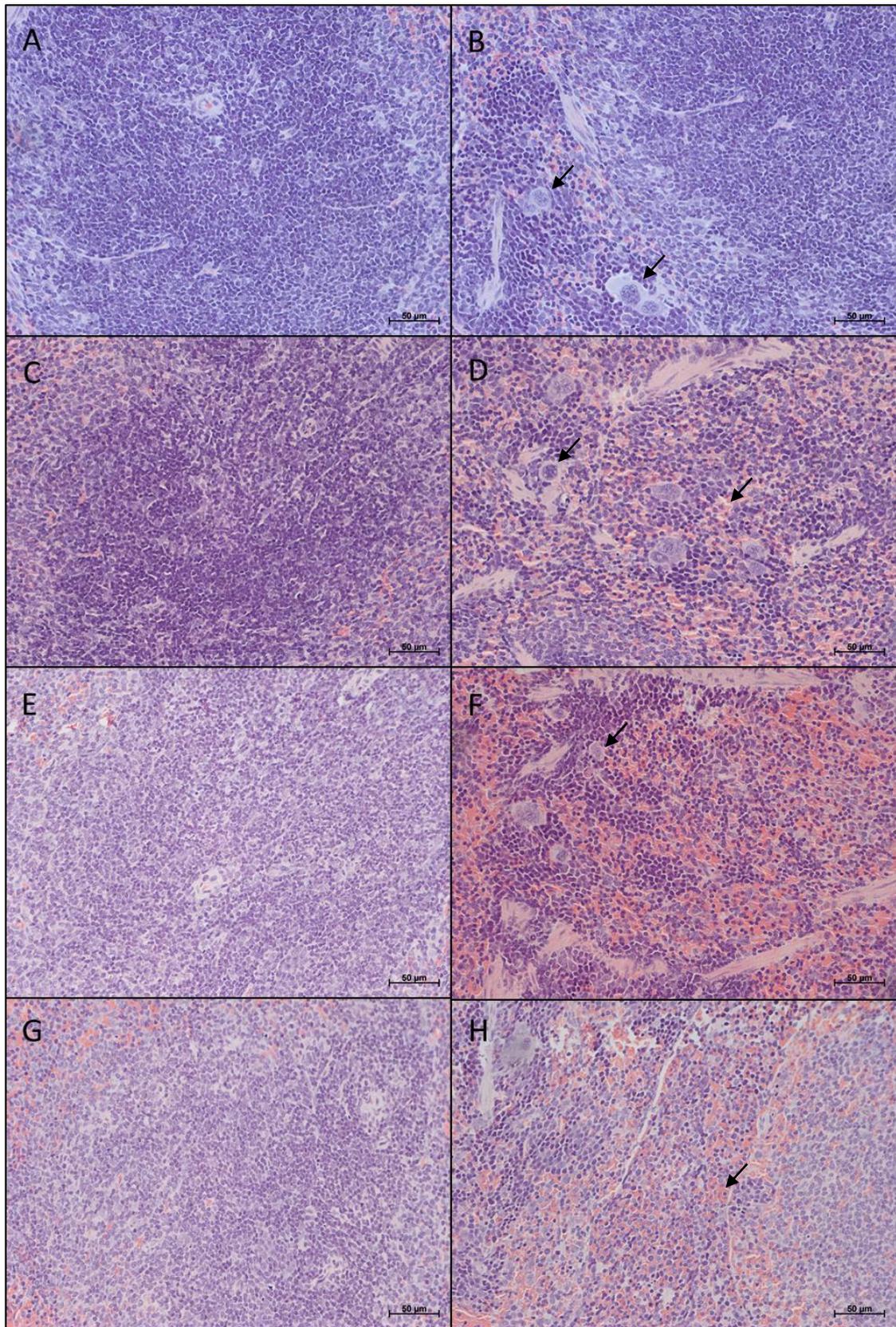


Figura 4.11 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do baço. Camundongos Swiss Webster fêmeas foram tratadas durante 28 dias por via oral com A e B: veículo; C e D: 5 mg/kg/dia; E e F: 50 mg/kg/dia; G e H: 500 mg/kg/dia. Escala = 50µM. A, C, E e G – Polpa branca; B, D, F e H – Polpa vermelha. Aumento de 20x. Coloração: Hematoxilina e eosina.

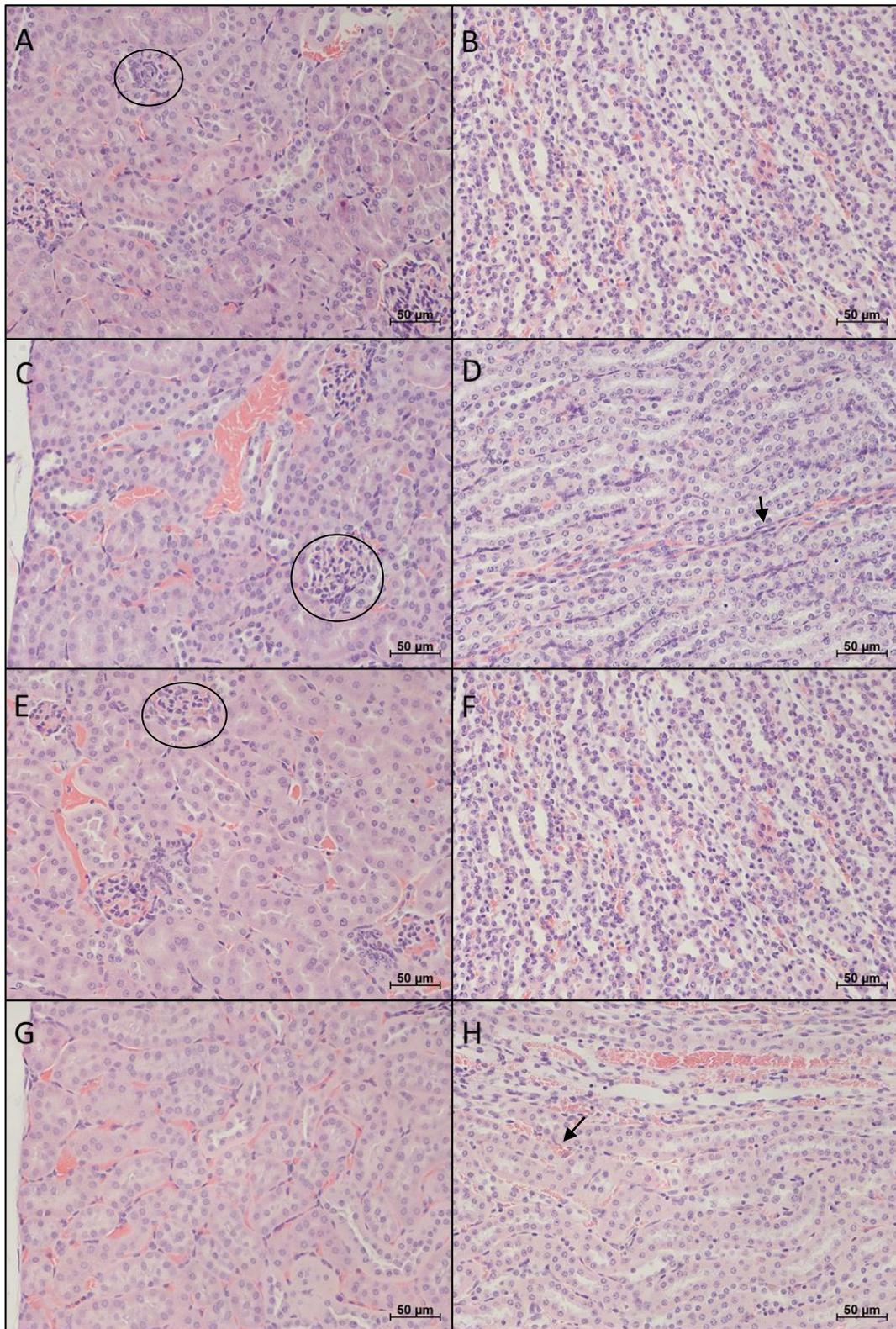


Figura 4.12 Toxicidade subaguda da 2HF: histopatologia do rim. Camundongos Swiss Webster fêmeas foram tratadas durante 28 dias por via oral com A e B: veículo; C e D: 5 mg/kg/dia; E e F: 50 mg/kg/dia; G e H: 500 mg/kg/dia. Escala = 50μM. A, C, E e G – Córtex renal; B, D, F e H – Medula renal. Aumento de 20x. Coloração: Hematoxilina e eosina.

4.3 Desenvolvimento do método, validação e determinação do perfil farmacocinético da 2HF

O primeiro passo para determinar o perfil farmacocinético da 2HF é desenvolver um método sensível e seletivo de quantificação do composto. Para isso, foi estabelecido um método de quantificação em sangue total de camundongos BALB/c da 2'-hidroxiflavanona por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) com ionização por eletronebulização negativa (ESI-) pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A Narigenina, um flavonoide pertencente também à classe flavanona foi escolhida como padrão interno (PI) do método. A faixa de concentração estabelecida para o método foi de 1ng/mL (limite inferior de quantificação –LIQ) a 250 ng/mL (limite superior de quantificação – LSQ). Ambos compostos (2HF e PI) foram extraídos do sangue por extração líquido-líquido utilizando TBME. A cromatografia líquida foi realizada em modo isocrático e sua fase móvel consistiu em uma mistura de metanol: acetonitrila (80:20) e uma solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico (65:35, v/v).

Na figura 4.13 podemos observar o espectro representativo da detecção e perfil de fragmentação, da 2HF e do PI respectivamente, demonstrando as moléculas, 238,8 Da e 270,8 Da, respectivamente, e os dois fragmentos mais intensos utilizados para identificação e confirmação da 2HF nas amostras, 119 Da e 93,2 Da para 2HF e 151 Da e 119 Da para o PI.

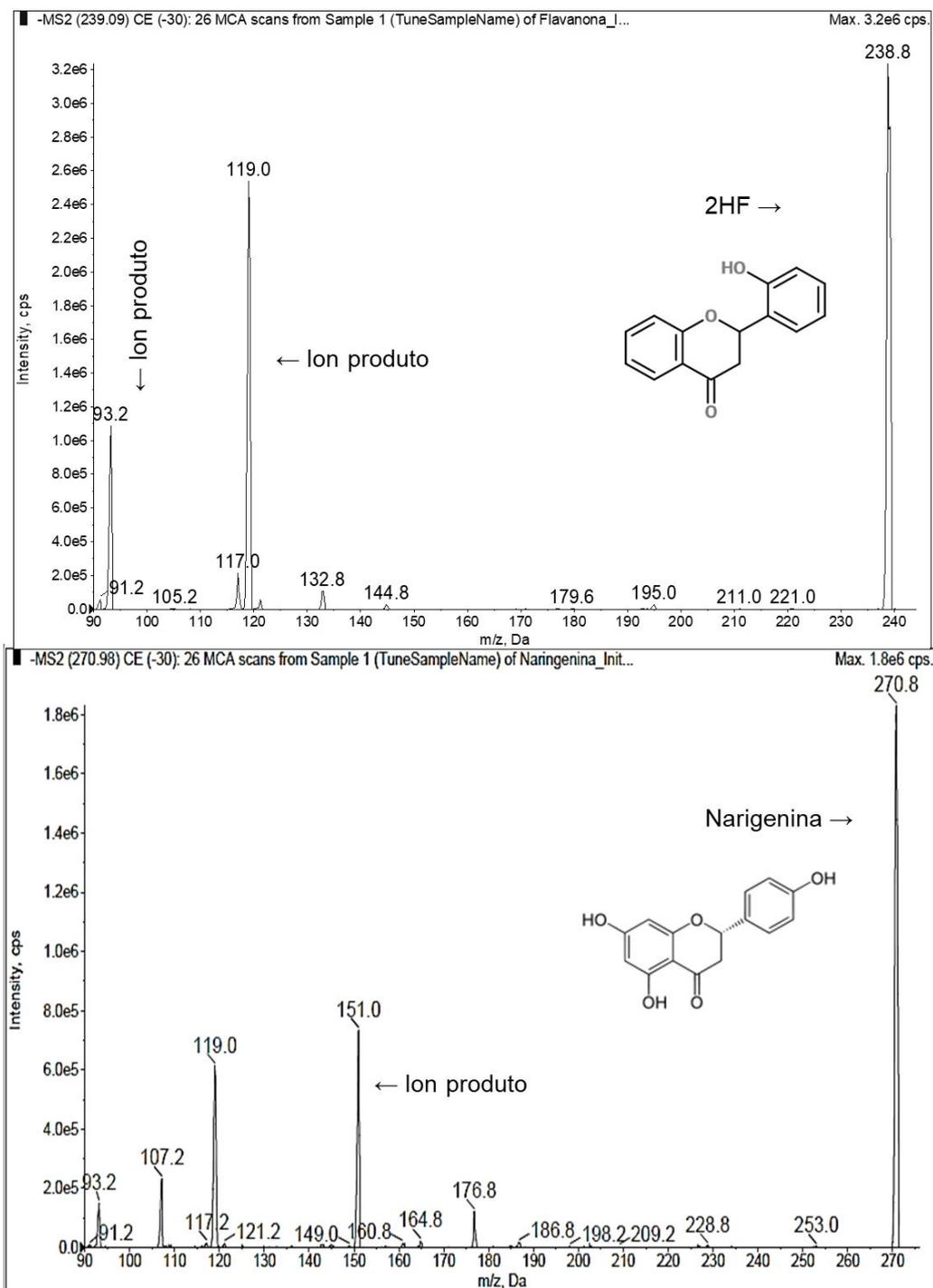


Figura 4.13 Espectro de massas representativo da detecção e o perfil de fragmentação da 2HF (A) e do PI (B). A detecção da 2HF e da Narigenina (PI) foi realizada por espectrometria de massas em série com ionização por eletronebulização negativa (ESI-) pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Uma vez determinada a detecção da 2HF por espectrometria, o próximo passo foi a separação e posterior quantificação da 2HF e do PI em matriz biológica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas. Na figura 4.15 A e B observamos os cromatogramas da 2HF e PI respectivamente,

demonstrando os picos de detecção de cada um e seus respectivos tempos de retenção.

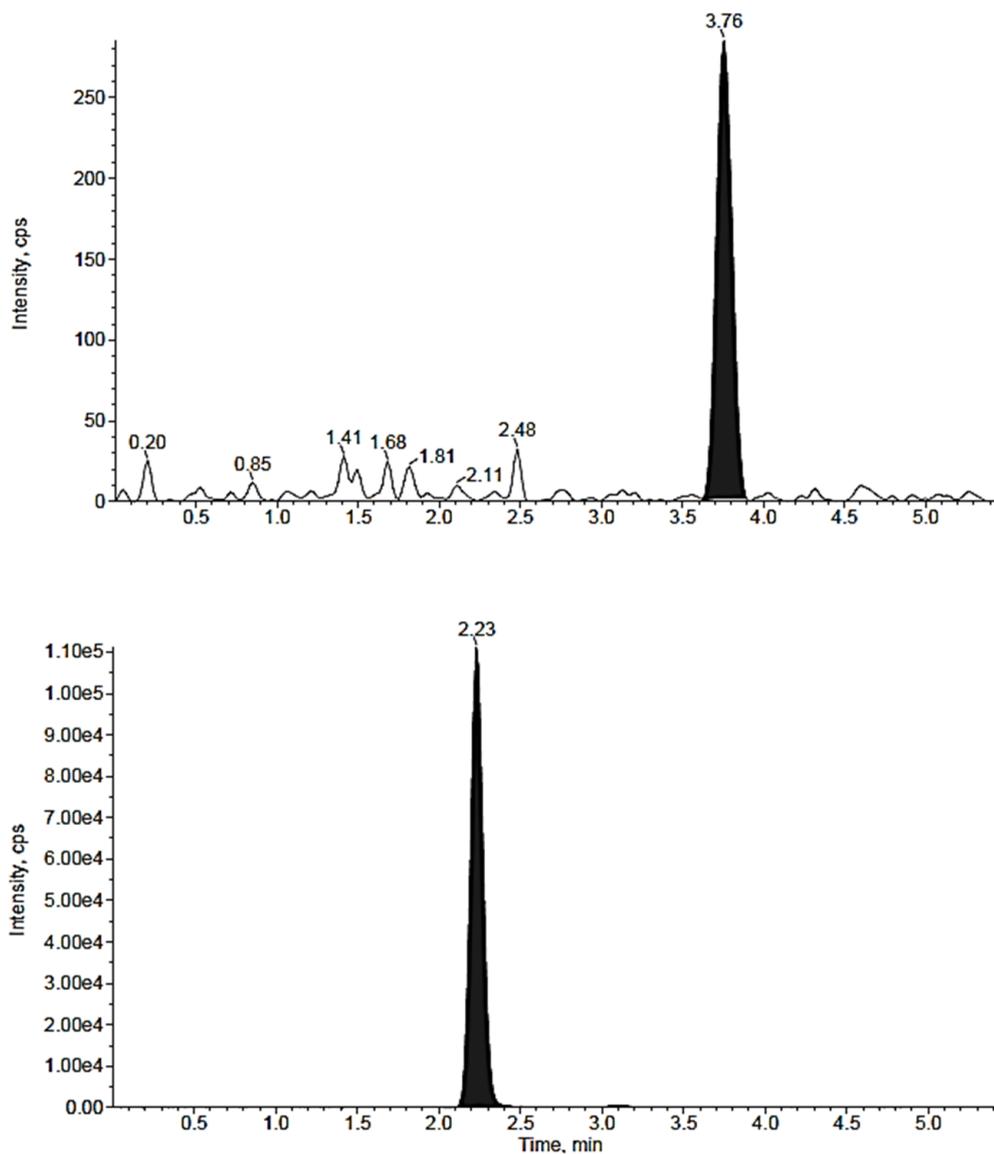


Figura 4.14 Cromatogramas representativos do tempo de retenção da 2HF (A) e PI (B). A cromatografia líquida foi realizada em modo isocrático em coluna Zorbax Eclipse C18 5 μ m x 150 mm x 4.6 mm i.d. Fase móvel - metanol: acetonitrila (80:20) e solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico (65:35, v/v). A detecção da 2HF e da Narigenina (PI) foi realizada por espectrometria de massas em série com ionização por eletronebulização negativa (ESI-) pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Após desenvolver o método é preciso validá-lo. Todos os procedimentos para a validação do método seguiram a resolução RDC n° 27 de 2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos (ANVISA, 2012). O

primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade. Não foram observadas interferências no tempo de retenção da 2HF e do PI acima do limite de variação permitido. Amostras biológicas provenientes de 6 fontes distintas foram contaminadas ou não com 1ng/mL de 2HF e PI e foram analisadas. Os valores de área sob a curva e interferência da matriz biológica estão representados na tabela 4.12.

Tabela 4.12 Teste de seletividade da 2HF

Descrição da amostra	Valor da área da 2HF	% de interferência de 2HF	Valor da área do PI	% de interferência do PI
Branco em sangue lipêmico	0	0	0	0
LIQ em sangue lipêmico	2942,12		593458,87	
Branco em sangue normal 1	0	0	0	0
LIQ em sangue normal 1	3169,71		614016,00	
Branco em sangue normal 2	0	0	0	0
LIQ em sangue normal 2	3420,71		675769,91	
Branco em sangue normal 3	0	0	0	0
LIQ em sangue normal 3	3926,56		566784,50	
Branco em sangue normal 4	0	0	0	0
LIQ em sangue normal 4	4005,95		747538,16	
Branco em sangue normal 5	0	0	0	0
LIQ em sangue normal 5	3938,97		761398,91	

LIQ: limite inferior de quantificação (1ng/mL); 2HF: 2'-hidroxiflavanona; PI: padrão interno;

O segundo parâmetro analisado para validação foi o teste efeito residual para determinar uma possível contaminação durante a corrida analítica. Foram realizadas, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do limite superior de quantificação (LSQ). Não houve contribuição entre as análises como observado na tabela 4.13 abaixo. Os valores aceitáveis para efeito residual do analito e PI não devem passar de 5% do valor de área observada. Portanto, a 2HF e o PI foram aprovados no teste.

Tabela 4.13 Teste de efeito residual da 2HF

Amostras	Concentração nominal (ng/mL)	Valor da área da 2HF	% de interferência de 2HF	Valor da área do PI	% de interferência do PI
1	0	0	0	0	0
2	1	3160,30	0	595099,86	0
3	250	477813,56	0	579437,64	0

Para calcular e validar a linearidade de um método bioanalítico, é necessário que a faixa de linearidade contemple o limite inferior de quantificação (LIQ) e o maior nível de concentração da curva de calibração (Limite superior de quantificação/LSQ). Ao observar os valores da razão da área de 2HF pela área do PI, observamos na figura 4.16 que o aumento do desvio padrão se dá de maneira dose-dependente, aumentando de acordo com a concentração.

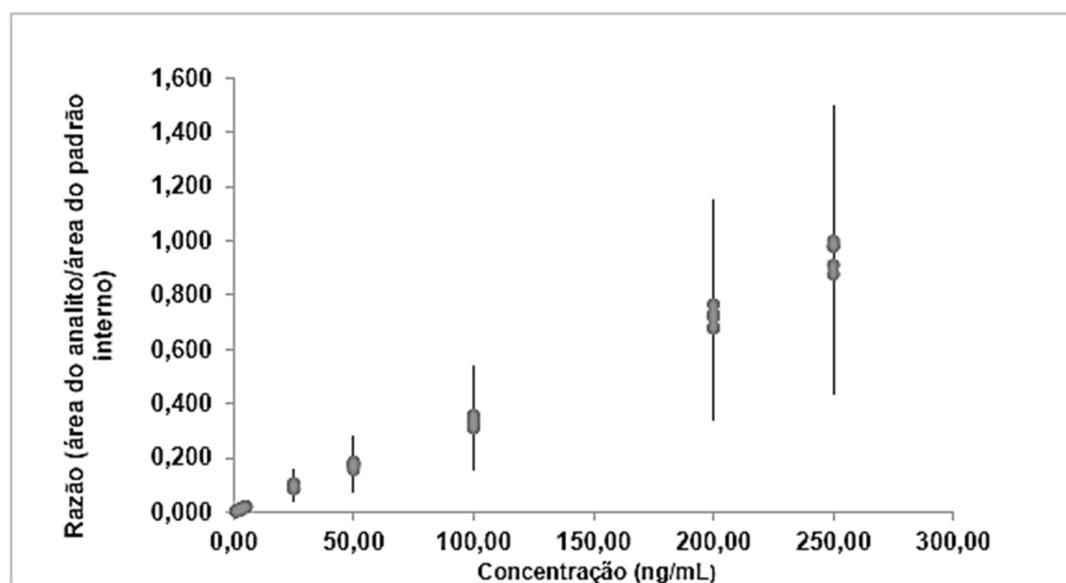


Figura 4.15 Relação entre a razão das áreas de 2HF e PI por concentração. O gráfico representa a dispersão dos valores da razão entre a área da 2HF e PI por concentração. n = 5. Barras representam o desvio padrão.

O aumento do desvio e a observação da dispersão entre os valores definiram a escolha do modelo heterocedástico de regressão linear. Assim, foi realizada a escolha do melhor método de ponderação que deverá ser o que apresenta o menor valor da soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva (% ER). Estes valores de % ER apresentaram-se aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo do X, em forma de uma banda horizontal estreita em função das concentrações da curva de calibração.

As amostras da curva de calibração foram, inicialmente, adicionadas do padrão do analito e do padrão interno e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação. O método ponderado que apresentou o menor valor de % ER foi o método ponderado de $1/x^2$. A figura 4.17 apresenta a regressão linear obtida pelo método de ponderação escolhido. O coeficiente de linearidade (r) obtido é 0,9969 e a equação da reta é $y = 0,884x + 0,000279$.

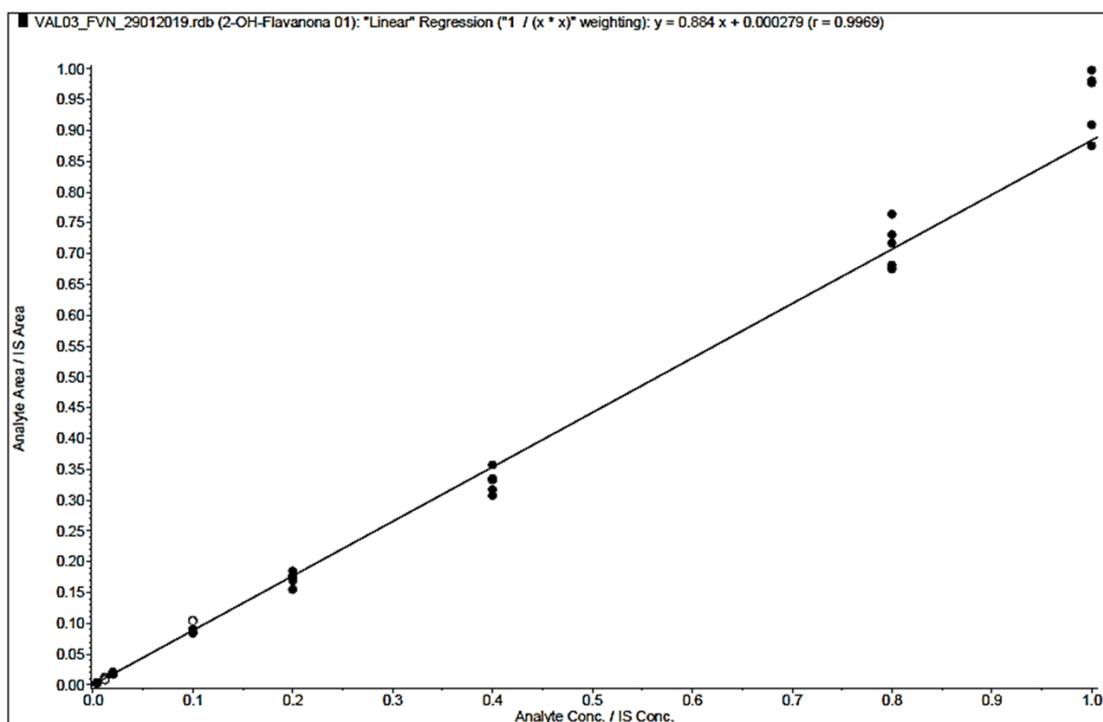


Figura 4.16 Linearidade da 2HF. Representação dos valores da curva de calibração com os coeficientes com a ponderação escolhida (modelo $1/x^2$).

Nas tabelas 4.14 e 4.15 observamos os cálculos de precisão e exatidão intra-dias (4.14) e intercorridas (4.15). Foram realizados 3 testes de precisão e exatidão intra-dias. A precisão é demonstrada através do cálculo do coeficiente de variação (CV%). O cálculo da exatidão se dá pela fórmula do Erro padrão relativo (EPR) sendo:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

A tabela 4.14 demonstra os valores de um experimento representativo, uma vez que os 3 não obtiveram muitas variações de valores. O método desenvolvido foi aprovado em ambos os testes uma vez que sua precisão se manteve abaixo de 15% e sua exatidão entre a faixa de 80 a 115%, de acordo com as normas da legislação.

Tabela 4.14 Precisão e exatidão intra-dia de 2HF

	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Média	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
LIQ	1	1.06	1.02	6.18	101.96
		1.03			
		0.95			
		0.97			
		1.07			
		0.93			
		1.05			
		1.11			
CQB	3	3.16	3.02	6.76	100.77
		3.02			
		3.16			
		3.10			
		2.54			
		3.02			
		3.06			
		3.13			
CQM	100	98,24	98.47	1.89	98.47
		99.39			
		99.82			
		96.26			
		100.97			
		99.51			
		98.17			
		95.43			
CQA	200	203,82	201.49	2.99	100.75
		196.86			
		201.93			
		192.36			
		202.56			
		199.50			
		213.24			
		201.66			
CQD	200	203,26	199.34	1.61	99.67
		197.43			
		200.77			
		194.00			
		200.40			
		197.69			
		203.40			
		197.80			

LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: baixa concentração; CQM: média concentração; CQA: alta concentração. CQD: concentração diluída;

Tabela 4.15 Precisão e exatidão intercorridas (inter dias) da 2HF

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Média	Precisão (CV%)	Exatidão (%)	Desvio
1	0,85	0,95	0,08	95,27	- 4,73
	0,98				
	1,02				
3	2,62	3,02	6,67	100,77	0,77
	2,79				
	3,02				
100	87,07	98,47	7,59	98,47	- 1,53
	101,15				
	98,47				
200	201,75	201,49	3,03	100,75	0,75
	212,18				
	201,49				
200	200,59	199,34	2,96	99,67	- 0,33
	210,12				
	199,34				

Uma vez que constituintes de uma matriz biológica podem afetar a resposta do analito ou do PI, seguindo a RDC nº27 o teste de efeito matriz foi realizado. Neste teste, amostras de branco da matriz biológica (sangue de camundongos BALB/c), são submetidas ao processo de extração e adiciona-se posteriormente o analito e o PI para verificar seu efeito. Das 6 amostras analisadas, quatro eram de sangue normal e duas de sangue lipêmico. Nestas análises, foram utilizadas duas concentrações nominais da 2HF, 3ng/mL (baixa concentração – CQB) e 200ng/mL (alta concentração - CQA) para a corrida analítica. Os valores de área da 2HF e do PI foram obtidos para o cálculo do fator matriz normalizado (FMN) pelo padrão interno. A equação utilizada para o cálculo deste parâmetro foi:

$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

Na tabela abaixo estão os valores calculados de FMN para cada replicata referente as concentrações. A detecção e quantificação de 2HF não demonstrou sofrer efeito matriz uma vez que o coeficiente de variação obtido através dos cálculos de FMN está abaixo do valor máximo permitido (15%) (Tabela 4.16).

Tabela 4.16 Cálculo do efeito matriz normalizado pelo PI

	Concentração nominal (ng/mL)	FMN	Média	CV (%) total
CQB	3	0,96	0,96	2,91
		0,95		
		0,94		
		0,97		
		1,01		
		0,93		
CQA	200	0,91	0,96	2,64
		0,94		
		0,97		
		0,97		
		0,98		
		0,98		

CQB: baixa concentração; CQA: alta concentração; CV: coeficiente de variação; FMN: fator matriz normalizado:

O último parâmetro da validação foi a estabilidade do analito em matriz biológica onde foram avaliados a estabilidade da 2HF em ciclos de congelamento e descongelamento. Foram realizados 6 ciclos de congelamento e descongelamento por um período de 191h:00m. As temperaturas estão listadas na tabela abaixo.

Tabela 4.17 Registros de temperatura dos ciclos de congelamento e descongelamento da 2HF

Ciclos	Temperatura de descongelamento (°C)	Temperatura de congelamento (°C)
Congelamento	-	-74,4
1° ciclo	22,9	-73,7
2° ciclo	23,6	-74,6
3° ciclo	23,1	-74,2
4° ciclo	23,1	-74,0
5° ciclo	23,6	-75,5
6° ciclo / análise	22,4	-

Após os ciclos realizados, as amostras foram analisadas de acordo com a curva de calibração. Na tabela abaixo, observamos que não houve degradação da 2HF após os ciclos e período empregado. Os coeficientes de variação (%) calculados para baixa concentração de 2HF (3ng/mL – CQB) e alta concentração (200ng/mL – CQA) foram 5,51 e 6,24.

Tabela 4.18 Curva de calibração da 2HF após ciclo de congelamento e descongelamento

Amostras	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Exatidão (%)
1	1	0,99	99,03
		1,01	100,75
2	3	2,75	91,6
		3,14	104,8
3	5	4,88	97,51
		5,37	107,32
4	25	26,7	106,81
		27,52	110,06
5	50	52,27	104,54
		44,77	89,54
6	100	99,23	99,23
		93,22	93,22
7	200	196,84	98,42
		177,95	88,97
8	250	255,57	102,23
		264,95	105,98

Uma vez desenvolvido e validado, o método de detecção e quantificação da 2HF foi utilizado para determinar o perfil farmacocinético da 2HF. Para isso, 8 camundongos BALB/c fêmeas por grupo receberam uma dose única de 2HF de 10mg/kg. Os tempos de coleta determinados foram: 0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 minutos. A coleta foi realizada via plexo orbital. Na figura 4.17 o gráfico da concentração plasmática média de 2HF por tempo.

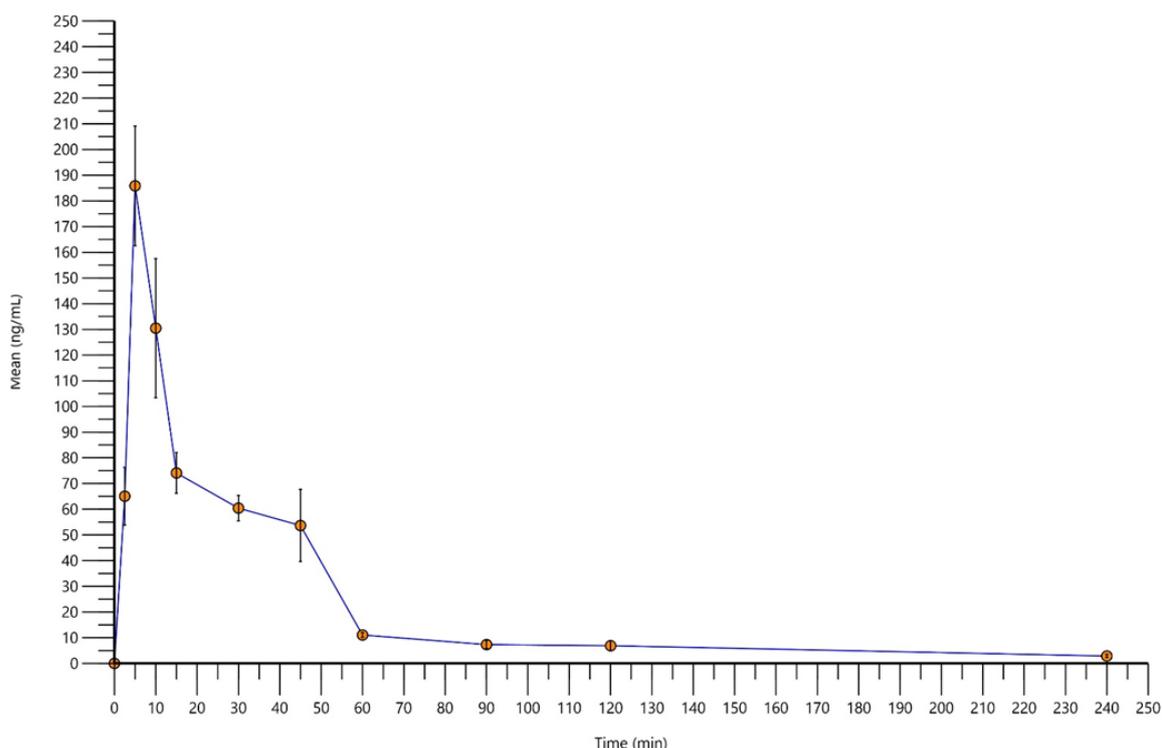


Figura 4.17 Perfil farmacocinético da 2HF. Concentração média x tempo. Camundongos BALB/c foram tratados com 10 mg/kg de 2HF via oral. O sangue total foi coletado via plexo orbital para detecção e quantificação pelo método validado de 2HF por LC-MS/MS. Valores plotados no gráfico são a média e o erro padrão (n=8).

Curiosamente, nas corridas analíticas observamos um segundo pico presente no cromatograma com intensidade e tempo de retenção menores em relação a 2HF. Este pico é encontrado somente nas curvas da 2HF em sangue de camundongo utilizadas para farmacocinética e não nos controles e no branco. Foi realizada uma injeção direta de 2HF por espectrometria de massas time off flight, uma técnica de espectrometria de massas mais sensível que detecta moléculas pelo tempo de voo das mesmas após ionizadas. Na figura 4.18 observamos o espectro de massas obtido da 2HF, destacando a mesma e os fragmentos já observados na figura 4.13. Porém, um novo íon produto é observado, de 319.0 Da, um indicativo de que o pico

que está sendo observado nos cromatogramas possa ser um produto do metabolismo da 2HF.

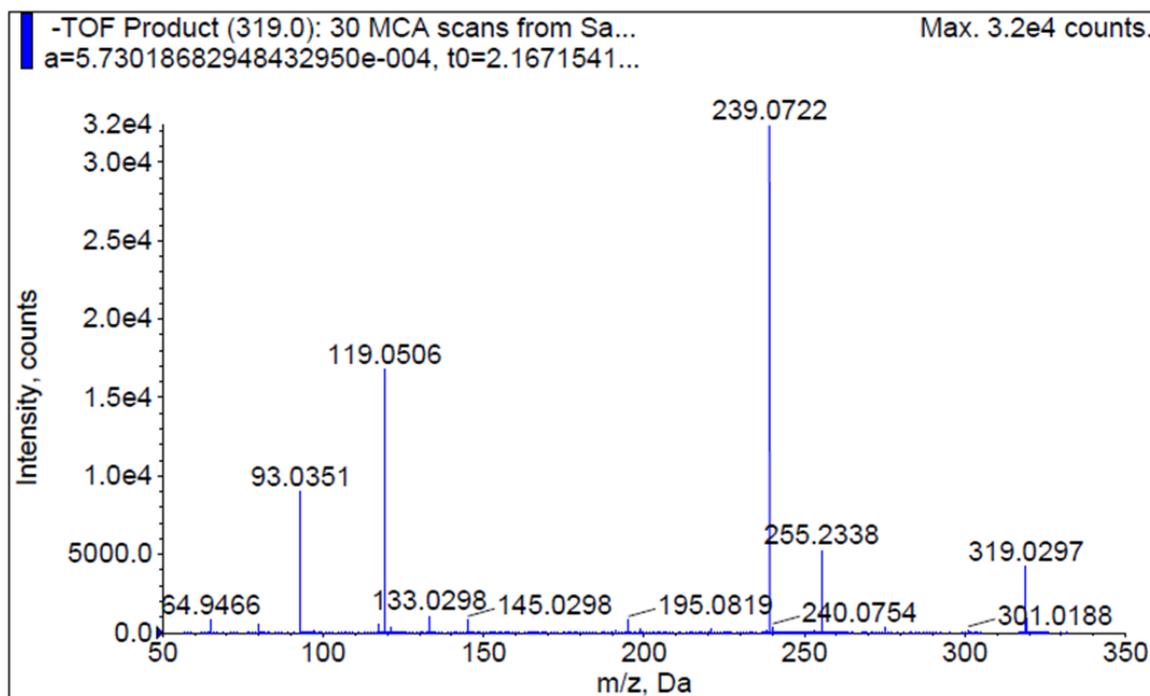


Figura 4.18 Espectro de massas da 2HF por espectrometria de tempo de voo.

A partir de uma curva concentração plasmática x tempo, é possível, por meio de análises matemáticas, determinar os parâmetros farmacocinéticos. No caso da 2HF, o modelo escolhido foi análise compartimental por dois compartimentos. Na tabela abaixo observamos os parâmetros obtidos, destacando a meia vida da 2HF de 97,52 min.

Tabela 4.19 Parâmetros farmacocinéticos da 2HF

Parâmetro (unidades)	Valores
Ke (1/min)	0,00711
T1/2 beta (min)	97,52
Tmáx (min)	5
Cmáx (ng/mL)	185,86
ASC0-t (min*ng/mL)	5120,98
ASC0-inf (min*ng/mL)	5524,54
ASC % extrap (%)	7,30
Vd/F (mL)	5093,53
Cl/F (mL/min)	36,20

Ke: constante de eliminação;

T1/2 beta: tempo de meia vida beta;

Tmax: tempo máximo;

Cmáx: concentração máxima;

ASC0-t: área sob a curva concentração versus tempo 0 ao tempo da última concentração acima do Limite de quantificação;

ASC0-inf: área sob a curva concentração versus tempo 0 ao tempo extrapolado ao infinito;

ASC%extrap: percentagem extrapolada ao infinito;

Vd/F: volume de distribuição;

Cl/F: clearance;

5 DISCUSSÃO

Apesar do surgimento de diversos programas de incentivo e iniciativas nas últimas 4 décadas, as Doenças Tropicais Negligenciadas ainda sofrem com baixo investimento ou investimento direcionado (para doenças como AIDS e malária), o que torna difícil o desenvolvimento de medicamentos, vacinas e até de uma possível cura, uma vez que o financiamento para pesquisa básica é baixo ou quase inexistente (G-FINDER, 2018; Ferreira & Andricopulo, 2019).

Inserida nas DTNs, a Leishmaniose é formada por um complexo de doenças que causam desde um estigma social por sua forma mucocutânea (tegumentar), que pode levar à desfiguração facial, até a forma visceral que, se não tratada, pode levar à morte. O número de novos casos da doença por ano é considerado exorbitante, partindo de 30 mil para a forma visceral, chegando até 1 milhão de novos casos para a forma tegumentar. O Brasil faz parte de um grupo de países que concentra 85% dos casos de Leishmaniose do mundo e dentro da América Latina, atinge uma marca de 97% de casos da forma visceral, dados alarmantes em um país de dimensões continentais considerado emergente (Alvar *et al.* 2012; Ministério da saúde, 2019; Paho, 2019; WHO, 2019; WHO, 2020).

Assim como outras DTNs, a Leishmaniose sofre com a falta de investimento, que acarreta uma lentidão no desenvolvimento de alternativas para sua erradicação. Há mais de um século o antimônio é utilizado para o tratamento da doença, permanecendo como medicamento de primeira escolha em diversos países. Desde então, apenas 4 novos medicamentos foram licenciados para ajudar no combate da doença: a anfotericina B, a pentamidina, paramomicina e miltefosina, este último sendo o primeiro e único medicamento até o momento administrado por via oral. Vale ressaltar que nem todos os medicamentos são licenciados em todos os territórios endêmicos para a doença, o que dificulta ainda mais o tratamento, uma vez que o ônus do tratamento é muitas vezes maior do que o bônus. Os pontos negativos da quimioterapia da leishmaniose incluem as vias de administração, o custo elevado do tratamento, efeitos tóxicos diretos ao paciente que podem levar a doenças secundárias, teratogenicidade, a falha terapêutica e resistência ao tratamento. Muitos problemas, poucos medicamentos, um quadro que destaca a urgência no desenvolvimento de novas alternativas (Uliana *et al.* 2018; Ghorbani & Farhoudi, 2017).

Diversos autores, como Ponte-Sucre *et al.* (2017), consideram as falhas no tratamento e a resistência um dos maiores desafios do século para a Leishmaniose. Os casos de resistência ao antimônio, por exemplo, aumentam vertiginosamente, causando o desuso do medicamento em diversas regiões. A preocupação se torna maior por conta de casos de resistência a outros medicamentos como a miltefosina, que já possui diversos relatos de casos (Cojean *et al.* 2012; Van Bockstal *et al.* 2020).

Os problemas e limitações da quimioterapia da leishmaniose tem levado à busca de novas alternativas. O reposicionamento de fármacos e a terapia combinada são demonstrações claras de vertentes a serem consideradas. A fim de ir mais a fundo na pesquisa por medicamentos capazes de diminuir ou não demonstrarem efeitos colaterais, os produtos naturais, como metabólitos secundários, têm sido amplamente estudados em modelos experimentais de leishmaniose (Gervazoni *et al.* 2020). Velhos conhecidos da medicina tradicional chinesa, egípcia e greco-romana, compostos provenientes de fontes naturais estão ao alcance de todos, um ponto a favor a se pensar no custo do tratamento. Flavonoides como a Quercetina e Epigallocatequina-3-galato, que já tem descrito seu potencial leishmanicida (Fonseca-Silva *et al.* 2013; Inácio *et al.* 2019) por via oral, são comercializados em farmácias como fitoterápicos.

A 2'-hidroxiflavanona, vem sendo estudada em diversos tipos de câncer, demonstrando resultados promissores e seletivos (Nagaprashanta *et al.* 2011; 2018; 2019; Hsiao *et al.* 2007; Shin *et al.* 2012; Singhal *et al.* 2015; Bose *et al.*, 2019; Yue *et al.* 2020).

O presente estudo dá continuidade ao estudo dos efeitos da 2HF em *L. amazonensis* resistentes ao antimônio. O primeiro passo foi avaliar o efeito da 2HF em amastigotas resistentes. Observamos então a capacidade já destacada da 2HF de provocar um efeito inibitório em amastigotas de *L. amazonensis*. Este resultado se mostra similar a outros estudos do grupo que demonstram o efeito de diversos flavonoides contra espécies de *Leishmania* (Fonseca-Silva *et al.* 2013; Inácio *et al.* 2013; Inácio *et al.* 2014; Fonseca-Silva *et al.* 2015; Fonseca-Silva *et al.* 2016; Emiliano & Almeida Amaral 2018; Inácio *et al.* 2019).

A 2HF demonstrou um IC₅₀ de 3,09 µM para amastigotas sensíveis e 3,36 µM para resistentes, valores muito próximos. Este efeito é visualmente comprovado nas fotomicrografias que demonstram a diminuição do número de amastigotas dentro dos macrófagos e a diminuição do número de macrófagos infectados provocados

pela 2HF para ambas. O índice de seletividade da 2HF também se mostra similar para amastigotas sensíveis (28,5) e resistentes (26,2). Segundo Katsuno *et al.* (2015), moléculas promissoras para o tratamento de doenças infecciosas devem apresentar um índice de seletividade maior que 10. A 2HF se enquadra nesse parâmetro, sendo aproximadamente três vezes mais seletiva do que o proposto, destacando a capacidade da 2HF de provocar efeito, sem atingir concentrações que sejam prejudiciais às células.

Comparada a outros flavonoides, a 2HF demonstra um efeito em células sensíveis similar à epigallo catequina-3-gallato (EGCG), quercetina e apigenina, flavonoides estudados pelo grupo, cujo IC₅₀ em amastigotas de *L. amazonensis* são 1,6, 3,4 e 4,3 µM respectivamente (Fonseca-Silva *et al.* 2013; Fonseca-Silva *et al.* 2016; Inácio *et al.* 2013). A 2HF demonstra ser mais seletiva que a apigenina e quercetina, que demonstram índices de seletividade de 18,2 e 16,8 respectivamente. Porém, se mostra menos seletiva que a EGCG, cujo índice de seletividade é 129,4. Comparando a outros flavonoides como a Brachdina B e Brachdina C, estudados por Rocha *et al.* (2018) demonstram IC₅₀ de 2,2 e 6,5 µM em amastigotas de *L. amazonensis*, valores próximos ao IC₅₀ demonstrado pela 2HF. Porém, ambos biflavonoides demonstram um índice de seletividade menor que a 2HF (9,1 e 3,2 respectivamente), tendo a Brachdina C um índice menor do que o índice preconizado para uma molécula promissora (Katsuno *et al.*, 2015).

Uma vez determinado os efeitos *in vitro* da 2HF em *L. amazonensis* resistente ao antimônio, o próximo passo foi avaliar o efeito da 2HF por via oral em modelo de leishmaniose cutânea experimental. O primeiro passo foi confirmar a capacidade infectiva de promastigotas resistentes ao antimônio em camundongos BALB/c, resultado que pode ser confirmado pela figura 4.4A demonstrando o desenvolvimento da lesão em camundongos tratados somente com o veículo e 4.4C destacando uma carga parasitária maior se comparada com a carga obtida no experimento *in vivo* de células sensíveis (Gervazoni *et al.* 2018). O efeito da 2HF também se mostra similar em infecção *in vivo* por células sensíveis e resistentes, demonstrando uma diminuição do tamanho da lesão e da carga parasitária em comparação ao grupo controle e ao controle positivo, Glucantime. A avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos também pontua o efeito seletivo da 2HF para o parasito uma vez que a dose utilizada, 50mg/kg/dia não foi capaz de provocar nenhuma alteração de parâmetros toxicológicos como ALT, AST e creatinina.

Os resultados prévios obtidos da 2HF em *L. amazonensis* sensíveis em conjunto com os resultados obtidos neste trabalho para *L. amazonensis* resistentes, indicam um grande potencial da 2HF para o tratamento da Leishmaniose, uma vez que a 2HF se mostra seletiva ao parasito em ambos os casos, *in vitro* e *in vivo*.

Apesar do avanço no estudo do potencial leishmanicida de diversas classes de metabólitos secundários como terpenoides, quinonas, alcaloides e flavonoides (Gervazoni *et al.*, 2020), segundo Schimidt *et al.* (2012), pela complexidade das estruturas e a dificuldade de investimento, pouquíssimas moléculas provenientes de produtos naturais ultrapassam a barreira dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, chegando a possíveis estudos pré-clínicos e clínicos.

Com objetivo de atravessar essa barreira e dar um passo adiante na busca e desenvolvimento de um possível novo fármaco, a proposta de avaliar os efeitos pré-clínicos da 2HF foi colocada em prática. Estudos destacam a importância da etapa pré-clínica uma vez que ao observar os efeitos de um composto em animais, pode-se prever e até contornar possíveis efeitos adversos ao homem (Polson & Fuji, 2012).

A primeira etapa foi avaliar a toxicidade aguda da 2HF, com doses únicas, aumentadas em progressão, seguindo o manual nº425 da OECD. A 2HF não foi capaz de alterar nenhum parâmetro clínico e consumos de água e ração. O peso relativo dos órgãos não foi alterado e não houve mortalidade no estudo para ambos os gêneros.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, camundongos machos demonstraram um leve aumento dos parâmetros ácido úrico, proteínas totais e albumina. Quando um fármaco chega à corrente sanguínea, ele pode se ligar a proteínas plasmáticas como a albumina e outras. Essa ligação é reversível, porém, dependendo da velocidade de difusão do fármaco pelos capilares, a ligação fármaco-proteína pode durar um tempo maior. Assim, valores aumentados como proteínas totais e albumina, podem indicar uma menor concentração disponível de 2HF.

O aumento dos níveis de ácido úrico pode indicar uma reação ao fármaco, possíveis danos metabólicos ou diminuição da função renal, fatores esses que não são corroborados uma vez que os níveis de creatinina, indicativo de função renal, não sofreram alterações em relação ao controle e sendo o fígado o órgão responsável por metabolizar a maioria dos compostos, parâmetros hepáticos como

alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) deveriam demonstrar alteração, o que não foi observado.

A única alteração bioquímica observada em fêmeas é o aumento da creatina quinase (CK), uma molécula formada por um dímero que possui três isoenzimas que podem ser encontradas no músculo estriado esquelético e miocárdio, musculatura cardíaca e tecido cerebral. As causas do aumento dos níveis séricos de CK podem ser: infarto agudo do miocárdio (IAM), rabdomiólise, distrofia muscular progressiva, lesão muscular por esmagamento, acidente vascular cerebral (AVC), tétano, intoxicação por monóxido de carbono, alcoolismo crônico, psicose, hemofilia grave, dermatomiosite, doença renal crônica, distrofia muscular (Alves *et al.* 2019).

A avaliação da toxicidade de doses repetidas (crônica) da 2HF demonstrou que o tratamento oral, feito com 3 diferentes doses de 2HF (5 mg/kg/dia; 50 mg/kg/dia; 500 mg/kg/dia) não alterou os parâmetros clínicos avaliados. Segundo Raza *et al.* (2002), alterações no peso corporal podem indicar efeitos adversos. Apesar de demonstrar uma leve desaceleração, não significativa, no ganho de peso de fêmeas, o consumo de água e ração não foi alterado e não ocorreram mortalidades durante o experimento.

Na avaliação do peso relativo dos órgãos, há uma ligeira diminuição do tamanho do fígado de machos. Khandare *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade aguda de glicosídeos extraídos do fenacho (*Trigonella foenum-graecum* ou feno-grego) onde a dose máxima utilizada no estudo causou um aumento do peso relativo do fígado. Cunha-Junior *et al.* (2016), demonstrou que a dose de 50mg/kg/dia da LQB-118, uma pterocarpanoquinona, causou um leve aumento do peso relativo do fígado de camundongos Swiss webster.

Ao avaliar os parâmetros bioquímicos, não há uma similaridade de alteração de parâmetros em relação aos machos. Nenhuma das doses utilizadas de 2HF provocou alteração significativa dos níveis de proteínas totais, albumina ou ácido úrico. Diferente da toxicidade aguda, não foi observada alteração dos níveis de creatinina quinase (CK) em nenhum grupo observado. Em contrapartida, todas as doses de 2HF provocaram uma diminuição de alanino aminotransferase (ALT). Gella (1994) discute a diminuição dos níveis de ALT mediante falha renal, além de certos medicamentos também serem capazes de diminuir os níveis dessa enzima (Kramer & Hoffman, 1997). Já para fêmeas, observamos uma similaridade com a toxicidade aguda, uma vez que as doses de 50 e 500 mg/kg/dia foram capazes de provocar um

aumento significativo dos níveis séricos de creatina quinase. Um aumento pontual dos níveis de sódio também foi observado para a dose de 50 mg/kg/dia.

Para responder melhor os resultados bioquímicos obtidos, realizamos uma análise histopatológica dos órgãos. Em todos os órgãos, já no grupo controle podemos observar alterações basais, seja de pontos focais de necrose, infiltrados inflamatórios ou depósito de gordura. Uma vez que os níveis de creatina quinase se mostraram elevados na análise bioquímica, esperava-se encontrar danos teciduais mais acentuados no coração, o que não foi possível uma vez que as fibras musculares se mantiveram preservadas. Já pelos níveis de ALT e diminuição do peso do fígado observados, esperava-se um dano tecidual maior no fígado dos animais, com mais pontos de necrose, o que explicaria uma possível diminuição do peso relativo e concomitante diminuição dos níveis enzimáticos. Porém, mesmo com a presença de pontos de esteatose e infiltrados inflamatórios, os hepatócitos e o tecido de maneira geral se encontram também preservados. Isso se repete com os rins, uma vez que a diminuição de ALT e o aumento de ácido úrico pode indicar falha renal. Apesar de uma hemorragia destacada na maior concentração, podemos observar a preservação das células e do córtex e medula renal.

Dados da literatura demonstram uma certa normalidade ao encontrar danos histopatológicos leves em testes pré-clínicos em camundongos, que não levam a problemas mais sérios. Estudos pré-clínicos, também baseados nos manuais 407 e 425 da OECD, com capsulas de bacnil e glicosídeos derivados de fenacho, ambos naturais, demonstram leves alterações bioquímicas e histopatológicas, porém em doses mais elevadas do que as doses que já possuem efeito conhecido, portanto estas seriam seguras (Khandare *et al.* 2015; Panigrahi *et al.* 2019).

Segundo Singh, 2002, um bom candidato a fármaco deve exibir boas propriedades farmacocinéticas. Para que sejam obtidos os parâmetros farmacocinéticos, é necessário que se desenvolva um método de detecção para o composto desejado. Sendo assim, um método bioanalítico foi desenvolvido para 2HF em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Após a administração de uma dose única de 10 mg/kg da 2HF via oral em camundongos BALB/c, o sangue foi coletado para quantificação da concentração plasmática de 2HF em diferentes tempos de coleta estabelecidos utilizando o método validado. Observamos que a curva concentração x tempo da 2HF demonstrou um perfil comum a curvas de concentração plasmática de administração

por via oral. Diferentemente da via intravenosa, que permite a biodisponibilidade direta do composto no sangue já no tempo 0 de administração atingindo o pico máximo da curva, a via oral, por atravessar etapas de digestão e metabolização, faz o caminho inverso, com uma baixa biodisponibilidade no tempo 0 atingindo posteriormente sua concentração máxima.

Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada uma análise não compartimentalizada. Para simulação de dose única ou múltiplas, foi escolhido o modelo de 2 compartimentos.

Podemos observar que a 2HF atingiu o pico máximo de concentração no tempo de 5 minutos ($T_{m\acute{a}x}$), com um $C_{m\acute{a}x}$ de 185,86. O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) determinado da 2HF é de 97,52 minutos. O tempo de meia vida é um parâmetro muito importante obtido no estudo da farmacocinética de um composto. Ele dita o intervalo de tempo no qual a concentração do mesmo é reduzida à metade. Uma vez definido o tempo de meia vida da 2HF sabemos que a cada 97,52 minutos, sua concentração será reduzida pela metade. Sendo um tempo muito curto, o composto será eliminado totalmente do sistema de maneira muito rápida, podendo não realizar o efeito desejado. Ambos $T_{m\acute{a}x}$ e $T_{1/2}$ da 2HF são muito inferiores se relacionados ao estudo da farmacocinética da apigenina, publicado em 2004 por Gradolatto *et al.* Nesse estudo, a apigenina, também pertencente à classe dos flavonoides, apresentou em dose única oral de 10 mg, um $T_{m\acute{a}x}$ de 24 horas e um $T_{1/2}$ de 91,8 horas, tempos muito maiores do que os apresentados pela 2HF.

O primeiro questionamento levantado quanto aos parâmetros apresentados pela 2HF é a questão do $T_{m\acute{a}x}$ e $T_{1/2}$ muito curtos. Foster *et al.* (2015) citam a administração via gavagem como uma questão a ser considerada uma vez que, ela alterou os níveis sistêmicos disponíveis de magnésio comparados com consumo normal de água e ração. O tempo de meia vida muito curto apresentado é considerado como preocupante uma vez que a 2HF via oral não é capaz de atingir os níveis de concentração plasmática necessários para um steady state em um modelo de doses a cada 8, 12 ou 24 horas (tempos mais comuns de administração de medicamentos). Porém, ao voltar no experimento *in vivo* da 2HF em modelo experimental de leishmaniose cutânea, observamos um efeito significativo da mesma com doses diárias de 50 mg/kg, em 35 dias, provando que mesmo com um curto tempo de meia vida, a 2HF promove o efeito desejado. Como hipótese para justificar o efeito da 2HF em modelo de leishmaniose cutânea temos o surgimento de um pico diferente do analito observado nos cromatogramas apenas de sangue de

camundongos contendo a 2HF nos tempos de coleta. Após realizar a injeção da 2HF em um espectrômetro de massas do tipo TOF (time off light), o espectro obtido demonstrou um pico de massa 319 Da sendo este um possível metabólito da 2HF.

A correlação entre as massas e estrutura da 2HF e do possível metabólito observado, sugere que este possível metabólito tenha sido sulfatado, ou seja, a metabolização da 2HF promoveu uma substituição do hidrogênio da posição 2' por um grupo sulfato no anel B. A possível estrutura química do metabólito pode ser observada na figura abaixo.

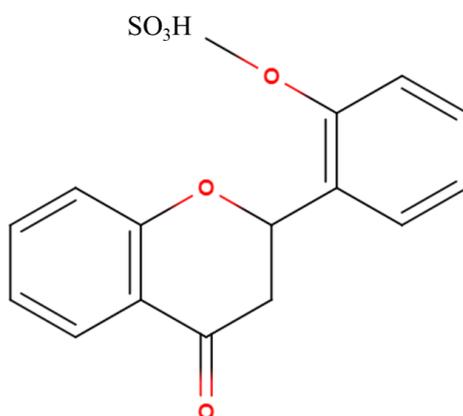


Figura 5.1 Possível metabólito da 2HF.

Estudos relatam a sulfatação de flavonoides nas etapas de metabolização (Chao *et al.* 2002). Após a administração de 50mg/kg por via oral em ratos da fisetina, um flavonoide da classe flavonol, Shia *et al.* (2009) observaram o aumento de metabólitos sulfatos no soro após avaliação por HPLC.

A possibilidade de que a 2HF seja sulfatada na sua metabolização abre precedentes para explicar o seu efeito em doses únicas diárias, uma vez que nas corridas analíticas o pico indicativo do mesmo aparenta aumentar de maneira inversamente proporcional à diminuição do pico da 2HF. O efeito da 2HF poderia ser explicado pelo aumento do metabólito livre que pode provocar o mesmo efeito que a 2HF ou até ser mais ativo. Estes resultados levaram à consideração de um estudo futuro sobre esse metabólito a partir da sua síntese para possível detecção, quantificação e corroboração dos resultados obtidos.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho trouxe como perspectivas uma futura síntese e detecção/quantificação de um possível metabólito sulfatado da 2HF. Também como se faz necessário o estudo do efeito desse metabólito *in vitro* e *in vivo* em *Leishmania*, para fins de comparação com a 2HF.

Outra perspectiva que vem à tona é a possibilidade de outra alternativa de entrega da 2HF como nanoencapsulamento, que regularia a liberação de 2HF e poderia melhorar seus parâmetros farmacocinéticos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho fortalecem a indicação da 2HF como possível alternativa à quimioterapia da Leishmaniose uma vez que:

Demonstra efeito sobre *L. amazonensis* resistente ao antimônio;

Pode ser considerada segura em termos de toxicidade uma vez que apresentou pequenas alterações bioquímicas e histopatológicas e nenhuma mortalidade.

Demonstra o perfil farmacocinético da 2HF por via oral em modelo murino, resultado este que pode ser aplicado não só no âmbito da leishmaniose mas em diversos campos de estudos onde a 2HF está inserida;

Destaca o curto tempo de meia vida, trazendo novas perspectivas sobre formulações e descoberta/quantificação de um possível metabólito ativo

8 REFERÊNCIAS

Adler S, Ber M. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *Ind J Med Res*. 1941; 29:803–9.

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 Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004349.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Alves MMSR, Nakagome BHY, Traldi MCC, Guachala MC, Kawakami NT, Yamaoka PHT, Pereira AC. Análise crítica da dosagem de creatinofosfoquinase no Pronto-Socorro Central do Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*. 2019; 64(1):1-7.

Badirzadeh A, Mohebbali M, Ghasemian M, Amini H, Zarei Z, Akhoundi B, Hajjaran H, Emdadi D, Molaei S, Kusha A, Alizadeh S. Cutaneous and post kala-azar dermal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in endemic areas of visceral leishmaniasis, northwestern Iran 2002-2011: a case series. *Pathog Glob Health*. 2013;107(4):194-7.

Bari AU. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. *Dermatol. Online J*. 2012; 18(2):4.

Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11: 340–344.

Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev infect dis*. 1988; 10(3):560–586.

Beutler JA. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr Protoc Pharmacol*. 2009; 46:9.11.1-9.11.21.

Bose C, Singh SP, Igid H, Green WC, Singhal SS, Lee J, Palade PT, Rajan A, Ball S, Tonk V, Hindle A, Tarbox M, Awasthi S. Topical 2'-Hydroxyflavanone for Cutaneous Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(10):1556.

Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*. 2003; 19(5):232-9.

Brazil, R. P.; Brazil B. G.; *Biologia de flebotomíneos do Brasil*, In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 257-274.

J B, M BM, Chanda K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Front Chem*. 2021;12(9):622286.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018; 392(10151):951-970.

Castellano, LRC. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão. *Vitae: Academia Biomédica Digital*. [internet]. 2005; 25. Disponível em: <http://www.vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=11&n=130> Acessado em 30 de agosto de 2020.

Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019; 20(10):1251-1265.

Chao PDL; Hsiu SL; Hou YC. Flavonoids in herbs: biological fates and potential interactions with xenobiotics. *J. Food Drug Anal*. 2002; 10:219–228.

Cojean S, Houzé S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V, Michard F, Bories C, Pratlong F, Le Bras J, Loiseau PM, Matheron S. Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(4):704-6.

Costa MA, Matheson C, Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O. Ancient Leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile." *PloS one*. 2009; 4(9): e6983.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol*. 1987; 36:2633–6.

Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do género *Leishmania* pathogenico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. *Nota Prévia*. *O Hospital*, Rio de Janeiro. 1937; 11:3-9.

Cunha-Júnior EF, Martins TM, Canto-Cavalheiro MM, Marques PR, Portari EA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC, Torres-Santos EC. Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(6):3794-801.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther*. 2009; 22(6):491–502.

Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(6):e2869.

Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J*. 1903; 2:79.

Dutta AK. Pursuit of medical knowledge: Charles Donovan (1863-1951) on kala-azar in India. *J Med Biogr*. 2008; 16(2):72-6.

Emiliano YSS, Almeida-Amaral EE. Efficacy of Apigenin and Miltefosine Combination Therapy against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *J Nat Prod*. 2018; 81(8):1910-1913.

Espinosa AO, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*. 2018; 145(4): 430-442.

Ferreira LLG, Andricopulo AD. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(2):125-127.

Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *J Nat Prod*. 2013; 76(8):1505-8.

Fonseca-Silva F, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. *J Nat Prod*. 2015; 78(4):880-4.

Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(2):e0004442.

Foster ML, Bartnikas TB, Johnson LC, Herrera C, Pettiglio MA, Keene AM, Taylor MD, Dorman DC. Pharmacokinetic evaluation of the equivalency of gavage, dietary, and drinking water exposure to manganese in F344 rats. *Toxicol Sci*. 2015; 145(2):244-51.

Franco MA, Barbosa AC, Rath S, Dorea JG. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1995;52:435-7.

Gasser, R. A.; Magill, A. J.; Oster, C. N.; Franke, E. D.; Grögl, M.; Berman, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1994; 18(1):83-90.

Gella, J. Enzimologia clínica. In: Sastre, F. G. (Ed.). *Bioquímica clínica*. Barcelona: Barcanova, 1994; 113-124.

Gervazoni LFO, Gonçalves-Ozório G, Almeida-Amaral EE. 2'-Hydroxyflavanone activity in vitro and in vivo against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(12):e0006930.

Gervazoni LFO, Barcellos GB, Ferreira-Paes T, Almeida-Amaral EE. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. *Front Chem*. 2020; 8:579891.

G-finder. G-finder 2018 Policy Cures Research, 2018. Disponível em: <https://www.policycuresresearch.org/g-finder-2018>. Acessado em 30 de agosto de 2020.

Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther*. 2017; 12:25-40.

Gibson ME. The identification of kala azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist*. 1983; 27:203–13.

Goto H, Lindoso JAL. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2012; 26(2):293–307.

Gradolatto A, Basly JP, Berges R, Teyssier C, Chagnon MC, Siess MH, Canivenc-Lavier MC. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33(1):49-54.

Guido, Rafael VC; Andricopulo, Adriano D; Oliva, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. av*. 2010;24(70):81-98.

Gurel MS, Tekin B, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clin Dermatol*. 2020; 38(2):140-151.

Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 108(1):131-5.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol*. 2009; 54:285-302.

Hendrickx S, Van den Kerkhof M, Mabile D, Cos P, Delputte P, Maes L, Caljon G. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 15;11(5):e0005620

Hoare CA. Early discoveries regarding the parasites of Oriental sore. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1938; 32:66–92.

Hoensch H, Oertel R. Anti-inflammatorische Wirkungen der Tee-Flavonoide [Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2012; 137(51-52):2738-40. German.

Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, Chang HR, Lin TH, Yang WE, Hsieh YS, Chu SC, Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chem Biol Interact.* 2007; 167(3):193-206.

Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. In vitro and in vivo effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod.* 2013; 76(10):1993-6.

Inacio JD, Gervazoni L, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate in vitro and in vivo in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(8):e3093.

Inacio JDF, Fonseca MS, Almeida-Amaral EE. (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate as a New Approach for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J Nat Prod.* 2019; 82(9):2664-2667.

Kandhare AD, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of glycosides based standardized fenugreek seed extract in laboratory mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015; 72(2):323-34.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(11):751-8.

Kaur G, Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *leishmania*. *J Parasitol Res.* 2014; 2014:726328.

Killick-Kendrick, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology.* 1999; 17(3): 279–289.

Knutsen LJ. Drug discovery management, small is still beautiful: Why a number of companies get it wrong. *Drug Discov Today.* 2011; 16(11-12):476-84.

Kramer, JW, Hoffmann, WE. Clinical enzymology. IN: Kaneko, JJ, Harvey, JW, Bruss, ML (ed.) *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997; 12: 303-325.

Kumar S, Kumar R, Dwivedi A, Pandey AK. In vitro antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activity and in vivo effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:459452.

Lainson R. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010; 1:13–32.

Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J.* 1903; 1:1252–4.

Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants.* 2017; 3:17109.

Liarte DB, Murta SM. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 2010; 107(1):205-12.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(12):e912.

Maia-Elkhoury ANS, O B Valadas SY, Puppim-Buzanovsky L, Rocha F, Sanchez-Vazquez MJ. SisLeish: A multi-country standardized information system to monitor the status of Leishmaniasis in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(9):e0005868.

Malik NN. Drug discovery: past, present and future. *Drug Discov Today.* 2008 Nov; 13(21-22):909-12.

Maltezou H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology.* 2010; 2010:8.

Manly CJ, Chandrasekhar J, Ochterski JW, Hammer JD, Warfield BB. Strategies and tactics for optimizing the Hit-to-Lead process and beyond--a computational chemistry perspective. *Drug Discov Today.* 2008; 13(3-4):99-109.

Manson-Bahr PEC. Old World leishmaniasis. In: Cox FEG, editor. *The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases.* London: The Wellcome Trust; 1996. pp. 206–17.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 2013; 27(2):123–47.

Maspero G. The Dawn of Civilization - Egypt and Chaldaeaa. 5th ed. London: Society for the Promotion of Christian Knowledge; 1910. p. 218.

Matta AA. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. Bull Soc Path Exot. 1916; 9:494-503.

Maxfield L, Crane JS. Leishmaniasis. [Updated 2020 Jul 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/>. Acessado em 30 de Agosto de 2020.

Ministério da Agricultura. Nota técnica no 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa, 2016. Disponível em: <https://www.apipa10.org/images/apipa/downloads/nota-tecnica-milteforan.pdf>. Acessado em 30 de agosto de 2020.

Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. Curr. Med. Chem. 2007; 14(10):1153–69.

Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. Tropical Parasitology. 2014; 4(1):4-9.

Mokni M. Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]. Ann Dermatol Venereol. 2019;146(3):232-246.

Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, Melo MN, Frézard F, Ouellette M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(5):e1167.

Monte-Neto R, Laffitte MC, Leprohon P, Reis P, Frézard F, Ouellette M. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(2):e0003476.

Mullard A. 2010 FDA drug approvals. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10(2):82-5.

Muskus, CE, Marin Villa, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. Biomedica 22, 167-177.

Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, Singhal J, Lelsani P, Prokai L, Awasthi S, Singhal SS. 2'-hydroxyflavanone inhibits proliferation, tumor vascularization and promotes normal differentiation in VHL-mutant renal cell carcinoma. Carcinogenesis. 2011; 32:568–7

Nagaprashantha LD, Singhal J, Li H, Warden C, Liu X, Horne D, Awasthi S, Salgia R, Singhal SS. 2'-Hydroxyflavanone effectively targets RLIP76-mediated drug

transport and regulates critical signaling networks in breast cancer. *Oncotarget*. 2018; 9(26):18053-18068.

Nagaprashantha LD, Singhal J, Chikara S, Gugiu G, Horne D, Awasthi S, Salgia R, Singhal SS. 2'-Hydroxyflavanone induced changes in the proteomic profile of breast cancer cells. *J Proteomics*. 2019; 192:233-245.

Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJN, et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* 2014; 114(22):11305–47.

Neal RA. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1968; 62(1):54–62.

Neuber, H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2008; 6(9): 754–765.

Neves BJ, Braga RC, Melo-Filho CC, Moreira-Filho JT, Muratov EN, Andrade CH. QSAR-Based Virtual Screening: Advances and Applications in Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2018;9:1275.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003; 66(7):1022-37.

Newman DJ, Cragg GM. Natural product scaffolds as leads to drugs. *Future Med Chem*. 2009; 1(8):1415-27.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*. 2016; 79:629–661.

Nunes CDR, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, Vieira IJC, Barros de Oliveira D. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 2020; 25(16):3726.

Pan American Health Organization (PAHO). Neglected, tropical and vector borne diseases. <https://www.paho.org/en/topics/neglected-tropical-and-vector-borne-diseases>. Acessado em 30 de Agosto de 2020.

Pan American Health Organization (PAHO). Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, DC: PAHO; 2019. Disponível em <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>. Acessado em 30 de agosto de 2020.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016; 5:e47.

Panigrahi B, Sharma S, Sitapara B, De S, Nariya M. Safety profile of Ayurvedic poly-herbomineral formulation - Bacnil capsule in albino rats. *Ayu*. 2019; 40(3):185-191.

Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(18):4305-12.

Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today*. 2016; 21(2):204-7.

Pedrique B, Strub-Wourgaft N, Some C, Olliaro P, Trouiller P, Ford N, Pécoul B, Bradol JH. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. *The Lancet. Global health*. 2013; 1,6: e371-9.

Perry M, Wyllie S, Prajapati V, Menten J, Raab A, Feldmann J, Chakraborti D, Sundar S, Boelaert M, Picado A, Fairlamb A. Arsenic, antimony, and *Leishmania*: has arsenic contamination of drinking water in India led to treatment-resistant kala-azar? *Lancet*. 2015; 385 Suppl 1:S80

Polson AG, Fuji RN. The successes and limitations of preclinical studies in predicting the pharmacodynamics and safety of cell-surface-targeted biological agents in patients. *Br J Pharmacol*. 2012; 166(5):1600-2.

Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(12):e0006052.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal Immun*. 1990; 145: 4311-4316.

Raza M, Al-Shabanah OA. Effect of vigabatrin on contractile response to arachidonic acid and prostaglandins in smooth muscle preparations and platelet aggregation in experimental laboratory animals. *Pharmacol Res*. 2003; 47(6):477-83.

Rocha VPC, Quintino da Rocha C, Ferreira Queiroz E, Marcourt L, Vilegas W, Grimaldi GB, et al. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*. 2018; 24:1.

Rodrigues T, Reker D, Schneider P, Schneider G. Counting on natural products for drug design. *Nat Chem*. 2016; 8(6):531-41.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J*. 1903; 2:1261-2.

Ross R. Further notes of Leishman's bodies. *Br Med J.* 1903; 2:1401.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(3):353-359.

Salem MM, Werbovets KA. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr Med Chem.* 2006; 13(21):2571-98.

Sampaio SA, Godoy JT, Paiva L, Dillon NL, da Lacaz CS. The treatment of American (mucocutaneous) leishmaniasis with amphotericin B. *Arch Dermatol.* 1960; 82:627-35.

Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Da Costa FB, de Castro SL, Ferreira VF, de Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, das Neves Amorim RC, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, de N C Soeiro M, Steindel M, Tempone AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr Med Chem.* 2012; 19(14):2128-75.

Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Da Costa FB, de Castro SL, Ferreira VF, de Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, das Neves Amorim RC, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, de N C Soeiro M, Steindel M, Tempone AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr Med Chem.* 2012; 19(14):2176-228.

Schriefer, A, Wilson, ME, Carvalho, EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21:483–488.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1296.

Sergent Ed, Sergent Et, Parrott LM, Donatien AL, Beguet ME. Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop.). *C R Hebd Séances Acad Sci.* 1921; 173:1030–2.

Shia CS, Tsai SY, Kuo SC, Hou YC, Chao PD. Metabolism and pharmacokinetics of 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-

hydroxyflavone and antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(1):83-9.

Shin SY, Kim JH, Lee JH, Lim Y, Lee YH. 2'-Hydroxyflavanone induces apoptosis through Egr-1 involving expression of Bax, p21, and NAG-1 in colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56(5):761-74.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 5(6):485-97.

Singhal SS, Singhal J, Figarola JL, Riggs A, Horne D, Awasthi S. 2'-Hydroxyflavanone: A promising molecule for kidney cancer prevention. *Biochem Pharmacol.* 2015; 96(3):151-8.

Silveira F; Corbett, CEP. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010; 1(2): 143-147.

Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):82.

Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, Murray HW, Singh VP. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59(1):139-43.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2002; 7(3):293.

Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology.* 2018; 145(4):481-489.

Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(7):507-19.

Tauchen J, Huml L, Rimpelova S, Jurášek M. Flavonoids and Related Members of the Aromatic Polyketide Group in Human Health and Disease: Do They Really Work? *Molecules.* 2020; 25(17):3846.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10):e1003594.

Telleria EL, Martins-da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Csekö YM. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology.* 2018; 145(10):1336-1353.

Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6):1578.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R . Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017; 6:750.

Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 2018; 145(4):464-480.

United Nations. Os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio — ODM Brasil, 2000. Disponível em: <http://www.odmbrasil.gov.br/o-brasil-e-os-odm>. Acesso em: 2 abr. 2019

United Nations. Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio-92), 2012. Disponível em: http://www.rio20.gov.br/sobre_a_rio_mais_20.html Acesso em: 21 mar. 2019

United Nations. Task team on the post-2015 UN Development Agenda. 2012. http://www.un.org/millenniumgoals/pdf/Think%20Pieces/8_health.pdf. Acessado em 30 de Agosto de 2020.

United Nations. SDGs -Sustainable Development Knowledge Platform- Sustainable development goals. The 2030 Agenda 2015a. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/topics/sustainabledevelopmentgoals>. Acesso em: 27 mar. 2019

Van Bockstal L, Bulté D, Hendrickx S, Sadlova J, Volf P, Maes L, Caljon G. Impact of clinically acquired miltefosine resistance by *Leishmania infantum* on mouse and sand fly infection. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2020; 13:16-21.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des*. 2002; 8(4): 297-318.

Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Arch. Bras. Med*. 1912;1:36–8.

Viegas Jr, C, Bolzani, VS, Barreiro, EIJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. 2006; 29(2): 326-337.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases World Health Organization, 2010.

WHO. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control: report of a WHO consultative meeting, Kolkata, India, 2–3 July 2012. 2013. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78608>. Acessado em 30 de Agosto de 2020.

WHO. Weekly epidemiological record Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance, 2017c.

WHO. Global Health Observatory Data Repository. World Heal. Organ. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>. Acessado em 30 de agosto de 2020.

WHO. Global Health Observatory Data Repository. World Heal. Organ. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2018. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>. Acessado em 30 de agosto de 2020.

Yamey G, Batson A, Kilmarx PH, Yotebieng M. Funding innovation in neglected diseases. *BMJ (Clinical research ed)*. 2018; 360: k1182.

Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 2016; 21(5):559.

Yue Y, Qian W, Li J, Wu S, Zhang M, Wu Z, Ma Q, Wang Z. 2'-Hydroxyflavanone inhibits the progression of pancreatic cancer cells and sensitizes the chemosensitivity of EGFR inhibitors via repressing STAT3 signaling. *Cancer Lett*. 2020; 471:135-146.

Zicker F, Faid M, Reeder J, Aslanyan G . Building coherence and synergy among global health initiatives. *Health res policy and syst*. 2015; 13:75.

Zicker F, Cuervo LG, Salicrup LA. Promoting high quality research into priority health needs in Latin America and Caribbean. *BMJ (Clinical research ed)*. 2018; 362:k2492.

Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(10): 1616-7