

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação de Ciência da Saúde: Infectologia Medicina Tropical

Naianda Rezende Ribeiro

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO 8-
HIDROXIQUINOLINA (8-HQN) PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Belo Horizonte

2022

Naianda Rezende Ribeiro

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO 8-
HIDROXIQUINOLINA (8-HQN) PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no referido Programa.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mariana Costa Duarte
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Menezes Souza

Belo Horizonte

2022

R484d Ribeiro, Naianda Rezende.
Desenvolvimento de uma nova formulação tópica contendo 8-Hidroxiquinolina (8-HQN) para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar [recurso eletrônico]. / Naianda Rezende Ribeiro. - - Belo Horizonte: 2022.
79f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Mariana Costa Duarte.
Coorientador (a): Daniel Menezes Souza.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Oxiquinolina. 3. Anti-Infeciosos Locais. 4. Leishmania braziliensis. 5. Camundongos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Duarte, Mariana Costa. II. Souza, Daniel Menezes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

"DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO 8- HIDROXIQUINOLINA (8-HQN) PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR"

NAIANDA REZENDE RIBEIRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 11 de fevereiro de 2022, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

DRA. LUIZA DOS REIS CRUZ

UNICAMP

DRA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES

UFMG

PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - Coorientador

UFMG

PROFA. MARIANA COSTA DUARTE - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 11 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Costa Duarte, Professora Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 11/02/2022, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luíza dos Reis Cruz, Usuária Externa**, em 11/02/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grasiele de Sousa Vieira Tavares, Usuário Externo**, em 16/02/2022, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Menezes Souza, Professor Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 16/02/2022, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1244454** e o código CRC **16F8C9D0**.

AGRADECIMENTOS

Um novo ciclo concluindo-se em minha vida e não posso deixar de agradecer pois não cheguei até aqui sozinha, primeiramente a Deus por me permite realizar este sonho, força que preciso diariamente e pessoas maravilhosas que esteve no meu caminho contribuindo para concretização desta etapa.

Agradeço minha orientadora Mariana Costa Duarte, que me acolheu com todo carinho e paciência me guiando/ensinando em todos os sentidos que necessitava. Sempre muito generosa e flexível se colocando no lugar do próximo, obrigada por compreender minhas limitações.

A minha família (Mãe, esposo e filha), fonte de amor e doação, o meu muito obrigada por todo apoio e incentivo durante todos estes anos. Obrigada por não me deixar desistir do meu sonho, por me escutarem e tentarem me ajudar mesmo sem entender o assunto com cara de paisagem (rsrsrs), espero algum dia poder retribuir toda essa dedicação comigo.

Aos amigos do Laboratório, em especial a Scarleth, Larissa e Lucas pela disposição de sempre ajudar nos experimentos e, também, pelos momentos de tranquilidade deixando os dias no laboratório mais leves e divertidos, vocês são maravilhosos.

A todos os Mestres que contribuíram transmitindo conhecimento para meu progresso , também, aqueles que foram parceiros de experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e também a CAPES pela bolsa que auxiliou na realização deste estudo.

O meu muito obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho, as quais eu não citei, mas que foram essenciais para sua realização.

“Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar.”

Madre Teresa de Cálcuta

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas, transmitidas por vetores e causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, e contam com a participação de diversos hospedeiros suscetíveis à infecção, como o homem, além de algumas espécies de animais silvestres e domésticos, como o cão. No âmbito das doenças negligenciáveis, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta caráter emergente e re-emergente no território nacional e no mundo. As características clínicas dessa doença incluem uma ampla gama de manifestações com diferentes graus de gravidade que dependem da espécie e virulência do parasito, além do estado imunológico do indivíduo infectado. Atualmente os fármacos empregados no tratamento apresentam limitações como a toxicidade elevada, via de administração endovenosa e elevado custo do tratamento. Além disso, devido à resistência dos parasitos ao principal fármaco disponível (Glucantime), associada a problemas de diagnóstico e monitoramento em áreas endêmicas, colocam em risco os programas de controle da doença no Brasil. Assim, diversos estudos buscam novas estratégias terapêuticas, a fim de melhorar a eficácia do tratamento das leishmanioses. Dessa forma, o presente estudo utilizou uma formulação tópica, contendo 8-hidroquinolina (8-HQN), para o tratamento de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* para o tratamento da LT. Para avaliar a eficácia *in vivo* do tratamento, avaliou-se a média do diâmetro da lesão, bem como a carga parasitária da lesão, baço, fígado, medula óssea e linfonodos, além de parâmetros imunológicos associados ao tratamento. Foram utilizados como controle os grupos tratados com salina (controle), pomada veículo (CV), e os grupos tratados com os fármacos de referência Glucantime e Anfotericina-B. Os resultados mostraram que os animais tratados com 8-HQN 5%, quando comparados aos controles, apresentaram redução na média do diâmetro da lesão e também da carga parasitária na pele, baço, fígado, linfonodos drenantes e medula óssea. Os animais tratados com a pomada apresentaram um perfil de resposta imunológica celular do tipo 1 associada a produção de citocinas como INF- γ e TNF- α nas análises realizadas por citometria de fluxo, além do tratamento não apresentar toxicidade aos camundongos. Sendo assim, a formulação tópica contendo 8-HQN 5% é um candidato promissor no tratamento tópico da LT e poderia ser considerada futuramente uma alternativa para o tratamento da LT.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar; 8-hidroquinolina; tratamento tópico

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious diseases transmitted by vectors and caused by parasites of the genus *Leishmania*, and have the participation of several hosts susceptible to infection, such as man, in addition to some species of wild and domestic animals, such as the dog. In the context of neglected diseases, cutaneous leishmaniasis (TL) presents an emerging and re-emerging character in the national territory and in the world. The clinical features of this disease include a wide range of manifestations with different degrees of severity that depend on the species and virulence of the parasite, in addition to the immunological status of the infected individual. Currently, the drugs used in the treatment have limitations such as high toxicity, intravenous administration route and high treatment cost. In addition, due to the resistance of the parasites to the main drug available (Glucantime), associated with problems of diagnosis and monitoring in endemic areas, puts the disease control programs in Brazil at risk. Thus, several studies seek new therapeutic strategies in order to improve the effectiveness of the treatment of leishmaniasis. Thus, the present study used a topical formulation, containing 8-hydroxyquinoline (8-HQN), for the treatment of Balb/c mice infected with *L. amazonensis* for the treatment of TL. To assess the *in vivo* efficacy of the treatment, the mean diameter of the lesion was evaluated, as well as the parasitic load of the lesion, spleen, liver, bone marrow and lymph nodes, in addition to immunological parameters associated with the treatment. The groups treated with saline (control), vehicle ointment (CV) and the groups treated with the reference drugs Glucantime and Amphotericin-B were used as controls. The results showed that the animals treated with 8-HQN 5%, when compared to the controls, showed a reduction in the mean diameter of the lesion and also in the parasite load in the skin, spleen, liver, draining lymph nodes and bone marrow. The animals treated with the ointment showed a type 1 cellular immune response profile associated with the production of cytokines such as INF- γ and TNF- α in the analyzes performed by flow cytometry, in addition to the treatment not showing toxicity to mice. Therefore, the topical formulation containing 8-HQN 5% is a promising candidate in the topical treatment of TL and could be considered in the future as an alternative for the treatment of TL.

Keywords: Leishmaniasis; 8-hydroxyquinoline; topical treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa de acordo com a forma clínica e país.....	19
Figura 2: Status de endemicidade da leishmaniose tegumentar no mundo, 2019	19
Figura 3: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	21
Figura 4: Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 5: Resposta das células CD4+ TH1 x TH2 à infecção por <i>Leishmania</i> spp.	23
Figura 6: Formas clínicas de Leishmaniose tegumentar.	25
Figura 7: Forma clínica de Leishmaniose Mucosa.....	26
Figura 8: Estrutura química da 8-HQN..	32
Figura 9: Determinação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L. Amazonensis</i>	43
Figura 10: Figura 10: Análise do desenvolvimento de lesões cutâneas (mm ²) em camundongos BALB/c após infecção experimental com <i>L. Amazonensis</i>	45
Figura 11: Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/ c infectados com <i>L. Amazonensis</i>	46
Figura 12: Carga parasitária avaliada por qper no tecido infectado dos animais tratados.	47
Figura 13: Análise <i>in vitro</i> da razão de INF- γ /IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com SLA de <i>L. Amazonensis</i>	48
Figura 14: Citocinas intracitoplasmática em esplenócitos..	49
Figura 15: Parâmetros toxicológicos da avaliação renal	50
Figura 16: Parâmetros toxicológicos da avaliação cardíaca e hepática.....	51

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Creme não iônico, adaptado (ANVISA/BRASIL, 2012)	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-HQN - 8-hidroxiquinolina

Anf-B - Anfotericina B

Anf-CL - Complexo Lipídico de Anfotericina B

Anf-D - Desoxicolato de Anfotericina B

Anf-L - Anfotericina B Lipossomal

CV - Controle contendo apenas a pomada veículo

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias

d.C. – depois de Cristo

DCs - Células Dendríticas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FDA - Food and Drug Administration

Glu GLU -

GlucantimeIFN- γ -

Interferon-gamaIgG -

Imunoglobulina GIL –

Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IP. – Intraperitoneal

L. - Leishmania

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD- Leishmania Cutânea Difusa

LCL – Leishmania Cutânea Localizada

LD- Cutânea Disseminada

LM - Leishmaniose Mucosa

LR - Recidiva Cútis

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

M ϕ – Macrófago

NK - Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RNI - Intermediários Reativos de Nitrogênio
ROI - Intermediários Reativos de Oxigênio
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
SFM - Sistema Fagocitário Mononuclear
SisLeish – Sistema de Informação de Leishmaniose
SLA – Extrato Solúvel de Antígenos de Leishmania
spp. – Nome da espécie não identificada
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
Th – T help
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-Alfa
V. – Viannia
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Aspectos Históricos da Leishmaniose Tegumentar	17
2.2 Epidemiologia.....	18
2.3 Ciclo Biológico do Parasito <i>Leishmania</i> spp.....	20
2.4 Aspectos Imunológicos das Leishmanioses.....	22
2.5 Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	24
2.6 Tratamentos da Leishmaniose Tegumentar	26
2.7 8-Hidroxiquinolina	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 Animais de experimentação.....	36
4.2 Parasito	36
4.3 Preparação do extrato proteico solúvel de <i>Leishmania</i>	36
4.4 Infecção e tratamento.....	37
4.5 Formulação tópica	37
4.6 Determinação da área da lesão	38
4.7 Carga Parasitária	39
4.8 Avaliação do desenvolvimento das lesões cutâneas e da carga parasitária tecidual por PCR quantitativo (<i>qPCR</i>).....	39
4.9 Citometria de Fluxo	40
4.10 Resposta Imune Celular	41
4.11 Avaliação Toxicológica.....	41
4.12 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO	60
8 PERSPECTIVAS	61
9 REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO.....	62
10. ANEXO	78

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças infecciosas transmitidas por vetores causados por parasitos protozoários obrigatórios da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* (ROSS, R., 1903) e contam com a participação de diversos hospedeiros suscetíveis à infecção, como o homem, além de algumas espécies de animais silvestres e domésticos, como o cão (AKHOUNDI, M. *et al* 2016; ALEMAYEHU & ALEMAYEHU, 2017).

Estas doenças têm distribuição mundial, podendo ser encontradas em cerca de 98 países, sendo endêmica em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e bacia do Mediterrâneo, onde mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob o risco de infecção. Estima-se que ocorram anualmente 30.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 1 milhão de Leishmaniose Tegumentar (LT) (TORRES-GUERRERO, E. *et al.*, 2017, WHO a, 2021). A leishmaniose é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas (DTN) em termos de mortalidade e morbidade, constituindo um problema de saúde pública (ALVAR, J. *et al.* 2012; PIGOTT, D. M. *et al* , 2014; BRASIL, 2017).

Os parasitos possuem um ciclo de vida heteróximo, onde as formas promastigotas se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado; e formas amastigotas, que são encontradas em células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (SACKS & SHER, 2002; ZAMBRANO-VILLA, S., *et al.* 2002; TORRES-GUERRERO, E. *et al.* 2017). Já as características clínicas dessa doença incluem uma ampla gama de manifestações com diferentes graus de gravidade que dependem da espécie e virulência do parasito, além do estado imunológico do indivíduo infectado (GOTO & LINDOSO, 2010; TORRES-GUERRERO, E. *et al.*, 2017).

A leishmaniose divide-se em LV e LT, onde na apresentação clínica da LT, a doença pode se manifestar sobre duas formas clínicas: Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucosa (LM) (BRASIL, 2017; WHO b, 2021). A LC pode ser subdividida da seguinte forma: cutânea localizada (LCL), mais prevalente, cutânea disseminada (LD), recidiva cútis (LR) e cutânea difusa (LCD). A LCD no Brasil é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e constitui uma forma com manifestação rara, porém, grave da doença; além de apresentar forte resistência ao tratamento (REITHINGER, R., *et al.*, 2007; GOTO & LINDOSO, 2010).

O tratamento dessa doença é realizado com antimoniais pentavalente, que foram os primeiros medicamentos clinicamente eficazes empregado contra as leishmanioses e ainda são

considerados os medicamentos de primeira escolha no Brasil (TUON, F. F. *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que os parasitos causadores das leishmanioses têm apresentado resistência aos antimonais pentavalentes, além disso, a cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimonais representam uma das limitações do seu uso e a via de administração endovenosa ou intramuscular, também, diminui a continuidade do tratamento pelos pacientes (PAVLI & MALTEZOU, 2010; OLIVEIRA, L.F. *et al.*, 2011).

Fármacos de segunda escolha incluem a Anfotericina B (Anf-B), que apresenta toxicidade, e a Anfotericina B lipossomal (Anf-L), uma formulação menos tóxica, entretanto de elevado custo (BALASEGARAM, M. *et al.*, 2012; CUNHA, M. A. *et al.*, 2015). Outro fármaco considerado de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses é a Pentamidina, porém esta apresenta alta toxicidade e efeitos adversos que incluem diabetes mellitus, hipoglicemia e nefrotoxicidade (SINGH, N. *et al.*, 2012). Paromomicina é considerado um fármaco alternativo, todavia sua formulação parenteral causa graves efeitos adversos (JHINGRAN, A. *et al.*, 2009; MATOS, A.P.S. *et al.*, 2020). É por fim, a miltefosina, que no Brasil ainda não foi liberada para tratamento da LT pelo Sistema Único de Saúde (SUS), mas que pode causar sintomas gastrointestinais, nefrotoxicidade e potencial efeito teratogênico (DORLO, T. P. C. *et al.*, 2012; MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2015).

Assim, diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar novas moléculas com potencial ação leishmanicida, como estratégia para melhorar a eficácia do tratamento das leishmanioses (SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.*, 2010; DUARTE, M. C. *et al.* 2016 a; DUARTE, M. C. *et al.* 2016 b; LAGE, L. M. *et al.*, 2016).

A substância 8-hidroxiquinolina (8-HQN) e seus derivados têm chamado à atenção tanto na química medicinal, quanto nas ciências da saúde por suas características física e pelas propriedades químicas apresentadas. O interesse por esse composto e seus derivados têm aumentando consideravelmente nas duas últimas décadas (OLIVERI & VECCHIO, 2016). 8-HQN e muitos dos seus derivados, possuem uma ampla gama de aplicações farmacológicas avaliados em diferentes estudos como agentes quimioterapêuticos (COLLERY, P. *et al.*, 2000), atividade antimicrobiana (LENTZ, D. L. *et al.* 1999; SHEN, A. Y. *et al.* 1999a) e associado ao tratamento de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.*, 2013). A 8-HQN também foi avaliada como agente anti-HIV, antifúngico (SAADEH, H. A. *et al.*, 2020). Lage *et al.* (2016), avaliou essa substância *in vivo* em uma composição micelar na tentativa de reduzir a toxicidade, e os resultados demonstraram que o sistema micelar 8-HQN foi eficaz na redução da infecção e controle da doença nos animais, além de não apresentar toxicidade.

Logo, na tentativa também de eliminar os efeitos adversos pela formulação parenteral, o tratamento tópico da LT tem sido recomendado devido a sua potencialização da ação local do fármaco, baixo custo, facilidade de administração e a não necessidade de infraestrutura complexa do sistema de saúde para a realização do tratamento (MODABBER, F. *et al.* 2007, TRINCONI, C. T. *et al.* 2017; MEHEUS, F. *et al.* 2010). Um protocolo de tratamento da LT que utilizasse a via tópica como alternativa, poderia aumentar a adesão ao tratamento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do fármaco 8-HQN, em uma nova formulação tópica, para o tratamento da LT empregando modelos murino de infecção pelo parasito *L. amazonensis*, visando aumentar a eficácia e segurança do tratamento da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A LT é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e/ou cartilaginosa da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, causada por várias espécies de protozoários digenéticos, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do SFM (MOKNI, M., 2019). A OMS considera as leishmanioses como uma das seis mais importantes doenças infecciosas pelo seu alto coeficiente de detecção, pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico (ALVAR, J. *et al.* 2012; BRASIL, 2017).

2.1 Aspectos Históricos da Leishmaniose Tegumentar

A LT parece ser uma doença antiga, que afligia humanos, como sugerido em antigas peças de cerâmica originárias do Peru e Equador (huacos), datadas de 400 a 900 anos d.C. (BASANO & CAMARGO, 2004; LAINSON, R. 2010). Essas peças geralmente retratavam rostos humanos com deformações graves bastante similares às causadas pela LM, conhecida como espúndia. Já as lesões cutâneas eram chamadas de *uta* pelos índios peruanos (LAINSON, R. 2010).

A primeira referência de LT no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antigüedad de la Syphilis en el Perú”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (BASANO & CAMARGO, 2004).

Em 1909, os parasitos dessa doença foram descritos no Novo Mundo pela primeira vez de forma independente em lesões de pele de pacientes com 'úlceras de Baurú' do Estado de São Paulo, Brasil. Dois anos depois, encontraram o parasito, que é idêntico a *L. tropica*, em lesões mucocutânea de pacientes com espúndia. Em 1911, Gaspar Vianna investigou formas amastigotas em lesões cutâneas de um paciente e concluiu que sua morfologia diferia das formas amastigotas de *L. tropica* e nomeou as novas espécies por *lapsus calami Leishmania brazilienses*, que foi corrigida para *Leishmania braziliensis* pelo colega de Vianna, Alfredo Augusto da Matta, em 1916 (LAINSON, R. 2010; STEVERDING, D. 2017).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas no Brasil

sete espécies dermatrópicas. Seis do subgênero *Viannia* (*V.*) e uma do subgênero *Leishmania* (BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017).

2.2 Epidemiologia

A leishmaniose pode ser separada em dois grupos de doenças: a leishmaniose do Velho Mundo, onde a maioria dos casos são causados por *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*; e do Novo Mundo, causadas principalmente por *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. naiffi* e *L. panamensis* (ASHFORD, R.W., 2000; FERNÁNDEZ-FIGUEROA, A. *et al.*, 2020). Essa divisão refere-se à região geográfica em que a infecção é adquirida. A leishmaniose do “Velho Mundo” refere-se à doença causada por espécies encontradas na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na África. Já a leishmaniose “Novo Mundo” diz respeito a infecção pelas espécies encontradas no México, América Central e do Sul (DAVID & CRAFT, 2009).

A LT constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), assim, devido à sua magnitude essa doença merece mais atenção pelo risco de ocorrência de deformidades que podem vir a causar no ser humano. (BRASIL, 2017). Nas Américas, no ano de 2019, 17 países endêmicos reportaram um total de 41.617 casos de LT, sendo que desse total 77% foram reportados pelo Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052). Dentre esses, o Brasil é responsável por 48,2% do número de casos, assim temos para o Brasil, 14.659 casos de forma clínica cutânea (94,7%) e 825 mucosa (5,3%), conforme Figura 1 (SisLeish- OPAS/OMS, 2020). Já a LV, é endêmica em 13 países das Américas e em 2019, do total de casos (2.603), 97% foram notificados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai.

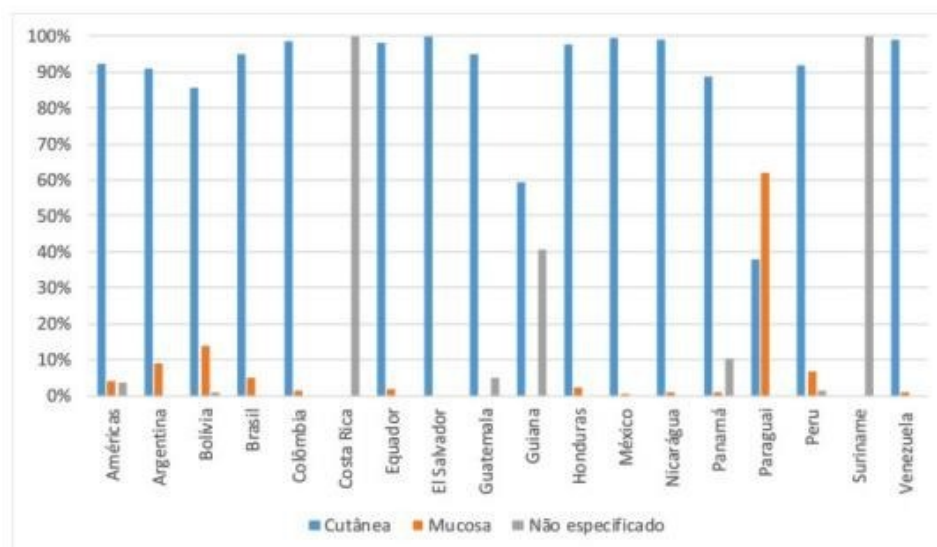


Figura 1: Proporção de casos de leishmaniose cutânea e mucosa de acordo com a forma clínica e país. Região das Américas, 2019. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS, nov., 2020.

A LT é uma doença com distribuição mundial (Figura 2), com cerca de 95% dos casos cutâneos ocorrendo nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Estima-se que ocorra, aproximadamente, 1 milhão de novos casos em todo o mundo. Já em 2019, os países com maiores números de casos reportados de LT foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica), Iraque, Líbia, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia (TORRES-GUERRERO, E. *et al.*, 2017; WHO b, 2021).

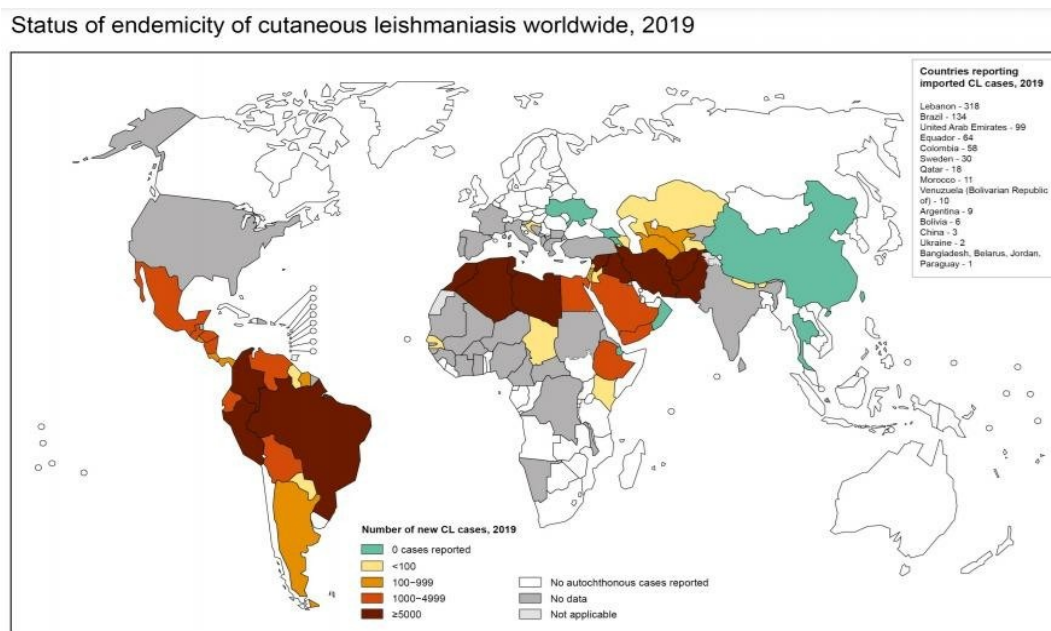


Figura 2: Status de endemicidade da leishmaniose tegumentar no mundo, 2019. Fonte: WHO/NTD, 2021.

Desde 2015, onde se registou o maior número de casos (67.949), verifica-se uma tendência decrescente, atingindo em 2019 o menor número de casos (41.617), porém o Brasil continua um país muito intenso no nível de transmissão da doença com 14,4 incidência/100.000 habitantes, de acordo com Índice do triênio (2017-2019), conforme pode-se observar na figura 2 acima, onde o Brasil é classificado como vermelho (muito intenso) atingiu mais de 5.000 casos (SisLeish-OPAS/OMS, 2020).

No Brasil, a LT tem a sua distribuição em todo o território nacional, onde pode se apresentar com três perfis epidemiológicos da doença como ambientes silvestres, ocupacional em que se associa à exploração de florestas ou rural. (BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017).

A epidemiologia da LC na região das Américas é complexa, com variação nos ciclos de transmissão, hospedeiros de reservatório, vetores de flebotomíneos, manifestações clínicas e resposta à terapia, além de múltiplas espécies de *Leishmania* em circulação na mesma área geográfica (PIGOTT, D. M. *et al*, 2014).

2.3 Ciclo Biológico do Parasito *Leishmania* spp.

Os vetores das leishmanioses são comumente conhecidos como flebotomíneos, sendo que no Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (MAROLI, M. *et al*, 2013). Estes apresentam vários nomes populares, dependendo da localização geográfica, a saber: mosquito palha, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, ligeirinho, arrupiado (BASANO & CAMARGO, 2004).

Normalmente, os flebotomíneos fêmeas se alimentam à noite e apresentam o ciclo de vida heteroxeno (Figura 3), assim, o vetor infectado, durante o repasto sanguíneo inserem seus aparelhos bucais na pele e os agitam para produzir uma pequena ferida na qual o sangue flui dos capilares superficiais (BATES, P. A, 2007; MENEZES, J. P. *et al.*, 2016). Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são depositadas na derme em uma mistura de secreções salivares (KILLICK-KENDRICK, R., 1999; SOARES & TURCO, 2003; MICHALICK, M. S. M., 2005; KAYE & SCOTT, 2011; STRAZZULLA, A. *et al*, 2013).

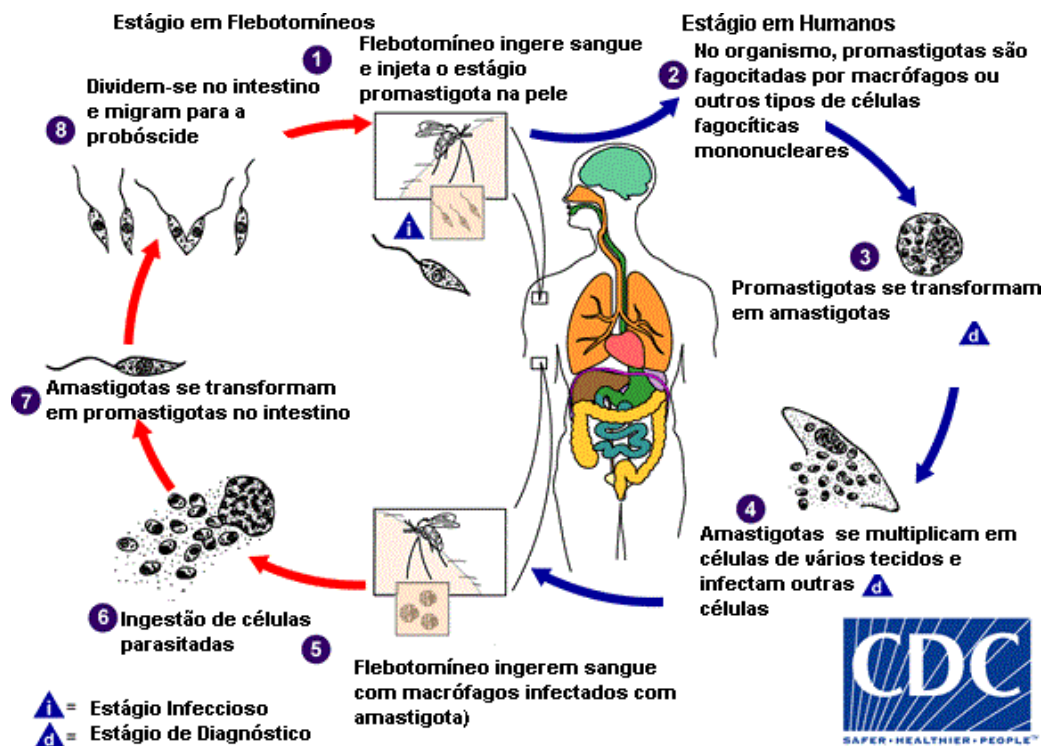


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC, a), 2017.

Em seguida, formas promastigota metacíclicas são fagocitadas por macrófagos ($M\phi$) e inicia o processo de sucessivas multiplicações. Posteriormente, os $M\phi$ s se rompem e as amastigotas liberadas infectam outros $M\phi$ s, por mecanismo semelhante, e o ciclo começa novamente. (MICHALICK, M. S. M., 2005; ANVERSA, L. *et al* , 2017). Amastigota (Figura 4A) é uma das principais formas morfológica do parasito encontrado no interior das células

fagocitárias do hospedeiro vertebrado e as promastigotas (Figura 4B), são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (SUNTER & GULL, 2017; PACE, D., 2018).

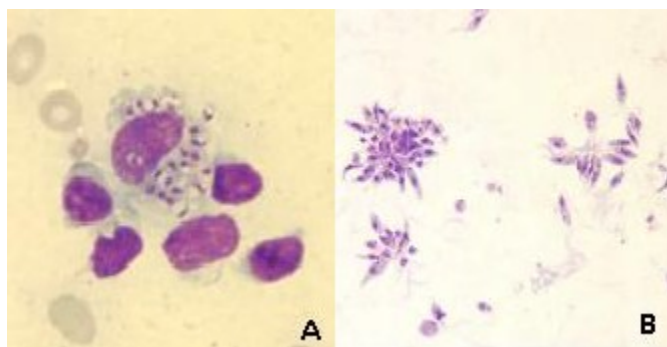


Figura 4: Formas morfológicas de *Leishmania* spp. A - Formas amastigotas de *Leishmania* spp. B - Formas promastigota de *Leishmania* spp. de cultura. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, b), 2017.

2.4 Aspectos Imunológicos das Leishmanioses

A maioria dos estudos de mecanismos de resposta imune foi realizada em modelos murinos, sendo caracterizados dois padrões de resposta gerados por subpopulações de LT com perfil T_H1 (resistência) e subpopulação de LT com T_H2 (susceptibilidade), os quais são similares em humanos (GENARO & REIS, 2005; REIS, L. de C. *et al.*, 2006).

Existem muitas complexidades na imunidade contra as leishmanioses, pois, vários paradoxos permanecem sobre o papel das respostas imunes na imunoproteção e imunopatologia da LC (MASPI, N. *et al.*, 2016). A subpopulação de LT T_H1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-12) tem papel essencial para a imunoproteção, porém sua produção excessiva pode levar concomitantemente a imunopatologia grave na doença. Ao contrário, o desenvolvimento da subpopulação de LT T_H2 está associado à persistência do parasito no local da infecção, mas a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) em níveis mais baixos também poderia mitigar as reações inflamatórias e acelerar o processo de cicatrização de feridas (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; GAUSE *et al.* 2013; MASPI, N. *et al.*, 2016).

Assim, conforme a Figura 5, suscetibilidade ou controle da doença vai depender dos tipos de citocinas que serão secretados no local da infecção. Considerando que a subpopulação de LT T_H1 leva à

Destruição do parasito e um perfil de subpopulação LT TH2 leva à sobrevivência do parasito e progressão da doença.

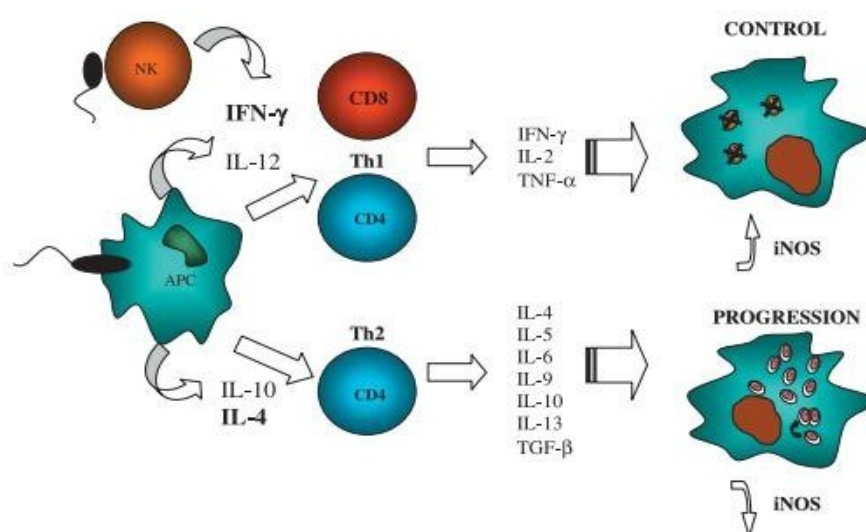


Figura 5: Resposta das células CD4⁺ TH1 x TH2 à infecção por *Leishmania* spp. (fonte: RUIZ & BECKER. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2007).

O IFN- γ é secretado principalmente por linfócitos T citotóxicos TH1 CD4⁺ e CD8⁺. Ele estimula a produção de óxido nítrico (NO) em Møs ativadas e inibe o crescimento intracelular do parasito (SCHOENBORN & WILSON, 2007). Já a IL-12 atua como uma citocina essencial para a diferenciação de células TH1 na leishmaniose e inibe a apoptose de células T (MA & TRINCHIERI, 2001). Outra citocina é a TNF- α , produzido principalmente por Møs, que desempenham um papel importante na eliminação de *Leishmania* por meio do aumento da atividade dos Møs e da síntese de NO (MASPI, N. *et al.*, 2016).

Por outro lado, a IL-10, conhecida por ser uma citocina imunorreguladora potente, é produzida por diferentes células de imunidade inata (células dendríticas (DCs), Møs, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos) e células de imunidade adaptativa (células CD4⁺ TH1, TH2 e TH17 subconjuntos, células Treg, células T CD8⁺ e células B), suprime a ativação de Møs e a maturação das DCs (O'GARRA & VIEIRA, 2007; TRINCHIERI, G., 2007). A produção de IL-4 tem sido associada à inibição da atividade leishmanicida de Møs e contribui com a sobrevivência prolongada dos parasitos e também limita a geração de citocinas TH1 por meio da regulação negativa da produção de IL-12 (SZABO, S. J. *et al.*, 1997). Além disso, a IL-4 regula negativamente a produção de quimiocinas que recrutam células do tipo TH1 para o local da infecção (LAZARSKI, C. A. *et al.*, 2013).

Já a resposta imune humoral segundo Pinheiro (2004), a estimulação policlonal de células B *in vitro* e a indução de respostas de anticorpos específicas a um antígeno, *in vitro* ou *in vivo*, demonstram que as células T_H1 induzem respostas de anticorpos dominadas pelo isotipo IgG2a (Imunoglobulina G), enquanto as células T_H2 favorecem a síntese de isotipos IgG1, que induz a IL-10, por sua vez, pode suprimir a ativação de Møs (ALEXANDER & BROMBACHER, 2012).

2.5 Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar

As manifestações clínicas da LT são determinadas pela espécie infectante (virulência e tropismo), fatores imunológicos e suscetibilidade genética do hospedeiro (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; STEBUT, E. V., 2015). Na apresentação clínica da LT, a doença pode-se manifestar sobre duas formas clínicas: LC e LM (BRASIL, 2017; WHO b, 2021).

A LC é a manifestação clínica mais prevalente, ocorrendo em 90% dos pacientes (STEBUT, E. V., 2015). A lesão ulcerada é precedida por uma mácula, que evolui para uma pápula e aumenta progressivamente produzindo, geralmente, uma úlcera, que são encontrados em áreas descobertas do corpo, como rosto, antebraços e pernas, sendo, no local ou próximo ao local da picada do flebotomíneo e o período de incubação da doença varia entre duas semanas e dois meses (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; STEBUT, E. V., 2015; SCORZA, B. M. *et al.*, 2017). Essa forma inicial da LC pode regredir espontaneamente, pode permanecer estacionária por vários anos e/ou coexistir com lesões mucosas. Quando essas lesões evoluem para a cura costumam deixar cicatrizes atróficas (GENARO & REIS, 2005; GOTO & LINDOSO, 2012; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

A LC pode apresentar-se sob as formas clínicas: LCL, LD, LR e LCD (Figura 6 a, b, c e d, respectivamente) (GOTO & LINDOSO, 2012; BRASIL, 2017).





Figura 6: Formas clínicas de Leishmaniose tegumentar. a) LCL; b) LD; c) LR e d) LCD. Fonte: Brasil, 2017.

Leishmaniose cutânea difusa

A LCD é uma forma rara e grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Caracteriza-se por desenvolvimento de múltiplas lesões, predominantemente, nodulares ou papulares não ulceradas recobrendo grandes áreas cutâneas, que contêm abundância de amastigotas parasitados, mas poucos linfócitos (GOTO & LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017; SCORZA, B. M. *et al.*, 2017). A LCD é altamente resistente ao tratamento e apresentam recidivas frequentes e não apresenta cura espontânea com o tempo, como em LCL (ZERPA, O. *et al.*, 2007; SCORZA, B. M. *et al.*, 2017).

Leishmaniose Mucosa

A LM, também conhecida como espundia, caracteriza-se pela capacidade do parasito de causar metástase para os tecidos mucosos, via células linfáticas ou disseminação hematogênica (REITHINGER, R., *et al.*, 2007). Essa forma clínica pode ocorrer simultaneamente ou meses/anos após cura sem tratamento ou com tratamento inadequado, sendo LM secundária as lesões cutâneas primárias, assim, é comum que pacientes com LM apresente cicatriz indicativa de LC anterior (REITHINGER, R., *et al.*, 2007; BRASIL, 2017). A principal espécie causadora de LM no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, porém *L. (V.) guyanensis* pode também causar lesão mucosa (STRAZZULLA, A. *et al.*, 2013). A LM pode ser muito desfigurante (Fig. 7 a e 7 b) e acompanhada por extensa destruição do tecido. As principais áreas afetadas podem incluir a mucosa nasal, palato mole, faringe, laringe, lábios ou bochechas e, raramente, a traqueia ou genitália (GOTO & LINDOSO, 2010; SCORZA, B.

M. *et al.*, 2017). Essa forma clínica não cura espontaneamente e é de difícil tratamento, normalmente, além de apresentar risco para ocorrência de infecções bacterianas secundárias comuns que podem ser potencialmente fatais (REITHINGER, R., *et al.*, 2007).

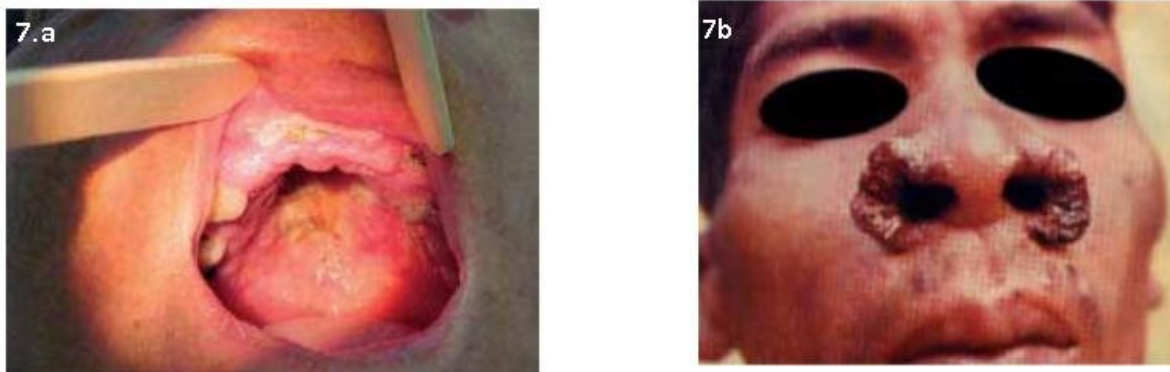


Figura 7: Forma clínica de Leishmaniose Mucosa. 7a - Lesão ulcerada do palato mole; 7 b - Lesão de mucosa nasal. (Fonte: BRASIL, 2017).

A confirmação parasitológica da LM é difícil devido à escassez parasitária, porém predominam linfócitos e Møs. Já o tratamento exige doses maiores de drogas e apresenta difícil resposta terapêutica, normalmente, os pacientes requerem mais de um curso de tratamento, além do padrão. (BACELLAR O. *et al.*, 2002; FARIA, D. R. *et al.*, 2005; GAZE, S.T. *et al.*, 2006).

2.6 Tratamentos da Leishmaniose Tegumentar

Antimoniais

Antimoniais pentavalentes são fármacos de primeira escolha para o tratamento de Leishmaniose. Esses foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, em sua forma trivalente (antimônio trivalente Sb^{3+}), também conhecido como tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio). Essa formulação apresentava efeitos adversos, como dor no peito, carditoxicidade e nefrotoxicidade (SOARES- BEZERRA, R. J. *et al.*, 2004), assim a administração desses compostos foi interrompida após o desenvolvimento de drogas menos tóxicas à base de Sb (SILVA & MACHADO, 2019).

Existem duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado, sendo o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam[®]), disponível nos Estados Unidos, Europa e China, e o antimoniato de N-metil-glucamina (NMG) (Glucantime[®]), disponível na África e na América Latina (LIMA, E. B. de *et al.*, 2007; SILVA & MACHADO, 2019). O Glucantime (GLU) está disponível no Brasil desde 1940 e

continua sendo autorizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para uso no tratamento de primeira ou segunda linha contra todas as formas de LT (SILVA & MACHADO, 2019).

Os antimoniais pentavalentes são fármacos leishmanicidas, pois interferem no metabolismo celular das formas amastigotas de *Leishmania*. Assim, tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos (LIMA, E. B. de *et al.*, 2007).

Aplicações repetidas do antimonial pentavalente aumentam os níveis de retenção e parte desse antimônio será reduzido a antimônio trivalente, assim, grande parte do que foi retido fica concentrado no fígado e baço. A retenção do antimônio nos tecidos é responsável pelos efeitos tóxicos (PEREIRA, V. *et al.*, 2020). Os compostos trivalentes ligam-se mais aos tecidos, em geral células vermelhas, e sua toxicidade é bem maior quando comparada aos antimoniais pentavalentes, porém, para exercer a atividade leishmanicida, é necessária a redução de Sb^{5+} para Sb^{3+} (LIMA, E. B. de *et al.*, 2007; FRÉZARD, F. *et al.*, 2009).

O esquema terapêutico recomendado pela OMS (BRASIL, 2017) é de 10 mg a 20 mg Sb^{5+} /kg/dia, sendo administrado por via endovenosa ou intramuscular, de maneira lenta e no máximo três ampolas por dia. Para via intralesional utiliza-se de uma a três aplicações, por via subcutânea (SC), aproximadamente, 5 ml por sessão, com intervalo de 15 em 15 dias.

Já os efeitos adversos durante o tratamento sistêmico incluem, artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, hipersensibilidade local, edema, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiência renal, pancreatite e alterações dose-dependentes ao eletrocardiograma, como alteração da repolarização ventricular com inversão de ST, prolongamento do intervalo QT e no tratamento intralesional pode ocorrer os mesmos efeitos do tratamento sistêmico, porém de grau leve ou moderado, além, de dor no local da lesão (GALVÃO, E. L. *et al.*, 2017; GONÇALVES & COSTA, 2018; BRITO, N. C. *et al.*, 2019). A infiltração local das lesões não atinge infecções metastáticas (PALUMBO, E., 2010; GHORBANI & FARHOUDI, 2018).

Anfotericina B

A Anf-B é um antibiótico de polieno, que foi isolado pela primeira vez em 1959, a partir de culturas fermentadoras de *Streptomyces nodosus* (DUTCHER, J. D. *et al.*, 1959). Esse fármaco apresenta atividade antimicótica e antiparasitária, sendo considerado um medicamento de segunda linha para o tratamento da leishmaniose e de primeira para gestantes (LEMKE *et al.*, 2005). No Brasil estão disponíveis o desoxicolato de

anfotericina B (Anf-D) e as formulações lipídicas de Anf-B. Porém, a OMS dispensa para o tratamento da LT por Anf-D e a Anf-L (BRASIL, 2017).

Anf-B apresenta baixa solubilidade em água, além de efeitos adversos como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, distúrbio de comportamento, insuficiência renal e hipopotassemia (LIMA, E. B. de *et al.*, 2007; LINDOSO *et al.*, 2012). Além disso, esse medicamento tem baixíssima biodisponibilidade para tratamento por via oral, por isso é utilizado por via intravenosa (GHORBANI & FARHOUDI, 2018).

Anf-B atua no ergosterol, que é o principal constituinte da membrana plasmática do parasito de *Leishmania*, diferentemente, da membrana de células animais, assim, ocorre ligação de Anf-B ao ergosterol alterando a permeabilidade da membrana e o equilíbrio osmótico do parasito, o que contribui para a morte celular (SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.*, 2004).

A Anf-D é uma formulação convencional com suspensão de micelas de desoxicolato (Fungizone) misturado com Anf-B, porém, as micelas são instáveis na corrente sanguínea e o Anf-B tem uma rápida liberação. Dessa forma, essa formulação está associada aos efeitos adversos, pois o Anf-B livre sem incorporação em um sistema de entrega é um agente que contribui para a toxicidade (GHORBANI & FARHOUDI, 2018; AMMAR, A. A. *et al.*, 2019).

Como tentativa de reduzir as desvantagens de Anf-D, como toxicidade, uma nova formulação foi introduzida, Anf-L (AmBisome[®]), apresentando um perfil de toxicidade significativamente menor em comparação com o Anf-D convencional e é melhor tolerada (AL-NATOUR, S. H., 2009; AMMAR, A. A. *et al.*, 2019). Esse medicamento atinge níveis plasmáticos mais elevados, exibe meia-vida de circulação curta e atinge concentrações mais elevadas no fígado e baço, assim, com muito menos toxicidade (LINDOSO *et al.*, 2012). A formulação lipossomal de Anf-L poderia ser o medicamento de primeira escolha para pacientes de países desenvolvidos, pois o uso desse em países em desenvolvimento, como Brasil, nem sempre é acessível para todos os pacientes pelo valor financeiro elevado do tratamento (GHORBANI & FARHOUDI, 2018).

O Anf-CL, conhecido como Abelcet[®], é licenciada no Reino Unido e foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1995 (JANKNEGHT, R. *et al.*, 1992; HIEMENZ & WALSH, 1996; FILIPPIN & SOUZA, 2006;

STEIMBACH, L. M. *et al.*, 2017). Essa formulação é menos tóxica que Anf-D (ADLER-MOORE & PROFFITT, 2008; BOTERO, M. C. *et al.*, 2014) e o tratamento com Anf-CL é frequentemente estudado para LV e é mais eficaz do que o tratamento convencional com Anf-D (GANGNEUX, J.-P. *et al.*, 1996; SUNDAR, S. *et al.*, 1997; GOLDSMITH & PERRY, 2004).

Pentamidina

As pentamidinas são diamidinas aromáticas utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar. São comercializadas as seguintes formulações: Isotionato e Mesilato, sendo que no Brasil apenas a formulação Isotionato é utilizada (BRASIL, 2013). A recomendação da OMS para o tratamento com pentamidina é 4 mg/kg/dia, por via intramuscular ou endovenosa, de dois em dois dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2 g e o uso, também, deve ser feito no ambiente hospitalar (SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.*, 2004; LIMA, E. B. de *et al.*, 2007; BRASIL, 2017).

Esse fármaco interfere na síntese do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) da *Leishmania*, agindo no cinetoplasto e na fragmentação da membrana mitocondrial, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasito (SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.*, 2004; LINDOSO *et al.*, 2012; GOTO & LINDOSO, 2010). Contudo, estudos demonstram a resistência desse fármaco frente ao uso contra parasito de *Leishmania*, mas o mecanismo de resistência não é totalmente compreendido (MUKHERJEE *et al.*, 2004; COELHO, A. C. *et al.*, 2008; KAUR & RAJPUT, 2014).

Pentamidina é contraindicado para gestantes e, também, apresenta efeitos adversos como, hipoglicemia e diabetes mellitus, além de hipotensão, dor, induração e abscessos estéreis, se aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, lipotimias e síncope (GOTO & LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017; HAFIZ & KYRIAKOPOULOS, 2020).

Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), propôs o desenvolvimento de um tratamento alternativo em seu estudo investigando os efeitos do tratamento tópico com formulações contendo isetionato de pentamidina e seu tratamento possibilitou a redução do número de parasito e sugeriu a associação do tópico com outros fármacos pois as

formulações tópicas poderiam ser um método alternativo para o tratamento da LC.

Miltefosina

Miltefosina (hexadecil 2-etil fosfato) é um fármaco que foi desenvolvido, inicialmente, em meados de 1980 para o tratamento de câncer. Este fármaco, também, apresenta perfil de atividade contra parasitos *trypansomatídeos*, assim, após resultados encorajadores *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania*, em 2002 miltefosina foi o primeiro fármaco oral aprovado para tratamento da Leishmaniose Visceral na Índia (DORLO, T. P. C. *et al.*, 2012; PONTE-SUCRE, A. *et al.*, 2017).

Posteriormente, a miltefosina foi registrada em vários países para o tratamento de LV e LC. O espectro de indicações para miltefosina aumentou ao longo do tempo, cobrindo LV causada por *Leishmania donovani* e leishmaniose dérmica pós-calazar na Ásia, CL causada por *Leishmania V. (braziliensis, guyanensis, panamensis)* e leishmaniose mucocutânea (MCL) causada por *L. braziliensis* (SUNDAR, S. *et al.*, 2012; SUNYOTO, T. *et al.*, 2018). No Brasil, em outubro de 2018, o Ministério da Saúde por meio da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC) elaborou um manual sobre recomendações e a incorporação do fármaco miltefosina para o tratamento da LT pelo SUS (BRASIL, 2018).

O mecanismo de ação da miltefosina não é totalmente compreendido, mas acredita-se que este fármaco tenha mais de um sítio de ação molecular, assim, interferir com os lipídios da membrana de *leishmania*, morte celular semelhante à apoptose, efeitos mitocondriais (citocromo c oxidase) e efeitos imunomoduladores (DORLO, T. P. C. *et al.*, 2012; FDA, 2014; WARE, J. M. *et al.*, 2020).

A incorporação de um medicamento oral como tratamento de primeira linha seria um avanço no tratamento, pois poderia diminuir os gastos financeiros com o tratamento aliviar, bem como melhorar o acesso e a adesão ao tratamento em áreas remotas (BERGER, B. A. *et al.*, 2017). No entanto, o fármaco apresenta alguns efeitos adversos, como sintomas gastrointestinais (náuseas, vômito e diarreia) ocorrendo em 97% (24/26) dos pacientes, segundo Ware *et al.* (2020). Além de toxicidade hepática, nefrotoxicidade e potencial efeito teratogênico, que já foram relatados (DORLO, T. P. C. *et al.*, 2012; MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2015; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015; BRASIL, 2018).

Assim devido suas limitações, como efeitos adversos, custo financeiro, resistência, o uso desse fármaco tem sido recomendado em combinação com outras terapias, pois poderia reduzir a

duração do tratamento e melhorar a eficácia do tratamento para casos mais complexos (TRINCONI, C. T. *et al.*, 2016; GHORBANI & FARHOUDI, 2018; WARE, J. M. *et al.*, 2020).

Paromomicina

Paromomicina, também conhecido como aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, pela primeira vez em 1956, licenciado na Europa para o tratamento contra infecções bacterianas (SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.*, 2004; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2008; DAVIDSON, R. N., *et al.*, 2009). A ação leishmanicida da paromomicina é complexa, acredita-se que esse fármaco supostamente afete a inibição do metabolismo do parasito e da respiração mitocondrial, dados confirmados em um estudo sobre promastigotas de *L. donovani* (MAAROUF, M. *et al.*, 1997; DAVIDSON, R. N., *et al.*, 2009).

Inicialmente estudos publicaram resultados promissores com a pomada contendo 15% de paramomicina associada a 12% de cloreto de metilbenzetônio (EI-ON, J. *et al.*, 1986). Krause & Kroeger (1994), compararam dois esquemas de tratamento, sendo, administração da pomada associada duas vezes por dia por 10 dias ou uma vez por dia por 20 dias, os dois esquemas de tratamento não resultaram em qualquer diferença significativa no tempo de cura e a taxa de cura foi de 72% após 50 dias, 90% após 100 dias e 85% após um ano. Já Arana *et al.* (2001), em um ensaio duplo-cego randomizado realizado na Guatemala, administrou a pomada associada duas vezes por dia por 20 dias em comparação com grupo placebo. A taxa de resposta clínica final, após 12 meses, foi de 85,7% (31 de 35) no grupo de tratamento e 39,4% (13 de 33) no grupo de placebo.

Ambos estudos relataram efeitos adversos, como crescimento da lesão e inflamação, inicialmente, prurido local, sensação de queimação, dor local e edema local. Devido aos efeitos adversos, estudos foram realizados em uma nova associação de paromomicina com ureia para substituir o cloreto de metilbenzetônio (NEAL, R. A. *et al.*, 1994; FAGHIHI & TAVAKOLI-KIA, 2003; ARMIJOS, R. X. *et al.*, 2004).

2.7 8-Hidroxiquinolina

A 8-HQN é um derivado de quinolina originário de plantas e, também, de síntese. A química dos derivados da quinolina tem atraído especial interesse devido às suas propriedades terapêuticas (REIS, D.C. *et al.*, 2011; WALLACE, D. R., 2014). A 8-HQN é um composto químico com uma estrutura acessível e amplo espectro de aplicações medicinais que incluem

doenças neurodegenerativas, câncer, infecções microbianas e atividade antiparasitária (SONG, Y. *et al.*, 2015; DALECKI, A. G. *et al.*, 2017).

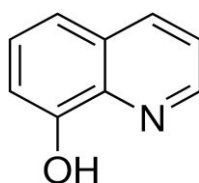


Figura 8: Estrutura química da 8-HQN. Fonte: Sigma-Aldrich.

A 8-hidroxiquinolina é composto bicíclico, que consiste em um anel de piridina fundido ao fenol, no qual o grupo hidroxila está anexado à posição 8. A 8-HQN apresenta-se como um pó cristalino branco/esbranquiçado ou ligeiramente amarelo (SAADEH, H. A. *et al.*, 2020; PUBCHEM, 2021; SIGMA-ALDRICH, 2021).

Os íons metálicos (como ferro, zinco e cobre) desempenham um papel importante nos processos biológicos e na homeostase do metal. O desequilíbrio do metal é a principal causa de muitas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.*, 2013). Devido seu potencial, 8-HQN e seus derivados vêm sendo amplamente utilizados como ponto de partida para a síntese de compostos com potencial atividade de combater a doença de Alzheimer por meio da complexação com os íons metálicos envolvidos na doença (como o cobre e o zinco) (LEVINE *et al.*, 2009; SILVA, T. U. da *et al.*, 2018; SILVA & MACHADO, 2019).

Já Zhai *et al* (2010) observou que, quando associados cobre, 8-HQN e clioquinol inibiram a atividade proteassomal e a proliferação em células cancerosas humanas em cultura. Prachayasittikul *et al.*, (2013) relatou que o ferro desempenha papéis essenciais no câncer por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de servir como nutriente para o crescimento das células cancerosas, assim, Fe-8HQ formado é capaz de entrar e se distribuir dentro das células, causando a quebra maciça das fitas de DNA e, conseqüentemente, à morte celular. Outros autores também investigam

potencial dos derivados 8-HQN contra o câncer (SHEN, A. Y. *et al.* 1999a; SHAW *et al.*, 2010; PRATI *et al.*, 2016; CHEN, C. *et al.*, 2019).

Além disso 8-HQN e seus derivados têm desempenhado um papel importante na terapia antifúngica. Demonstrado por Pippi *et al.*, (2017), derivados de 8-HQN foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.*, *Microsporium spp.* e *Trichophyton spp.* Já Darby & Nathan (2010), verificou a atividade antibacteriana contra a espécie *Mycobacterium tuberculosis* e o resultado mostrou que 8-HQN pode matar *M. tuberculosis* replicante e não replicante *in vitro*. Além disso, a toxicidade para células de mamíferos não foi observada, o que sugere sua segurança em humanos.

Atividades antiparasitária também foram demonstradas para 8-HQN e seus derivados contra diferentes espécies de *Leishmania* (DARDARI, Z. *et al.*, 2004; DUARTE, M. C. *et al.*, 2016a; TAVARES, G. de S. V. *et al.*, 2018). O mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado em atividades antiparasitárias. Estudos mostram a capacidade da molécula de complexar com íons, que podem fazer parte de estruturas ou vias metabólicas importantes para a vida do parasito (PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.*, 2013). Alterações do potencial de membrana de mitocôndrias também é estudado como possível via de ação do medicamento (DUARTE, M. C. *et al.*, 2016a).

Estudos realizados por Duarte *et al.*, (2016a), com a 8-HQN apresentou atividade antileishmanial *in vitro*, associada a uma baixa toxicidade em *Mos* murinos e em hemácias de indivíduos do grupo sanguíneo O⁺. A Anf-B foi utilizada com controle e apresentou elevada toxicidade em *Mos* murinos e atividade hemolítica significativa. Em outro estudo, 8-HQN foi avaliada *in vivo* em uma composição micelar na tentativa de reduzir a toxicidade, e os resultados demonstraram redução da carga parasitária nos órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, quando comparados aos grupos controles avaliados. Tais animais também apresentaram uma resposta celular do tipo TH1, assim, os autores concluíram que o sistema micelar 8-HQN foi eficaz na redução da infecção e controle da doença nos animais, não apresentando toxicidade (LAGE, L. M. *et al.*, 2016; DUARTE, M. C. *et al.*, 2016b).

O tratamento da LC no Brasil é limitado aos antimoniais pentavalentes e Anf-B, sendo que esses apresentam várias limitações relacionadas à toxicidade, eficácia, resistência e administração parenteral, sendo, portanto, necessário pesquisar medicamentos alternativos para o tratamento (ULIANA, S. *et al.*, 2018; COSER, E. M. *et al.*, 2020). Assim, o tratamento tópico para LT tem sido recomendado devido a sua potencialização da ação local do fármaco, baixo custo, facilidade de administração, a não necessidade de infraestrutura

complexa do sistema de saúde para a realização do tratamento, além de diminuir o risco de efeitos sistêmicos como hepatotoxicidade, já que seu metabolismo é de primeira passagem (MODABBER, F. *et al.* 2007; PRAUSNIT & LANGER, 2008; TRINCONI, C. T. *et al.*, 2016). Dessa forma, nesse estudo, propomos uma formulação tópica contendo 8-HQN para o tratamento da LC contra infecção experimental em camundongos Balb/C em uma tentativa de eliminar os problemas dos medicamentos atuais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Utilizar e avaliar uma formulação tópica contendo 8-HQN para o tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c contra a infecção experimental de LC utilizando a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar a formulação tópica contendo a 8-hidroxiquinolina para utilizar sob forma tópica no tratamento de camundongos BALB/c experimentalmente infectados pela espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- Avaliar o grau de proteção nos animais após o tratamento por meio da avaliação da carga parasitária na lesão cutânea, baço, fígado, linfonodos drenantes e medula óssea;
- Avaliar o perfil da resposta imune celular gerada nos animais após o tratamento por meio da dosagem de citocinas por ELISA de captura e citometria de fluxo;
- Avaliar marcadores de toxicidade renal, cardíaco e hepática nos animais após o tratamento.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas, com aproximadamente 8 semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, sob condições assépticas, com livre consumo de alimentos e água. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG (227/2019). O cálculo do amostral para o experimento piloto foi realizado com o auxílio do Núcleo de Apoio Bioestatística da Faculdade de Medicina. Um tamanho amostral de seis animais em cada um dos quatro grupos do estudo, por etapa, para obter 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença mínima entre as médias dos grupos em relação a carga parasitária. Já o cálculo do amostral para o experimento final determinou o tamanho amostral de sete animais em cada um dos cinco grupos do estudo, por etapa, para obter 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença mínima entre as médias dos grupos em relação a carga parasitária. Considerou-se nos cálculos um desvio padrão de 6,064 obtido de um estudo previamente realizado (MARTINS, V. T. *et al.*, 2013). O nível de significância foi de 0,05. O software utilizado foi o Minitab Release 14.

4.2 Parasito

Cepas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8), forma promastigotas em fase estacionária, foram cultivadas a 24 °C no Departamento de Patologia Clínica do COLTEC/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, em meio de cultura Schneider's (Schneider's Insect Medium, SigmaAldrich, USA), completo, que foi constituído pelo meio Schneider's acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma), 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4, conforme COELHO *et al.* 2003. Os parasitos permaneceram em cultivo a 24 °C, sendo que repiques das culturas foram efetuados quando encontravam-se na fase logarítmica de crescimento.

4.3 Preparação do extrato proteico solúvel de *Leishmania*

O extrato proteico solúvel dos parasitos (SLA) foi realizado de acordo com Coelho *et al.* (2003), partir de promastigotas da fase log tardia de *L. amazonensis*, cultivadas em meio Schneider's completo depois de algumas passagens em cultura líquida, assim, utilizou-se,

aproximadamente 2×10^8 promastigotas/ml, que foram lavados três vezes em 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril fria. Após cinco ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm, por 20 min a 4° C, e o sobrenadante contendo SLA foi coletado e armazenado a -70° C. As concentrações de proteínas foram estimadas pelo método de Bradford (1976).

4.4 Infecção e tratamento

Camundongos BALB/c fêmeas (aproximadamente 8 semanas de idade, n=7 por grupo) foram infectadas com $5,0 \times 10^6$ formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* por via subcutânea na base da cauda, após tricotomia. Após a abertura das lesões, 65 dias depois da infecção, os animais foram agrupados de acordo com o tamanho da lesão, de modo a garantir um tamanho médio similar entre os grupos. Posteriormente os camundongos foram tratados durante 30 dias conforme os grupos descritos a seguir:

- Grupo controle salina: camundongos infectados e tratados apenas com salina (PBS) (pH 7,4). Aplicação intraperitoneal (Ip.) de 200,0 µL;
- Grupo controle contendo apenas a pomada veículo: camundongos tratados somente com a formulação sem a substância 8- HQN (B-8HQN). Utilizou na lesão 25,0 mg da formulação;
- Grupo Anf-B: camundongos tratados com 1 mg/kg/dia (200,0 µL de Anf-B) via Ip.;
- Grupo GLU: camundongos tratados com 20 mg/Kg/dia (200,0 µL de Glu) via Ip.;
- Grupo formulação tópica 5% 8-HQN: camundongos tratados com a formulação tópica contendo 5% de 8-HQN, sobre a lesão com uma dose diária de 25,0 mg.

Devido à menor absorção da pele, por uma quantidade pequena de administração na área da lesão e remoção voluntária do medicamento pelos animais, estabeleceu-se a administração de 25,0 mg de pomada diariamente (ALLEN JR., L. V. *et al.*, 2006).

4.5 Formulação tópica

A base farmacotécnica (tabela 1) escolhida foi creme não iônico descrita no Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (ANVISA/BRASIL, 2012), adaptada para incorporação da substância 8-HQN:

Quadro 1: Creme não iônico, adaptado (ANVISA/BRASIL, 2012)

Componentes:	Quantidade:
Fase Aquosa	
EDTA dissódico	0,1 g
Solução conservante de parabenos	3,3 g
Água purificada q.s.p	100,0
Fase Oleosa	
Cera autoemulsificante não iônica	14,0 g
Butilhidroxitolueno (BHT)	0,05 g
8-Hidroxiquinolina	5 g

Para o preparo, a Fase B (oleosa) e a Fase A (aquosa) foram aquecidas à temperatura aproximada de 70 – 75 °C. Sob agitação lenta, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa. Manteve-se agitação lenta até atingir aproximadamente 40 °C. O pH foi verificado e, se necessário, corrigido para 5,5 – 6,5 com o auxílio das soluções acidulante ou alcalinizante.

Solução conservante de parabenos: Para o preparo da solução conservante de parabenos, utilizou-se 6,0 g de metilparabeno, 3,0 g de propilparabeno e 91,0 g de propilenoglicol. Aqueceu-se sob agitação até a completa solubilização e armazenou-se em recipiente adequado.

Solução acidulante: Dissolveu-se 25,0 g de ácido cítrico em 100,0 ml de água purificada, misturando até a dissolução total e foi transferido para recipiente adequado.

Solução alcalinizante: Dissolveu-se 0,4 g de hidróxido de sódio em 100,0 ml de água, misturando até completa dissolução e armazenou em recipiente adequado.

4.6 Determinação da área da lesão

O acompanhamento da medida do tamanho da lesão, foi feito desde a primeira abertura de lesão no primeiro animal, posteriormente, a determinação da área da lesão foi feita no início do tratamento, para homogeneizar os valores de cada grupo, e durante o

decorrer do tratamento. Essa medida da área da lesão foi realizada com auxílio de um paquímetro (Digimess[®]) e orientada para a medição em 2 eixos, sendo eles paralelo (a) e perpendicular (b) à cauda. Os valores mensurados são multiplicados (a x b), encontrando-se o valor da área da lesão e ajustados, com o valor da média, para cada grupo experimental.

4.7 Carga Parasitária

Depois de eutanasiados, realizou-se a retirada do baço, fígado (esquerdo), linfonodo drenante (Poplíteo), medula óssea e lesão. Para avaliação da carga parasitária, conforme técnica de Coelho *et al.* (2003), os órgãos foram pesados e macerados em meio Schneider incompleto (Sigma-Aldrich[®]), utilizando um macerador de tecidos vivos. As diluições seriadas foram realizadas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato (Alfa[®]) variando-se de 10^{-1} até a diluição máxima de 10^{-12} , com meio Schneider completo, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico (Penicilina + Estreptomicina). As placas foram incubadas a 24,0 °C e analisadas 10 dias após o início da cultura com o auxílio de um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss). Os resultados foram expressos como o logaritmo negativo do título, isto é, a diluição correspondente ao último poço positivo, ajustado por miligrama de tecido ou órgão.

4.8 Avaliação do desenvolvimento das lesões cutâneas e da carga parasitária tecidual por PCR quantitativo (qPCR)

A carga parasitária da infecção também foi analisada pelo ensaio de qPCR. Para isso, DNA dos fragmentos de lesão foram extraídos usando o método fenol-clorofórmio. Utilizou-se 500 µL do tampão de lise (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100) e 20 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL, Promega) foram adicionados a cada fragmento (20 mg). A mistura foi incubada por 16h a 37°C, e posteriormente 500 µL de fenol (Sigma- Aldrich) foram adicionados a mistura, homogeneizados por inversão por 10 minutos e centrifugados a 10.000 x g por 5min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o processo foi repetido. Então, 500 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; Sigma-Aldrich) foi adicionado ao sobrenadante, o qual foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 10.000 x g por 5min. A amostra foi coletada em um novo tubo, 500 µL de etanol 95% (v/v) foi adicionado, e o material foi incubado por 10 min em banho de gelo para a precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 10min, e 500 µL de etanol 70% (v/v) foi adicionado ao *pellet*, o qual foi ressuspenso e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi removido e a amostra foi seca a temperatura

ambiente. O DNA resultante foi ressuspensionado em 100 μL de H_2O mili-Q e foi amplificado usando oligonucleotídeos forward (CCTATTTTACACCAACCCCCAGT) e reverso (GGGTAGGGGCGTTCT GCGAAA). O gene β -actina de camundongo (forward: CAGAGCAAGAGAGGTATCC e reverso TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC) foi usado como controle endógeno (para normalizar o número de células nucleadas por única cópia) e para verificar a integridade das amostras. Curvas padrões foram obtidas da extração de DNA de 1×10^8 parasitos por kDNA e de 1×10^7 macrófagos peritoneais por β -actina, nas mesmas condições usadas da extração das outras amostras. O qPCR foi realizado em placas de 48 poços (StepOne™ Instrument, Life Technologies) utilizando 5 μL de 2x SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), com 1 μL de cada primer (2 mM) e 4 μL de DNA (5 ng/ μL). As amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Durante cada tempo a fluorescência foi detectada. Resultados foram convertidos em número de parasitos (em log) por células nucleadas (multiplicadas por mil para facilitar a visualização).

4.9 Citometria de Fluxo

Para análise da produção interna de citocinas contra antígenos dos parasitos utilizou-se a avaliação por citometria de fluxo. Assim, os esplenócitos dos camundongos foram incubados em meio RPMI 1640 completo (adicionado de 10,0% de SFB, 100,0 U/mL de penicilina e 50,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina) em placas estéreis de 96 poços de fundo em U (Alfa®). As células foram estimuladas (teste) ou não (controle) com 25,0 $\mu\text{g}/\text{poço}$ de SLA de *L. amazonensis*. As culturas foram incubadas por 48 h a 37,0° C em 5,0% de CO_2 , seguindo de adição de 10,0 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de Brefeldina A 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mantendo-se por mais 4 h. Posteriormente, 20,0 μL de solução EDTA 20,0 mM foram adicionados a cada poço, numa concentração final de 2,0 mM, por 15 minutos.

As culturas foram, então, lavadas uma vez com o Tampão PBS 1X. Após ressuspender, 50,0 μL de solução FVS450 0,125 mg/mL foram adicionados e as células foram incubadas no escuro por 15 minutos. Após lavagem com solução PBS-Wash (BSA 0,5% e Azida 0,1% em PBS 1X), as células foram marcadas com 30,0 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de anticorpos monoclonais anti-CD3⁺, anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺ (BD®) e incubadas, no escuro à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Posteriormente, os procedimentos de lise de hemácias e fixação foram realizados com solução Billig Dog 1X (10,0g/L de Paraformaldeído, 10,2 g/L de Cacodilato de Sódio e 6,63 g/L de Cloreto de Sódio em PBS-Wash, em pH 7,2). Em seguida, os esplenócitos foram

permeabilizados com solução PBS-P (0,5% saponina em PBS-Wash) e incubados, no escuro à temperatura ambiente, por 30 minutos, na presença de 30,0 µL/poço de anticorpos monoclonais marcados anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-10 (BD[®]). Os esplenócitos foram lavados com PBS-Wash e fixados usando a solução de MFF 1X. As células foram armazenadas à 4,0°C antes da análise por citometria de fluxo.

A leitura das amostras foi feita em citômetro Fortessa LSR-2[®] (BD[®]) e o software FlowJo[®] (BD[®]) foi utilizado para a aquisição e análise de dados (100.000 eventos por amostra). Para avaliar marcações inespecíficas, foram usados reagentes isotópicos marcados com fluorescência. A frequência de células T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ e a expressão de citocinas intraplasmáticas foram determinadas seguindo a análise baseada no seu tamanho relativo (Forward Laser Scatter – FSC) e granulosidade (Side Laser Scatter – SSC). Os resultados foram expressos como índices, determinados pela razão entre as porcentagens de células T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ nas culturas estimuladas e não estimuladas (SLA/CC).

4.10 Resposta Imune Celular

Suspensões de células foram coletadas do baço dos animais, no dia seguinte ao fim do tratamento e foram plaqueadas (1×10^6 células por mL) em duplicata, em placas de 24 poços (Nunc). As células foram incubadas em RPMI-Fenol red+ suplementado com 20% de SFB e 20 mM de L-glutamina, pH 7.4, e estimuladas ou não com SLA de *L. amazonensis* (25 µg/mL), por 48h a 37°C em 5% de CO₂. Níveis de IFN e IL-10 foram avaliados nos sobrenadantes por kits comerciais de ELISA sanduíche (BD OptEIA TM set mouse IFN- γ e IL-10, Pharmingen, San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Todos os anticorpos foram adquiridos pela BD Pharmingen[®].

4.11 Avaliação Toxicológica

As amostras de sangue, colhidas após a eutanásia dos animais, foram centrifugadas para a obtenção do soro. Nesse último, realizou-se a dosagem de enzimas hepáticas (Alanina Aminotransferase – ALT/TGP, aspartato aminotransferase – AST/TGO), marcadores cardíacos (CK-MB) e de marcadores renais (Creatinina e Ureia). Todos os testes foram realizados utilizando kits comerciais (BiocLin[®] e LabTest[®]), seguindo os procedimentos conforme o fabricante.

4.12 Análise Estatística

Os resultados serão avaliados pelo teste one-way ANOVA e o post-teste de Bonferroni será utilizado para comparações múltiplas entre os grupos. Diferenças estatisticamente significantes serão consideradas com o valor de $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

Determinação da concentração de 8-hidroquinolina para utilização por via tópica no tratamento da leishmaniose tegumentar em camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*

Para determinar qual a concentração ideal para o tratamento de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*, realizou-se inicialmente um estudo piloto com 3 grupos de concentrações diferentes de 8-HQN (1,0%, 2,5% e 5,0%). Os animais foram infectados com $5,0 \times 10^6$ formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* por via subcutânea na base da cauda e tratados durante 20 dias consecutivos com 25,0 mg das formulações com 1,0%, 2,5% e 5,0% de 8-HQN tópica e 200 μ L de PBS 1x estéril (controle salina). Após o período do tratamento, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária da lesão e do baço foram avaliadas (Figura 9 A e 9 B). O grupo tratado com 5% de 8-HQN apresentou uma redução da carga parasitária tanto na lesão quanto no baço. Na lesão observou-se que quando os animais foram tratados com 5% de 8-HQN pela via tópica, houve uma redução da carga parasitária quando comparado aos dados do grupo salina e com os grupos tratados com 1% e 2,5% de 8-HQN. Já no baço houve redução com diferença estatística entre os animais tratados com 5% de 8-HQN em relação ao grupo salina e ao grupo tratado com 1% de 8-HQN. Tendo em vista que a pomada contendo 5% de 8-HQN apresentou uma maior redução da carga parasitária nos órgãos avaliados, essa concentração foi determinada para a realização dos experimentos posteriores de validação da formulação proposta.

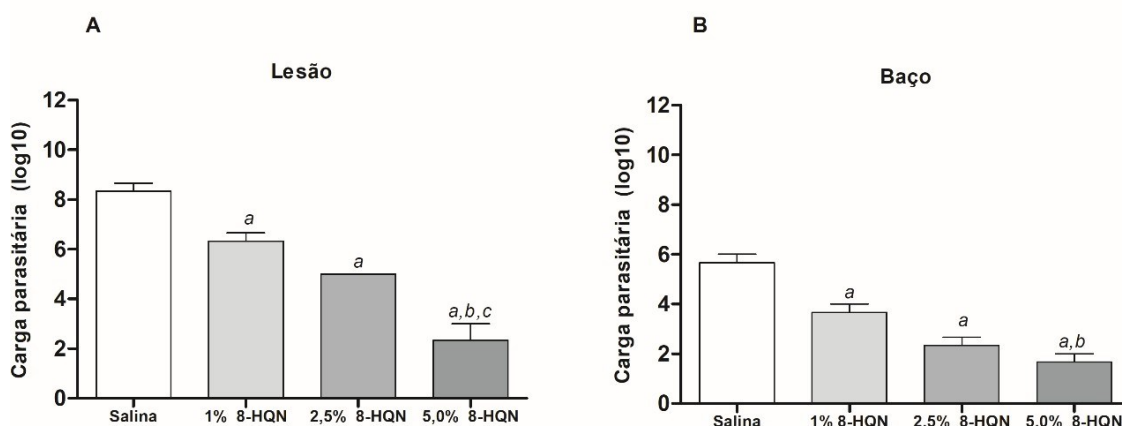


Figura 9: Determinação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados pela via tópica com formulações contendo diferentes concentrações de 8- HQN: Avaliação da carga parasitária determinada por diluição limitante após a infecção na lesão (A) e no baço, resultados expressos como média±desvio padrão. Os grupos avaliados foram tratados com formulações de 1,0%, 2,5% e 5,0% de 8-HQN. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Salina, *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com formulação de 1,0% e *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com 2,5% ($p < 0,05$).

Eficácia *in vivo* da formulação tópica contendo 5% de 8-HQN para o tratamento de camundongos BALB/C infectados com *L. amazonensis*

A avaliação da eficácia do tratamento pela formulação tópica contendo 5% de 8-HQN proposta no presente estudo, foi determinada pela análise do tamanho da lesão cutânea desenvolvida pelos animais, pós-desafio com o parasito *L. amazonensis*, além da quantificação dos parasitos em amostras de lesão. O desenvolvimento da lesão nos animais infectados foi monitorado diariamente, usando um paquímetro eletrônico. Os compostos foram administrados durante 30 dias consecutivos, uma vez ao dia.

Ao avaliar a área da lesão cutânea desenvolvida ao longo do percurso da infecção, observa-se uma significativa redução do diâmetro da lesão (área) nos animais tratados com a pomada contendo 5% de 8-HQN, Anf-B e GLU quando comparado com o grupo salina e controle contendo apenas o veículo (CV) (Figura 10). O grupo pomada 5% 8-HQN apresentou um menor tamanho da lesão estatisticamente significativo em comparação com os grupos tratados com salina e CV. Os grupos tratados com Anf-B e GLU também apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles salinae excipiente. O grupo tratado com pomada contendo 5% de 8-HQN apresentou uma redução do tamanho da lesão em relação aos grupos Anf-B e GLU, entretanto não foi estatisticamente significativo.

Além disso, outros parâmetros foram avaliados, mediante observações cautelosas em relação aos animais submetidos ao experimento. Não foram observada aparência de nódulos e metástases em outras regiões do corpo dos camundongos, sinais clínicos, como ataxia, perda de peso e fraqueza. A perda de pelo foi observado nos camundongos infectados que receberam somente salina e tratados com pomada contendo apenas o veículo. Ademais, nenhuma alteração clínica foi observada nos camundongos que foram tratados com a pomada contendo 5% 8-HQN, Anf-B e GLU.

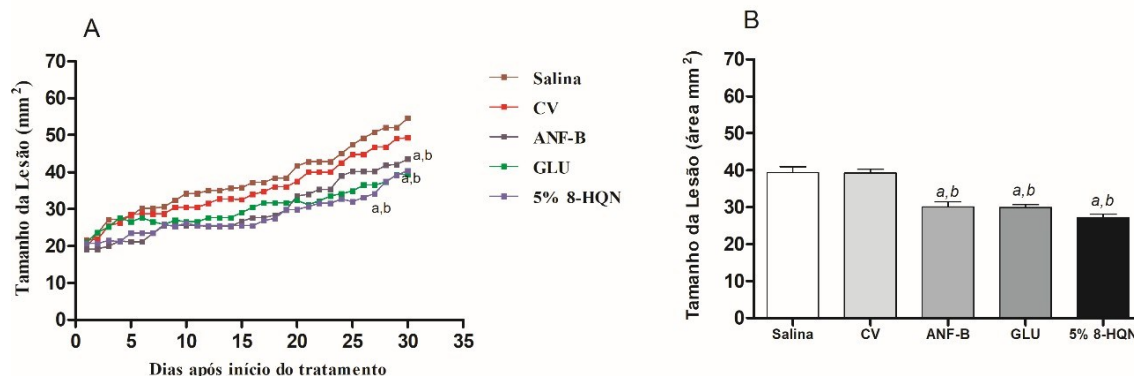


Figura 10: Figura 10: Análise do desenvolvimento de lesões cutâneas (mm²) em camundongos BALB/c após infecção experimental com *L. amazonensis*. Os grupos avaliados foram tratados por 30 dias com uma formulação tópica de 5,0% de 8-HQN, pomada somente com controle veículo, Salina, Anf-B e GLU (A). Média do tamanho da lesão após tratamento (B). Valores apresentados em mm². Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Salina; *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$.

Um dos parâmetros para a determinação da carga parasitária foi a diluição limitante Coelho *et al.* (2003), avaliando-se o logaritmo da presença do protozoário na menor diluição realizada. Conforme visto na Figura 11, os animais tratados com a pomada contendo 5% de 8-HQN quando comparados aos grupos controle salina e CV, demonstraram uma diminuição significativa da carga parasitária nos órgãos baço, fígado, linfonodo e lesão. Já na medula óssea, houve diminuição estatisticamente significativa em relação aos grupos controles e também aos grupos tratados com Anf-B e GLU. Em relação aos grupos tratados com Anf-B houve redução da carga parasitária em relação ao grupo controle salina em todos os órgãos avaliados, já os animais tratados com GLU houve redução da carga parasitária em relação aos grupos controle salina e CV. Não houve diferença estatística na avaliação da carga parasitária do grupo GLU em relação a medula óssea. Na avaliação da carga parasitária da lesão por qPCR Figura (12) os animais tratados com 5% de 8-HQN apresentaram diferença estatística quando comparado com todos os grupos. Já os grupos tratados com ANF-B e GLU apresentaram diferença estatística somente contra os grupos controles tratados com salina e com CV.

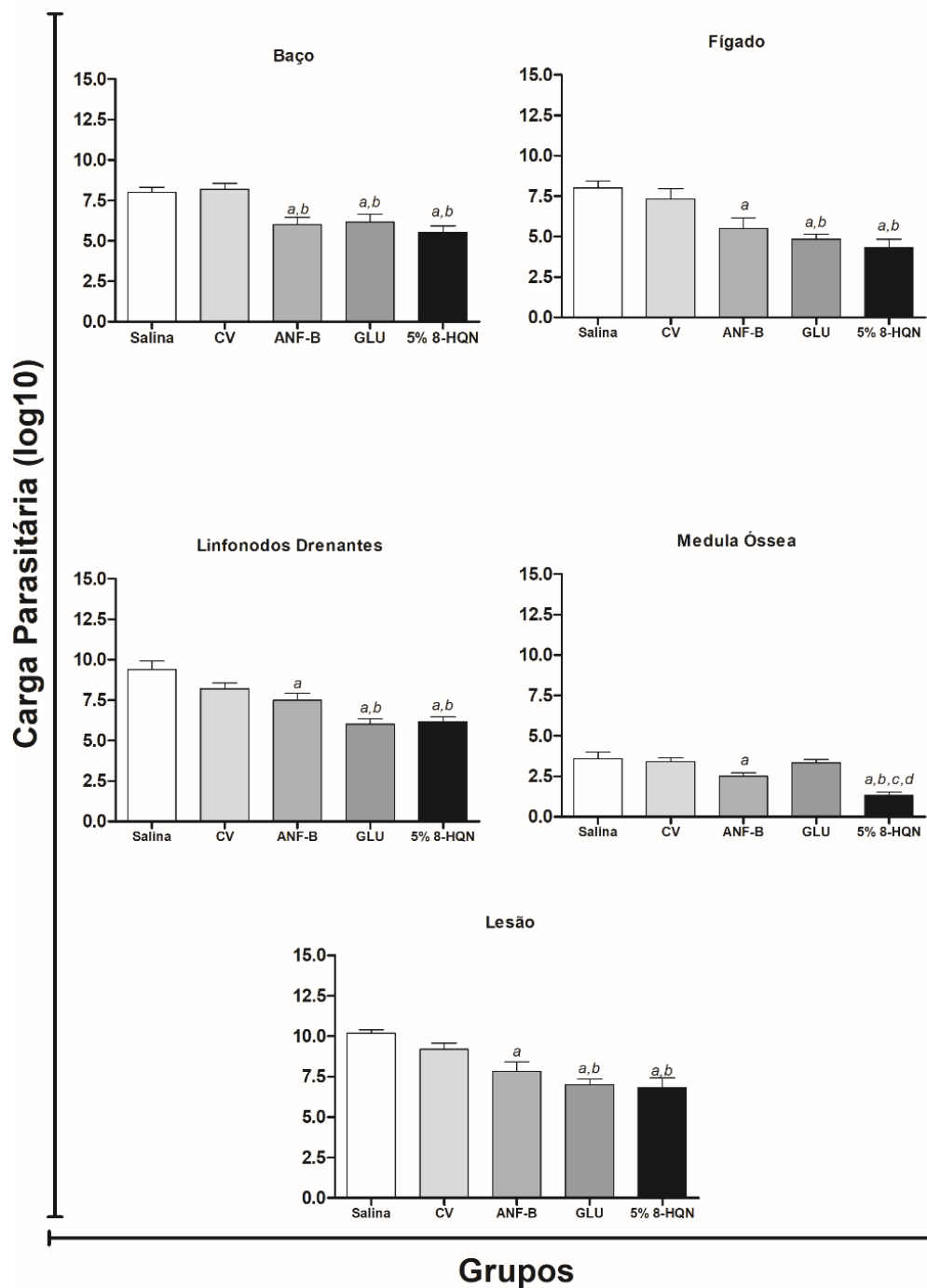


Figura 11: Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/ c infectados com *L. amazonensis*. Avaliação da presença de parasitos na menor diluição foi realizada com macerado de órgãos. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Salina; *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo; *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

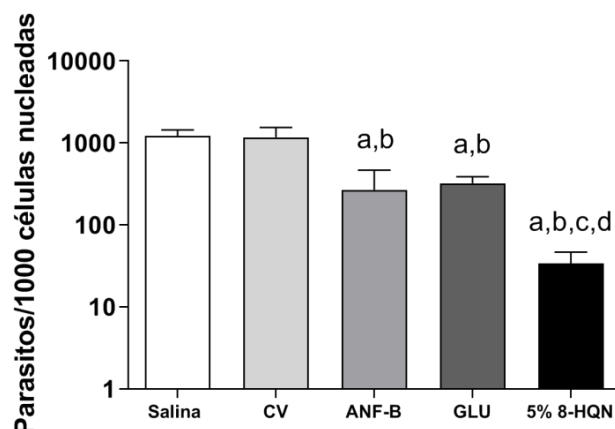


Figura 12: Carga parasitária avaliada por qPCR no tecido infectado dos animais tratados. Os resultados são expressos pelo número de parasitas (em log) por 1.000 células nucleadas do hospedeiro. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Salina; *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

Perfil da resposta imune em animais infectados e tratados:

Análise *in vitro* da razão de IFN- γ /IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com SLA de *L. amazonensis*

Para avaliar se o tratamento induziu uma resposta imune nos animais infectados, citocinas IFN- γ e IL-10 foram dosadas em esplenócitos estimulados com SLA um dia após o fim do tratamento. Como mostrado na Figura 13, esplenócitos de camundongos tratados com a pomada 8-HQN apresentaram uma maior razão de IFN- γ /IL-10 do que os esplenócitos dos animais tratados com CV, salina e ANF-B, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta imune T_H1 nesses animais. Como um correlato da progressão da doença, os animais que receberam solução salina ou foram tratados com CV apresentaram uma maior razão de IFN- γ /IL-10 do que os animais que receberam a pomada. O grupo tratado com Glu também apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos salina, CV e Anf-B, indicando também um perfil de resposta T_H1 . O grupo tratado com Anf-B não apresentou diferença quando sua razão IFN- γ /IL-10 foi comparado com os grupos controles.

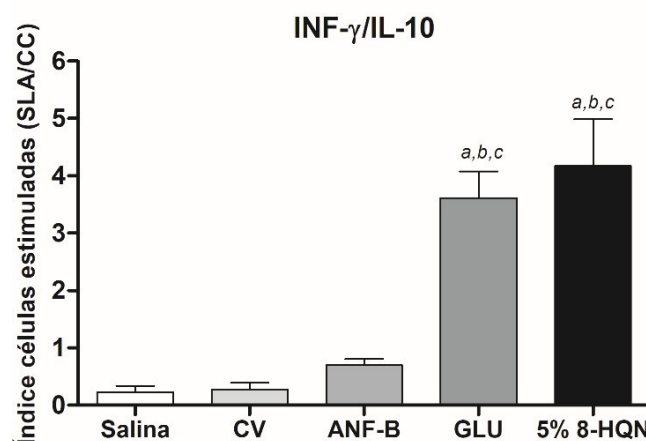


Figura 13: Análise *in vitro* da razão de INF- γ /IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com SLA de *L. amazonensis*. Os resultados são apresentados como razão de INF- γ /IL-10 (SLA/CC) A figura 12, apresentam a razão do índice de citocinas INF- γ /IL-10 Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

Análise *in vitro* da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ a partir de esplenócitos estimulados com SLA de *L. amazonensis*

Para avaliar se o tratamento induziu uma resposta imune nos animais infectados, citocinas foram dosadas em esplenócitos estimulados com SLA- Antigen um dia após o fim do tratamento. Os resultados da análise de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , TNF- α e IL- 10), produzidas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão demonstrados na Figura (14).

Em relação a produção de citocinas após estímulo com SLA-Antigen, observou-se que o grupo pomada 8-HQN apresentou aumento das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ produtores das citocinas do tipo 1, IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺ (Figura 14). Os dados de citocinas para linfócitos TCD8⁺ também indicaram aumento das citocinas de IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺ em relação aos grupos controles. Em relação ao grupo tratado com Anf-B quando se avaliou o perfil de linfócitos CD4⁺, observou-se o aumento de IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺. Já em relação aos linfócitos CD8⁺ houve aumento apenas de INF- γ ⁺. Os animais tratados com GLU, apresentaram um aumento das citocinas tipo 1, IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺ produzidas por linfócitos T CD4⁺ e em relação perfil T CD8⁺ observa-se aumento apenas TNF- α ⁺ com diferença dos grupos salina, CV e Anf-B. Ao analisar a citocina regulatória IL-10, o grupo pomada 8-HQN 5% demonstrou uma redução comparada aos grupos controles salina e CV para linfócitos T CD4⁺ e em relação aos linfócitos T CD8⁺, respectivamente. Também foi possível observar

uma redução da citocina IL-10 nos grupos Anf-B e GLU quando comparados aos grupos controle e CV.

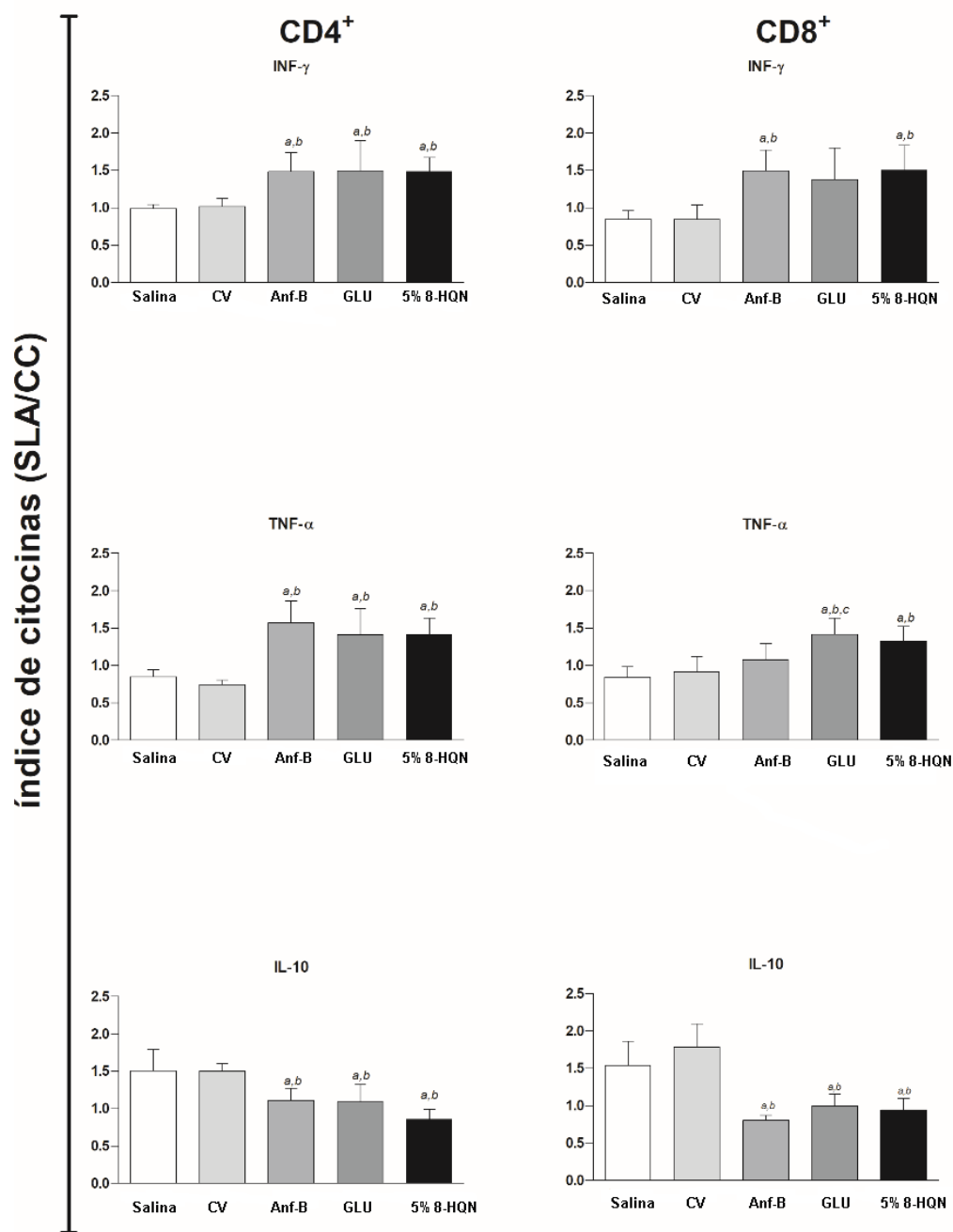


Figura 14: Citocinas intracitoplasmática em esplenócitos. Os resultados são apresentados como índice de citocinas (SLA/CC) para células T CD4⁺ e T CD8⁺, com marcação anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-10. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

Determinação dos parâmetros de toxicidade

Para a análise da segurança do tratamento em relação a sua toxicidade foram realizadas dosagens de marcadores renais (creatinina e ureia), cardíacos (CK-MB) e hepáticos: a transaminase pirúvica (TGP) e transaminase oxalacética (TGO), através de amostras de soro e conforme orientações dos fabricantes dos kits utilizados. Quando avaliou-se os parâmetros relacionados aos marcadores renais (creatinina), não se observou diferença estatística entre os grupos controles e tratados (Fig 15 A). Por outro lado, o grupo que foi tratado com a pomada contendo 8-HQN apresentou menores valores de dosagem de ureia estatisticamente significativos quando comparados aos grupos controles CV e Anf-B (Fig. 15 B). Ao avaliar o marcador cardíaco CK-MB (fig. 16 A), o grupo tratado com 8-HQN apresentou valores inferiores desse marcador quando comparados aos grupos CV e Anf-B. Em relação aos marcadores hepáticos TGO e TGP, não se observou diferença estatística entre os grupos controles e tratados (Fig 16 B e C).

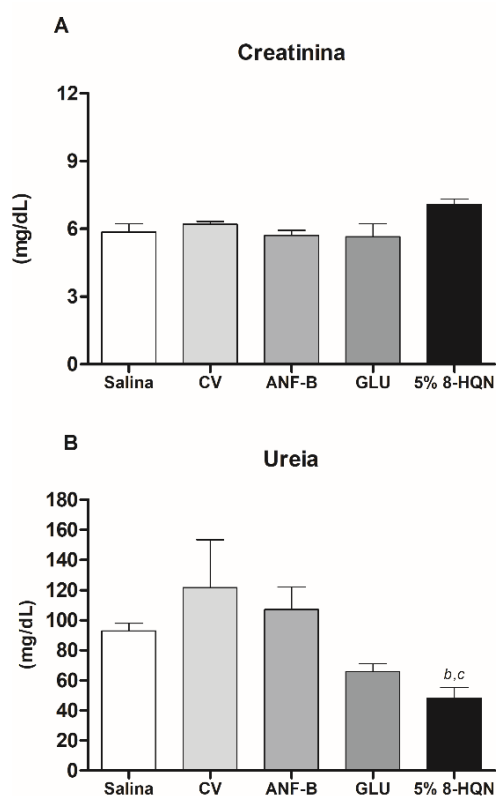


Figura 15: Parâmetros toxicológicos da avaliação renal: Creatinina e Ureia. As amostras de soro dos animais foram dosadas com Kits comerciais de creatinina (A), ureia (B), conforme o fabricante. Nas imagens, mg/dL corresponde à miligramas por decilitro. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado

com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

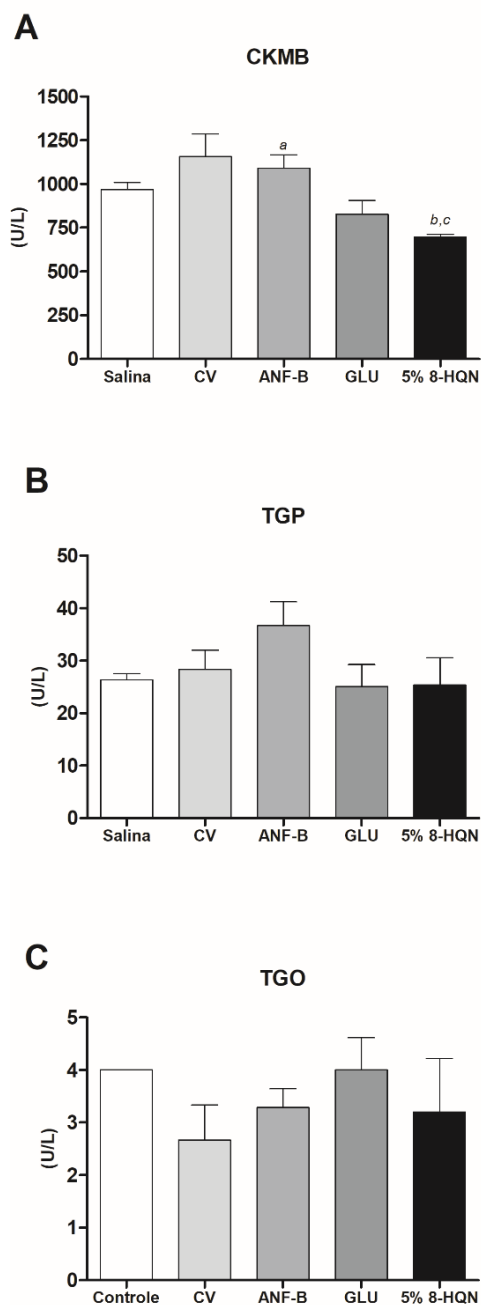


Figura 16: Parâmetros toxicológicos da avaliação cardíaca e hepática. As amostras de soro dos animais foram dosadas com Kits comerciais de CKMB (A), TGP (B) e TGO (C) conforme o fabricante. Nas imagens, U/L corresponde à unidades por litro. Nas figuras, *a* representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); *b* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com controle veículo, *c* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com Anf-B e *d* representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com GLU, sendo $p < 0,05$. As barras representam a média \pm desvio-padrão dos grupos.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais, consideradas negligenciadas e que apresentam alta prevalência e constituem um problema de saúde pública. São doenças que afetam predominantemente pessoas de baixo nível socioeconômico e que possuem um difícil controle epidemiológico (ULIANA, S. *et al.*, 2018; BAILEY, F. *et al.*, 2019; OLIVEIRA, B. C. de *et al.*, 2019).

A LT possui uma incidência global elevada, após sua infecção a lesão pode permanecer por um longo período (3-18 meses) dependendo da espécie infectante e estado imunológico do hospedeiro. Embora não seja fatal, a LT tem um impacto socioeconômico devido à estigmatização dos indivíduos que podem apresentar lesões desfigurantes e mesmo após a cura da doença (BENNIS, I. *et al.*, 2018; BAILEY, F. *et al.*, 2019). De acordo com a OMS, o tratamento da LT irá variar entre os países que devem levar em consideração a forma clínica da doença, a espécie infectante. Os tratamentos atuais, apresentam eficácia variada, efeitos sistêmicos diversos que muitas vezes levam ao abandono do tratamento pelo paciente (ULIANA, S. *et al.*, 2018; BAILEY, F. *et al.*, 2019; OLIVEIRA, B. C. de *et al.*, 2019).

O tratamento inicial da LC se baseia no uso de antimoniais pentavalentes, composologia determinada conforme condições clínicas e a sua forma de administração (parenteral) representa uma grande desvantagem, pois é doloroso para a maioria dos pacientes, principalmente crianças, possui longa duração de tratamento, causa reações locais que requer hospitalização. Esses fatos, aumentam o custo da terapia e outros efeitos adversos, fatores que provavelmente são responsáveis pela não adesão ao tratamento e/ou descontinuidade do mesmo (ULIANA, S. *et al.*, 2018; CARVALHO, S. H. *et al.*, 2019).

Outros fármacos, tais como Anf-B, miltefosina, pentamidinas e paramomicina, são recomendados como segunda opção no tratamento e para condições especiais como: gestantes, crianças, cardiopatas, pessoas portadoras do vírus HIV e falha terapêutica. Além dos diversos efeitos adversos (cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade entre outros), o uso destes medicamentos causou o desenvolvimento de resistência e falha nos tratamentos no decorrer do tempo, impactando diretamente no controle da doença. A resistência surge com mutações genéticas que diminuem a resposta do parasito a um fármaco quando o mesmo está sob pressão deste fármaco. Portanto, novas formas terapêuticas precisam ser desenvolvidas em uma tentativa de reduzir estes problemas. (GOTO & LINDOSO, 2012; MORAIS-TEIXEIRA, E. *et al.*, 2015; PONTE-SUCRE, A. *et al.*, 2017; TASLIMIT, Y. *et al.*, 2018).

As terapias locais têm sido recomendadas para infecções causadas por espécies de *Leishmania* que causam lesões pequenas e pouco disseminadas (MARTÍNEZ-SALAZAR *et al.*, 2020). Dessa forma, há um interesse no desenvolvimento de novos tratamentos que utilizem a via tópica como alternativa, por apresentar diversas vantagens, tais como, facilidade de autoadministração, redução de efeitos de primeira passagem, natureza nãoinvasiva, assim, o tratamento poderia aumentar a acessibilidade e adesão do paciente, resultando em uma maior taxa de cura da doença (VARIKUTI, S. *et al.*, 2017; BERENQUER, D. *et al.*, 2019; HOROIWA, T. A. *et al.*, 2020; AZIM, M. *et al.*, 2021).

Diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar novas moléculas com potencial ação leishmanicida, como estratégia para melhorar a eficácia do tratamento das leishmanioses. Um estudo de Neira *et al.* (2019), avaliou o tratamento da LC com um gel tópico de miltefosina em camundongos BALB/c infectados com espécies do Novo Mundo, onde o gel foi ativo contra parasitos *in vitro* e *in vivo*, reduzindo o tamanho da lesão em 84%, além disso, não foram observados sinais de irritação/inflamação ou alterações nos níveis séricos de ureia e transaminases após o tratamento. Já em outro estudo Martínez-Salazar *et al.* (2020), utilizou em seu tratamento tópico um creme MF29 1% e obteve redução da carga parasitária em comparação com os outros grupos controle que apresento uma lesão não cicatrizada e necrótica, além da resposta imunecom perfil T_H2, que foi reduzida.

O sulfato de paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, que na década de 60 demonstrou efeitos anti-*Leishmania* de forma sistêmica para LV e tópica para LC (*L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*) (FERNÁNDEZ, M. M. *et al.*, 2011). Em um ensaio clínico duplo-cego randomizado no Irã, pesquisadores relataram resultados clínicos da terapia tópica contendo 15% de paramomicina entre os pacientes que apresentaram lesões única não complicada de LC provocados por *L. major*, com uma taxa de cura entre 59% e 74% após 2 e 4 semanas de tratamento respectivamente (ASILIAN, A. *et al.*, 2003; AZIM, M. *et al.*, 2021). Outro estudo demonstrou uma combinação de paramomicina 15% e gentamicina 0,5% para tratar LT em camundongos Balb/c, infectados com *L. major*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*. Durante 10 dias os camundongos foram tratados duas vezes ao dia, e 100% das lesões apresentaram cura (GROGL *et al.*, 1999).

Outro estudo demonstrou que a morfina atua como agente imunomodulador e que seu uso tópico é capaz de diminuir o tamanho da lesão em camundongos Balb/c infectados com *L. major* (GHAFFARPASAND. F, *et al.*, 2016; AZIM, M. *et al.*, 2021). Um creme composto de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) que induz a produção de reativo de óxido nítrico(NO), após 30 dias de tratamento houve a resolução de todas as lesões presentes

nos indivíduos com LC (LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 1998).

A combinação de fármacos com antimonial tem sido recomendada para aumentar a eficácia, reduzir a falha terapêutica e os efeitos adversos (MODABBER, F. *et al.*, 2007; MEHEUS, F. *et al.* 2010). Estudos demonstraram a combinação de creme fluconazol a 1%, três vezes ao dia durante 6 semanas com aplicação de glucantime intralesional uma vez por semana, potencializou o tratamento em 74% (NILFOROOSHADEH *et al.*, 2011).

A hidroxiquinolina e seus derivados são uma subclasse de quinolinas com várias atividades biológicas descritas. A 8-HQN é um composto heterocíclico caracterizado por uma afinidade por metais. Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido relacionadas às HQ pela sua capacidade estrutural de desenvolvimento de novos candidatos com atividade biológica em vários alvos (OLIVERI & VECCHIO, 2016). Historicamente, as HQ são utilizadas como fungicidas na agricultura, e como conservantes na indústria têxtil, madeireira e de papel (PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.*, 2013). Ao longo dos anos, os estudos demonstraram que a 8-HQN apresenta atividade quimioterápica, antimicrobiana e tem sido associada ao tratamento de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (LENTZ, D. L. *et al.* 1999; SHEN, A. Y. *et al.* 1999b; REIS, D.C. *et al.*, 2011; SONG, Y. *et al.*, 2015; OLIVERI & VECCHIO, 2016). A 8-HQN e seus derivados já tiveram relatos de atividade antitumoral (COLLERY, P., *et al.* 2000; SAADEH, H. A. *et al.*, 2020), e como um candidato para o tratamento de indivíduos infectados com HIV. (LENTZ, D. L. *et al.* 1999; PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.*, 2013).

Em relação à atividade parasitária, estudos demonstraram que a 8-HQN inibiu o crescimento de *L. panamensis*, *L. tropica* e promastigotas de *L. major* (LENTZ, D. L. *et al.* 1999; SHEN, A. Y. *et al.* 1999b). Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo de triagem com a substância 8-HQN que apresentou potencial antileishmanial no tratamento da LT e LV. A 8-HQN foi avaliada contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* e neste estudo, a 8-HQN, apresentou eficiente atividade antileishmanial *in vitro*, associada a uma baixa toxicidade em Møs murinos e em hemácias de indivíduos do grupo sanguíneo O+. A Anf-B foi utilizada como controle e apresentou elevada toxicidade em Møs murinos e atividade hemolítica significativa. O estudo concluiu que a 8-HQN seria um bom candidato para novos testes de tratamento das leishmanioses.

A 8-HQN foi avaliada, também, *in vivo* em uma composição micelar na tentativa de reduzir a toxicidade, e os resultados demonstraram redução da carga parasitária nos órgãos

como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, quando comparados aos grupos controles avaliados. Tais animais também apresentavam níveis significativamente elevados de IFN- γ e IL-12 e baixos níveis de IL-4 e IL-10, quando comparados aos controles, denotando uma resposta celular do tipo T_{H1} que foi gerada nos animais infectados e tratados. Os autores concluíram que o sistema micelar 8-HQN foi eficaz na redução da infecção e controle da doença nos animais, não apresentando toxicidade nos mesmos (DUARTE, M. C. *et al.*, 2016b; LAGE, L. M. *et al.*, 2016).

O tratamento tópico da LT tem sido recomendado devido a sua potencialização da ação local do fármaco, baixo custo, facilidade de administração e a não necessidade de infraestrutura complexa do sistema de saúde para a realização do tratamento (MODABBER, F. *et al.*, 2007; TRINCONI, C. T. *et al.*, 2016). Além disso, a terapia combinada também tem sido recomendada para aumentar a eficácia do tratamento, prevenir possíveis casos de resistência, reduzir a dose e o tempo de tratamento e diminuir o efeito de toxicidade nos pacientes (MODABBER, F. *et al.*, 2007; MEHEUS, F. *et al.* 2010). Assim, tendo em vista a eficácia apresentada pela 8-HQN tanto no tratamento *in vitro* como *in vivo* contra a LV e LT, esse trabalho propôs avaliar o potencial da 8-HQN em uma formulação tópica contra a leishmaniose tegumentar em camundongos Balb/c infectados pela espécie *L. amazonensis*.

O tratamento tópico da substância 8-HQN neste trabalho iniciou-se após abertura das lesões nos camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, que são altamente suscetíveis à infecção, com duração de 30 dias e a eutanásia um dia após o final do tratamento. O protocolo de tratamento foi estendido, para além, dos 20 dias recomendados pela OMS no tratamento LC para verificar se a substância causaria possíveis efeitos adversos nos animais (MARTÍNEZ-SALAZAR *et al.* 2020). Os resultados do tratamento tópico realizado com a 8-HQN a 5%, determinada experimentalmente foram comparados com os grupos sem a formulação 8-HQN (somente veículo da pomada), grupo de tratado com salina (Controle) e os grupos GLU (20 mg/Kg/dia) e Anf-B (1 mg/kg/dia), por via peritoneal, sendo os dois últimos grupos medicamentos de referência no tratamento da doença.

A espécie *L. amazonensis* foi originalmente descrita na Amazônia brasileira, mas apresenta uma vasta distribuição em outras regiões do Brasil, sendo capaz de induzir no hospedeiro desde lesões cutâneas à forma visceral da doença (BARRAL, A. *et al.*, 1991; COELHO, E. A. F. *et al.*, 2003). Por ser uma espécie com capacidade elevada de desenvolvimento de lesão, todos os camundongos infectados apresentaram um aumento da área da lesão ao longo do período do tratamento, sendo o grupo tratado com 8-HQN 5% apresentou a menor taxa de crescimento quando comparado aos controles salina e CV ao final

do tratamento, o que também, reflete na avaliação da carga parasitária. O grupo tratado com a formulação tópica com 8-HQN 5% apresentou melhor desempenho na redução da carga parasitária, diante dos grupos controle e CV, sendo significativa a diferença em todos os órgãos avaliados (baço, fígado, linfonodo drenante, lesão e medula óssea). Como visto em estudos anteriores do grupo (DUARTE, M. C. *et al.* 2016a; LAGE, L. M. *et al.*, 2016), a 8- HQN possui atividade leishmanial, o que poderia sugerir uma ação local direta nos parasitos presentes na lesão dos camundongos infectados, gerando uma redução da carga parasitária local. Consequentemente, uma menor disseminação hematogênica dos parasitos para os demais órgãos, o que pode ser sugerido pela baixa carga parasitária da medula óssea quando comparado com os demais grupos. Entretanto o mecanismo de ação desta substância ainda não está elucidado na literatura, mas parece que atua na despolarização da membrana mitocondrial do parasito, o que é considerado crítico para a sobrevivência de qualquer célula (FIDALGO & GILLE, 2011; DUARTE, M. C. *et al.* 2016a). Resultados semelhantes foram verificados por Martínez-Salazar *et al.* (2020), que desenvolveu um tratamento tópico e ao final observou-se redução do tamanho das lesões em camundongos tratados com o creme MF29 a 1%, significativamente menor do que o grupo controle seguido de redução da carga parasitária na lesão e no linfonodo drenante, demonstrando o potencial ação antileishmanial de ambas as substâncias dos estudos.

Em outro estudo, Sosa *et al.* (2020), realizou tratamento tópico com 15% de EGCG, que é um polifenol e constituído de galato de epigallocatequina, em camundongos BALB / c infectados com *L. (L.) amazonensis*. O tamanho da lesão dos camundongos tratados com 15% EGCG tópico foram diminuindo significativamente no decorrer do tratamento em comparação com o grupo controle (sem tratamento). Os autores correlacionaram a evolução das lesões nos camundongos tratados com EGCG tópico com a diminuição significativa da carga parasitária (80% de inibição) em comparação com o grupo controle. Já em comparação com o grupo Glu a eficácia foi semelhante.

A patogenia e patologia da LT em modelos experimentais murinos é influenciada fortemente por fatores ligados à genética do hospedeiro, bem como resposta imunológica. E também pelo parasito, como virulência da espécie de *Leishmania*, tamanho do inóculo, forma do parasito e via de inoculação (STAUBER, L. A., 1958; OLIVEIRA *et al.* 2012). O presente estudo utilizou um elevado inóculo de *L. amazonensis*, uma espécie altamente virulenta que desenvolveu uma carga parasitária exponencial nos órgãos avaliados como lesão, fígado, baço, linfonodo e medula óssea sugerindo uma infecção crônica da doença, o que dificulta o controle da replicação dos parasitos (OLIVEIRA *et al.* 2012; LAGE, L. M. *et al.*, 2016).

Nesse âmbito, dificilmente um regime muito efetivo de tratamento diminuiria totalmente a carga parasitária nos órgãos ou levaria a cicatrização das lesões. Nesse sentido, o tratamento com a 8-HQN 5% se mostrou eficaz, visto que os dados obtidos mostram redução estatisticamente significativa em relação aos grupos controles salina e CV utilizados no estudo, embora a carga parasitária não tenha sido totalmente eliminada. Ademais, nosso estudo avaliou somente um regime terapêutico (1 vez ao dia), sendo necessário estudos adicionais para avaliar o aumento da frequência do uso da pomada e o tempo de tratamento.

Segundo Pereira *et al.* (2020), os parasitos exercem um papel importante na resposta imune, contribuindo para o agravamento das úlceras, que podem se disseminar pelo corpo. Logo, a não regressão e o reaparecimento da lesão podem ser decorrentes da persistência do processo inflamatório induzido, assim, o equilíbrio entre os dois subconjuntos de células T CD4⁺ (T_{H1} e T_{H2}) é fundamental para determinar a gravidade da doença. Dessa forma, a liberação de citocinas provenientes de um perfil de resposta T_{H1} é muito importante, além disso, é usado para avaliar os efeitos de um novo tratamento.

As células T_{H1} CD4⁺, após a infecção, são recrutadas para as lesões cutâneas onde produzem IFN- γ e TNF- α para ativar M ϕ para produzir NO, que vai contribuir para eliminação do parasito. Já a falta de resolução da doença pode ser devido a produção aumentada da citocina IL-10, que regula negativamente a expressão das citocinas T_{H1}. Por outro lado, as células T CD8⁺ desempenham, também, um papel vital na proteção imunológica por meio da produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α), bem como sua atividade citotóxica, através da expressão de granzima e perforina. No entanto, a produção de citocinas pelas células T CD8⁺ é menor em frequência e intensidade em comparação com as subpopulações de células T CD4⁺, pois pode levar a grandes danos teciduais e exacerbar a resposta (DA SILVA & BRODSKYN, 2014; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Em nosso estudo, avaliamos se o tratamento com a formulação com 8-HQN 5% foi capaz de produzir células T CD4⁺ e T CD8⁺ e os resultados demonstraram que o tratamento apresentou perfil de resposta CD4⁺ com aumento, sendo diferença significativa aos grupos controle e CV, em relação a citocina IFN- γ , assim, como os tratamentos de referência. Já a citocina IL-10 para o grupo 8-HQN 5% apresentou redução do valor quando comparado com os grupos controle e CV, os resultados foram semelhantes para os grupos de tratamento de referência. Quando se avaliou o perfil CD8⁺ observou aumento estatisticamente significativo na produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , comparado aos grupos controle e CV, sendo que os grupos GLU e Anf-B não apresentou diferença significativa para ambas citocinas apenas o grupo 8-HQN 5%. Entretanto, a produção de IL-10 do grupo 8-HQN 5% foi reduzida

estatisticamente apenas quando comparado aos grupos controle e CV. Embora a via de administração da 8-HQN seja distinta, nossos dados estão de acordo com os estudos anteriores em que no tratamento com a 8-HQN observa-se um perfil de resposta celular predominante T_H1 (DUARTE, M. C. *et al.*, 2016b; LAGE, L. M. *et al.*, 2016).

Já nas dosagens realizadas por ELISA apenas o grupo 8-HQN 5% teve uma redução significativa comparando com os grupos controle e CV para citocina IL-10 e para IFN- γ o grupo 8-HQN 5% teve o maior índice de todos os grupos com diferença significativa comparando com os grupos controle e CV. Kawakami *et al* (2021), realizou um tratamento tópico com óleos naturais e avaliou o nível de citocina IL-10, assim, associaram que o nível de citocina pode estar envolvido no controle da multiplicação do parasito. Em seu resultado o nível IL-10 foi reduzido, o que sugere redução da resposta inflamatória, redução da carga parasitária no local da infecção e redução do tamanho das lesões. Nosso estudo demonstrou uma menor carga parasitária da lesão e demais órgãos tratados com a pomada 8-HQN 5%, o que pode sugerir um equilíbrio maior da resposta celular com um perfil predominantemente T_H1 .

Ao realizar um novo tratamento a toxicidade deve ser verificada em todos as condições clínicas do tratamento, visto que o mesmo pode levar a riscos fisiológicos, assim, adosagem bioquímica é realizada para verificar a segurança do tratamento com marcadores renais, hepáticos e cardíacos (ALMEIDA, A. S. *et al.*, 2008; SPINELLI, M. O. *et al.*, 2012). De acordo com a OMS (1993), biomarcador é qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser medido no corpo ou em seus produtos que influenciam o desfecho da doença (DUARTE, D. B. *et al.*, 2020).

Após o término do tratamento diversos parâmetros bioquímicos foram avaliados para determinar se houve toxicidade ao longo da terapia. Os dados demonstram que não houve diferença estatística para os testes de creatinina e ureia. Já para fração CK-MB (cardíaco) o grupo tratado com 8-HQN 5% mostrou-se menor que o grupo de tratamento de referência ANF-B e este obteve, também, diferença significativa do grupo CP. Por último, os valores de ALT/TGP (hepático) também não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Assim, como nos resultados bioquímicos deste projeto Pereira *et al* (2020), em seu tratamento com curativos tópico apresentou variações bioquímica normal para todos os parâmetros séricos avaliados (creatinina, uréia, ALT e AST), o que não implicou nas condições clínicas. Ressalta-se que níveis de marcadores muito elevados podem estar relacionados ao uso de medicamentos, corroborando possíveis reações adversas dos medicamentos utilizados no

tratamento, assim, como observamos com o grupo Anf-B, que apresentou elevação significativa dos demais grupos para fração CK-MB.

A LT ainda é endêmica em diversos países em desenvolvimento e do terceiro mundo, devido a problemas de diagnóstico e monitoramento em áreas endêmicas e ao número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento dos casos. É importante ressaltar que, a maior parte dos tratamentos utilizados no mundo e no Brasil, requerem via de administração parenteral, o que gera um desconforto para os pacientes, que muitas vezes acabam não aderindo ao protocolo de tratamento levando muitas vezes à falha terapêutica devido ao desenvolvimento de resistência dos parasitos frente ao principal fármaco disponível (GLU). Ademais, isso representa um custo ao sistema de saúde, devido aos gastos gerados com internação dos pacientes.

Dessa forma, estudos buscando alternativas terapêuticas contra LT apresentam impacto direto para a redução da doença humana. Diversas terapias tópicas vêm sendo avaliadas para contornar esses problemas, visto que podem ter uma alta concentração do fármaco no local da infecção. Ademais é necessário promover o uso de terapias combinadas afim de reduzir doses, efeitos adversos, aumentar adesão entre os pacientes, evitar o aparecimento de cepas resistentes do parasito e consequentemente reduzir custos no âmbito do sistema de saúde. Estas abordagens podem favorecer os programas de saúde pública do Brasil e em diferentes regiões do globo (América do Sul, Europa, Ásia e África). Neste contexto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra LT apresentam potenciais públicos consumidores na região da América do Sul, onde a doença é endêmica e consiste em grave problema de saúde pública.

7 CONCLUSÃO

Com base nos dados gerados no presente estudo a substância 8-HQN 5% foi tolerável pelos animais não apresentando irritação na pele, apresentou atividade contra os parasitos de *Leishmania*, reduzindo a carga parasitária e possibilitando um perfil de resposta T_H1 , além, dos dados toxicológicos não apresentarem diferença estatística. Assim, a formulação contendo 8-HQN 5% é um candidato promissor no tratamento tópico da LC por todos dados gerados no presente estudo, que são favoráveis, e facilitar a adesão dos pacientes, pois poderia ser usado em combinação ou isolado, além de gerar a redução dos custos do tratamento. Por fim, sugerimos estudos adicionais para verificar sua ação em combinação com os tratamentos de referência, e em diferentes esquemas terapêuticos e sistemas de entrega para uma ação mais eficaz.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a utilização da pomada contendo 8-HQN 5% em associação com os fármacos de referência utilizados no tratamento da LT;
- Avaliar diferentes esquemas terapêuticos, como aumento da periodicidade do uso da pomada e tempo de tratamento;
- Avaliação do uso da pomada contra outras espécies de *Leishmania* causadoras da LT como a *L. major* e *L. braziliensis*.

9 REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

- ADLER-MOORE, J. P.; PROFFITT, R. T. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 25-36, maio 2008.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n. 3, p. 1-40, mar. 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.
- ALEXANDER, J; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant?. **Front Immunol.**, v. 3, p. 1-13, abr. 2012.
- ALLEN JR., L. V. *et al.* **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed. Rio Grande do Sul: Editora Artmed. 2006.
- ALMEIDA, A. S. *et al.* Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 6, p. 429-432, dez. 2008.
- AL-NATOUR, S. H. Update in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **J Family Community Med.**, v. 16, n. 2, p. 41–47, maio 2009.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. 1-12, maio 2012.
- AMMAR, A. A. *et al.* Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 1, p.76–84, fev. 2019.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 64, n. 3, p. 281-289, ago., 2017.
- ANVISA/BRASIL (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Ministério da Saúde. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-nacional/arquivos/8065json-file-1>>. Acesso em: 5 jan. 2021.
- ARANA, B. A. *et al.* Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 466–470, nov. 2001.
- ARMIJOS, R. X. *et al.* Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 91, n. 2, p.153–160, jul. 2004.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, nov. 2000.

ASILIAN, A. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 5, p. 353-359, jul. 2003.

AZIM, M. *et al.* Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1-15, mar. 2021.

BACELLAR O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, dez. 2002.

BAILEY, F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 13, n. 2, fev. 2019.

BALASEGARAM, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, dez. 2012.

BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, maio 1991.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, set. 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, ago. 2007.

BENNIS, I. *et al.* Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: A scoping review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 358, p. 1-12, mar. 2018.

BERENGUER, D. *et al.* Development and Characterization of a Semi-Solid Dosage Form of Meglumine Antimoniate for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 613, p. 1-16, nov. 2019.

BERGER, B. A. *et al.* Cost-effectiveness of meglumine antimoniate versus miltefosine caregiver DOT for the treatment of pediatric cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 4, p. 1-16, abr. 2017.

BOTERO, M. C. *et al.* Lipid formulations of amphotericin. **Rev. chil. infectol**, v. 31, n.5, p. 518-527, out. 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências e Tecnologias e Insumos Estratégico. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC). **Miltefosina para tratamento da leishmaniose tegumentar: relatório de recomendação**, 30p, 2018. Disponível em:

<http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 180 p., 2013. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p., 2017. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf> Acesso em: 9 jul. 2020.

BRITO, N. C. *et al.* Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Plos One**, v. 12, n. 9, p. 1-29, set. 2019.

CARVALHO, S. H. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, abr. 2019.

CHEN, C. *et al.* Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of 8-hydroxyquinoline derivatives as matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, n. 1, p. 1-13, nov. 2019.

COELHO, A. C. *et al.* Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 98-102, set. 2008.

COELHO, E. A. F. *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immun.**, v. 71, n. 7, p. 3988 – 3994, jul. 2003.

COLLERY, P. *et al.* Inhibitory effects of gallium chloride and tris(8-quinolinolato) gallium III on A549 human malignant cell line. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 2 A, p.955-958, abr. 2000.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. *et al.* Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amaz.**, v.47, n.1, p. 39-46, mar. 2017.

COSER, E. M. *et al.* Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility *in vitro* and the treatment outcome *in vivo*. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 14, p. 91-98, dez. 2020.

CUNHA, M. A., *et al.* Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 93, n. 6, p. 1214-1218, dez. 2015.

- DA SILVA, S. C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Front Public Health**, v. 2, n. 165, p. 1-6, set. 2014.
- DALECKI, A. G. *et al.* Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 70, p. 193–260, mar. 2017.
- DARBY, C. M.; NATHAN, C. F. Killing of non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* by 8-hydroxyquinoline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1424–1427, jul. 2010.
- DARDARI, Z. *et al.* Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino) methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. **II Farmaco**, v. 59, n. 3, p. 195-199. mar. 2004.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, dez. 2009.
- DAVIDSON, R. N., *et al.* Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, jul. 2009.
- DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, nov. 2012.
- DUARTE, D. B. *et al.* Kidney biomarkers in tropical infections: an update. **Pathog Glob Health**, v. 114, n.6, p. 302-306, jul. 2020.
- DUARTE, M. C. *et al.* An effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 217, p. 81 – 88, fev. 2016a.
- DUARTE, M. C. *et al.* Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. **Parasitology International**. v. 65, n. 6 Pt A, p. 728 -736, dez. 2016b.
- DUTCHER, J. D. *et al.* **Amphotericin B, its production and its salt**. 1959. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US2908611A/en>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- EI-ON, J. *et al.* Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 87, n. 2, p. 284-288, mar. 1986.
- FAGHIHI, G.; TAVAKOLI-KIA, R. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 13–16, jan. 2003.
- FARIA, D. R. *et al.* Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect. Immun**, v. 73, n.12, p. 7853-7859, dez. 2005.

FERNÁNDEZ, M. M. *et al.* Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 1, p. 86-93, jan. 2011.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, A. *et al.* Relevance of epidemiological surveillance in travelers: an imported case of *Leishmania tropica* in Mexico. **Rev Inst Med Trop.**, v. 62, n. e41, p. 1-5, abr. 2020.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, nov. 2011.

FIGURA 1: SisLeish-OPAS/OMS. **Leishmaniose – informe epidemiológico das Américas**, n. 9, dez. 2020. Disponível em: < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>>. Acesso em: 06 jul. 2021.

FIGURA 2: World Health Organization – Control of Neglected Tropical Diseases (WHO/NTD). **Status de endemidade da leishmaniose tegumentar no mundo, 2019**. Disponível em: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab_7>. Acesso em: 06 jul. 2021.

FIGURA 3: Centers for disease control and prevention (CDC, a), 2017. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

FIGURA 4: Centers for disease control and prevention (CDC, b), 2017. **Leishmaniasis – Image gallery**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

FIGURA 5: RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 671–678, dez. 2007.

FIGURA 6 & 7: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p., 2017. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf> Acesso em: 9 jul. 2020.

FIGURA 8: SIGMA-ALDRICH. **8-Hydroxyquinoline**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/252565?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Therapeutic efficacy of amphotericin B lipid formulations. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 42, n. 2, p. 167-194, jun 2006.

FRÉZARD, F. *et al.* Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, jul. 2009.

GALVÃO, E. L. *et al.* Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and metaanalysis. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. 1-24, oct. 2017.

GANGNEUX, J.-P. *et al.* Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 574–577, 1996.

GAUSE, W. C. *et al.* Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, n. 8, p. 607–614, ago. 2013.

GAZE, S.T. *et al.* Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scand. J. Immunol**, v. 63, n. 1, p. 70-78, dez. 2005.

GENARO, A.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2005. cap. 8, p. 47-64,

GHAFFARPASAND, F. *et al.* Effect of Topical Morphine on Cutaneous Leishmaniasis in an Animal Model: A Preliminary Report. **Iran Red Crescent Med J**. v. 18, n. 5, p. 1-5, maio 2016.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Des Devel Ther**, v. 12, p. 25-40, 2018

GOLDSMITH, D. R.; PERRY, C. M. Amphotericin B Lipid Complex In Visceral Leishmaniasis. **Drugs**, v. 64, n. 17, p. 1905-1911, 2004.

GONÇALVES, S. V. C. B.; COSTA, C. H. N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 93, n.3, p. 347-355, jun. 2018.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, abr. 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Diseases Clinics of North America**. v. 26, n. 2, p. 293 – 307, jun. 2012.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out.1982.

GROGL, M. *et al.* Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. **J Parasitol**, n. 85, n. 2, p. 354-359, abr. 1999.

HAFIZ, S.; KYRIAKOPOULOS, C. **Pentamidine** (2020). StatPearls. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557586/>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. **Drugs**, v.73, p. 919–934, jun. 2013.

HEINZEL, F. P. *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J.Exp.Med.**, v. 169, n. 1, p. 59-72, jan. 1989.

HIEMENZ, J. W.; WALSH, T. J. Lipid Formulations of Amphotericin B: Recent Progress and Future Directions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. supplement 2, p. S133–S144, maio 1996.

HOROIWA, T. A. *et al.* Sugar-based colloidal nanocarriers for topical meglumine antimoniate application to cutaneous leishmaniasis treatment: *Ex vivo* cutaneous retention and *in vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 147, p. 1-9, abr. 2020

JANKNEGT, R. *et al.* Liposomal and Lipid Formulations of Amphotericin B. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 23, n. 4, p. 279-291, 1992.

JHINGRAN, A. *et al.* Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 164, n. 2, 111-117, abr. 2009.

JÚNIOR, A. M. P. *et al.* Diversity, natural infection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera, *Psychodidae*) in the western Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, n. e190170, p. 1-9, jun. 2019.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Parasitology**, v, 22, n.9, p. 439-445, jul. 2006.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. **J Parasitol Res.**, v. 2014, p. 1-11, maio 2014.

KAWAKAMI, M. Y. M. *et al.* Efficacy of nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 134, p. 1-12, fev. 2021.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, jul. 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinicas de Dermatologia*, v. 17, n. 3, p. 279-289, jun. 1999.

- KOSAKA, A. *et al.* Failure of Liposomal-amphotericin B Treatment for New World Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **Internal Medicine**, v. 59, n. 9, p. 1227–1230, maio 2020.
- KRAUSE, G.; KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 88, n. 1, p. 92-94, fev. 1994.
- LAGE, L. M. R. *et al.* An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentar leishmaniasis. **Parasitol Res.**, v. 115, n. 11, p.4083-4095, nov. 2016.
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, jun. 2010.
- LAZARSKI, C. A. *et al.* IL-4 Attenuates Th1-Associated Chemokine Expression and Th1 Trafficking to Inflamed Tissues and Limits Pathogen Clearance. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-10, ago. 2013.
- LEMKE, A. *et al.* Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, n. 2, p. 151-162, ago. 2005.
- LENTZ, D. L. *et al.* New antifungal agents that inhibit the growth of *Candida* species: dichlorinated 8-quinolinols. **Mycopathologia**, v. 147, n. 3, p. 117–120, 1999.
- LEVINE, H. *et al.* Clioquinol and other Hydroxyquinoline Derivatives Inhibit A β (1-42) Oligomer Assembly. **Neuroscience Letters**, v. 465, n. 1, p. 99-103, nov. 2009
- LIMA, E. B. de *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n. 2, p. 111-124, abr. 2007.
- LINDOSO, J. A. L. *et al.* Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, jul. 2012.
- LOCKSLEY, R. M. *et al.* Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann Inst Pasteur Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 744-749, out. 1987.
- LOPEZ-JARAMILLO, P. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. **The Lancet**, v. 351, n. 9110, abr. 1998.
- MA, X.; TRINCHIERI G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Advances in Immunology**, v. 79, p. 55-92, ago. 2001.
- MAAROUF, M. *et al.* *In Vivo* Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of *Leishmania*. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 2, p. 339–348, maio 1997.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, jun. 2013.

MARTINS, V. T. *et al.* Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 3, p. 1-9, mar. 2013.

MARTÍNEZ-SALAZAR, B. *et al.* Evaluation of a New Topical Treatment for the Control of Cutaneous Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1-16, nov. 2020.

MASPI, N. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, set. 2016.

MATOS, A.P.S. *et al.* A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 1-17, mar. 2020.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM.**, v. 107, n. 1, p. 7–14. jan. 2014.

MEHEUS, F. *et al.* Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. 1-9, set. 2010.

MEHRIZI, T. Z. *et al.* Comparative analysis between four model nanoformulations of amphotericin B-chitosan, amphotericin B-dendrimer, betulinic acid-chitosan and betulinic acid-dendrimer for treatment of *Leishmania major*: real-time PCR assay plus. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p. 7593–7607, set. 2019.

MENEZES, J. P. *et al.* The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 264, p. 1-8, maio 2016.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2005. cap. 7, p. 41-46.

MODABBER, F. *et al.* Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13–15 June, 2006. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 6, n. 3, p. 1-24, abr. 2007.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232-246, mar. 2019.

- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-1404, maio 2015.
- MORAIS-TEIXEIRA, E. *et al.* Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 70, n. 12, p. 3283 – 3290, dez. 2015.
- MUKHERJEE, A. *et al.* Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 1-10, jan. 2006.
- MURRAY, H. W. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185-2197, ago. 2001.
- NASSIF, P. W. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology**, v. 144, n. 08, p. 995–1004, jul. 2017.
- NEAL, R. A. *et al.* Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v.88, n. 2, p. 223-225, abr. 1994.
- NEIRA, L. F. *et al.* Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 74, n. 6, p. 1634-1641, fev. 2019.
- NEVA, F. A. *et al.* Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 473–475, ago.1997.
- NGUYEN, A. K. *et al.* Microneedle-Based Delivery of Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Biomed Microdevices**, v. 21, n. 8, p. 1-10, jan. 2019.
- NILFOROOSHADEH, M. A., *et al.* Topical Fluconazole Combined with Local Glucantime Injection Compared with Local Glucantime Injections in Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 28, n. 118, p. 1-9, fev. 2011.
- O’GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 425-428, jun. 2007.
- OLIVEIRA, B. C. de *et al.* Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 919-930, nov. 2019.
- OLIVEIRA, D. M. *et al.* Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. **Parasitol Res**, v. 110, n. 3, p. 1277-1285, mar. 2012.

OLIVEIRA, L.F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop.**, v. 118, n. 2, p. 87-96, maio 2011.

OLIVERI, V.; VECCHIO, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. **Eur J Med Chem.**, v. 120, p. 252-274, set. 2016.

ORGANIZAÇÃO Mundial da Saúde. Programa Internacional de Segurança Química. **Biomarcadores e avaliação de risco: conceitos e princípios**. Genebra: OMS, v. 155. 1993. Disponível em: < <https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm#SectionNumber:6.3>>. Acesso em: 22 dez. 2021.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. s10-s18, nov. 2018.

PALUMBO, E. Treatment Strategies for Mucocutaneous Leishmaniasis. **J Glob Infect Dis.**, v.2, n. 2, p. 147-150, ago. 2010.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032-e1039, dez. 2010.

PEREIRA, V. *et al.* Drug-containing hydrophobic dressings as a topical experimental therapy for cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, p. 79-87, mar. 2020.

PIGOTT, D. M. *et al.* Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLIFE**, v 3, n. e02851, p. 1-21, jun. 2014.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, nº 7-8, p. 79-82, 2004.

PIPPI, B. *et al.* Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. **Medical Mycology**, v. 55, n. 7, p. 763-773, out. 2017.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Journal List PLoS Negl Trop Dis.**, v.11, n.12, p.1-24, dez. 2017.

PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.* 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 1157-1178, out. 2013.

PRAMANIK, K. P. *et al.* Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p.1-11, set. 2019.

PRATI, F. *et al.* Novel 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Multitarget Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1284-1295, jun.2016.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nat Biotechnol.**, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, nov. 2008.

PUBCHEM. **8-Hydroxyquinoline**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8-Hydroxyquinoline>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

RAVIS, W. R. *et al.* Pharmacokinetics and Absorption of Paromomycin and Gentamicin from Topical Creams Used To Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 10, p. 4809-4815, out. 2013.

REIS, D.C. *et al.* Investigation on the pharmacological profile of antimony(III) complexes with hydroxyquinoline derivatives: anti-trypanosomal activity and cytotoxicity against human leukemia cell lines. **Biometals**, v. 24, n. 4, p. 595–601, jan. 2011.

REIS, L. de C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, ago. 2006.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-1262, nov. 1903.

SAADEH, H. A. *et al.* Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 1-26, set. 2020.

SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, New York, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, nov. 2002.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The Immunology of Susceptibility and Resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, nov. 2002.

SALAH, A. B. *et al.* Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. **The new england journal of medicine**, v. 368, p. 524-532, fev. 2013.

SALAH, A. B. *et al.* WR279,396, a Third Generation Aminoglycoside Ointment for the Treatment of *Leishmania major* Cutaneous Leishmaniasis: A Phase 2, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 5 e432, p. 1-9, maio 2009.

SALAIZA-SUAZO, N. *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Trop. Med. Int. Health**, v. 4, n. 12, p. 801–811, dez1999.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of Interferon-g During Innate and Adaptive Immune Responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p. 41-101, 2007.

SCHUBACH, A. *et al.* Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 911–914, set. 1998.

SCORZA, B. M. *et al.* Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int J Mol Sci.**; v. 18, n. 6, p. 1-26, jun. 2017.

SCOTT, P. *et al.* Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, nov. 1988.

SCOTT, P. *et al.* Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunology Review**, v. 112, p. 161-182, dez.1989.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 16, n. 9, p. 581-592, jul. 2016.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **Open Med Chem J.**, v. 5, p. 31-39, 2011.

SHAW, A. Y. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of 8-hydroxyquinoline-derived Mannich bases as anticancer agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2860-2867, mar. 2010

SHEN, A. Y., *et al.* Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Some 8-Hydroxyquinoline Derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 5, p. 543–548, maio 1999a.

SHEN, A. Y. *et al.* A chelating agent possessing cytotoxicity and antimicrobial activity: 7-morpholinomethyl-8-hydroxyquinoline, **Life Sci.**, v. 64, n. 9, p. 813–825, 1999b.

SILVA, T. U. da *et al.* Estudo teórico de potenciais agentes para o tratamento da doença de alzheimer derivados da 8-hidroxiquinolina com substituintes do tipo N-Acil-Hidrazona. **Química Nova**, v.41, n.10, p. 1132-1139, dez. 2018.

SILVA, T. U.; MACHADO, S. de P. Estudo eletrônico da reatividade da 8-hidroxiquinolina substituída frente ao sítio de ligação do peptídeo β -amiloide ao íon zinco. **Química Nova**, v.42, n.8, p. 885-890, ago. 2019.

SINGH, N. *et al.* Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.5, n.6, p. 485–497, jun. 2012.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n.5, p. 1-8, maio 2010.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, set. 2003.

SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.* Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, jun. 2004.

SONG, Y. *et al.* 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. **MedChemComm**, v. 6, n. 1, p. 61-74, 2015.

SOSA, A. M. *et al.* Efficacy of Topical Treatment with (-)-Epigallocatechin Gallate, A Green Tea Catechin, in Mice with Cutaneous Leishmaniasis. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1-9, abr. 2020.

SPINELLI, M. O. *et al.* Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério da faculdade de medicina da USP. **Ver Soc Bras Ciên Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 76-81, mar. 2012.

STAUBER, L. A. Host resistance to the kartoum strain of *Leishmania donovani*. **Rince Intitut Pamphect.**, v. 45, n. 1, p. 80-96, 1958.

STEBUT, E. V. Leishmaniose. **JDDG: Journal of the German Dermatological Society**, v. 13, n. 3, p. 191–201. mar. 2015.

STEIMBACH, L. M. *et al.* Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations-A systematic review and meta-analysis. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 146–154, mar. 2017.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 82, p. 1-10, fev. 2017.

STRAZZULLA, A. *et al.* Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, jun. 2013.

SUNDAR, S. *et al.* Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use, **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, ago. 2012.

SUNDAR, S. *et al.* Short-Course, Low-Dose Amphotericin B Lipid Complex Therapy for Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Antimony. **Annals of Internal Medicine**, v. 127, n. 2, p. 133-137, 1997.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787–794, maio 2008.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 16, n. 2, p. 237-252, fev. 2015.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 1-13, set. 2017.

SUNYOTO, T. *et al.* Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, p. 1-10, maio 2018.

SZABO, S. J. *et al.* Regulation of the Interleukin (IL)-12R β 2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells. **J Exp Med.**, v. 185, n. 5, p. 817–824, mar. 1997.

TABELA 1: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p., 2017. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf> Acesso em: 9 jul. 2020.

TASLIMIT, Y. *et al.* Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497-507, abr. 2018.

TAVARES, G. de S. V. *et al.* Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 123, n. 3, p. 236–246, set. 2018.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 1-15, maio 2017.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **JEM.**, v. 204, n. 2, p. 239-243, fev. 2007.

TRINCONI, C. T. *et al.* Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 1-7, mar. 2017.

TRINCONI, C. T. *et al.* Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonenses*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1314–1322, maio 2016.

TUON, F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. **Int J Dermatol**, v. 47, n.2, p. 109–124, fev. 2008.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). **Bula Miltefosine**. 2014. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/204684s000lbl.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2020.

ULIANA, S. *et al.* Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, abr. 2018.

VARIKUTI, S. *et al.* Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Acta Tropica**, v. 173, p. 102-108, set. 2017.

WALLACE, D. R. **Quinoline**. 3. ed. USA: Encyclopedia of Toxicology, 2014.

WARE, J. M. *et al.* Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, c1aa1238, p. 1-6, out. 2020.

World Health Organization (WHO a). **Leishmaniose (2021)**. Disponível em: <
https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 > Acesso em: 06 jul. 2021.

World Health Organization (WHO b). **Leishmaniose (2021)**. Disponível em: <
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> Acesso em: 20 jul. 2021.

ZAMBRANO-VILLA, S., *et al.* How protozoan parasites evade the immune response.
Trends in Parasitology, v. 18, n. 6, p. 272-278, jun. 2002.

ZERPA, O. *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses.
British Journal of Dermatology, v. 156, n. 6, p. 1328-1335, jun. 2007.

ZHAI, S. *et al.* Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. **J Biol Inorg Chem**, v. 15, n. 2, p. 259–269, fev. 2010.

10. ANEXO



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 222/2020

Título do projeto: Utilização de uma formulação tópica contendo 8-Hidroxiquinolina para tratamento da leishmaniose tegumentar em camundongos Balb/c infectados com Leishmania amazonensis.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Mariana Costa Duarte

Unidade: Colegio Técnico

Departamento: Colegio Técnico

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião on-line do dia 09/11/2020. Validade: 09/11/2020 à 08/11/2025

Belo Horizonte, 09/11/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br