

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Juliana Martins Ribeiro

**Estudo pré-clínico dos fármacos letrozol e pamidronato como alternativas  
terapêuticas para tratamento da leishmaniose visceral humana**

Belo Horizonte

2021

Juliana Martins Ribeiro

**Estudo pré-clínico dos fármacos letrozol e pamidronato como alternativas terapêuticas para tratamento da leishmaniose visceral humana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes  
Coorientadora: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Belo Horizonte

2021

- 043      Ribeiro, Juliana Martins.  
            Estudo pré-clínico dos fármacos letrozol e pamidronato como alternativas terapêuticas para tratamento da leishmaniose visceral humana [manuscrito] / Juliana Martins Ribeiro. – 2021.  
            131 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes. Coorientadora: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal.  
            Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.
1. Farmacologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Reposicionamento de Medicamentos. I. Fagundes, Elaine Maria de Souza. II. Pascoal, Vanessa Peruhype Magalhães. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:  
Fisiologia e Farmacologia

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 330**

**"Estudo Pré-clínico dos Fármacos Letrozol e Pamidronato  
Como Alternativas Terapêuticas Para Tratamento da Leishmaniose Visceral Humana"**

**JULIANA MARTINS RIBEIRO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **29 de janeiro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt - DECBIO/UFOP**

**Prof. Dr. Edward José de Oliveira - IRR/FIOCRUZ**

**Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares - ICB/UFMG**

**Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar - FaFar/UFMG**

**Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes - ICB/UFMG - Orientadora**

**Profa. Dra. Vanessa Peruhype M. Pascoal - IRR/FIOCRUZ - Coorientadora**

Belo Horizonte, 29 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, Usuário Externo**, em 29/01/2021, às 14:35, 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 **Edward José de Oliveira, Usuário Externo**, em 01/02/2021, às 13:18, 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 **Elaine Maria de Souza Fagundes, Professora do Magistério Superior**, em 02/02/2021, às 09:55, 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 **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 03/02/2021, às 12:05, 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 **Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal, Usuário Externo**, em 03/02/2021, às 14:52, 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 **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 09/02/2021, às 21:50, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0527181** e o código CRC **61E87974**.

---

## **ORIENTAÇÃO**

Orientadora: Dra. Elaine Maria de Souza-Fagundes (DFIB/ICB/UFMG)

Coorientadora: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (GIPB – IRR)

## **COLABORADORES**

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães

Instituto René Rachou – IRR

Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores - GIPB

Dra. Andréa Teixeira Carvalho

Dra. Marcela de Lima Moreira

Dra. Marina Luiza Rodrigues Alves

Grupo de Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* – GFP

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias - PCPP

Dra. Eliane de Moraes Teixeira

Doutoranda Lindicy Leidicy Alves

## **LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO**

Laboratório de Biologia Celular e Molecular - UFMG

Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores – GIPB - IRR

Grupo de Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* - GFP  
- IRR

Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias –  
PCPP - IRR

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

Dedico esse trabalho à minha mãe, Raquel, por todo incentivo. E ao meu marido, Waltinho, por todo apoio e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela fonte inesgotável de amor e esperança.

À Elaine, por ter me recebido como sua aluna. Por toda compreensão nos momentos difíceis. Pela oportunidade de realização desse trabalho, confiança e por me proporcionar novas oportunidades de conhecimento.

À Vanessa, por ter me acolhido gentilmente como aluna. Pela compreensão nos momentos difíceis, oportunidade de realização desse trabalho, por todos os ensinamentos e pela confiança.

À Dra. Andrea Teixeira, pela contribuição científica e colaboração.

À Dra. Silvane Murta, por todo o apoio científico e colaboração.

À Dra. Eliane Teixeira, por todo o suporte e colaboração nos experimentos com os animais.

À Lindicy, pelos ensinamentos e colaboração com os experimentos com os animais.

Aos Drs. Pedro Guimarães, Edward Oliveira e Rodolfo Giunchetti, pela colaboração neste projeto.

À Marcela e Marina, por todo o auxílio e contribuição nas análises de citometria de fluxo.

Aos amigos da UFMG, especialmente, Vanessa, Fernando, Igor, Letícia, Fernanda, Jonas, Leidiane e Brian, pela convivência agradável e divertida.

A todos do GIPB, principalmente a Jaque, Marina, Andreza e Inara, pela recepção e auxílio durante a realização dos experimentos.

À plataforma de citometria do IRR, especialmente a Tiza, Dayane e Lorena, por toda a ajuda durante a aquisição dos dados.

À minha família, meu pai Geraldo, minhas irmãs Mariana e Poliana, e meus queridos sobrinhos, Kauã, Caio, Caroline, Cristian e Franco e, especialmente à minha mãe, Raquel, pelo amor e incentivo.

Ao Waltinho, pelo amor, incentivo, cuidado, carinho e paciência.

Às minhas amigas, Nadiane e Marcela, por todo apoio, incentivo e amizade.

À UFMG e ao Instituto René Rachou por toda estrutura oferecida.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelos serviços prestados.



Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse concluído. Obrigada!

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa causada, no Brasil, pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e, atualmente, não existem vacinas e/ou terapias profiláticas para a LV em humanos, sendo as abordagens farmacológicas atualmente utilizadas, oriundas do processo de reposicionamento de fármacos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar estudo pré-clínico dos fármacos anticâncer letrozol (LET) e pamidronato (PAM), visando identificar novas opções terapêuticas para tratamento da LV humana. A atividade antileishmania, *in vitro*, dos fármacos foi avaliada por meio das atividades antipromastigota e anti-amastigota de *L. infantum*, com avaliação da citotoxicidade celular e produção de óxido nítrico (NO), por 72 horas. No contexto *ex vivo*, as atividades antileishmania e imunomoduladora dos fármacos foram avaliadas utilizando-se leucócitos do sangue periférico humano, que foram incubados com *L. infantum*, e com LET e PAM, por 6 horas. A atividade antileishmania foi avaliada em monócitos clássicos e não clássicos, e neutrófilos ativados e não ativados. Também, aspectos fenotípicos-funcionais foram avaliados nas subpopulações de monócitos e neutrófilos, bem como linfócitos T CD8<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup> e B. O potencial antileishmania de LET e PAM *in vivo* foi avaliado por meio da quantificação da carga parasitária do baço e fígado, em camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*, e a atividade imunomoduladora foi avaliada por meio da quantificação de citocinas séricas. A análise dos resultados *in vitro* mostrou que ambos os fármacos apresentaram atividade antipromastigota, observando-se formação de vacúolos no citoplasma das promastigotas, bem como alteração na morfologia do cinetoplasto e mitocôndria. Foi observado que LET e PAM promoveram redução tanto da quantidade de macrófagos infectados quanto das amastigotas intracelulares, de maneira concentração dependente. Não foi observada produção de NO, e nas condições avaliadas, LET e PAM, apresentaram viabilidade celular acima de 70%. Pelo modelo *ex vivo* utilizado, usando leucócitos humanos, LET e PAM promoveram redução das formas internalizadas de *L. infantum* na subpopulação de monócitos clássicos. A caracterização fenotípica das subpopulações de monócitos e neutrófilos evidenciou que o tratamento promoveu aumento da expressão de HLA-DR nos monócitos, e a expressão dos receptores do tipo Toll (TLR) 2 foi elevada e de TLR-4 reduzida, em todos os tratamentos, na subpopulação de monócitos clássicos. Também não foi observada produção de NO por esta metodologia. LET e PAM promoveram aumento de IL-12, e redução de IL-10 e TGF- $\beta$ , pelos monócitos e neutrófilos. Foi demonstrado aumento de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>, e de TNF pelos linfócitos B, bem como redução de IL-10 pelas subpopulações de linfócitos avaliadas. E por meio das análises de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível sugerir que LET e PAM promovem danos às amastigotas intracelulares. Os resultados *in vivo* mostraram que LET na dose de 2,0 mg/Kg e PAM a 10,0 mg/Kg promoveram redução da carga parasitária do fígado. Diante dos resultados obtidos, demonstramos que LET e PAM podem ser elegíveis para avaliação como potenciais alternativas terapêuticas e/ou como protótipos para tratamento da leishmaniose visceral humana.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral humana; reposicionamento de fármacos; letrozol; pamidronato.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious disease caused in Brazil by the species *Leishmania (Leishmania) infantum* and, currently, there are no vaccines and/or prophylactic therapies for VL in humans, and the pharmacological approaches currently used, originating from the process drug repositioning. In this context, the objective of the present study was to carry out a preclinical study of the anticancer drugs letrozole (LET) and pamidronate (PAM), aiming to identify new therapeutic options for the treatment of human VL. The antileishmania activity of the drugs *in vitro* was evaluated by means of the antipromastigote and anti-amastigote activities of *L. infantum*, with evaluation of cell cytotoxicity and production of nitric oxide (NO), for 72 hours. In the *ex vivo* context, the antileishmania and immunomodulatory activities of the drugs were evaluated using leukocytes from human peripheral blood, which were incubated with *L. infantum*, and with LET and PAM, for 6 hours. Antileishmania activity was evaluated in classic and non-classic monocytes and activated and non-activated neutrophils. Also, phenotypic-functional aspects were evaluated in monocyte and neutrophil subpopulations, as well as CD8<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes. The antileishmania potential of LET and PAM *in vivo* was evaluated by quantifying the parasitic load of the spleen and liver, in Balb/c mice infected with *L. infantum*, and immunomodulatory activity was assessed by quantifying serum cytokines. The analysis of the results *in vitro* showed that both drugs showed antipromastigote activity, observing the formation of vacuoles in the cytoplasm of the promastigotes, as well as changes in the morphology of the kinetoplast and mitochondria. It was observed that LET and PAM reduced both the number of infected macrophages and the intracellular amastigotes, in a concentration-dependent manner. NO production was not observed, and in the evaluated conditions, LET and PAM, presented cell viability above 70%. By the *ex vivo* model used, using human leukocytes, LET and PAM reduced the internalized forms of *L. infantum* in the subpopulation of classic monocytes. The phenotypic characterization of monocyte and neutrophil subpopulations showed that the treatment promoted an increase in the expression of HLA-DR in monocytes, and the expression of Toll-like receptors (TLR) 2 was high and that of TLR-4, in all treatments, in the subpopulation of classic monocytes. Nor was NO production observed by this methodology. LET and PAM promoted an increase in IL-12, and a reduction in IL-10 and TGF- $\beta$ , by monocytes and neutrophils. An increase in IFN- $\gamma$  by CD8<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, and TNF by B-lymphocytes was demonstrated, as well as a reduction in IL-10 by the evaluated lymphocyte subpopulations. And through transmission electron microscopy analyzes, it was possible to suggest that LET and PAM promote damage to intracellular amastigotes. The *in vivo* results showed that LET at 2.0 mg/kg and PAM at 10.0 mg/kg promoted a reduction in the parasitic burden of the liver. In view of the results obtained, we demonstrated that LET and PAM may be eligible for evaluation as potential therapeutic alternatives and/or as prototypes for the treatment of human visceral leishmaniasis.

**Keywords:** human visceral leishmaniasis; drug repositioning; letrozole; pamidronate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de transmissão das leishmanioses.....	26
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos antimoniais.....	31
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da anfotericina B.....	32
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da miltefosina.....	33
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do sulfato de paromomicina.....	34
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do letrozol.....	36
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática simplificada da via de síntese dos hormônios esteróides a partir dos tecidos adiposos periféricos e a inibição da enzima aromatase pelo letrozol. ....	37
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do pamidronato dissódio.....	38
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática simplificada da via do mevalonato e a inibição da enzima farnesil-pirofosfato sintase pelo pamidronato.....	39
<b>Figura 10.</b> Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmania dos fármacos letrozol e pamidronato <i>in vitro</i> ....	41
<b>Figura 11.</b> Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora <i>ex vivo</i> dos fármacos letrozol e pamidronato, utilizando sangue periférico humano incubado na presença de <i>L. infantum</i> , por meio de análises multiparamétricas por citometria de fluxo.....	46
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora, por citometria de fluxo.....	53
<b>Figura 14.</b> Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por fagócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo.....	55
<b>Figura 15.</b> Análise da qualidade da leitura das amostras, por citometria de fluxo.....	57
<b>Figura 16.</b> Análise da população de monócitos do sangue periférico humano, por citometria de fluxo.....	58
<b>Figura 17.</b> Análise da população de neutrófilos do sangue periférico humano, por citometria de fluxo.....	60
<b>Figura 18.</b> Análise da população de linfócitos, por citometria de fluxo.....	62

- Figura 19.** Análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por monócitos e neutrófilos do sangue periférico, por citometria de fluxo. ....63
- Figura 20.** Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c.....64
- Figura 21.** Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora dos fármacos letrozol e pamidronato *in vivo*.....67
- Figura 22.** Avaliação da atividade antipromastigota dos fármacos (A) anfotericina B (ANFB), (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), após 72 horas de tratamento.....68
- Figura 23.** Avaliação ultraestrutural e subcelular das formas promastigotas de *L. infantum* por microscopia eletrônica de transmissão, da (A-B) cultura controle (sem tratamento); e promastigotas tratadas com as respectivas  $CI_{50}$  de (C) Anfotericina B, (D-E) letrozol e (F-G) pamidronato, após 72 horas.....70
- Figura 24.** Avaliação da atividade antiamastigota dos fármacos anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM).....71
- Figura 25.** Figuras representativas dos macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *L. infantum* (controle) e tratados com diferentes concentrações, por 72 horas, com anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM) .....72
- Figura 26.** Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos derivados de células THP-1 (CC), infectados com *L. infantum* (CF) e após tratamento com (A) anfotericina B (ANFB), (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), por 72 horas.....73
- Figura 27.** Avaliação da viabilidade de macrófagos derivados de células THP-1, após tratamento com os fármacos (A) anfotericina B (ANFB), (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), por 72 horas.....74
- Figura 28.** Avaliação da viabilidade celular de (A) monócitos ( $CD14^{+}LiveDead^{low}$ ), (B) neutrófilos ( $CD16^{+}LiveDead^{low}$ ) e (C) linfócitos ( $Linfócitos^{+}LiveDead^{low}$ ) de indivíduos (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....75
- Figura 29.** Avaliação da atividade antileishmania em (A) monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), (B) não clássicos ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), (C) neutrófilos ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{+}$ ) e (D) não ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....76
- Figura 30.** Avaliação do perfil de expressão do receptor CD14 nos (A) monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ) e nos (B) não clássicos ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), e da molécula de ativação HLA-DR nos (C) monócitos clássicos, (D) monócitos não clássicos, (E) neutrófilos ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{+}$ ) e (F) neutrófilos não ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ), do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....78
- Figura 31.** Avaliação do perfil de expressão dos receptores do tipo Toll (TLR) 2 e 4 por monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), não clássicos ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) e por neutrófilos ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{+}$ ) e não ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ) do sangue periférico de

doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....80

**Figura 32.** Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por (A) monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), (B) não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e por (C) neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e (D) não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET), pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....81

**Figura 33.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF intracitoplasmáticas, pelos monócitos totais (CD14<sup>+</sup>) e por neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....83

**Figura 34.** Avaliação do perfil de produção de citocinas moduladoras TGF- $\beta$  e IL-10 intracitoplasmáticas, pelos monócitos totais (CD14<sup>+</sup>) e por neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....84

**Figura 35.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF intracitoplasmáticas, pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....86

**Figura 36.** Avaliação do perfil de produção de citocinas moduladoras IL-4 e IL-10 intracitoplasmáticas, pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....87

**Figura 37.** Avaliação ultraestrutural e subcelular das formas promastigotas de *L. infantum* (PRO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e de leucócitos do sangue periférico humano por MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET) do controle de células (CC), do controle de fagocitose (CF) e com os tratamentos com anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura.....89

**Figura 38.** Avaliação ultraestrutural das formas promastigotas de *L. infantum* por microscopia eletrônica de varredura, da (A-B) cultura controle (sem tratamento), e tratadas com (C-D) Anfotericina B 25  $\mu$ M; (E-F) letrozol 100  $\mu$ M e (G-H) pamidronato 100  $\mu$ M, após 6 horas de cultura.....91

**Figura 39.** Avaliação da carga parasitária no (A) baço e no (B) fígado de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal, letrozol (LET) nas doses de 2,0, 1,0 e 0,2 mg/Kg/dia, via gavagem e diluente CMC 0,5% via gavagem, durante 5 dias consecutivos.....92

**Figura 40.** Avaliação da carga parasitária no (A) baço e no (B) fígado de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia e pamidronato (PAM) 10,0 mg/Kg/dia, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos.....93

**Figura 41.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro de camundongos Balb/c (n=6)

infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal, letrozol (LET) nas doses de 2,0, 1,0 e 0,2 mg/Kg/dia, via gavagem e diluente CMC 0,5% via gavagem, durante 5 dias consecutivos.....94

**Figura 42.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia e pamidronato (PAM) 10,0 mg/Kg/dia, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos.....95

**Figura 43.** Síntese dos resultados obtidos da avaliação da toxicidade celular e das atividades anti-mastigota e anti-promastigota *in vitro* dos fármacos letrozol e pamidronato.96

**Figura 44.** Síntese dos resultados referentes ao potencial antileishmania e imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato, em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*.....97

**Figura 45.** Síntese dos resultados referentes ao potencial imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato em linfócitos T CD8<sup>-</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*.....98

**Figura 46.** Síntese os resultados referentes à eficácia e potencial imunomodulador *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato, através da quantificação da carga parasitária no baço e no fígado e da dosagem de citocinas séricas.....99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais características dos medicamentos utilizados para tratamento da LV.....	35
<b>Tabela 2.</b> Perfil hematológico e caracterização dos doadores saudáveis voluntários ....	47
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos de superfície celular utilizados para caracterização imunofenotípica das subpopulações de monócitos, neutrófilos e linfócitos.....	51
<b>Tabela 4.</b> Anticorpos utilizados para avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas.....	52
<b>Tabela 5.</b> Concentração inibitória (CI <sub>50</sub> ) dos fármacos letrozol e pamidronato contra as formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	69
<b>Tabela 6.</b> Concentrações inibitória (CI <sub>50</sub> ) e citotóxica (CC <sub>50</sub> ), e índice de seletividade (IS) dos fármacos letrozol e pamidronato contra as formas amastigotas intracelulares e macrófagos derivados de células THP-1.....	74



## LISTA DE ABREVIACOES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
BFA	Brefeldina A
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL2	Ligante de Quimiocina 2 ( <i>C-C motif chemokine ligand-2</i> )
CD	Grupo de diferenciação ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
CR	Receptor de Complemento
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico ( <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i> )
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-Diaminofluorescena
DAF-2T	Triazolofluorescena
DNA	cido Desoxirribonucléico
DNT	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	cido Etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSC	Tamanho Celular
HCl	cido Clordrico
HLA-DR	Antgeno Leucocitrio Humano
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23

IMF	Intensidade Média de Fluorescência
IRR	Instituto René Rachou
kV	Kilovolt
LIT	Liver infusion triptose
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
M	Molar
MCP-1	Proteína Quimioatrate de Monócito 1 ( <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFF	Solução Fixadora
mg	Miligrama
MIP-1 $\beta$	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 ( <i>Macrophage inflammatory protein-1<math>\beta</math></i> )
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3,4,5-dimetil-2-triazolil-2,5-difeniltetrazólio
ng	Nanograma
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS 1x	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2
PBS-W	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina
PD-1	Proteína de Morte Celular Programada 1
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila piridinina
pH	Potencial hidrogênico
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RNA	Ácido Ribonucleico

Sb <sup>III</sup>	Antimonial trivalente
Sb <sup>V</sup>	Antimonial pentavalente
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Granulosidade celular
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	23
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. Objetivo geral .....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1. Aspectos gerais das leishmanioses .....	25
3.2. Leishmaniose visceral .....	27
3.3. Aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral .....	27
3.4. Reposicionamento de fármacos .....	30
3.5. Fármacos atualmente utilizados para tratamento da leishmaniose visceral .....	31
3.5.1. Antimoniais pentavalentes .....	31
3.5.2. Anfotericina B .....	32
3.5.3. Milteosina .....	33
3.5.4. Sulfato de paromomicina .....	34
3.6. Uso de terapias anticâncer como alternativas terapêuticas para leishmaniose visceral.....	35
3.6.1. Letrozol .....	36
3.6.2. Pamidronato dissódio .....	38
4. METODOLOGIA .....	41
4.1. Fármacos .....	41
4.2. Avaliação da citotoxicidade celular e das atividades antiamastigota e antipromastigota <i>in vitro</i> dos fármacos letrozol e pamidronato .....	41
4.2.1. Obtenção das formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e cultivo das células THP-1 .....	41
4.2.2. Avaliação da atividade antipromastigota .....	42
4.2.2.1. Avaliação das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão .....	42
4.2.3. Avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos derivados de células THP-1 .....	43
4.2.4. Avaliação da atividade antiamastigota .....	44
4.2.4.1. Dosagem de óxido nítrico .....	45
4.2.5. Índice de seletividade .....	45
4.3. Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato por meio de modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano incubados com <i>L. infantum</i> no contexto <i>ex vivo</i> .....	45
4.3.1. Aspectos éticos .....	46
4.3.2. Obtenção das amostras de sangue periférico .....	46
4.3.3. Caracterização da população de estudo .....	47
4.3.4. Obtenção das formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> e marcação com Alexa Fluor 647 (AF647) .....	47
4.3.5. Preparação das amostras de sangue, avaliação da toxicidade celular, do potencial antileishmania e do perfil fenotípico-funcional em leucócitos do sangue periférico .....	49

4.3.6.	Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por fagócitos do sangue periférico humano, incubados com <i>L. infantum</i> e tratados ou não com os fármacos anticâncer .....	53
4.3.7.	Avaliação das alterações ultraestruturais e subcelulares por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura .....	55
4.3.8.	Estratégias de análise dos dados obtidos nos experimentos <i>ex vivo</i> utilizando leucócitos do sangue periférico humano, incubados com <i>L. infantum</i> e tratados ou não com os fármacos, por citometria de fluxo .....	56
4.3.8.1.	Estratégias de análise multiparamétrica de monócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo .....	56
4.3.8.2.	Estratégias de análise multiparamétrica de neutrófilos do sangue periférico, por citometria de fluxo .....	59
4.3.8.3.	Estratégias de análise multiparamétrica de linfócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo .....	61
4.3.8.4.	Estratégias de análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por monócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo .....	62
4.4.	Avaliação do potencial imunomodulador e da eficácia <i>in vivo</i> dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental .....	64
4.4.1.	Aspectos éticos .....	64
4.4.2.	Obtenção das formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	64
4.4.3.	Animais .....	65
4.4.4.	Infecção, tratamento e eutanásia dos animais .....	65
4.4.5.	Diluição limitante .....	65
4.4.6.	Quantificação de citocinas séricas, por citometria de fluxo .....	66
4.5.	Análise estatística dos dados .....	67
5.	RESULTADOS .....	68
5.1.	Avaliação da citotoxicidade celular e das atividades antipromastigota e antipromastigota <i>in vitro</i> dos fármacos letrozol e pamidronato .....	68
5.1.1.	Avaliação da atividade antipromastigota .....	68
5.1.2.	Avaliação da atividade antimastigota .....	71
5.1.3.	Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados de células THP-1 .....	73
5.2.	Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador do letrozol e pamidronato usando modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano, incubados com <i>L. infantum</i> , no contexto <i>ex vivo</i> .....	75
5.2.1.	Avaliação da citotoxicidade celular em leucócitos do sangue periférico .....	75
5.2.2.	Avaliação do potencial antileishmania dos fármacos letrozol e pamidronato nos monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	76
5.2.3.	Caracterização dos aspectos fenotípicos dos monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	77
5.2.3.1.	Avaliação da expressão do receptor CD14 por monócitos e da molécula de ativação HLA-DR por monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	77
5.2.3.2.	Avaliação da expressão dos receptores tipo Toll 2 e 4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	79
5.2.4.	Caracterização da produção de óxido nítrico intracelular por monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	81
5.2.5.	Caracterização do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	82

5.2.5.1.	Perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	82
5.2.5.2.	Perfil de produção de citocinas moduladoras por monócitos e neutrófilos do sangue periférico .....	83
5.2.6.	Caracterização do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos do sangue periférico .....	85
5.2.6.1.	Perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos do sangue periférico .....	85
5.2.6.2.	Perfil de produção de citocinas moduladoras por linfócitos do sangue periférico .....	86
5.2.7.	Avaliação das alterações ultraestruturais e subcelulares por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura .....	88
5.3.	Avaliação do potencial imunomodulador e da eficácia <i>in vivo</i> dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental .....	92
5.3.1.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> dos fármacos letrozol e pamidronato .....	92
5.3.2.	Caracterização do perfil de citocinas séricas .....	93
5.4.	Resumo dos resultados .....	95
5.4.1.	Avaliação da toxicidade celular e das atividades anti-amastigota e anti-promastigota <i>in vitro</i> dos fármacos letrozol e pamidronato .....	95
5.4.2.	Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador do letrozol e pamidronato, usando modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano incubados com <i>L. infantum</i> , no contexto <i>ex vivo</i> .....	96
5.4.3.	Avaliação da eficácia e do potencial imunomodulador <i>in vivo</i> dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental .....	98
6.	DISCUSSÃO .....	100
7.	CONCLUSÃO .....	112
8.	PERSPECTIVAS .....	113
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114
ANEXOS	.....	126

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças tropicais continuam a assolar comunidades pobres nos países em desenvolvimento, devido, em grande parte, à falta de políticas públicas eficientes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças tropicais negligenciadas (DTN), são doenças que incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida. As leishmanioses compreendem uma das DTN, ocupando o segundo e o quarto lugar, em mortalidade e em morbidade, respectivamente (WHO, 2020).

A ausência de vacinas para humanos e programas que apresentem eficácia no controle vetorial faz com que a quimioterapia seja uma das principais medidas utilizadas para o controle de todas as formas clínicas da doença. Até o momento, não existe terapêutica ideal para as leishmanioses, as opções são limitadas e insuficientes e os principais desafios são baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (Guido et al., 2010; Murray, 2010). Esse cenário é agravado pelo número limitado de medicamentos e pela falta de inovação nos programas de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (P&D) na área de doenças negligenciadas (Nwaka & Hudson, 2006). Dessa forma, é essencial a concentração de esforços globais (governo – academia – indústria) para a criação e manutenção de programas de P&D, descoberta de novas alternativas terapêuticas e controle para tratamento dessas doenças (Guido et al., 2010).

Considerando os desafios encontrados para os tratamentos disponíveis das leishmanioses humanas, busca-se em novas alternativas terapêuticas respostas resolutivas a essas questões. Neste contexto, nosso grupo tem realizado pesquisas que visam a identificação de novas opções quimioterápicas para as leishmanioses, especialmente para tratamento da leishmaniose visceral, utilizando abordagem de reposicionamento de fármacos antitumorais e imunomoduladores, por meio de avaliação pré-clínica, envolvendo a caracterização da atividade antileishmania no contexto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo pré-clínico dos fármacos anticâncer letrozol e pamidronato, visando identificar novas opções terapêuticas para tratamento da leishmaniose visceral humana.

### 2.2 Objetivos específicos

Em relação aos fármacos letrozol e pamidronato:

- Avaliar *in vitro* as atividades antipromastigota e anti-amastigota de *L. infantum*, bem como a citotoxicidade, em modelo de macrófagos derivados de células THP-1;
- Avaliar as alterações ultra estruturais e subcelulares nas formas promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar em modelo *ex vivo* o potencial antileishmania em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano incubados com formas promastigotas de *L. infantum*;
- Caracterizar o perfil de citotoxicidade e fenotípico-funcional de monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* e após tratamento com os fármacos;
- Caracterizar o perfil de citotoxicidade e fenotípico-funcional de linfócitos B e T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* e após tratamento com os fármacos;
- Avaliar as alterações ultraestruturais e subcelulares dos leucócitos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* e após tratamento com os fármacos;
- Verificar a eficácia *in vivo* em modelo de leishmaniose visceral experimental, por meio da quantificação da carga parasitária do baço e fígado;
- Caracterizar o potencial imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato *in vivo*, por meio da quantificação de citocinas presentes no soro.



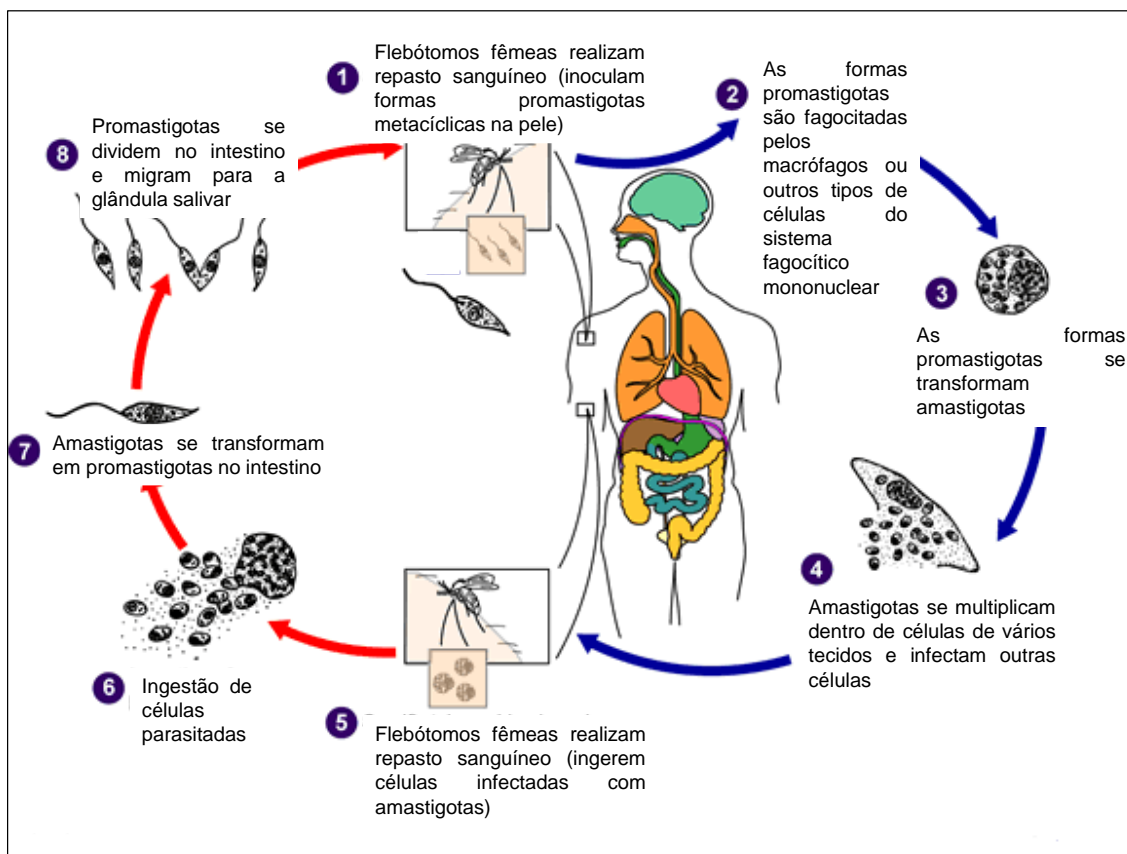
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Ross, 1903). São encontradas em populações de mais de 90 países, compreendidos em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa (WHO, 2020). Pessoas de todas as idades podem adquirir leishmaniose se morarem ou viajarem para áreas endêmicas e a transmissão é mais comum em áreas rurais, mas pode ser encontrada na periferia de algumas cidades (WHO, 2020).

A *Leishmania* é transmitida para os humanos por meio da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectados (gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo) (Georgiadou et al., 2015; WHO, 2020). As formas promastigotas metacíclicas presentes na glândula salivar desses insetos são introduzidas na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado durante a repasto sanguíneo. Neste local os parasitos são fagocitados pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Uma vez fagocitados, os parasitos se transformam em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo das células do SFM, dentre as quais, os macrófagos. No interior destas células as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária e são as responsáveis pelas infecções, que podem acarretar lesões cutâneas e viscerais (Conceição-Silva & Alves, 2014) (Figura 1). Na sequência da transmissão, durante a hematofagia, os flebotomíneos podem ingerir formas amastigotas do hospedeiro infectado, que são transformadas em formas promastigotas metacíclicas, que irão se instalar na glândula salivar do inseto, o que permite a transmissão do protozoário para o novo hospedeiro durante um novo repasto sanguíneo (Conceição-Silva & Alves, 2014).

O curso da infecção e as formas clínicas das leishmanioses são definidos tanto por fatores relacionados ao parasito (espécie, cepa, forma evolutiva, número inicial), quanto ao hospedeiro (*status* imunológico e nutricional, idade, presença de co-morbidades) (Conceição-Silva & Alves, 2014). O Ministério da Saúde divide e classifica as leishmanioses em duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).



**Figura 1.** Ciclo de transmissão das leishmanioses. (Adaptado de CDC, 2020)

Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* que podem parasitar o homem (CDC, 2020), pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Vianna* (Bates, 2007). No Brasil, a LT está associada, principalmente, à infecção pelas espécies *Leishmania (Vianna) braziliensis*, *Leishmania (Vianna) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a LV pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (Anversa et al., 2018). Outras espécies, como *Leishmania (Vianna) lainsoni*, *Leishmania (Vianna) naiffi*, *Leishmania (Vianna) shawi* e *Leishmania (Vianna) lindenbergi* também podem provocar quadros de LT, mas são menos comuns (Anversa et al., 2018).

De acordo com a OMS, de 200 países e territórios, 98 foram endêmicos para leishmanioses em 2018. Desses, 68 países são endêmicos tanto para LV quanto para LT, 9 endêmicos somente para LV e 21 somente para LT, estimando-se que cerca de 1 bilhão de pessoas vivam nessas áreas (PAHO, 2020) e que 350 milhões estejam em risco de infecção (PAHO, 2020). Atualmente, calcula-se que mais de 12 milhões de pessoas possuam alguma forma de leishmaniose (PAHO, 2020), com incidência anual entre 0,9-1,6 milhões de novos casos (PAHO, 2020).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, em 2019 foram registrados 15.484 casos de LT, sendo confirmados, em média, 21.000 casos/ano, com um coeficiente de

incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes. Já para a LV, são registrados cerca de 3.500 casos/ano, com um coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes. No ano de 2019, foram confirmados 2.529 casos, com 207 óbitos o que corresponde a uma letalidade de 9,0 % (Ministério da Saúde, 2020).

### **3.2 Leishmaniose visceral**

A leishmaniose visceral, causada pelas espécies de *Leishmania donovani* (principalmente, na Índia e África Oriental) e *Leishmania infantum* (demais regiões do mundo), é a apresentação mais grave da infecção (Conceição-Neto & Silva, 2014), que pode variar desde a forma assintomática até a forma clássica grave, potencialmente fatal. Os sintomas clássicos compreendem febre recorrente, mal-estar e calafrios. Manifesta-se, principalmente, por quadros de esplenomegalia, acompanhados ou não de hepatomegalia (Bhattacharya & Ali, 2013; Conceição-Neto & Silva, 2014; Rodrigues et al., 2016).

Células do sistema fagocítico mononuclear localizadas no baço, fígado, medula óssea e linfonodos apresentam elevado parasitismo. Anemia, trombocitopenia e neutropenia também são frequentes. Na LV clássica grave, icterícia e ascite podem estar presentes, além de trombocitopenia juntamente com depleção de protrombina que podem ocasionar hemorragia severa (Rodrigues et al., 2016). Coinfecções, particularmente HIV, tuberculose e pneumonia bacteriana, tornam-se comuns e são causas frequentes de morte (Dayakar et al., 2019).

Anualmente, estima-se que ocorram, em todo o mundo, entre 50.000 e 90.000 novos casos de LV que, se não tratada, é fatal em 95% dos casos, sendo uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade (WHO, 2020). Em 2018, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

### **3.3 Aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral**

A interação entre os parasitos de *Leishmania* spp. e as células hospedeiras determinam o curso da infecção, incluindo aspectos da resposta imune inata, como primeira linha de defesa (Meira & Gedamu, 2019; Dayakar et al., 2019). Inicialmente, durante repasto sanguíneo, componentes presentes na saliva do inseto promovem recrutamento rápido e sustentado de neutrófilos para o local da inoculação (de Menezes et al., 2016; Meira & Gedamu, 2019). Tem sido observada ativação da via do inflamassoma em neutrófilos levando à produção de IL-1 $\beta$ , citocina pró-inflamatória que atua ampliando o recrutamento de neutrófilos. No local da infecção, essas células desempenham papéis protetores após o

reconhecimento e fagocitose das promastigotas de *Leishmania*, promovendo a morte dos parasitos por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, bem como por meio das redes extracelulares de neutrófilos (NETs), que podem capturar e matar parasitos por um mecanismo que envolve a liberação de cromatina descondensada, histonas e proteínas microbicidas, extracelularmente (de Menezes et al., 2016; Meira & Gedamu, 2019).

Em modelo de leishmaniose visceral experimental murino utilizando *L. infantum*, foi observado que a depleção de neutrófilos não altera a carga parasitária no fígado, mas promove significativo aumento no baço e na medula óssea. A ausência dessas células desencadeou elevada produção de IL-10 e IL-4, com conseqüente comprometimento da resposta imune do tipo 1. Em experimentos *in vitro*, utilizando neutrófilos humanos, essas células promoveram morte da *L. infantum* por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (McFarlane et al., 2008).

Neutrófilos infectados desgranulam e liberam vários mediadores inflamatórios, incluindo MIP-1 $\beta$ /CCL4, quimiocina responsável pelo recrutamento de monócitos/macrófagos (McFarlane et al., 2008; Meira & Gedamu, 2019). Estes por sua vez, ao fagocitarem neutrófilos apoptóticos (“Cavalos de Tróia”), adquirem silenciosamente infecção por amastigotas viáveis (Meira & Gedamu, 2019).

O contato entre o parasito e a célula alvo, promove de maneira facilitada, a entrada de *Leishmania* nos fagócitos mononucleares monócitos/macrófagos (Viana et al., 2018). Essa interação depende de vários receptores de superfície, que reconhecem o parasito diretamente ou opsonizado, como receptores de complemento (CR1 e CR3), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores Fc $\gamma$ . Além disso, a interação do parasito com receptores do tipo Toll, promove internalização e ativação de vias de sinalização que influenciam a resposta imune de monócitos/macrófagos e podem impactar, posteriormente, o curso da infecção (de Menezes et al., 2016; Viana et al., 2018). Considerando que os monócitos/macrófagos são as principais células alvo para *Leishmania*, estas células apresentam papel crucial na doença estando associadas à destruição do parasito e, conseqüentemente, eliminação da infecção, bem como na manutenção e progressão da doença (Giudice et al., 2012). Foi demonstrado que o aumento da infectividade está relacionado aos mecanismos de evasão do parasito, que promovem, dentre outras alterações, a redução da produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio, assim, inibindo a capacidade dos macrófagos de eliminar os parasitos (de Menezes et al., 2016).

Os eventos iniciais que ocorrem no local da infecção, bem como a resposta imune inata do hospedeiro contra os parasitos de *Leishmania*, apresentam papel importante (de Menezes et al., 2016; Dayakar et al., 2019), mas a imunidade mediada por células T e as citocinas produzidas por diferentes tipos celulares desempenham papel crucial no desfecho

da doença (Dayakar et al., 2019). Por exemplo, a produção inicial de IL-12 por células apresentadoras de antígeno (APCs), induzem a produção de IFN- $\gamma$ , por células T, que por sua vez, induzem a ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Rodrigues et al., 2016). Assim, o controle/progressão da infecção está intimamente relacionado à ação coordenada de ambas as imunidades inata e adaptativa, processo esse que demanda precisa regulação. Citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF) e espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico, estão envolvidos na resistência à infecção por *Leishmania*, enquanto uma resposta moduladora, com produção de citocinas como IL-4 e IL-10 se associa ao desenvolvimento/evolução da infecção (Souza et al., 2012; Gollob et al., 2015). Outros fatores importantes relacionados à susceptibilidade à infecção incluem a variação genética e condição nutricional dos indivíduos, que podem influenciar a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção (Meira & Gedamu, 2019).

A resolução da doença é atribuída ao estabelecimento de imunidade mediada por células, especificamente a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4 que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, e as interleucinas IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23 pelos fagócitos, promovendo um microambiente favorável a ativação e eliminação do parasito pelas células infectadas (Meira & Gedamu, 2019). Ao passo que o desenvolvimento de um fenótipo anti-inflamatório está correlacionado com uma resposta tipo 2, com liberação de citocinas, como IL-4, IL-13, IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) (Meira & Gedamu, 2019). A abundância de IL-10 e não a falta de IFN- $\gamma$ , é determinante para a progressão da LV. Elevados níveis de IL-10 inibem parcialmente a produção de IFN- $\gamma$ , mas, principalmente, a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$ , inibindo o receptor do IFN- $\gamma$  presente na superfície celular dos macrófagos (Dayakar et al., 2019).

Além disso, outros subtipos de células T apresentam importante papel na patogênese da leishmaniose visceral, como as células T CD8, células T reguladoras (Treg) e células T<sub>H</sub>17 (Meira & Gedamu, 2019). As células T CD8 produtoras de citocinas pró-inflamatórias e de perforinas e granzimas, medeiam proteção contra os parasitos intracelulares (Kaushal et al., 2014). Os linfócitos T reguladores produtores de IL-10 estão associados com a progressão da doença, visto que diminuem a atividade antiparasitária dos macrófagos (Dayakar et al., 2019). E, as células T<sub>H</sub>17, participam do equilíbrio das citocinas pró-inflamatórias, modulando a imunidade adaptativa, e secretam a citocina IL-17 que contribui para o recrutamento de neutrófilos (Meira & Gedamu, 2019; Dayakar et al., 2019).

O desfecho da LV está intimamente interligado à resposta imune específica gerada pelos órgãos internos, notadamente o fígado e o baço (Meira & Gedamu, 2019). No fígado, as amastigotas são encontradas nas células de Kupffer e a sobrevivência e proliferação destes parasitos estão associados aos baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12. Por outro lado, a

formação de granuloma em torno das células de Kupffer, com infiltração de monócitos, neutrófilos, linfócitos T CD4 e CD8 e produção de TNF, IFN- $\gamma$  e IL-12, com consequente ativação de macrófagos, promovem o controle e posterior eliminação da infecção (Rodrigues et al., 2016; Meira & Gedamu, 2019). Já a progressão da doença no baço, ocorre devido ao aumento da produção de MCP-1/CCL2 e maior expressão do seu ligante, que fazem com que linfócitos T secretem IL-4 que, por sua vez, ativa macrófagos de maneira alternativa. Essas células expressam arginase, que auxilia na biossíntese de poliaminas, que favorecem a sobrevivência e o crescimento do parasito. A elevada expressão de PD-1 e/ou de CTLA-4 contribuem para que as células T CD4 produzam TGF- $\beta$ , com consequente persistência da infecção (Meira & Gedamu, 2019). Também no baço, o controle da infecção ocorre por meio da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  pelas células T que, por conseguinte, promovem ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Rodrigues et al., 2016). Assim, evidências sugerem que o desequilíbrio entre as respostas tipo 1 e tipo 2 são fatores críticos na patogênese da leishmaniose visceral.

### **3.4 Reposicionamento de fármacos**

O processo de descoberta e introdução de novos medicamentos no mercado é longo (cerca de 10 a 15 anos) e caro (entre 2 e 3 bilhões de dólares) (Xue et al., 2018; Charlton et al., 2018; Pushpakom et al., 2018), somado ao fato de que a probabilidade de sucesso é inferior a 10% (Charlton et al., 2018; Xue et al., 2018). No contexto das doenças tropicais negligenciadas, grupo ao qual as leishmanioses estão incluídas, os esforços para uma inovação terapêutica são limitados, pois não é financeiramente/comercialmente viável para as indústrias farmacêuticas, visto que o paciente acometido com leishmaniose possui uma renda de menos de dois dólares por dia (Nwaka & Hudson, 2006; Charlton et al., 2018). Assim, métodos alternativos para a descoberta de novos medicamentos têm sido implementados (Nwaka & Hudson, 2006), e o reposicionamento de fármacos tem sido utilizado como uma estratégia importante (Charlton et al., 2018).

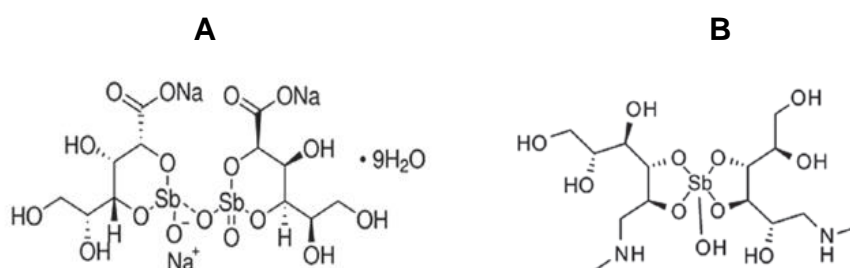
O processo de reposicionamento de fármacos é uma opção efetiva para encontrar novas indicações terapêuticas para medicamentos já existentes e comercializados ou que estão em fase experimental (Xue et al., 2018; Jourdan et al., 2020; Pushpakom et al., 2018). Essa abordagem apresenta várias vantagens, pois os fármacos já estão aprovados pelas agências regulamentadoras, possuem métodos de fabricação estabelecidos, contêm dados acerca da distribuição, absorção, metabolismo, excreção e toxicidade. Além disso, eles já possuem análise de segurança, eficácia e efeitos adversos já estabelecidos pelos ensaios clínicos e dispõem de informações de segurança da fase IV (vigilância pós-comercialização), que são análises de custo elevado e demorados para serem obtidos (Li & Jones, 2012).

### 3.5 Fármacos atualmente utilizados para tratamento da leishmaniose visceral

Não existem vacinas ou terapias profiláticas para a leishmaniose visceral em humanos (Charlton et al., 2018), e as abordagens farmacológicas atualmente utilizadas para tratamento da doença são oriundas do processo de reposicionamento de fármacos (Charlton et al., 2018; Andrade-Neto et al., 2018; Braga, 2019).

#### 3.5.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais desde a antiguidade eram utilizados tanto como cosméticos quanto para tratamento de diversas doenças, como febre tifóide e esquistossomose (Duffin & René, 1991), e foram as primeiras substâncias efetivas para tratamento da leishmaniose visceral, sendo introduzidos em 1945 e permanecendo como medicamento padrão até os dias atuais (Sangshetti et al., 2015). O estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) (Figura 2A) e o antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) (Figura 2B) são os antimoniais atualmente utilizados (Sangshetti et al., 2015; Charlton et al., 2018; Andrade-Neto et al., 2018).



**Figura 2.** Estruturas químicas dos antimoniais. (A) estibogluconato de sódio e (B) antimoniato de meglumina. Fonte: PubChem.

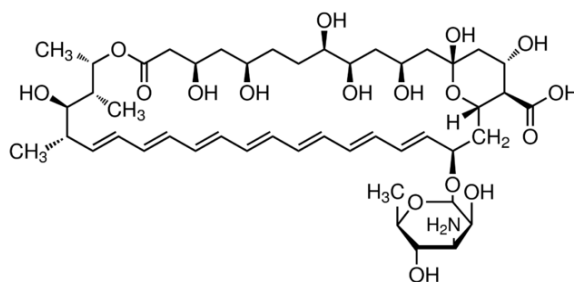
O mecanismo de ação do antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) ainda não é totalmente elucidado, mas é reportado que possa se comportar como pró-fármaco, sendo reduzido à sua forma trivalente ( $Sb^{III}$ ), que exibe atividade antileishmania (Haldar et al., 2011; Sangshetti et al., 2015). Essa conversão, de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  ocorre tanto no macrófago quanto na forma amastigota de *Leishmania*, sendo mediada por tióis presentes nas células dos mamíferos, como a glutatona e pela tripanotona presente nos parasitos. Nesses últimos, o  $Sb^{III}$  induz apoptose via indução de estresse oxidativo e aumento da concentração de cálcio intracelular (Haldar et al., 2011; Sangshetti et al., 2015; Charlton et al., 2018).

O uso do antimônio pentavalente promove ativação das respostas imune inata e adaptativa. Na presença dessa substância, os macrófagos são ativados e exercem suas ações microbidas por meio da produção de NO e IL-12, que irá induzir os linfócitos T a produzirem  $IFN-\gamma$ , que por sua vez, irá promover a produção tanto de TNF quanto de NO intracelular, pelos macrófagos (Haldar et al., 2011; Sangshetti et al., 2015).

Esses fármacos são baratos, e ainda que sejam eficazes contra a leishmaniose, a administração parenteral, o longo tempo de tratamento (de até quatro semanas), a variação na eficácia e o desenvolvimento de cepas resistentes, são alguns dos fatores que fazem com que seu uso apresente limitações (Haldar et al., 2011; Sangshetti et al., 2015). Somado a esses fatores, a utilização dessa substância pode desencadear efeitos colaterais graves, como arritmia cardíaca, pancreatite aguda, insuficiência renal e hepática, dentre outros (Chappius et al., 2007; Sangshetti et al., 2015; DNDi, 2020).

### 3.5.2 Anfotericina B

A anfotericina B (Figura 3) é um antifúngico da classe dos polienos, indicado para tratamento de infecções fúngicas como criptococose e coccidioomicose (Brunton et al., 2017). Este fármaco também é recomendado para tratamento da leishmaniose visceral em grupos populacionais em que é a única opção quimioterápica disponível, como por exemplo, gestantes ou em áreas onde ocorre resistência ao antimônio (Sangshetti et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018). Esse fármaco se liga aos esteróis, com particular afinidade pelo ergosterol presente na membrana da *Leishmania*, formando poros e levando ao aumento da permeabilidade celular a íons, com consequente desbalanço eletrolítico e estresse oxidativo, desencadeando morte celular (ação antileishmania) (Mesa-Arango et al., 2012; Sangshetti et al., 2015; Braga, 2019). Porém, a habilidade de se ligar a esteróis significa que a anfotericina B não apresenta afinidade somente pelo ergosterol da *Leishmania*, mas também pelo colesterol presente nas células dos mamíferos hospedeiros, o que implica em efeitos colaterais, como nefrotoxicidade (Sangshetti et al., 2015).



**Figura 3.** Estrutura química da anfotericina B. Fonte: PubChem.

Esse fármaco, atualmente, se apresenta nas formas desoxicolato (Fungizone<sup>®</sup>, Anforicin B<sup>®</sup>, entre outras) e lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>) (Sangshetti et al., 2015), sendo a formulação lipossomal desenvolvida com o intuito de diminuir a toxicidade celular, melhorar as propriedades de biodisponibilidade e farmacocinética, que proporcionam uma recaptação preferencial do fármaco por células susceptíveis, reduzindo efeitos tóxicos e aumentando a eficácia (Sangshetti et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018).

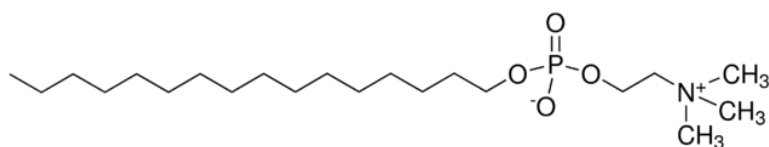


As propriedades pró-inflamatórias e imunomoduladoras induzidas pela anfotericina B estão associadas à eficácia contra a infecção por *Leishmania* (Mesa-Arango et al., 2012). Fagócitos do sangue periférico humano quando expostos a esse fármaco, liberam citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de óxido nítrico, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (Bem-Ami et al., 2008). A estimulação da resposta imune inata ocorre via receptores do tipo Toll 2 (TLR-2) e CD14 e envolve ativação de vias de sinalização, que culminam com a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Bem-Ami et al., 2008; Labro, 2012). Conseqüentemente, esse fármaco está associado ao desenvolvimento de uma resposta tipo 1, pois os macrófagos liberam IL-12 que ativam os linfócitos T a produzirem IFN- $\gamma$ , que em sinergia ao TNF, promovem ativação dos macrófagos, exercendo, assim, efeito protetor contra a leishmaniose (Mesa-Arango et al., 2012; Cuna et al., 2012).

A anfotericina B é eficaz no tratamento da leishmaniose visceral, mas o tratamento é longo, a via de administração é intravenosa e a formulação lipossomal possui elevado custo (Sangshetti et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018).

### 3.5.3 Miltefosina

A miltefosina ou hexadecilfosfocolina (Figura 4), um análogo de fosfolípídeo, é um fármaco desenvolvido originalmente como antineoplásico (Brunton et al., 2017), mas é o primeiro medicamento oral utilizado para tratamento da leishmaniose visceral humana em alguns países, como a Índia (Sangshetti et al., 2015; Braga, 2019; Nogueira et al., 2019). Em alguns territórios esse fármaco ainda não está disponível (DNDi, 2020), e no Brasil, é utilizada somente para tratamento da leishmaniose visceral canina (Nogueira et al., 2019).



**Figura 4.** Estrutura química da miltefosina. Fonte: PubChem.

Esse fármaco atua impedindo a biossíntese da glicosil fosfatidil inositol, molécula chave para a sobrevivência intracelular das amastigotas de *Leishmania* (Dos Santos-Nogueira et al., 2019). Seu mecanismo antileishmania envolve inibição da biossíntese de glicolípídeos e glicoproteínas de membrana do parasito, promovendo morte por apoptose. A miltefosina também, promove aumento da concentração de cálcio citosólico pela ativação dos canais de cálcio e estresse mitocondrial, por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (Dos Santos-Nogueira et al., 2019; Braga, 2019).

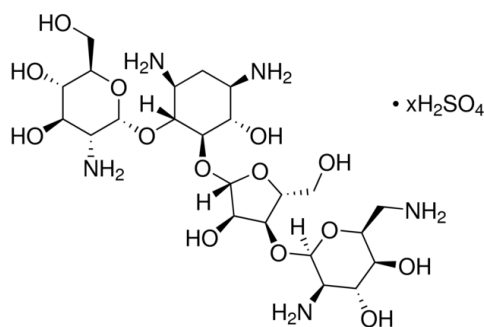
Além de exercer efeitos no parasito, a miltefosina também modula a resposta imune pelas células do hospedeiro (Braga, 2019). Os macrófagos e as células T são estimulados a

produzirem e liberarem citocinas pró-inflamatórias (como IL-12 e IFN- $\gamma$ ), ocorrendo, também, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, promovendo morte dos parasitos. Além disso, este medicamento consegue restaurar o balanço entre as respostas tipo 1 e 2, o que contribui para a redução da inflamação (Labro, 2012; Das et al., 2012; Sangshetti et al., 2015; Braga, 2019).

As limitações do uso da miltefosina incluem surgimento de cepas resistentes, com casos confirmados para leishmaniose visceral na Índia (Srivastava et al., 2017) e, os efeitos adversos relacionados a esse fármaco, que incluem teratogenicidade, distúrbios gastrointestinais e toxicidades renal e hepática (Sangshetti et al., 2015). Náuseas e vômitos são os sintomas mais comuns em pessoas que fazem uso dessa medicação, o que interfere na aderência ao tratamento, pois necessita ser ingerido duas vezes ao dia, durante 28 dias (DNDi, 2020).

### 3.5.4 Sulfato de paromomicina

O sulfato de paromomicina (Figura 5) é um antibiótico pertencente à classe dos aminoglicosídeos, e usado para tratamento de infecções como criptosporidíase, giardíase e infecção por *E. histolytica* (Brunton et al., 2017) e vem sendo utilizado e efetivo no tratamento da leishmaniose visceral em países como Índia, Quênia e Tunísia (Labro, 2012; Sangshetti et al., 2015).



**Figura 5.** Estrutura química do sulfato de paromomicina. Fonte: PubChem.

O mecanismo de ação antileishmania ainda não é totalmente compreendido, mas seu efeito é atribuído a alterações da fluidez da membrana, do metabolismo lipídico, no potencial de membrana mitocondrial e interação com ribossomos, que resulta em inibição da síntese de proteínas pelas *Leishmanias* (Chawla et al., 2011; Sangshetti et al., 2015). E, assim como outros fármacos antileishmania, a paromomicina promove estimulação das células T, produção de citocinas IL-12 e TNF e geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (Das et al., 2012; Ghosh et al., 2013).

O sulfato de paromomicina, que possui baixo custo, pode apresentar limitada eficácia em populações de alguns países, bem como mecanismos de resistência, se utilizado como

monoterapia (Andrade-Neto et al., 2018; DNDi, 2020). Seu uso deve ser via parenteral, com duração do tratamento em cerca de três semanas e está associado a reações adversas, principalmente relacionadas a toxicidade renal e otológica, podendo ser observado náusea, diarreia e elevação das transaminases hepáticas (Andrade-Neto et al., 2018; DNDi, 2020).

Como visto, todos os fármacos atualmente utilizados para tratamento da LV tanto no Brasil como em outros países, promovem efeito imunomodulador, característico de uma resposta tipo 1, com conseqüente eliminação da infecção. A Tabela 1 mostra resumidamente as principais características dos fármacos atualmente disponíveis para tratamento da leishmaniose visceral.

**Tabela 1.** Principais características dos medicamentos utilizados para tratamento da LV.

<b>Fármacos</b>	<b>Eficácia</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
Antimoniais pentavalentes	35-95%	Baixo custo; Pode ser combinado com Anfotericina B em pacientes idosos e grávidas.	Resistência aos medicamentos; Toxicidade cardíaca; Artralgia, mialgia, pancreatite, enzimas hepáticas elevadas.
Anfotericina B desoxicolato	>95%	Efetivo contra a resistência aos antimoniais pentavalentes.	Requer hospitalização; Miocardite, toxicidade renal reações no local da infusão.
Anfotericina B lipossomal	~100%	Baixa toxicidade; Nenhum caso relatado de resistência.	Alto custo; Febre; Toxicidade renal.
Miltefosina	94-97%	Altamente potente; Uso oral.	Elevada toxicidade (renal e hepática); Complicações gastrointestinais; Não seguro para grávidas (teratogênico).
Sulfato de Paromomicina	95%(Índia) 46-85% (África)	Baixo custo.	Ototoxicidade reversível; Dor no local da injeção; Nefrotoxicidade

Fonte: Adaptada de Nagle et al., 2014.

### **3.6 Uso de terapias anticâncer como alternativas terapêuticas para leishmaniose visceral**

Tanto as células cancerígenas quanto as formas amastigotas de *Leishmania* spp. possuem a capacidade de se desenvolverem e proliferarem em um organismo hospedeiro por um longo período (Klinkert & Heussler, 2006; Charlon et al., 2018). As células tumorais e os protozoários apresentam semelhanças bioquímicas que favorecem sua diferenciação e proliferação, como as vias relacionadas à das proteínas quinases, do catabolismo da glicose e do metabolismo de poliaminas. Manifestam, também, similaridades quanto ao mecanismo de morte, como atividade semelhante à caspase e fragmentação de DNA e, por esse motivo, a citotoxicidade proporcionada por distintos agentes anticânceres contra parasitos protozoários pode ser devido à essas características (Fuentes et al., 2008).

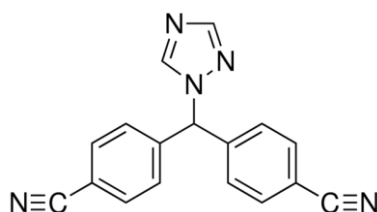
Um exemplo bem-sucedido de um medicamento anticâncer utilizado como recurso terapêutico na leishmaniose visceral é a miltefosina, que exerce seus efeitos antiparasitários por meio da inibição de enzimas quinases, notadamente a inibição da via PI3K/Akt/PkB, que está intimamente relacionada à susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania* (Charlton et al., 2018).

Um medicamento bastante estudado que se mostrou efetivo para o tratamento experimental da leishmaniose cutânea, notadamente contra *L. major* (Eissa et al., 2011), *L. braziliensis* (Miguel et al., 2009) e *L. amazonensis* (Miguel et al., 2007; Miguel et al., 2008; Trinconi et al., 2016) é o tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio, utilizado para tratamento do câncer de mama hormônio dependente (Brunton et al., 2017). Este fármaco também foi ativo contra as formas amastigotas e promastigotas de *L. chagasi* e *L. donovani* (Miguel et al., 2007; Miguel et al., 2009). O mecanismo pelo qual exerce seus efeitos antileishmania está envolvido com a alcalinização dos vacúolos parasitóforos (Miguel et al., 2007) e alteração na estrutura da membrana da *Leishmania*, por meio da inibição da síntese de inositolfosforilceramida e fosfatidilinositol (Trinconi et al., 2018).

Dessa maneira, os medicamentos antitumorais podem interagir com os parasitos e eliminá-los em dois diferentes níveis: (1) diretamente, se o alvo for semelhante. Nesse caso, os compostos podem ser modificados para inibirem especificamente a molécula alvo; (2) indiretamente, se o fármaco atuar na via de sinalização da célula hospedeira, que é essencial para a sobrevivência do parasito. Nessa situação, o medicamento não precisa ser modificado, uma vez que já é dirigido à célula alvo (Klinkert & Heussler, 2006).

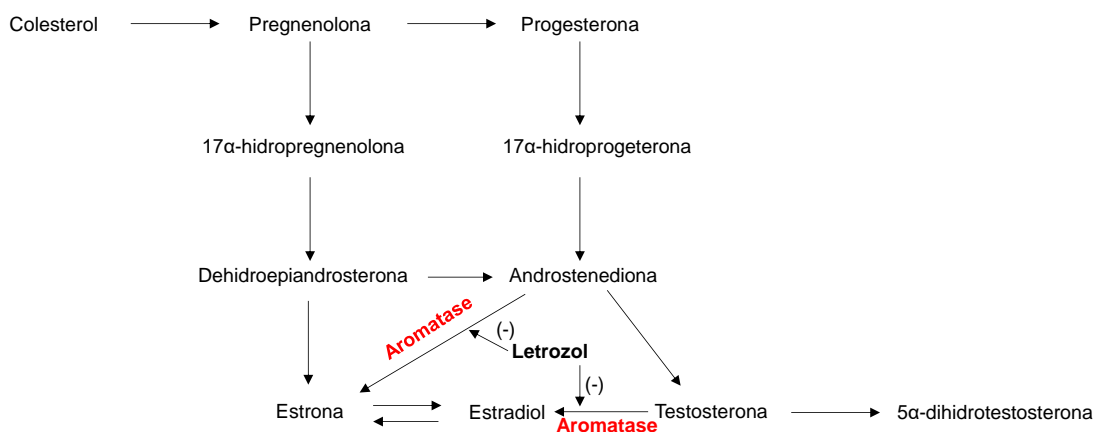
### 3.6.1 Letrozol

Letrozol ([4,4'-(1H-1,2,4-triazol-1-il)metileno]dibenzonitrila) (Figura 6) é um fármaco antitumoral pertencente à classe dos inibidores da enzima aromatase (Brunton et al., 2017) e atualmente comercializado como Femara® 2,5 mg (ou como genérico). É indicado para tratamento oral do câncer de mama receptor de estrogênio positivo em mulheres na pós menopausa, em estágios iniciais, avançados e metastáticos, bem como quimioprevenção (Brunton et al., 2017). São classificados como sendo de terceira geração e do tipo 1, por serem não esteroidais e se ligarem reversivelmente ao grupo heme da enzima aromatase, produzindo inibição reversível (Brunton et al., 2017).



**Figura 6.** Estrutura química do letrozol. Fonte: PubChem.

O crescimento e a proliferação de alguns cânceres de mama são estimulados ou mantidos pelos estrogênios e a enzima aromatase catalisa a conversão dos hormônios andrógenos adrenais, a androstenediona gonadal e a testosterona, aos estrogênios estrona e estradiol, respectivamente (Figura 7). Em mulheres na pós menopausa essa conversão ocorre em tecidos adiposos periféricos e a inibição dessa enzima promove redução da biossíntese de estrogênio (Brunton et al., 2017). Os efeitos adversos advindos da diminuição de estrogênio incluem artralguas, perda de densidade óssea mineral e distúrbios tromboembolíticos (Brunton et al., 2017).



**Figura 7.** Representação esquemática simplificada da via de síntese dos hormônios esteróides a partir dos tecidos adiposos periféricos e a inibição da enzima aromatase pelo letrozol. (Adaptado de Bagchi et al., 2019).

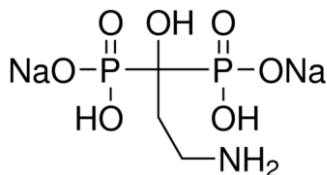
O efeito da redução de estrogênio advindos do tratamento com os inibidores da aromatase (IA) de terceira geração, como o letrozol e o anastrozol, promove uma ação antitumoral indireta via efeitos imunomoduladores no sistema imune (Ray & Ficek, 2012). Generali e colaboradores (2009) avaliaram biópsias de tumores de pacientes com câncer de mama que foram tratadas com letrozol e observaram que esse fármaco induziu significativa redução do número de linfócitos T reguladores (T reg). E, esse efeito, ocorre por meio da supressão da diferenciação de linfócitos T *naïve* em T reg, com concomitante aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-12 (Zarkavelis et al., 2016).

Jingxuan e colaboradores (2009) ao estudarem o efeito do anastrozol na poliartrite, observaram que esse fármaco potencializa essa doença devido à resposta imunomoduladora advinda do uso dos inibidores de aromatase, que além de promoverem a redução de linfócitos T reg, promovem aumento da secreção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 e decréscimo dos níveis de IL-4 e IL-10 no sangue periférico de ratos.

Não foram encontrados estudos acerca dos efeitos dos inibidores de aromatase como o letrozol de terceira geração em parasitos, notadamente os do gênero *Leishmania*.

### 3.6.2 Pamidronato dissódio

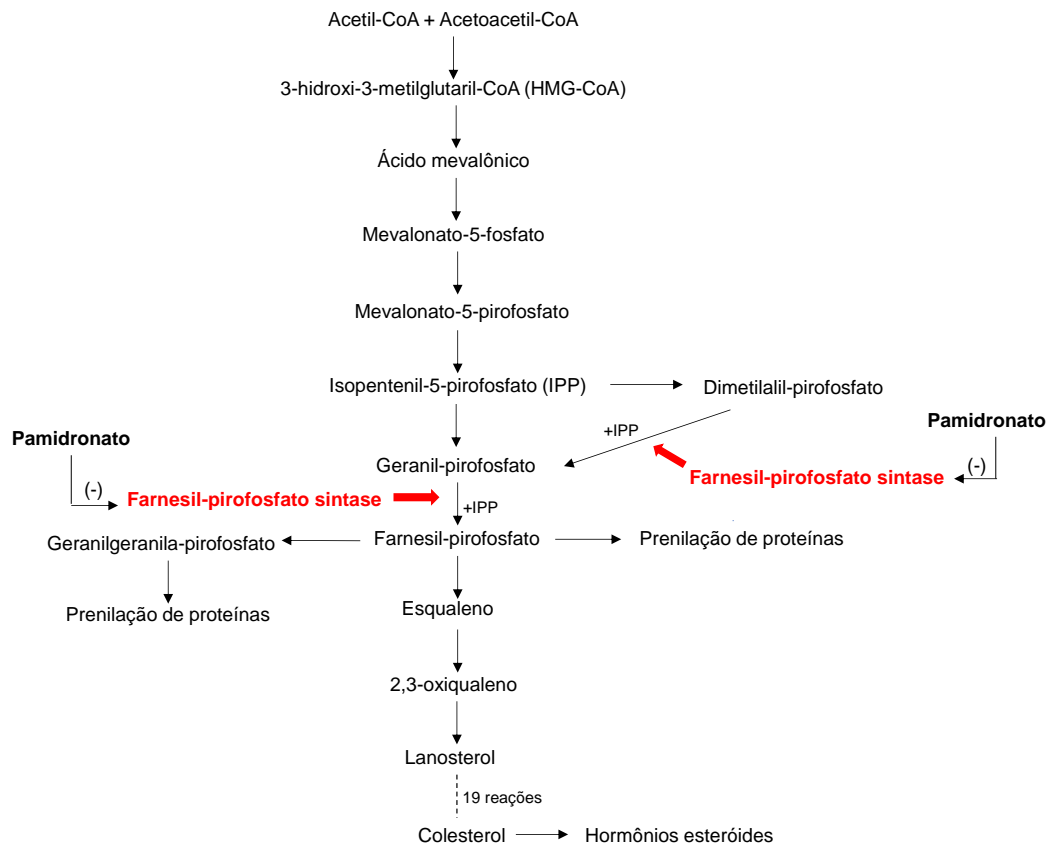
Os bifosfonatos são uma classe de medicamentos cuja estrutura é análoga ao pirofosfato e são utilizados para tratar distúrbios homeostáticos minerais e ósseos (Brunton et al., 2017). O pamidronato dissódio (disódio[3-amino-1-hidroxil-1-[hidroxil(óxido)fosforil]propil]-hidroxifosfato) é um bifosfonato (Figura 8) comercializado como Aredia® (ou como medicamento genérico), na forma de solução injetável. É classificado como sendo de segunda geração, por apresentar um grupo amino em sua estrutura (Brunton et al., 2017) e atua inibindo a reabsorção óssea e, dessa maneira, regulando a concentração de cálcio no sangue. É indicado como terapia adjuvante para tratamento de condições associadas ao aumento da destruição óssea, que eleva os níveis de cálcio no sangue, como a presença de tumores, metástases ósseas e doença de Paget (Brunton et al., 2017).



**Figura 8.** Estrutura química do pamidronato dissódio. Fonte: PubChem.

Esse fármaco é administrado por infusão intravenosa e o esquema terapêutico depende da indicação clínica. Seu uso pode provocar efeitos leves, como febre de baixa intensidade, calafrios e dor de garganta, que cessam dentro de dois dias. Mas também podem acarretar sintomas mais sérios, como broncoespasmos, dificuldade para respirar, coceira e inchaços na pele (Brunton et al., 2017).

Ao nível celular, o pamidronato inibe a enzima farnesil-pirofosfato sintase (FPPS), uma enzima chave na regulação da via do mevalonato (Russel, 2007). Essa via é importante rota biossintética responsável pela produção de colesterol, esteróis e lipídios isoprenóides, que são requeridos para modificação de pequenas proteínas, GTPases, importantes para a regulação de processos celulares, como a função osteoclástica, responsável pela reabsorção óssea (Russel, 2007; Kos & Luczak, 2008). Em resumo, pamidronato inibe a enzima FPPS, impedindo a síntese de farnesil-pirofosfato e geranylgeranil-pirofosfato, que são necessários para a prenilação de proteínas, essenciais para a formação de ergosterol em células eucarióticas (Figura 9) (Buhaescu & Izzedine, 2007).



**Figura 9.** Representação esquemática simplificada da via do mevalonato e a inibição da enzima farnesil-pirofosfato sintase pelo pamidronato. (Adaptado de Buhaescu & Izzedine, 2007)

Esse fármaco é um importante ativador de células T da imunidade inata, como as células T  $\gamma\delta$ , importantes células usadas em estratégias de imunoterapia no câncer atualmente e que, quando ativadas, produzem citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$  (Kato et al., 2001; Miyagawa et al., 2001; Wilhelm et al., 2003). Além disso, atuam favorecendo o recrutamento de outras células do sistema imune, como linfócitos T e B e células dendríticas, além de promoverem secreção de granzimas/perforinas, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6 (Pennanem et al., 1995; Lim et al., 2010; Latha et al., 2014).

Os bifosfonatos são amplamente utilizados para tratamento de distúrbios ósseos, mas apresentam, também, atividade contra diversos parasitos (Shankya et al., 2011). A ação inibitória desses compostos na FPPS, com conseqüente redução da produção de diversos esteróides, isoprenóides (proteínas farnesiladas, ubiquinona, Heme - A, entre outros) e na síntese de ergosterol, apresenta importante função, pois essas moléculas são fundamentais para a sobrevivência dos parasitos, bem como para desencadear funções na estrutura das membranas (Santos et al., 2020).

Nesse contexto, Martin e colaboradores (2001) demonstraram atividade antiproliferativa, *in vitro*, do alendronato (ALE), risedronato (RIS) e pamidronato (PAM) em

tripomastigotas de *Trypanosoma brucei*, amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, amastigotas de *Leishmania donovani*, taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e nas formas intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum*. Os compostos ALE, RIS e PAM foram efetivos contra *T. cruzi*, *T. gondii* e *L. donovani*. RIS e PAM foram também capazes de reduzir a quantidade de tripomastigotas de *T. brucei*, enquanto somente RIS afetou o metabolismo de *P. falciparum*. A eficácia do risedronato na doença de Chagas também foi demonstrada em outros estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Garzoni et al., 2004; Bouzahzah et al., 2005).

Nesse raciocínio, Yardley e colaboradores (2002), avaliaram a eficácia do alendronato (ALE), PAM e RIS contra a infecção provocada por *L. donovani* e *T. gondii*, *in vitro* e *in vivo* e concluíram que RIS foi capaz de promover a resolução de ambas as doenças, com elevado potencial de cura. Já PAM também demonstrou atividade antileishmania, mas quando comparado ao RIS, foi menos efetivo. Neste estudo, ALE não apresentou atividade.

O pamidronato demonstrou atividade antiparasitária em modelo experimental de leishmaniose cutânea por *Leishmania mexicana amazonensis*, por meio da redução da lesão e da presença de parasitos nas mesmas (Rodriguez et al., 2002). Órtiz-Gomes e colaboradores (2006) quiseram avaliar se a FPPS era a molécula alvo dos bifosfonatos e, para tanto, transfectaram formas promastigotas de *L. major* super expressando essa enzima. Os autores observaram que a concentração para inibir o crescimento de 50% dos parasitos foi setenta vezes maior, quando comparado com os parasitos não transfectados. O mesmo foi realizado, só que avaliando o efeito do zoledronato, que apresentou maior afinidade pelas *L. major* transfectadas (Kavanagh et al., 2006), indicando correlação entre o grau de resistência e o aumento da atividade da enzima, sugerindo, assim, que a FPPS é o alvo dos bifosfonatos na *Leishmania* (Órtiz-Gomes et al., 2006).

Gadelha e colaboradores (2020) realizaram um *screening, in vitro*, para verificar a atividade do alendronato, ibandronato, neridronato, pamidronato e residronato contra as formas promastigotas de *L. infantum*, e concluíram que todos os bifosfonatos avaliados apresentaram atividade antileishmania, sendo o ibandronato o mais potente.

Apesar das observações iniciais sobre a ação do pamidronato em diferentes espécies de *Leishmania*, notadamente na *Leishmania infantum*, ainda não há relatos do seu efeito no sistema imune após infecção, nem em modelo experimental de leishmaniose visceral.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Fármacos

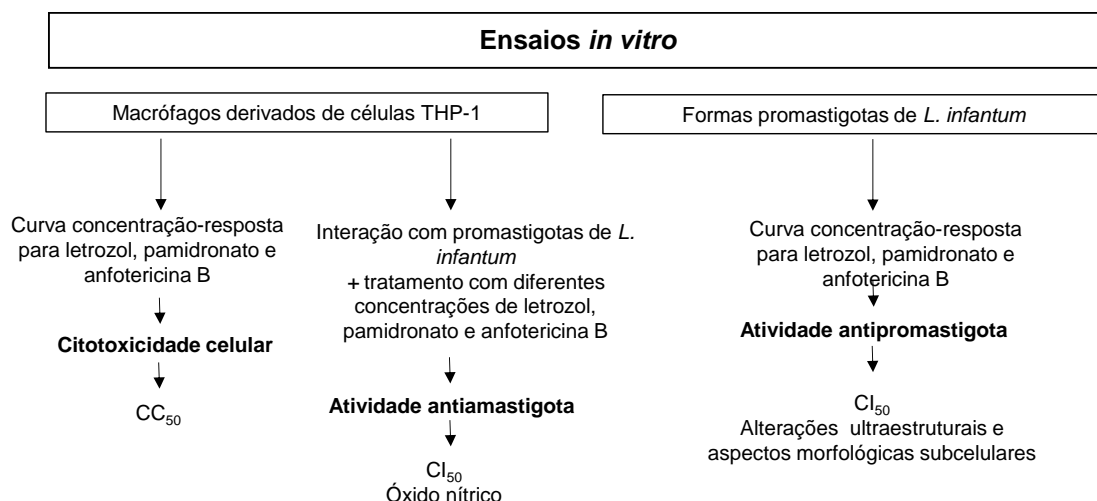
Os fármacos antitumorais avaliados foram letrozol e pamidronato. O primeiro, foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (lot #L2210) e, o segundo, da Sigma-Aldrich (lot #070M4707V). A anfotericina B desoxicolato, fármaco utilizado como referência, foi adquirida da Sigma-Aldrich (lot #066K4092).

Para os experimentos *in vitro* e *ex vivo*, os fármacos anfotericina B e letrozol foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) e o pamidronato em água estéril. A concentração estoque foi de 45 mM para anfotericina B e de 100 mM para letrozol e pamidronato. Todos foram aliquotados e armazenados a -20°C e descongelados somente no momento do uso.

Para o experimento *in vivo*, letrozol foi solubilizado em carboximetilcelulose 0,5% e o pamidronato em água para injeção. A anfotericina B desoxicolato utilizada foi Anforicin B® - Cristália, solubilizada em água para injeção.

### 4.2 Avaliação da citotoxicidade celular e das atividades anti-amastigota e antipromastigota *in vitro* dos fármacos letrozol e pamidronato

Os estudos de citotoxicidade celular e potencial antileishmania dos dois fármacos foram realizados, conforme esquema resumido abaixo (Figura 10).



**Figura 10.** Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmania dos fármacos letrozol e pamidronato *in vitro*.

#### 4.2.1 Obtenção das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e cultivo das células THP-1

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) foram cultivadas em garrafas de cultivo T25 contendo meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica penicilina-estreptomicina (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), em estufa B.O.D à 26°C, e utilizadas

na fase estacionária de crescimento, até a décima passagem. Para manter a infectividade da cepa, a mesma foi submetida a sucessivas passagens em camundongos Balb/c.

Células THP-1 (linhagem celular de leucemia monocítica aguda) foram cultivadas em garrafas T75 contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e solução antibiótica penicilina-estreptomicina (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As culturas foram mantidas à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e utilizadas até a vigésima passagem.

#### **4.2.2 Avaliação da atividade antipromastigota**

A atividade antipromastigota foi avaliada conforme Santi e colaboradores (2018), com modificações. As formas promastigotas de *L. infantum* foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1,0 \times 10^6$  parasitos/poço/180µL em meio de cultura M199 suplementado. Em seguida, os parasitos foram tratados (20 µL) com os fármacos, empregando-se dez diluições seriadas com concentrações entre 500-0,98 µM para letrozol e pamidronato, e entre 300-0,005 µM para anfotericina B, por 72 horas, em estufa B.O.D à 26°C. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,05%.

Após o período de incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada pela redução metabólica do brometo de 3,4,5-dimetil-2-triazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazan, cuja intensidade da cor é correlacionada com o número de células viáveis (Mosmann, 1983). Foram adicionados aos poços 20 µL de uma solução de MTT a 2,5 mg/mL e após quatro horas de incubação à 37°C em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub>, as placas foram centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos a 18°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma seringa acoplada a uma bomba de vácuo. Os cristais de formazan foram solubilizados com 200 µL de solução de HCl 0,04 M em isopropanol e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 595 nm em leitor de placas Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Todos os fármacos foram avaliados em triplicata e em três experimentos independentes.

Os valores de CI<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50% o número de parasitos) foram obtidos por meio de análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Prism Software Inc).

##### **4.2.2.1 Avaliação das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão**

Promastigotas de *L. infantum* ( $3,0 \times 10^7$  parasitos) foram incubadas em tubos de cultura de 14 mL, na presença dos fármacos letrozol, pamidronato e anfotericina B, nas suas respectivas CI<sub>50</sub>, durante 72 horas, em estufa B.O.D à 26°C. Após o tempo de incubação,

adicionou-se 2 mL de PBS 1x e os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a uma rotação de 1000 x g, à 18°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL do fixador glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, durante 3 horas à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de fixação, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e adicionado 400 µL de tampão fosfato 0,1 M. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do processamento.

O processamento das amostras foi realizado no Centro de Microscopia da UFMG e englobou as etapas de fixação secundária, desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação. Após as etapas de processamento, as imagens foram adquiridas utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão Tcnaí G2-12 – FEI SpiritBiotwin 210kV e posteriormente analisadas quanto aos aspectos morfológicos e subcelulares.

#### **4.2.3 Avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos derivados de células THP-1**

A toxicidade celular dos fármacos letrozol e pamidronato foi avaliada utilizando-se macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 (Gebre-Hiwot et al., 1992; Siqueira-Neto et al., 2010). Células THP-1 foram plaqueadas na densidade celular de  $2,0 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado e contendo PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) na concentração de 20 ng/mL (PMA; Sigma Aldrich) à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de diferenciação das células, o meio de cultura foi removido, os poços lavados três vezes com PBS 1x e adicionado 180 µL de meio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente, os macrófagos foram tratados (20 µL) com os fármacos, empregando-se dez diluições seriadas com concentrações entre 500-0,98 µM para letrozol e pamidronato, entre 225-0,4 µM para anfotericina B, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub>. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,05%.

Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, conforme descrito no item 4.2.2. Foram adicionados aos poços 20 µL de uma solução de MTT a 2,5 mg/mL e após quatro horas de incubação o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma seringa acoplada a uma bomba a vácuo. Os cristais de formazan foram solubilizados com 200 µL de solução de HCl 0,04 M em isopropanol e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 595 nm em leitor de placas Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Todos os fármacos foram avaliados em triplicata e em três experimentos independentes.

Os resultados foram expressos em valores de CC<sub>50</sub> para cada fármaco (concentração citotóxica para 50% das células em relação ao controle de células não tratado) e obtidos por meio de análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Prism Software Inc).

#### 4.2.4 Avaliação da atividade anti-amastigota

A avaliação da atividade anti-amastigota dos fármacos estudados, foi feita utilizando-se macrófagos derivados de células THP-1 (Gebre-Hiwot et al., 1992; Siqueira-Neto et al., 2010), infectados com as formas promastigotas de *L. infantum* e tratados com as substâncias teste. Células THP-1 foram plaqueadas na densidade celular de  $2,0 \times 10^5$  células/poço, em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm e incubadas por 72 horas à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 suplementado, contendo ainda PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) na concentração de 20 ng/mL (PMA; Sigma Aldrich).

Após o período de incubação, os macrófagos diferenciados e aderidos às lamínulas foram incubados com formas promastigotas de *Leishmania infantum* oriundas de culturas em fase estacionária de crescimento. Primeiramente, após a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, a densidade final ( $4,0 \times 10^6$  parasitos/mL) foi ajustada em meio RPMI suplementado. Em seguida, foram aplicados à cultura de macrófagos, 500 µL dessa suspensão ( $2,0 \times 10^6$  parasitos/poço = proporção 10:1). Após três horas de interação, o sobrenadante contendo os parasitos livres foi removido, os poços lavados três vezes com PBS e adicionados 900 µL de meio RPMI suplementado.

Os poços foram tratados adicionando-se 100 µL dos fármacos, de modo a se obter, nos poços, as concentrações de 250, 100, 0,1, 0,01 e 0,001 µM para letrozol; 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µM para pamidronato e de 45, 4,5, 0,45, 0,045 e 0,0045 µM de anfotericina B, durante 72 horas à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As concentrações utilizadas neste ensaio, para letrozol e pamidronato, foram escolhidas com base nos dados de viabilidade celular. O grupo controle foi mantido livre de substâncias. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

Após o período de incubação com os fármacos, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas com Panótico Rápido (Laborclin) e montadas em lâminas de vidro com Entellan® (Merck Millipore). Em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico na objetiva de 40 vezes. Foi realizada contagem de 100 macrófagos, infectados ou não, bem como a quantidade de amastigotas em cada célula infectada, utilizando-se o programa Image J.

Os valores de CI<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50% o número de macrófagos infectados em relação ao controle não tratado) foram obtidos por meio de análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Prism Software Inc).

Imagens representativas dos tratamentos, nas diferentes concentrações avaliadas, foram obtidas utilizando-se uma câmera digital Spot Insight Color acoplada a um microscópio Olympus (BX-40).

#### 4.2.4.1 Dosagem de óxido nítrico

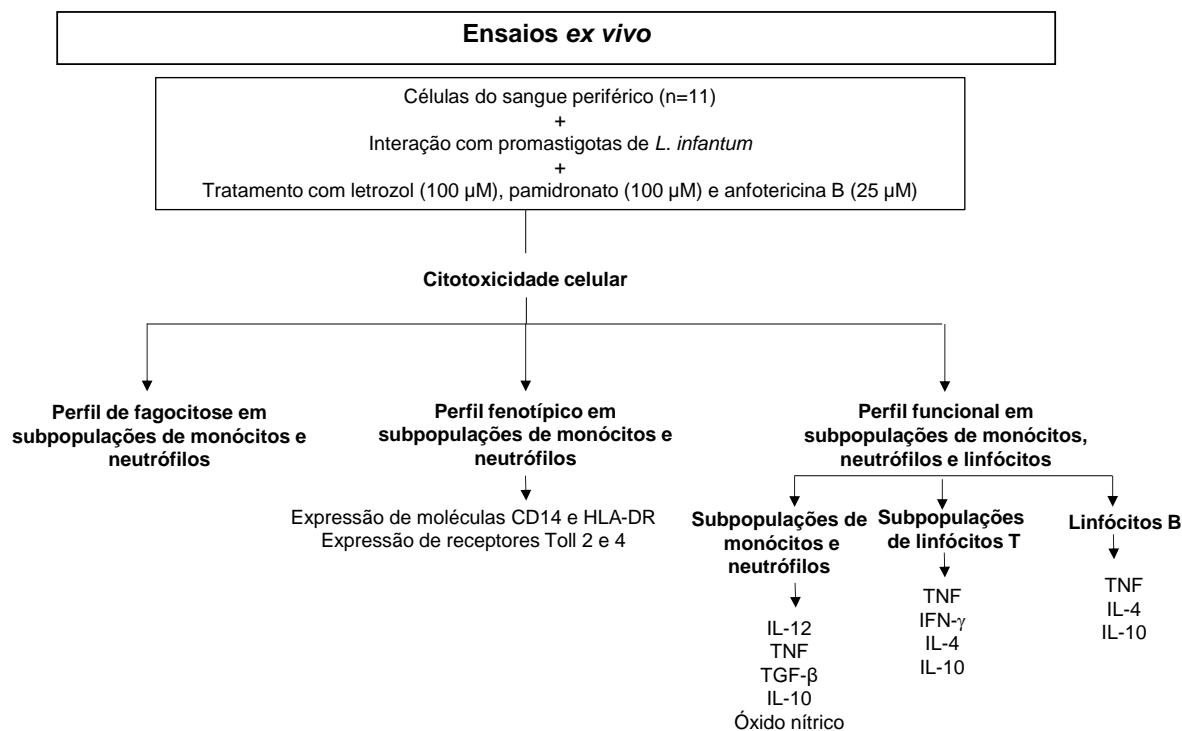
A dosagem de óxido nítrico (NO) foi avaliada por meio da quantificação da concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente no sobrenadante das culturas, pelo método de Griess (Grisham et al., 1996). Após infecção e tratamento dos macrófagos infectados, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das culturas foram colocados em placas de 96 poços, acrescidos de 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% diluída em ácido fosfórico a 2,5% e N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%) e incubados durante 20 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Como controle positivo foi utilizado LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A reação entre as amostras e o reagente de Griess gera um composto de coloração vermelha, e a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra (Grisham et al., 1996). Após reação, a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em leitor de placas Varioskan (Thermo Fisher Scientific). A quantidade de nitrito em cada amostra foi obtida por meio de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) utilizando concentrações de 500 – 3,9  $\mu\text{M}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes e os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da concentração em  $\mu\text{M}$  de nitrito.

#### 4.2.5 Índice de seletividade

O cálculo do índice de seletividade (IS) foi realizado por meio da razão entre os valores estimados de citotoxicidade ( $\text{CC}_{50}$ ) das substâncias nos macrófagos derivados de células THP-1 e atividade ( $\text{CI}_{50}$ ) contra as amastigotas de *Leishmania* intramacrófago. Valores de IS  $>10$  foram considerados satisfatórios (Araújo et al., 2018).

### 4.3 Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato por meio de modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*

Para avaliação do potencial antileishmania e imunomodulador dos dois fármacos anticâncer, empregou-se a estratégia descrita na Figura 11:



**Figura 11.** Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmaniana e imunomoduladora *ex vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato, utilizando sangue periférico humano incubado na presença de *L. infantum*, por meio de análises multiparamétricas por citometria de fluxo.

Para a avaliação das atividades antileishmaniana e imunomoduladora, utilizando leucócitos do sangue periférico humano, por análise multiparamétrica por citometria de fluxo, foi utilizado o protocolo preditivo descrito por Ribeiro e colaboradores (2020).

#### 4.3.1 Aspectos éticos

O estudo seguiu a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram encaminhados para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, e aprovado sob a licença CAAE: 79877417.2.0000.5149.

#### 4.3.2 Obtenção das amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico dos voluntários saudáveis foram coletadas em tubos contendo anticoagulante heparina sódica (volume de 20 mL) para a realização dos ensaios, e EDTA (volume de 4 mL) para a realização do hemograma e obtenção da contagem da global de leucócitos de cada indivíduo, necessária ao ajuste de células empregadas nas culturas.

### 4.3.3 Caracterização da população de estudo

O sangue periférico para a caracterização das atividades antileishmania e imunomoduladora foram obtidos de 11 voluntários saudáveis, provenientes da cidade de Belo Horizonte/MG, com idade entre 21 e 60 anos, sendo 7 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Os voluntários incluídos neste estudo declararam não serem portadores de doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem na capacidade imunológica do indivíduo e nem terem apresentado sintomas relacionados à alguma doença (gripe, resfriado, alergia, entre outras) no dia da coleta do sangue, bem como 15 dias antes da mesma.

O perfil hematológico e a caracterização (idade e sexo) dos onze doadores saudáveis voluntários estão apresentados na Tabela 2. Os resultados do hemograma estão expressos como valores absolutos ( $10^3/\text{mm}^3$ ) das células sanguíneas da série branca (leucócitos totais, granulócitos, linfócitos e monócitos) e apresentaram níveis basais próximos aos valores de referência.

**Tabela 2.** Perfil hematológico e caracterização dos doadores saudáveis voluntários\*.

Doador	Idade	Sexo	Global de leucócitos	Granulócitos	Linfócitos	Monócitos
1	23	feminino	7,2	5,1	1,3	0,8
2	23	feminino	10,2	8,0	1,4	0,8
3	28	masculino	6,3	4,8	0,7	0,8
4	25	feminino	7,1	4,8	1,7	0,6
5	60	feminino	8,2	6,2	1,4	0,6
6	26	masculino	7,1	5,8	0,9	0,4
7	21	feminino	10,9	8,9	1,3	0,7
8	23	feminino	10,5	6,7	2,8	1,0
9	33	feminino	9,2	6,8	1,9	0,5
10	41	masculino	6,5	3,7	1,9	0,9
11	25	masculino	5,9	4,2	1,2	0,5
<b>Valor de referência</b>			3,5-10,0	1,2-6,8	1,2-3,2	0,3-0,8

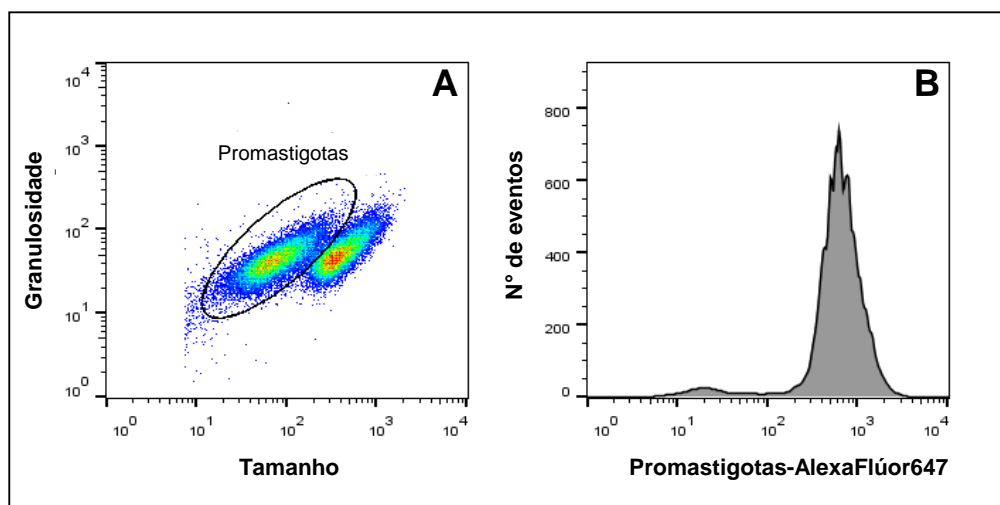
\* os resultados estão expressos como  $10^3/\text{mm}^3$ .

### 4.3.4 Obtenção das formas promastigotas de *Leishmania infantum* e marcação com Alexa Flúor 647 (AF647)

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) foram obtidas a partir de cultivos em garrafas T25 contendo meio de cultura bifásico NNN-LIT (Neal,Novy, Nicolle-LIT), sendo o meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico penicilina-estreptomicina (100 U/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina), durante 7 dias (fase estacionária de crescimento) em estufa B.O.D à temperatura de 26°C, por máximo 10 passagens.

A cultura de parasitos foi transferida para tubo cônico de polipropileno de 50 mL, homogeneizada em vórtex a baixa rotação e submetida a centrifugação diferencial a  $10 \times g$  durante 10 minutos à  $26^\circ\text{C}$ , para remoção de contaminantes como eritrócitos do meio NNN e grumos de parasitos no sedimento. Após a centrifugação, os tubos foram transferidos para a estufa B.O.D à  $26^\circ\text{C}$  e mantidos em repouso por período de 10 minutos a fim de favorecer a recuperação de parasitos viáveis no sobrenadante das culturas centrifugadas. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de polipropileno de 50 mL, sendo o sedimento desprezado. Ao sobrenadante recuperado, foram adicionados 30 mL de PBS 1x suplementado com 10% de soro fetal bovino, seguindo homogeneização com movimentos circulares e centrifugação a  $1000 \times g$  durante 7 minutos a  $18^\circ\text{C}$ . Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado cuidadosamente. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS 1x suplementado com 10% de soro fetal bovino e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para  $1 \times 10^7$  parasitos/mL.

Para a marcação das promastigotas, quantidades equivalentes de parasitos e da solução do fluorocromo Alexa Flúor 647 (AF647)  $3,2 \mu\text{g/mL}$  foram incubadas durante 30 minutos à  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação com AF647, adicionou-se 1 mL de PBS 1x e a suspensão de parasitos foi centrifugada a  $1000 \times g$  durante 10 minutos à  $18^\circ\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os parasitos marcados foram ressuspensionados com 1 mL de PBS 1x. Posteriormente, a intensidade da marcação bem como as características morfológicas da amostra foram avaliadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™, por meio de análise da intensidade média de fluorescência (IMF) apresentada pelos parasitos-AF647 (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas de *L. infantum*. (A) representa o perfil de promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, selecionadas no *gate* "Promastigotas" em gráfico de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade; (B) representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos (Nº de eventos) após a marcação com a sonda fluorescente Alexa Flúor 647 em gráfico de histograma.



#### **4.3.5 Preparação das amostras de sangue, avaliação da toxicidade celular, do potencial antileishmania e do perfil fenotípico-funcional em leucócitos do sangue periférico**

O sangue periférico coletado em tubo de heparina sódica foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 15 mL e centrifugado a 800 x g durante 10 minutos à 18°C. Após centrifugação, o plasma foi retirado e adicionou-se PBS 1x suplementado com 10% de soro fetal bovino (mesmo volume de plasma retirado). Em seguida, a suspensão celular foi homogeneizada com movimentos circulares e centrifugada novamente, nas mesmas condições. Ao final, foi realizado ajuste celular para a concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/mL.

Após ajuste da suspensão celular, leucócitos do sangue periférico foram incubados com as formas promastigotas de *L. infantum* marcadas com AF647 (proporção de 1 parasito para 2 células, ou seja, 250.000 parasitos para 500.000 células) em tubos de polipropileno de 14 mL, na presença dos fármacos de interesse do estudo (concentrações de 100  $\mu$ M para letrozol e pamidronato, e 25  $\mu$ M para a anfotericina B). A concentração da anfotericina B usada como controle positivo foi escolhida com base nos estudos de Ribeiro e colaboradores (2020). Já as concentrações para os dois fármacos anticâncer foram selecionadas por serem concentrações que apresentaram atividade nos estudos realizados com a forma amastigota. Foram realizadas também no estudo, duas culturas controles, uma contendo somente células (controle de células - CC) e outra contendo somente células e parasitos (controle de fagocitose – CF). Para o controle de funcionalidade da metodologia para quantificação de citocinas foi realizada cultura de células na presença de PMA (25 ng/mL) e de ionomicina (1 mg/mL). Os tubos contendo as culturas foram incubados sob agitação constante em homogeneizador hematológico à 37°C, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante duas horas. Após esse período, foi adicionado aos tubos, 10  $\mu$ L de Brefeldina-A (BFA) a 1 mg/mL (10  $\mu$ g/mL na cultura) e as culturas foram incubadas por mais quatro horas nas mesmas condições citadas anteriormente, totalizando seis horas de incubação. Posteriormente, 110  $\mu$ L de EDTA 20 mM (2 mM nas culturas) foram adicionados e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente e protegidas da luz durante 15 minutos.

Em seguida, adicionou-se PBS-W (PBS 1x acrescido de albumina sérica bovina) em cada tubo de cultura e os mesmos foram centrifugados a 600 x g durante 7 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo, mantendo aproximadamente 500  $\mu$ L da cultura. Foram adicionados 100  $\mu$ L de *Live/Dead* Aqua (marcador de viabilidade celular diluído 1:1000 em PBS 1x) e as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, PBS-W foi adicionado aos tubos e as culturas centrifugadas a 600 x g durante 7 minutos à 18°C. O sobrenadante foi retirado

cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo, mantendo aproximadamente 500 µL de cultura.

O volume total de suspensão celular obtido foi dividido em dois grupos, denominados fagócitos e linfócitos. Para o grupo dos fagócitos, metade do volume das culturas obtidas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL, contendo 2 µL de anticorpos monoclonais (Tabela 3) para identificação das populações de monócitos (anti-CD14-V450) e neutrófilos (anti-CD16-AlexaFlúor 700), receptores do tipo *Toll* (TLR's) (anti-TLR-2-PE e anti-TLR-4-PE) e 3 µL de anticorpo anti-HLA-DR-PerCP, para identificação da molécula de ativação. Já para o grupo dos linfócitos, a outra metade do volume das culturas foi transferida para outro tubo de poliestireno de 5 mL, contendo 3 µL de anticorpo monoclonal para identificação da população de linfócitos T (anti-CD3-PerCP) e 2 µL de anticorpos monoclonais para identificação da população de linfócitos T CD8 (anti-CD8-AlexaFlúor 700) e linfócitos B (anti-CD19-V450). Em seguida, as amostras foram incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, as culturas de sangue foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, por meio da adição de solução de lise comercial (*FACS Lising Solution*, BD), previamente diluída dez vezes em água Tipo I e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 600 x g durante 7 minutos à 18°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em vórtex. Foram adicionados 500 µL e, posteriormente, 3 mL de PBS-P (PBS-W acrescido de 0,5% de saponina) a cada cultura seguindo incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as amostras foram novamente centrifugadas a 600 x g durante 7 minutos à 18°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em vórtex. Em seguida, foi adicionado 3 mL de PBS-W, as amostras foram centrifugadas a 357 x g durante 7 minutos à 18°C e o *pellet* ressuspensionado em 200 µL de PBS-W.

**Tabela 3.** Anticorpos de superfície celular utilizados para caracterização imunofenotípica das subpopulações de monócitos, neutrófilos e linfócitos.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Principal expressão celular</b>	<b>Função</b>
Anti-CD14	V450	Células dendríticas, monócitos e macrófagos	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína de ligação ao lipopolissacarídeo
Anti-CD16	AlexaFluor 700	Neutrófilos, monócitos e células NK	Receptor da região Fc de IgG. Participa da fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpo
Anti-HLA-DR	PerCP	Monócitos, macrófagos	Molécula de MCH de classe II e ativação celular
Anti-TLR-2	PE	Granulócitos	Reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata
Anti-TLR-4	PE	Granulócitos	Reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata
Anti-CD3	PerCP	Linfócitos T	Transdução de sinal pelos receptores de antígeno de células T
Anti-CD8	AlexaFluor 700	Linfócitos T citotóxicos	Correceptor de MHC de classe I
Anti-CD19	V450	Linfócitos B	Ativação de células B

Fonte: Abbas et al., 2018.

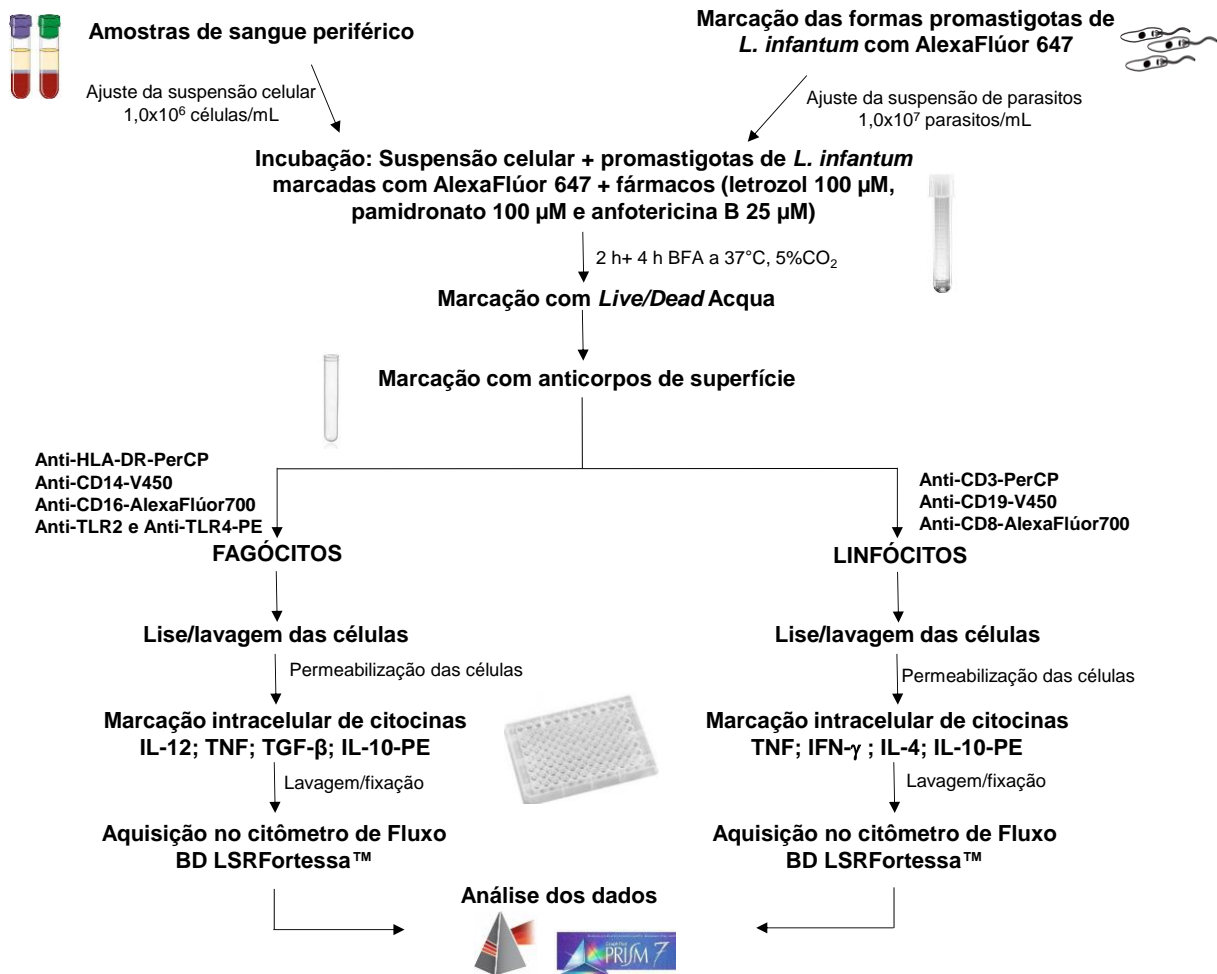
Alíquotas de 50 µL das suspensões celulares foram transferidos para placas de 96 poços de fundo em U, contendo 20 µL dos anticorpos monoclonais anti-citocinas (Tabela 4) previamente diluídos em PBS-P e, em seguida, incubados durante 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para suspensões celulares do grupo dos fagócitos foram avaliadas a produção das citocinas IL-12, TNF, TGF-β e IL-10, todas marcadas com o fluorocromo PE. Já para as amostras do grupo de linfócitos, foram avaliadas a produção das citocinas IFN-γ, TNF, IL-4 e IL-10, todas marcadas com o fluorocromo PE. Após incubação, foram adicionados 120 µL de PBS-P/poço, homogeneizou-se em vórtex cuidadosamente e a placa foi centrifugada a 600 x g durante 7 minutos à 18°C. Os sobrenadantes foram descartados, as células ressuspendidas em vórtex e foi adicionado 150 µL de PBS-W. Após homogeneização em vórtex, a placa foi novamente centrifugada a 600 x g durante 7 minutos à 18°C. Os sobrenadantes foram descartados, as células homogeneizadas em vórtex e 200 µL de solução fixadora – MFF, foram adicionados. Posteriormente, um total de 3.000 monócitos (grupo dos fagócitos) e 20.000 linfócitos (grupo dos linfócitos) foram adquiridos no citômetro de fluxo BD LSRFortessa™. Para a análise de fagocitose, parâmetros morfológicos e fenotípico-funcionais foi utilizado o software Flow Jo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 10).

**Tabela 4.** Anticorpos utilizados para avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Principal fonte celular</b>	<b>Função</b>
Anti-IL-12	PE	Macrófagos, células dendríticas	Células T: diferenciação para o tipo 1 NK e células T: síntese de IFN- $\gamma$ e aumento da atividade citotóxica
Anti-TNF	PE	Linfócitos T, NK e macrófagos	Ativação celular e inflamação
Anti-TGF- $\beta$	PE	Linfócitos T reguladores, macrófagos, outros tipos celulares	Células T: inibição da proliferação e de funções efetoras; Macrófagos: inibição da ativação e estimulação de fatores angiogênicos
Anti-IL-10	PE	Macrófagos, Linfócitos T e Linfócitos B	Macrófagos e células dendríticas: inibição da expressão de IL-12, coestimuladores e MHC de classe II
Anti- IFN- $\gamma$	PE	Linfócitos T, macrófagos	Macrófagos: ativação clássica (aumento das funções microbidas) Células T: diferenciação para o tipo 1 Outras células: aumento da expressão de moléculas de ativação, aumento do processamento e apresentação de antígenos
Anti-IL-4	PE	Linfócitos T (tipo 2) e mastócitos	Células T: diferenciação para o tipo 2 Macrófagos: ativação alternativa e inibição da ativação clássica pelo IFN- $\gamma$

Fonte: Abbas et al., 2018.

A Figura 13 esquematiza o protocolo de avaliação das atividades antileishmania e imunomoduladora dos fármacos anticâncer, usando sangue periférico humano, por citometria de fluxo.



**Figura 13.** Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora, por citometria de fluxo.

#### 4.3.6 Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por fagócitos do sangue periférico incubados com *L. infantum* e tratados ou não com os fármacos anticâncer

A estratégia utilizada para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) intracelular consiste na utilização da sonda diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), que é permeável à membrana celular. Por ação de esterases intracelulares, DAF-2DA é convertido a DAF-2, que não é permeável à membrana celular, permanecendo, portanto, no interior das células. Em pH fisiológico, o DAF-2 é relativamente não fluorescente, entretanto, na presença de óxido nítrico, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T). Assim, a intensidade da fluorescência emitida pelo DAF-2T é proporcional à concentração de NO intracelular e pode ser quantificada por meio da citometria de fluxo (Kojima et al., 1998).

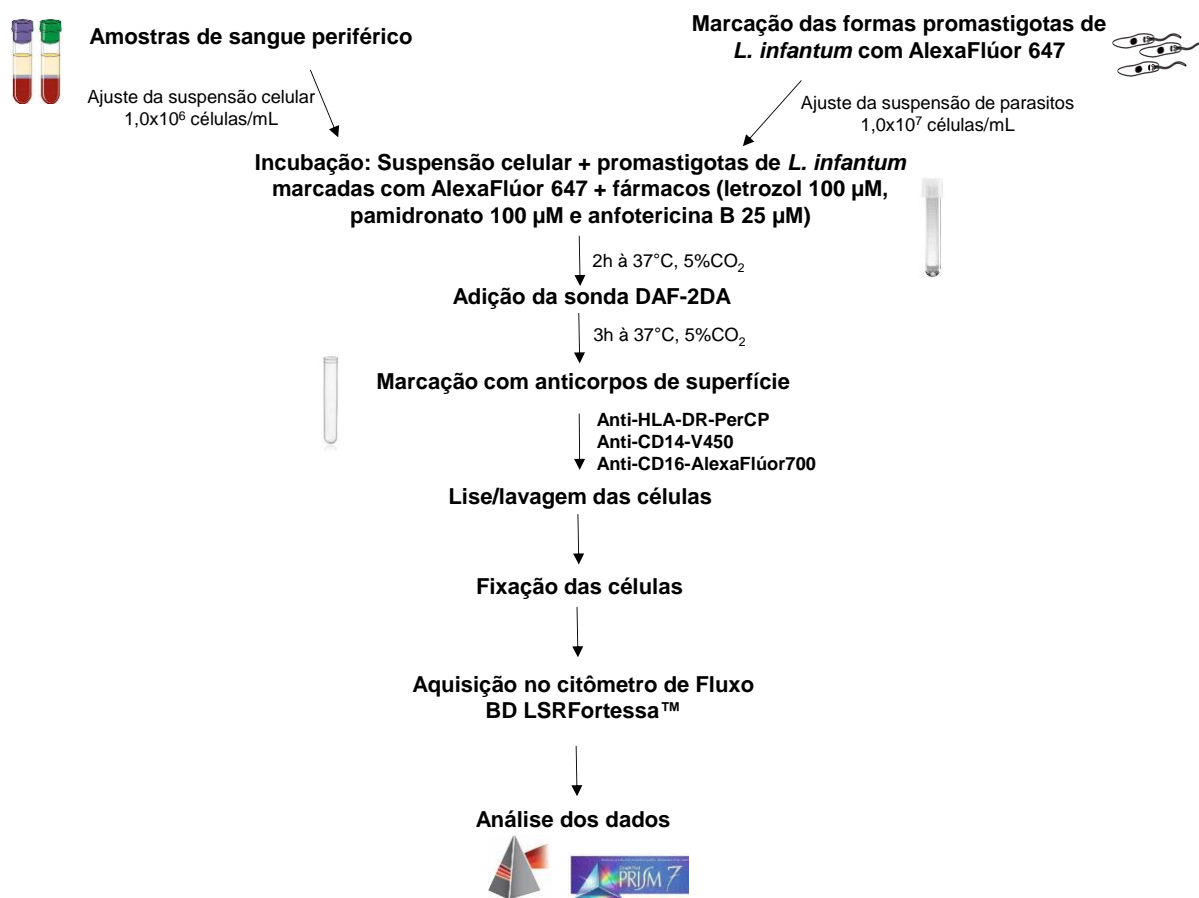
Após ajuste da suspensão de parasitos marcados com AF647 ( $1,0 \times 10^7$  parasitos/mL) e de células ( $1,0 \times 10^6$  células/mL), realizou-se culturas em tubos de polipropileno de 5 mL, contendo células e parasitos (proporção de 1 parasito para 2 células), fármacos nas concentrações de 100  $\mu$ M para letrozol e pamidronato e 25  $\mu$ M para anfotericina B, na

presença da sonda DAF-2DA. As amostras foram incubadas durante 5 horas sob agitação constante em homogeneizador hematológico à 37°C, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Neste protocolo, foram realizadas as seguintes abordagens: cultura controle negativo: somente células e meio RPMI; cultura controle de produção basal: células na presença de DAF-2DA; cultura controle de funcionalidade: células na presença de LPS, potente indutor da produção de NO (concentração final de 10 µg/mL) e DAF-2DA; controle de especificidade: células na presença de aminoguanidina, inibidor seletivo da síntese de NO via iNOS (concentração final de 10 µM) e DAF-2DA; cultura de estimulação específica: células na presença de *L. infantum* marcada com AF647 e DAF-2DA; e culturas de estimulação específica e tratadas com letrozol 100 µM; pamidronato 100 µM e anfotericina B 25 µM.

Após as incubações, os tubos de cultura foram colocados imediatamente no gelo e, em seguida, o volume das culturas foi transferido para tubos de poliestireno de 5 mL correspondentes aos estímulos, contendo 1 µL de anticorpos monoclonais para identificação das populações de monócitos (anti-CD14-V450) e neutrófilos (anti-CD16-AlexaFluor 700) e 2 µL de anticorpo anti-HLA-DR-PerCP para identificação da molécula de ativação. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos utilizando solução de lise comercial (*FACS Lising Solution*, BD), previamente diluída dez vezes em água Tipo I e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS 1x e as amostras foram centrifugadas a 600 x g durante 7 minutos à 4°C. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* ressuscitado no vórtex, seguindo adição de 2 mL de PBS 1x e centrifugação a 600 x g durante 7 minutos à 18°C. Finalizada a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* ressuscitado no vórtex, seguindo adição de 200 µL de PBS 1x em cada tubo. As amostras foram imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (3.000 eventos no *gate* de monócitos). Para a análise dos dados foi utilizado o software Flow Jo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 10).

A Figura 14 esquematiza o protocolo de avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por citometria de fluxo.



**Figura 14.** Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por fagócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo.

#### 4.3.7 Avaliação das alterações ultraestruturais e subcelulares por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura

Para análise ao nível morfológico e subcelular, leucócitos do sangue periférico, incubados com *L. infantum*, tratados e processados conforme o ensaio *ex vivo* (item 4.3.5) foram fixados durante 3 horas em 500 µL de fixador glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M. Decorrido o tempo de fixação, as amostras foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram adicionados 400 µL de tampão fosfato 0,1 M e as amostras mantidas em tubos microtubos. Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), 100 µL das amostras em tampão fosfato foram colocadas em lamínulas de 13 mm previamente tratadas com poli-L-lisina e colocadas em placas de 24 poços. Após fixação, as lamínulas foram mantidas recobertas com tampão fosfato 0,1 M. Todas as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do processamento.

Adicionalmente, formas promastigotas de *L. infantum* foram incubadas com os fármacos, nas mesmas condições utilizadas no ensaio *ex vivo* (concentrações de 100 µM para

letrozol e pamidronato e 25  $\mu$ M para anfotericina B seguindo 6 horas de incubação) e processadas da mesma maneira citada acima.

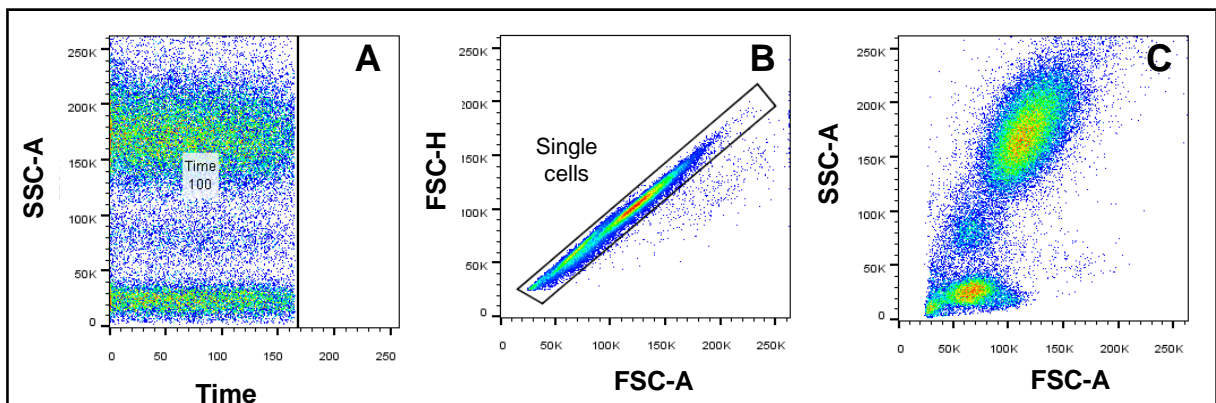
As amostras foram enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG, para que pudessem ser processadas. O processamento para MET envolveu as etapas de fixação secundária, desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação. Já para MEV, envolveu as etapas de desidratação, montagem e metalização. Após as etapas de processamento, as imagens foram adquiridas utilizando microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 – FEI SpiritBiotwin 120kV para as amostras de MET e o microscópio eletrônico de varredura – FEI Quanta 200 FEG e, posteriormente, analisadas quanto aos aspectos ultra-estruturais, morfológicos e subcelulares.

#### **4.3.8 Estratégias de análise dos dados obtidos nos experimentos *ex vivo* utilizando leucócitos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* e tratados ou não com os fármacos, por citometria de fluxo**

##### **4.3.8.1 Estratégias de análise multiparamétrica de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo**

Para a identificação das populações celulares em estudo, inicialmente, foi feita a análise de Time *versus* granulosidade celular (*Side Scatter Area* - SSC-A) (Time x SSC-A) (Figura 15A), em que as células foram selecionadas de acordo com a homogeneidade da leitura, ou seja, essa análise é importante para verificar se houve alguma bolha ou falha durante a leitura das amostras que possa ter provocado momentos de interrupção no fluxo e aquisição inadequada das amostras. A partir da seleção das células, foram construídos gráficos de tamanho celular em relação à área (*Forward Scatter Area* - FSC-A) *versus* tamanho celular em relação à altura (FSC-H) (FSC-A x FSC-H), para selecionar os singletos ou “*single cells*” (Figura 15B) que representa o fluxo individual de células passando pelo laser. Após identificação e seleção da população de “*single cells*”, foram construídos gráficos de tamanho celular *versus* granulosidade (FSC-A x SSC-A) para verificação do perfil morfométrico dos leucócitos do sangue periférico (Figura 15C).



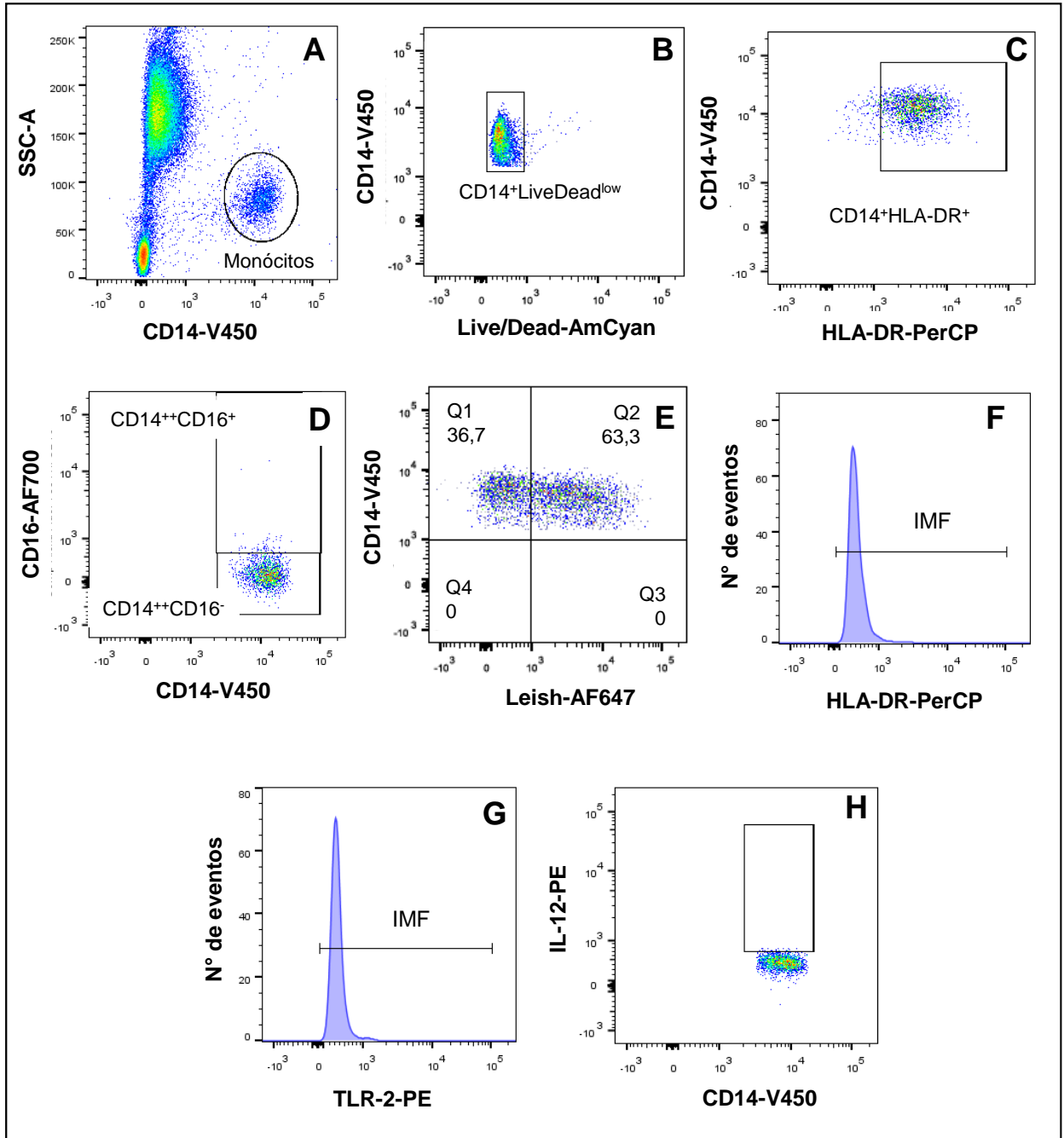


**Figura 15.** Análise da qualidade da leitura das amostras, por citometria de fluxo. (A) representa a homogeneidade da leitura, através do perfil de Time *versus* granulosidade celular (SSC-A). (B) representa a seleção das “*singles cells*”, células únicas que passaram individualmente pelo laser, em gráficos de FSC-H *versus* FSC-A (tamanho celular em relação a área *versus* tamanho celular em relação à altura); (C) representa o perfil morfométrico dos leucócitos do sangue periférico, em gráficos de FSC-A *versus* SSC-A (tamanho *versus* granulosidade).

Os monócitos foram identificados e selecionados por uma janela - “*gate*”, em gráficos de CD14-V450 *versus* granulosidade celular (SSC-A) (Figura 16A). Após seleção da população de interesse foi possível avaliar o percentual de monócitos viáveis, em gráficos de *Live/Dead<sup>low</sup>* *versus* CD14-V450 (Figura 16B). A partir da seleção dos monócitos viáveis, foram construídos gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD14-V450, para seleção dos monócitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>++</sup> (Figura 16C). Dentro do “*gate*” dos monócitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>++</sup>, os mesmos foram categorizados em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e monócitos não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), por meio da construção de gráficos de CD14-V450 *versus* CD16-Alexa Fluor 700 (CD16-AF700), representados na Figura 16D.

O percentual de fagocitose de formas promastigotas de *L. infantum* por cada subpopulação de monócitos, na presença e ausência dos fármacos estudados, foi realizado por meio da seleção da subpopulação de monócito e construção de gráficos de Leish-AF647 (Leish-Alexa Fluor 647) *versus* CD14-V450 (Figura 16E). Também, em cada subpopulação de monócito, foram avaliadas as densidades de expressão de CD14-V450, da molécula de ativação HLA-DR-PerCP e dos receptores Toll TLR-2-PE e TLR-4-PE, por meio da intensidade média de fluorescência (IMF), obtidas por meio da construção de histogramas.

Já a análise do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas IL-12, TNF, TGF- $\beta$  e IL-10 foi avaliada somente na população de monócitos totais - CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. Após seleção da população de interesse, foram construídos gráficos de CD14-V450 *versus* citocina-PE, em que foi possível quantificar o percentual de monócitos produtores de cada citocina avaliada (Figura 16H).



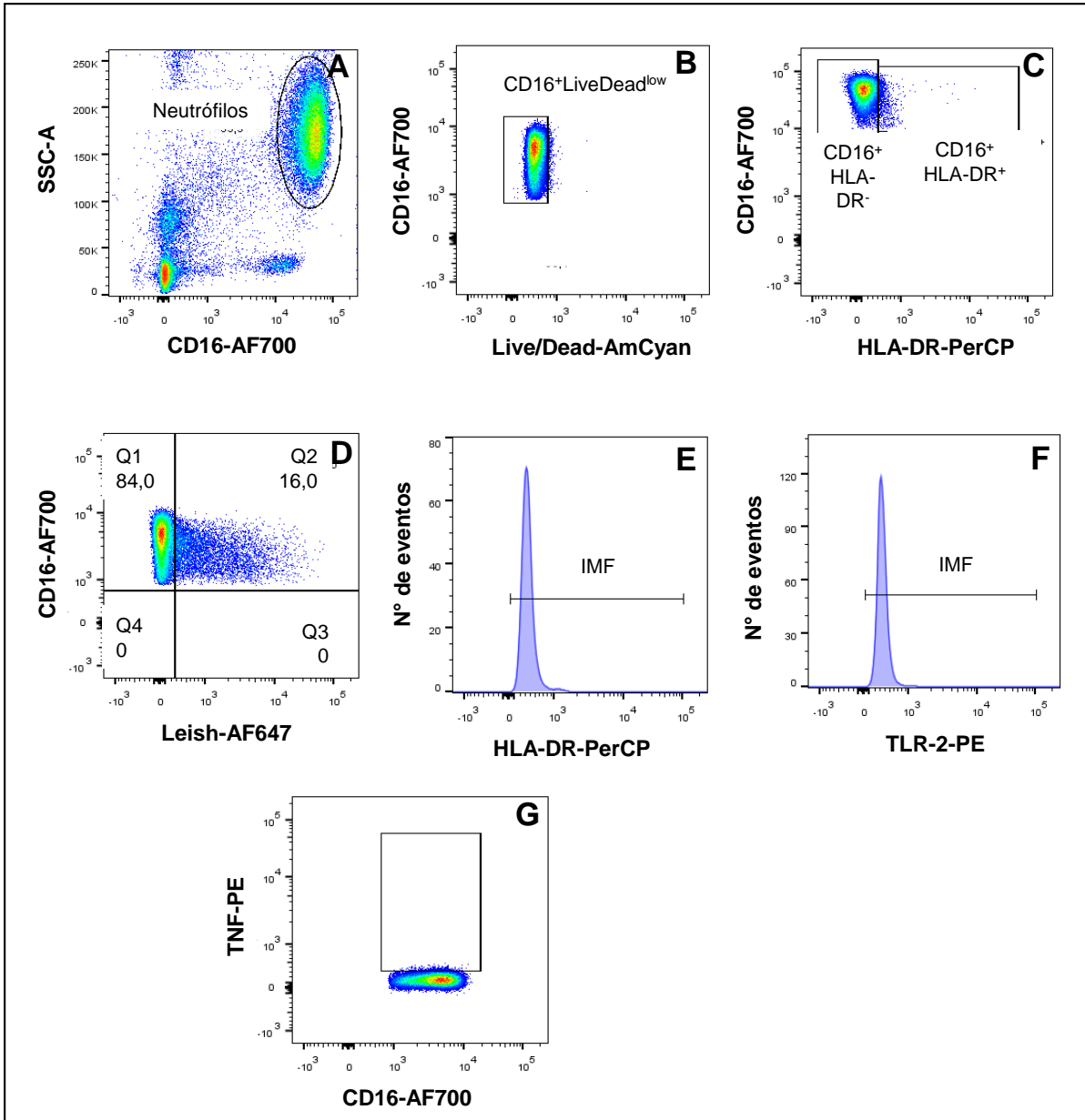
**Figura 16.** Análise da população de monócitos do sangue periférico humano, por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada por meio de gráficos de CD14-V450 *versus* SSC-A (granulosidade); (B) representa a seleção da população de monócitos viáveis, por meio de gráficos de *Live/Dead-AmCyan versus* CD14-V450; (C) análise dos monócitos quanto à expressão de HLA-DR, em gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD14-V450; (D) representa a subdivisão de monócitos em duas subpopulações, monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), por meio de gráficos de CD14-V450 *versus* CD16-AF700; (E) análise de cada subpopulação de monócitos quanto ao perfil de fagocitose, em gráficos de Leish-AF647 *versus* CD14-V450; (F) representa a expressão de HLA-DR avaliada em histogramas da intensidade média de fluorescência (IMF) de HLA-DR-PerCP *versus* número de eventos; (G) representa a IMF da expressão dos receptores Toll (TLR-2-PE) *versus* número de eventos; (H) representa a produção de citocinas intracitoplasmáticas, em gráficos de CD14-V450 *versus* IL-12-PE (citocina-PE).

#### 4.3.8.2 Estratégias de análise multiparamétrica de neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo

A seleção da população de neutrófilos se deu, inicialmente, conforme descrito na Figura 15 acima. Os neutrófilos foram identificados por meio de gráficos de CD16-AF700 *versus* SSC-A (granulosidade) (Figura 17A). Após seleção dos neutrófilos, foi realizada análise para separação e seleção dos neutrófilos viáveis, por meio de gráficos de *Live/Dead*<sup>ow</sup> *versus* CD16-AF700 (Figura 17B). Posterior à seleção dos neutrófilos viáveis, os mesmos foram analisados quanto à expressão de HLA-DR, sendo analisados como neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e neutrófilos não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>), por meio da construção de gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD16-AF700 (Figura 17C).

O percentual de fagocitose de formas promastigotas de *L. infantum* por cada subpopulação de neutrófilo, na presença e ausência dos fármacos estudados, foi realizado por meio da seleção da subpopulação de neutrófilo e construção de gráficos de Leish-AF647 (Leish-Alexa Fluor 647) *versus* CD16-AF70 (Figura 17D). Também, em cada subpopulação de neutrófilo, foi avaliada a densidade de expressão de HLA-DR-PerCP (Figura 15E) e dos receptores Toll TLR-2-PE e TLR-4-PE (Figura 17F), por meio da intensidade média de fluorescência (IMF), obtidas por meio da construção de histogramas.

Já o perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas IL-12, TNF, TGF- $\beta$  e IL-10 foi avaliado por meio da seleção da subpopulação de neutrófilo e construção de gráficos de CD16-AF700 *versus* citocina-PE (Figura 17G), em que foi possível quantificar o percentual de células produtoras de cada citocina avaliada.



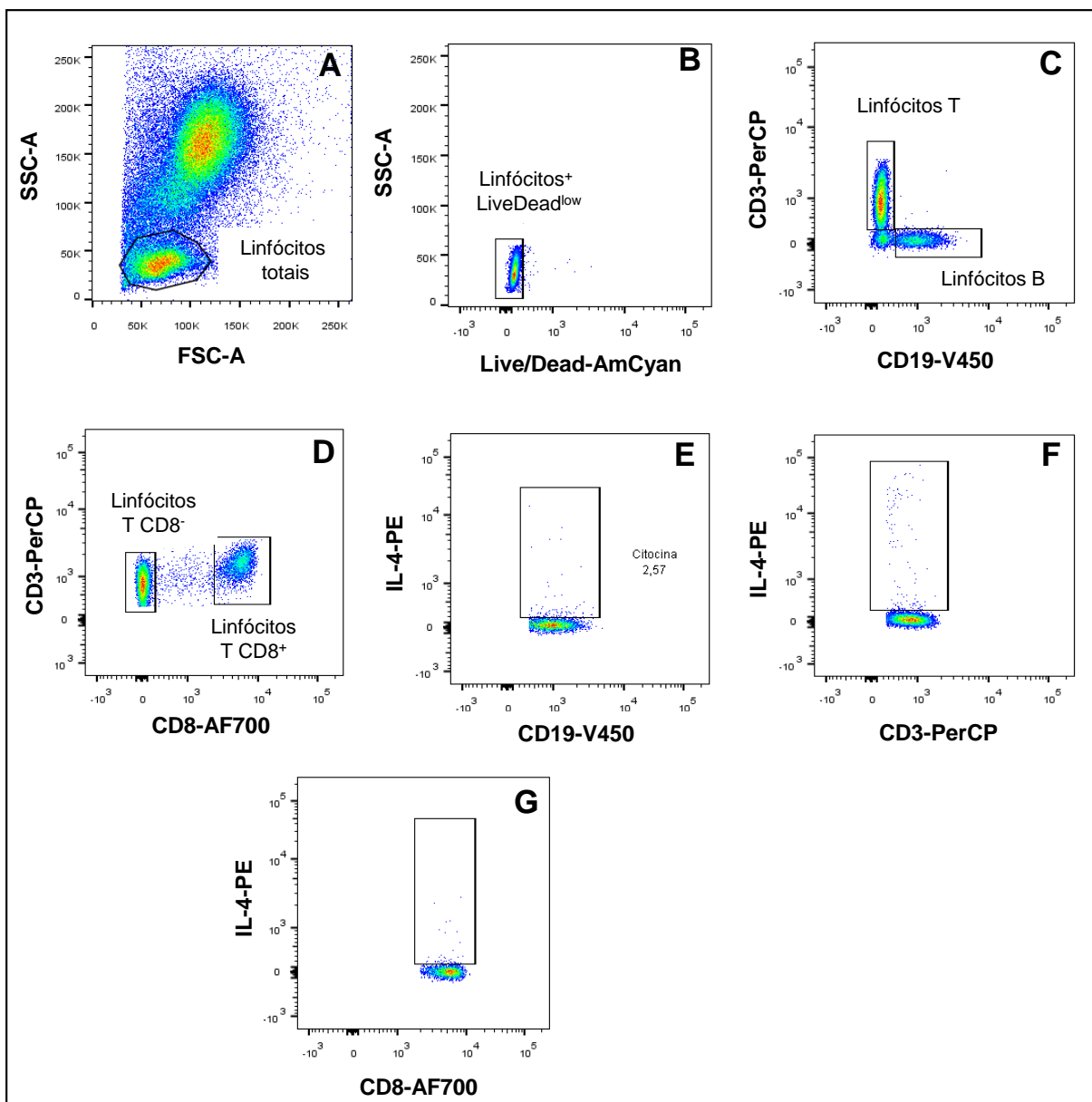
**Figura 17.** Análise da população de neutrófilos do sangue periférico humano, por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de neutrófilos, selecionada por meio de gráficos de CD16-AF700 *versus* SSC-A (granulosidade); (B) representação da seleção da população de neutrófilos viáveis, por meio de gráficos de *Live/Dead-AmCyan versus* CD16-AF700; (C) análise dos neutrófilos considerando a expressão de HLA-DR, em gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD16-AF700; (D) análise de neutrófilos quanto ao perfil de fagocitose, em gráficos de Leish-AF647 *versus* CD16-AF700; (E) análise de neutrófilos quanto a expressão de HLA-DR, em histogramas da intensidade média de fluorescência (IMF) de HLA-DR-PerCP *versus* número de eventos. (F) representa a IMF da expressão dos receptores Toll (TLR-2-PE) *versus* número de eventos; (G) representa o perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas, em gráficos de CD14-V450 *versus* TNF-PE (citocina-PE).

#### 4.3.8.3 Estratégias de análise multiparamétrica para linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Da mesma maneira, assim como para as populações de monócitos e neutrófilos, as análises iniciais para os linfócitos compreenderam estratégias já descritas na Figura 15.

A partir do perfil de tamanho *versus* granulosidade, foi possível identificar e selecionar a população de linfócitos (Figura 18A). Uma vez selecionada, procedeu-se a análise da viabilidade celular, com seleção da população de linfócitos viáveis, por meio de gráficos de *Live/Dead<sup>low</sup>* *versus* SSC-A (Figura 18B). Selecionada a população viável, foi feita a separação dos linfócitos T totais dos linfócitos B, por meio de gráficos de CD19-V450 *versus* CD3-PerCP (Figura 18C). Dentro do “gate” dos linfócitos T totais, foi realizada a separação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>, em gráficos de CD8-AF700 *versus* CD3-PerCP (Figura 18D).

Para cada subpopulação de linfócito foi possível obter o perfil de produção intracitoplasmática das citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, por meio de gráficos de CD19-V450 *versus* citocina-PE (para linfócitos B), CD8-AF700 *versus* citocina-PE e CD3-PerCP *versus* citocina-PE (Figuras 18E, 18F e 18G).



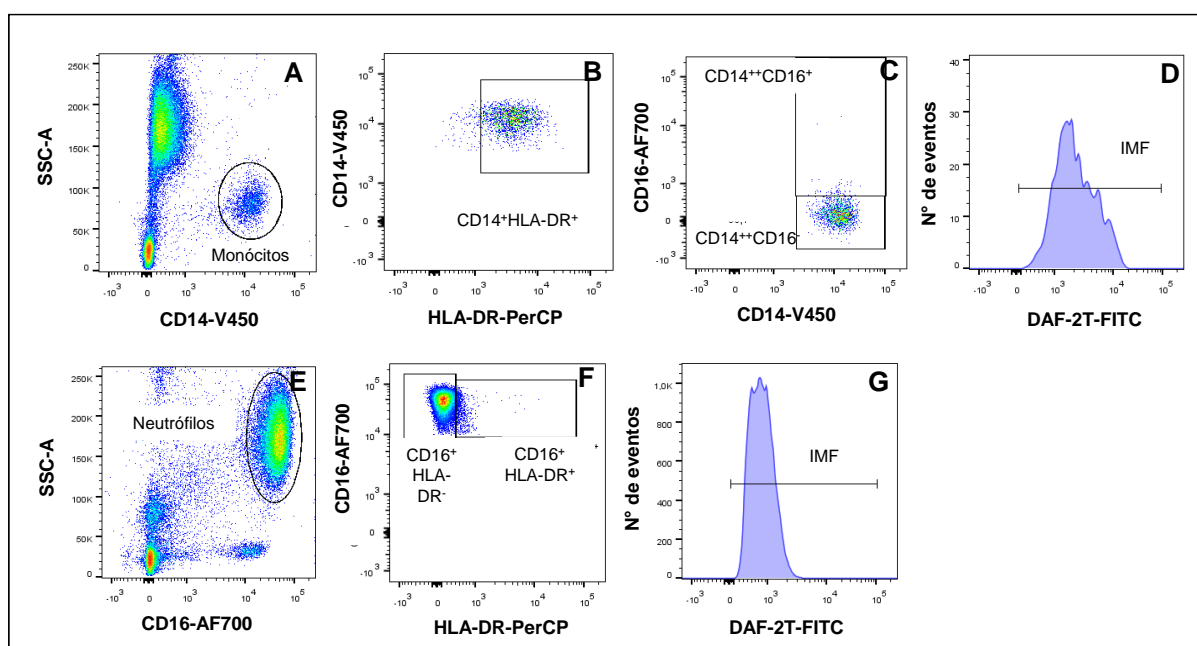
**Figura 18.** Análise da população de linfócitos, por citometria de fluxo. (A) representa a separação e seleção dos linfócitos totais, em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (FSC-A *versus* SSC-A); (B) representa a seleção dos linfócitos viáveis, em gráficos de *Live/Dead-AmCyan versus* SSC-A; (C) representa a seleção das populações de linfócitos B e T totais, em gráficos de CD19-V450 *versus* CD3-PerCP; (D) representa a identificação das subpopulações de linfócitos T totais (T CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>), em gráficos de CD8-AF700 *versus* CD3-PerCP; (E) (F) (G) representam as estratégias de análise do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas, em cada subpopulação de linfócito, em gráficos de CD19-V450 *versus* IL-4-PE, CD3-PerCP *versus* IL-4-PE e CD8-AF700 *versus* IL-4-PE, respectivamente.

#### 4.3.8.4 Estratégias de análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos e neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo

A análise inicial para a produção de óxido nítrico intracelular, por monócitos e neutrófilos do sangue periférico, se deu da mesma forma como descrito na Figura 15.

Para a seleção da população de monócitos, foram construídos gráficos de CD14-V450 *versus* SSC-A (Figura 19A). Seleccionada a população de interesse, os monócitos foram definidos de acordo com a expressão de HLA-DR, de acordo com a Figura 19B. Em seguida, os monócitos foram subdivididos em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), por meio da construção de gráficos de CD14-V450 *versus* CD16-AF700 (Figura 19C). Dentro de cada subpopulação de monócitos, a intensidade média de fluorescência (IMF) de DAF-2T foi avaliada e visualizada por meio de histogramas DAF-2T-FITC *versus* número de eventos (Figura 19D).

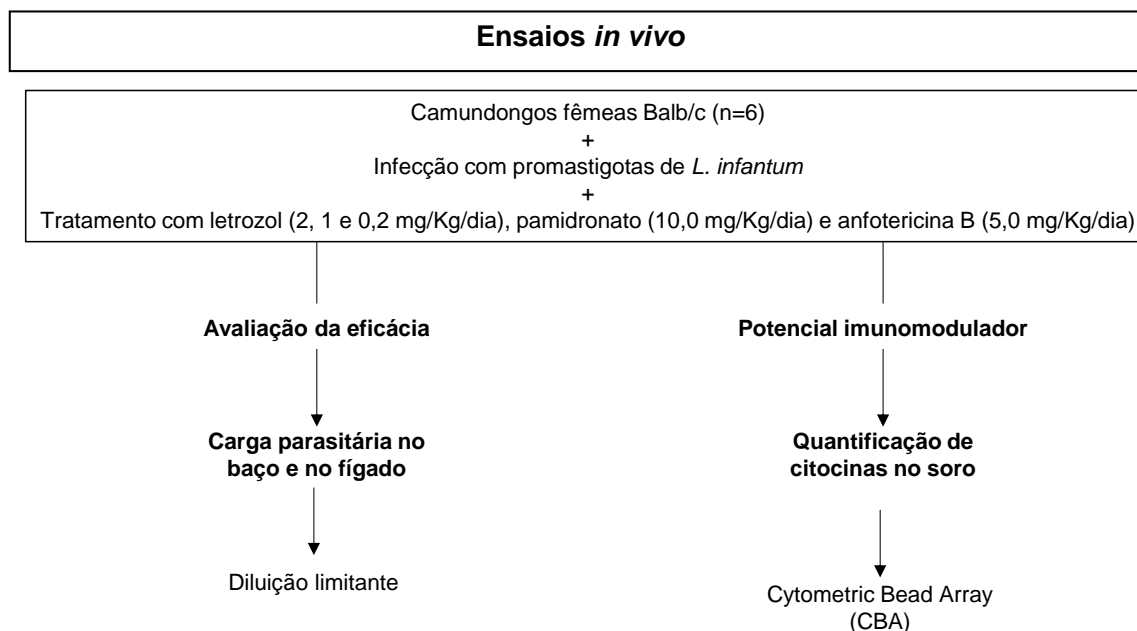
Já os neutrófilos foram selecionados em gráficos de CD16-AF700 *versus* SSC-A (Figura 19E) e, uma vez selecionados, os neutrófilos foram separados quanto à expressão de HLA-DR, em gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD16-AF700 (Figura 19F). Em seguida, dentro de cada subpopulação de neutrófilos, foi avaliado o perfil de produção intracelular de NO por meio de histogramas de IMF de DAF-2T-FITC *versus* número de eventos (Figura 19G).



**Figura 19.** Análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por monócitos e neutrófilos do sangue periférico, por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada por meio de gráficos de CD14-V450 *versus* SSC-A (granulosidade); (B) análise dos monócitos quanto à expressão de HLA-DR, em gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD14-V450; (C) representa a subdivisão de monócitos em duas subpopulações, monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), por meio de gráficos de CD14-V450 *versus* CD16-AF700; (D) análise de cada subpopulação de monócitos quanto ao perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por meio de histogramas de intensidade média de fluorescência (IMF) de DAF-2T-FITC *versus* número de eventos; (E) representa o perfil celular da população de neutrófilos, selecionada por meio de gráficos de CD16-AF700 *versus* SSC-A (granulosidade); (F) representa a subdivisão dos neutrófilos considerando a expressão de HLA-DR, em gráficos de HLA-DR-PerCP *versus* CD16-AF700; (G) análise das subpopulações de neutrófilos quanto ao perfil de produção de óxido nítrico intracelular, por meio de histogramas de intensidade média de fluorescência (IMF) de DAF-2T-FITC *versus* número de eventos.

#### 4.4 Avaliação do potencial imunomodulador e da eficácia *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental

Os estudos para avaliação do potencial antileishmania e imunomodulador dos dois fármacos anticâncer foram realizados no modelo de leishmaniose visceral experimental, conforme Figura 20 abaixo:



**Figura 20.** Desenho esquemático demonstrando as estratégias experimentais utilizadas para avaliação da atividade antileishmania e imunomoduladora *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c.

##### 4.4.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA – Fiocruz), sob a licença LW4/20.

##### 4.4.2 Obtenção das formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Após sete dias, os parasitos estavam viáveis e foi realizada a infecção de dois camundongos Balb/c, via intravenosa na veia lateral da cauda. Oito dias após, o baço e fígado dos animais foram removidos, triturados e o material processado obtido em meio de cultura Schneider suplementado foi colocado em placas de cultura estéril de 96 poços. Após 8 dias, culturas de promastigotas em meio Schneider suplementado foram iniciadas para a obtenção de massa de parasitas para a infecção.



#### 4.4.3 Animais

Para este ensaio, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas Balb/c, com idade de 4-6 semanas, e pesando entre 20-25 gramas, adquiridos do Biotério do Instituto René Rachou, Fiocruz/Minas. Os animais foram alojados no Biotério, equipado com controle de temperatura, ventilação, ciclo claro-escuro (12/12 horas) e acondicionados em caixas de plástico. Durante todo o tempo de execução do protocolo, os animais tiveram livre acesso a água e ração.

#### 4.4.4 Infecção, tratamento e eutanásia dos animais

Os animais foram infectados com as formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento, provenientes da fase estacionária de crescimento, através do inóculo de  $2,0 \times 10^7$  parasitos/200 $\mu$ L, por injeção intravenosa (veia lateral da cauda).

Após sete dias de infecção, os animais foram separados em grupos (n=6), e tratados uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos, com pamidronato 10,0 mg/Kg/dia (100  $\mu$ L) via intraperitoneal e com letrozol nas doses de 2, 1 e 0,2 mg/Kg/dia via gavagem (200  $\mu$ L). Anfotericina B foi utilizada como medicamento de referência e administrada na dose de 5,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal (200  $\mu$ L). Os animais dos grupos controles foram infectados e não tratados ou receberam diluente carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (200  $\mu$ L) via gavagem, que foi utilizado para a solubilização do letrozol.

Após três dias do final do tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina 100mg/Kg + xilazina 10,0 mg/Kg, via intraperitoneal e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 18°C e o soro foi armazenado a -20°C, para a quantificação de citocinas. Após coleta do sangue, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e o baço e o fígado de cada animal foi coletado. A eficácia dos fármacos foi determinada através da quantificação da carga parasitária no baço e no fígado, determinada pelo método de diluição limitante.

Os animais foram observados diariamente, quanto aos aspectos que seriam indicativos de dor e sofrimento, como ereção dos pelos e isolamento. Adicionalmente, a toxicidade foi estimada através da massa corpórea, antes e após os tratamentos.

#### 4.4.5 Diluição limitante

Após a eutanásia dos animais, o baço e o fígado foram coletados e colocados em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL contendo meio Schneider não suplementado. As amostras foram homogeneizadas em Ultra-Turrax e, em seguida, as suspensões foram centrifugadas, a 50 x g para o baço, por dois minutos a 4°C, e a 52 x g por um minuto a 4°C

para o fígado, para sedimentação. O sobrenadante de cada órgão foi coletado e colocado em outro tubo cônico de polipropileno de 15 mL e novamente centrifugados, a 1620 x g por dois minutos a 4°C para o baço e a 1900 x g por 10 minutos a 4°C para o fígado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio Schneider suplementado com 10% SFB e solução antibiótica (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). A diluição foi realizada em triplicata (1:10), em cultivos sucessivos em placas de 96 poços, que foram incubadas em estufa B.O.D. a 26°C, por 8 dias. Após o tempo de incubação, cada poço foi examinado em microscópio de luz invertida para avaliar a presença de parasitos viáveis. A carga parasitária nos órgãos foi determinada a partir da menor diluição em que o crescimento foi observado (Titus et al., 1985).

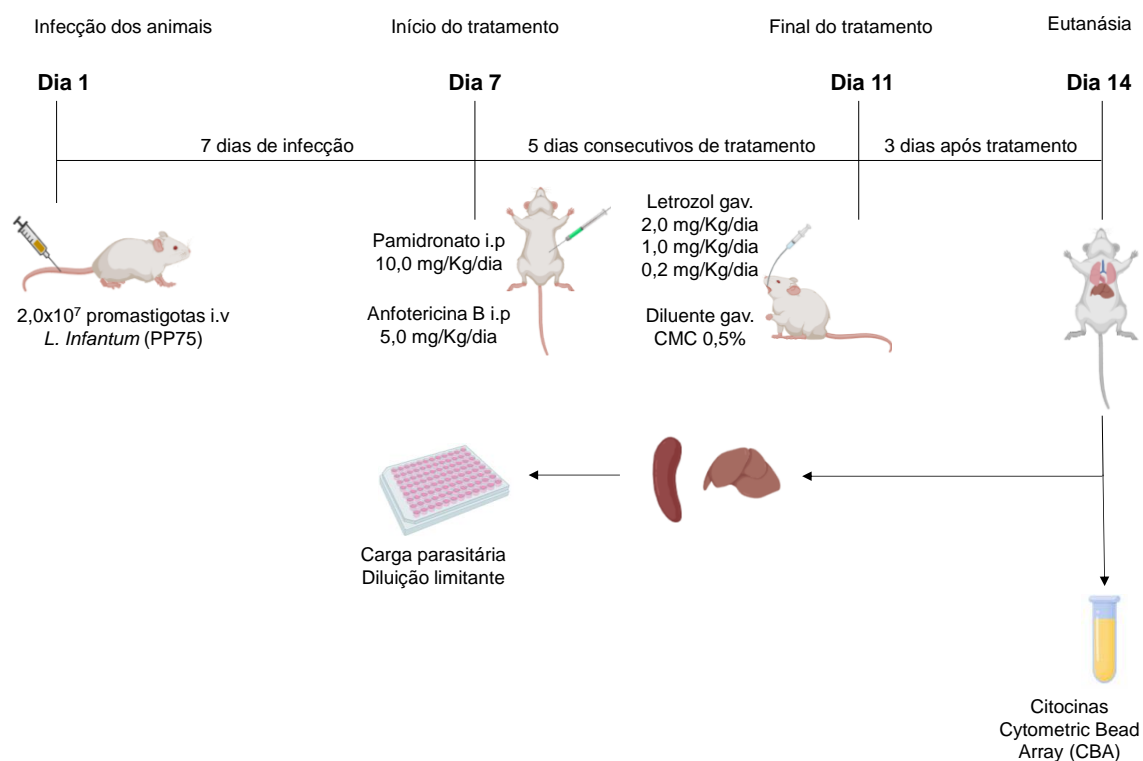
#### **4.4.6 Quantificação de citocinas séricas por citometria de fluxo**

A quantificação de citocinas séricas foi realizada empregando-se o ensaio citofluorimétrico Cytometric Bead Array (CBA, Becton Dickinson-BD), em que diferentes citocinas podem ser quantificadas, simultaneamente, utilizando-se pequenos volumes de amostra, por meio de microesferas fluorescentes com diferentes intensidades de fluorescência e conjugadas com anticorpos específicos para as citocinas a serem analisadas, sendo posteriormente detectadas no canal FL-3 do citômetro de fluxo FACSverse™ (Becton Dickinson).

Foi utilizado o kit Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit – IL-2, IL-4, IL-6, IFN, TNF, IL-17A e IL-10 (Becton Dickinson-BD), e o protocolo realizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas populações de microesferas com intensidades de fluorescência distintas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura específicos para cada citocina a ser analisada. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços fundo em U (Falcon) incubando-se 25 µL das amostras de soro dos animais juntamente com 17 µL da mistura de microesferas e 17 µL do reagente de detecção PE (ficoeritrina). O mesmo procedimento foi realizado para as curvas-padrão de citocinas, com incubação de 25 µL dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (“Top Standart” – 5000pg/mL, 1:2 – 2500pg/mL, 1:4 – 1250pg/mL, 1:8 – 625pg/mL, 1:16 – 312,5pg/mL, 1:32 – 156pg/mL, 1:64 – 80pg/mL, 1:128 – 40pg/mL e 1:256 – 20pg/mL) e 25µL de diluente G apenas (controle negativo). As amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 3 horas, em agitador de placas (velocidade de 500 rpm).

Após o período de incubação, 160 µL da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA), foram adicionados às amostras, seguido de centrifugação a 400 x g, durante 10 minutos à 18°C, para lavagem das microesferas de captura. Após centrifugação, as microesferas foram ressuspensionadas utilizando-se 200 µL do reagente F.

Foram adquiridas pelo menos 300 microesferas por analito avaliado com o auxílio do software FACS Suite versão 1.0 no citômetro de fluxo FACSverse™ (Becton Dickinson). As populações de microesferas foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. Os resultados foram gerados em intensidade média de fluorescência do canal de revelação FL-2 e expressos em pg/mL por meio da análise de equação do quinto parâmetro logístico, utilizando-se o software FCAP array v3.0 (Soft Flow).



**Figura 21.** Desenho esquemático demonstrando o protocolo para avaliação da atividade antileishmaniana e imunomoduladora dos fármacos letrozol e pamidronato *in vivo*.

#### 4.5 Análise estatística dos dados

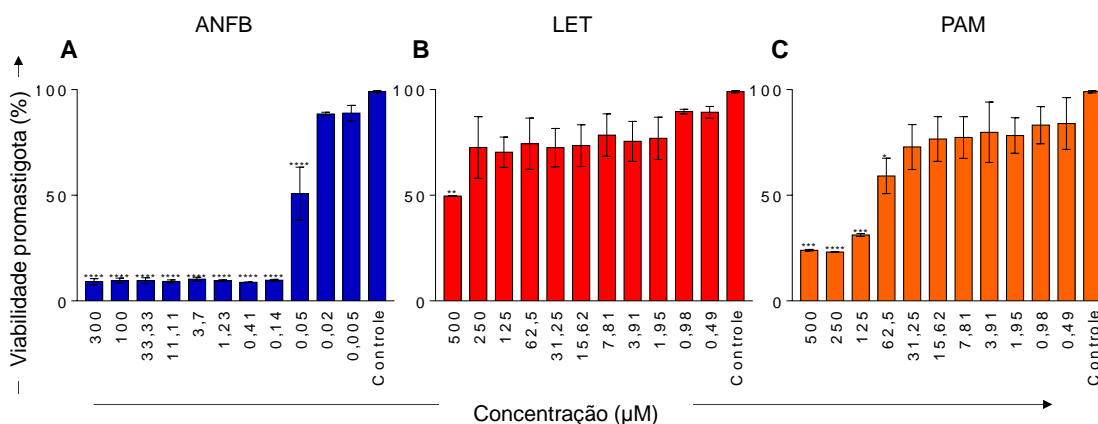
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 7.0.0 (San Diego, CA). Todos os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade. Para os dados que apresentaram distribuição não paramétrica, a comparação entre dois grupos foi feita aplicando-se o teste de Mann Whitney. Para os dados paramétricos, empregou-se o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ou Dunnett's. Os dados obtidos por meio da diluição limitante foram transformados em  $\log+1$  e avaliados conforme descrito acima. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p$  menor que 0,05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade celular e das atividades antiamastigota e antipromastigota *in vitro* dos fármacos letrozol e pamidronato

#### 5.1.1 Avaliação da atividade antipromastigota

A Figura 22 demonstra os dados da atividade antipromastigota dos fármacos letrozol (LET) e pamidronato (PAM). Observa-se que nas concentrações avaliadas, LET foi tóxico para as formas promastigotas de *L. infantum* na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , quando comparado ao controle não tratado (Figura 22B). Já o pamidronato se mostrou tóxico para os parasitos nas concentrações de 500 a 62,5  $\mu\text{M}$ , quando comparado ao controle não tratado (Figura 22C). A anfotericina B, fármaco referência e utilizado neste estudo como controle positivo, se mostrou tóxico nas concentrações de 300 a 0,05  $\mu\text{M}$  (Figura 22A).



**Figura 22.** Avaliação da atividade antipromastigota dos fármacos (A) anfotericina B (ANFB), (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), após 72 horas de tratamento. Os resultados estão expressos como percentual de viabilidade das promastigotas de *L. infantum*, quantificada pelo ensaio de MTT, em formato de gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média, de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações dos grupos ANFB, LET e PAM em relação à cultura controle (não tratado) estão representadas pelo nível de significância destacado por: \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

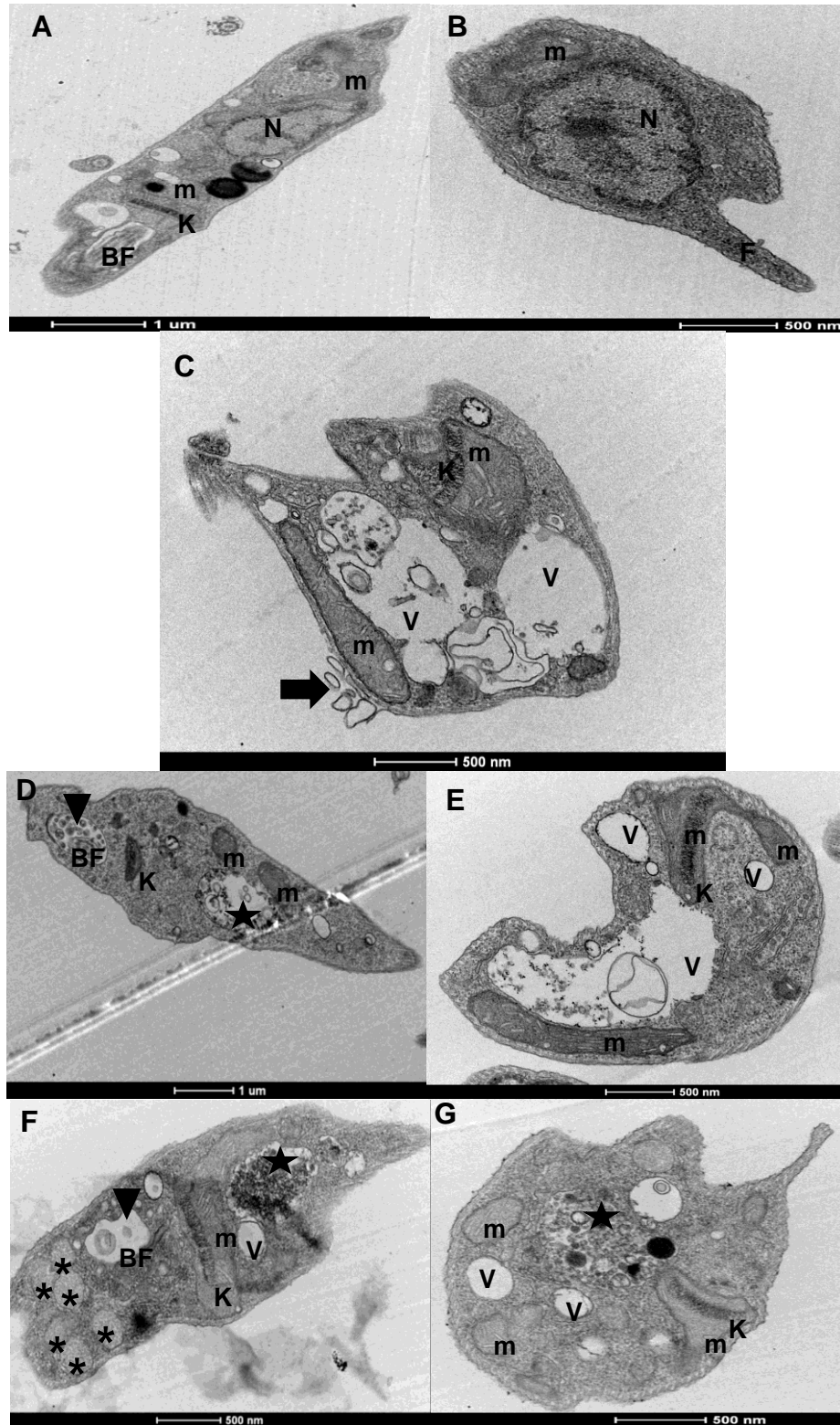
Após verificar a atividade dos fármacos letrozol e pamidronato contra as formas promastigotas de *L. infantum*, foram determinados os respectivos valores de  $\text{CI}_{50}$  para os parasitos, conforme disposto na Tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) dos fármacos letrozol e pamidronato contra as formas promastigotas de *L. infantum*.

<b>Fármacos</b>	<b>Promastigotas CI<sub>50</sub>, μM (95% IC)</b>
Letrozol	466,32 (452,9 – 1046)
Pamidronato	93,84 (20,97– 232,2)
Anfotericina B	0,09 (0,04 – 0,14)

95% IC: intervalo de confiança de 95%; μM: micromolar.

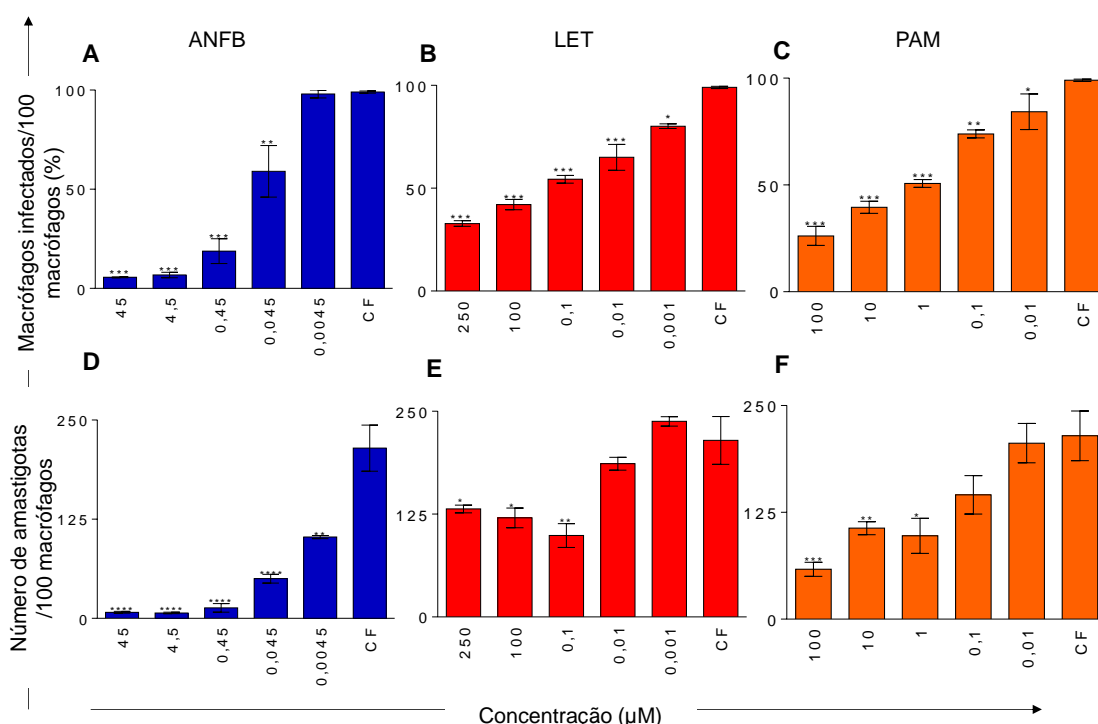
As alterações ultraestruturais e subcelulares analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formas promastigotas de *L. infantum*, tratadas com as concentrações de CI<sub>50</sub> obtidas para cada fármaco, durante 72 horas, estão apresentadas na Figura 23. As Figuras 23A e 23B representam as formas promastigotas da cultura controle (sem tratamento). É possível observar parasitos com aspectos e organelas normais, de acordo com as descritas na literatura (Silva et al., 2014), com evidência do núcleo (N), mitocôndrias (m), cinetoplasto (K) e bolsa flagelar (BF). É possível observar que ANFB promove vacuolização dos parasitos e alterações na membrana (presença de *blebs*) (Figura 23C). Nas Figuras 23D e 23E, é demonstrado que o tratamento com letrozol desencadeia formação de vacúolos, aparente modificação na morfologia do cinetoplasto e das mitocôndrias e presença de vacúolos contendo corpos multivesiculares no citoplasma. As mesmas alterações foram observadas após tratamento dos parasitos com pamidronato (Figuras 23F e 23G).



**Figura 23.** Avaliação ultraestrutural e subcelular das formas promastigotas de *L. infantum* por microscopia eletrônica de transmissão, da (A-B) cultura controle (sem tratamento); e promastigotas tratadas com as respectivas  $CI_{50}$  de (C) Anfotericina B; (D-E) letrozol e (F-G) pamidronato, após 72 horas. Seta preta cheia indica *blebs* de membrana. Cabeça de seta preta indica vesícula dentro da bolsa flagelar. Asteriscos indicam vesículas. Estrela indica vacúolos contendo corpos multivesiculares. N: núcleo; m: mitocôndria; K: kinetoplasto; V: vacúolo; F: flagelo; BF: bolsa flagelar.

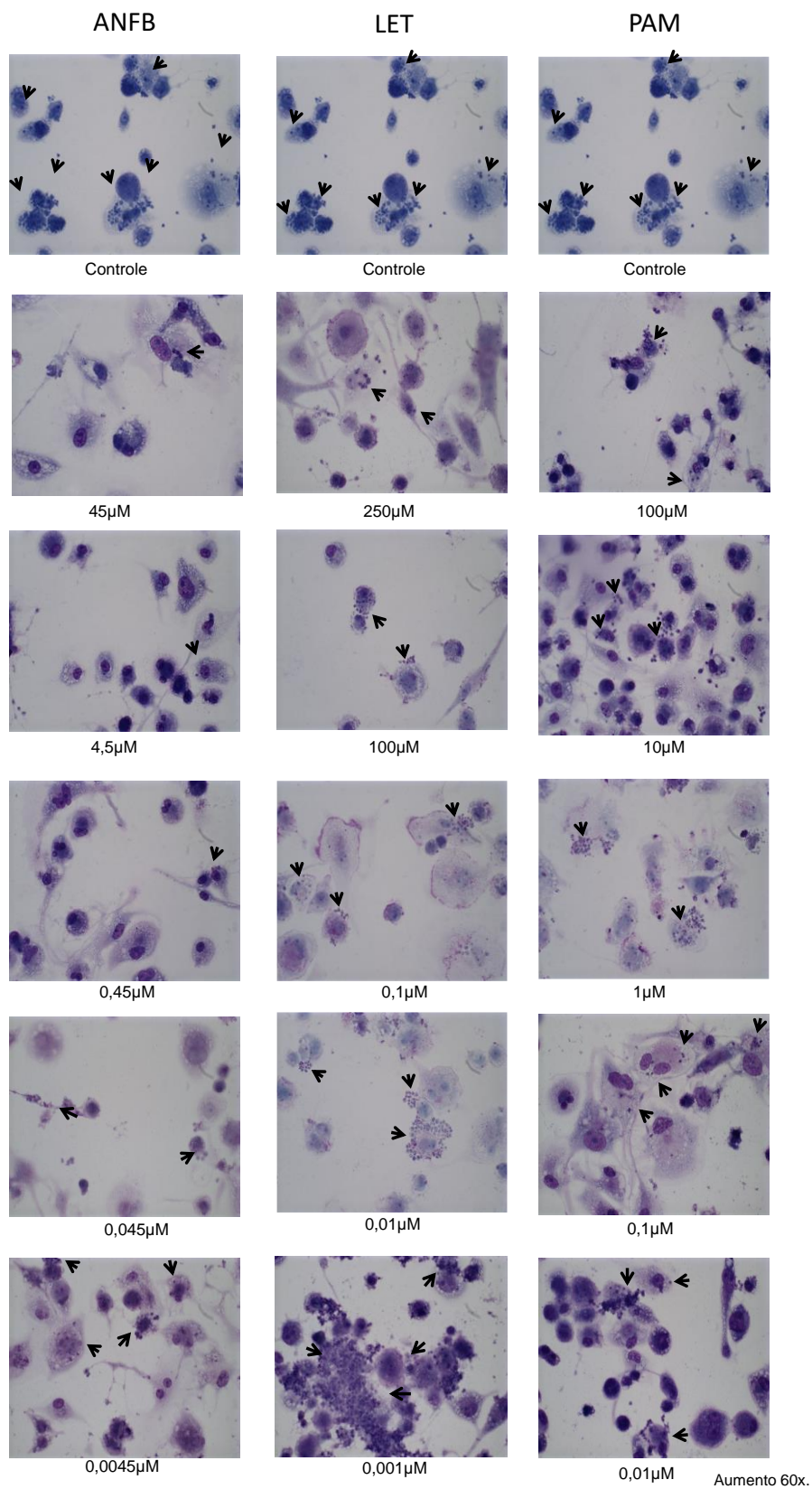
### 5.1.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

A Figura 24 mostra o percentual de macrófagos infectados, bem como a quantidade de amastigotas intramacrófago, após o tratamento com LET e PAM. Observa-se que LET e PAM promoveram redução do percentual de células infectadas, de maneira concentração-dependente quando comparado à cultura controle de fagocitose (CF) (Figuras 24B e 24C). O número de amastigotas intracelular também foi reduzido nas condições avaliadas (Figuras 24E e 24F). O medicamento de referência, ANFB, por meio da metodologia utilizada, se mostrou efetivo em ambas as análises (Figuras 24A e 24D).



**Figura 24.** Avaliação da atividade anti-amastigota dos fármacos anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM). (A), (B) e (C) representam o percentual de macrófagos infectados, após tratamento com ANFB, LET e PAM, respectivamente, e após 72 horas de tratamento; (D), (E) e (F) representam o número de amastigotas intramacrófago, após tratamento com ANFB, LET e PAM, respectivamente. Os resultados estão expressos em gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média, de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações dos grupos ANFB, LET e PAM em relação à cultura controle de fagocitose (CF) estão representadas pelo nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,005$ ), \*\*\* ( $p < 0,002$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

A Figura 25 mostra fotos representativas das células infectadas com *L. infantum* (controle) e após tratamento com ANFB, LET e PAM, nas diferentes concentrações avaliadas. É possível observar grande presença de amastigotas intracelulares na cultura controle, que é reduzida pela presença dos fármacos, de maneira concentração-dependente.

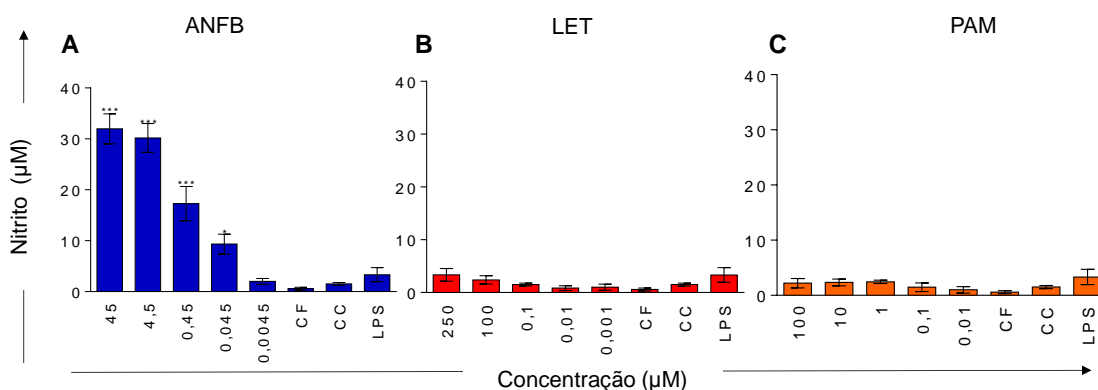


**Figura 25.** Figuras representativas dos macrófagos derivados de células THP-1 infectados com *L. infantum* (controle) e tratados com diferentes concentrações, por 72 horas, com anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM). As setas indicam algumas das células infectadas. Aumento 60x.



### 5.1.2.1 Dosagem de óxido nítrico

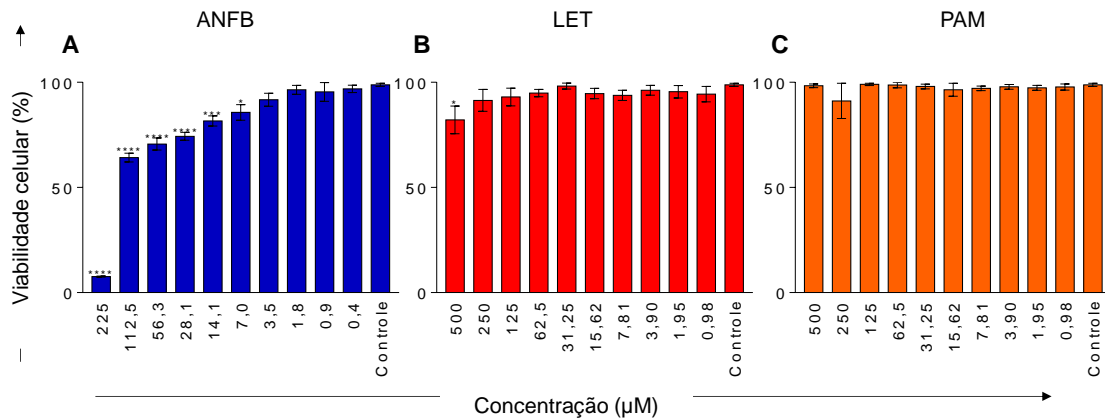
A Figura 26 representa os dados obtidos da dosagem de óxido nítrico (NO), através da quantificação de nitrito presente no sobrenadante das culturas, após 72 horas de tratamento, pela reação de Griess. Os dados demonstram que LET e PAM não promovem produção de NO nas concentrações e no tempo avaliados (Figuras 26B e 26C), quando comparados ao grupo contendo somente células infectadas com *L. infantum* (CF). O controle positivo ANFB, sabidamente indutor da produção de NO, estimulou a liberação de NO, de maneira concentração-dependente (Figura 26A).



**Figura 26.** Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos derivados de células THP-1 (CC), infectados com *L. infantum* (CF) e após tratamento com (A) anfotericina B (ANFB), (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), por 72 horas. A concentração de óxido nítrico foi avaliada pelo método de Griess. Os resultados estão expressos como concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ), em gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média, de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações dos grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo controle de fagocitose (CF) estão representadas pelo nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

### 5.1.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados de células THP-1

A Figura 27 mostra os resultados referentes à avaliação da citotoxicidade dos dois fármacos LET e PAM para macrófagos derivados de células THP-1, avaliada pela mensuração da viabilidade celular. O ensaio de viabilidade celular usando MTT demonstra que LET na concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi capaz de promover redução da viabilidade celular, observada pela redução da metabolização do MTT em 20%, quando comparado com o controle não tratado (Figura 27B). Não foi observada perda de viabilidade celular com pamidronato, nas concentrações avaliadas (Figura 27C). Redução da viabilidade celular foi observada com ANFB nas concentrações de 225 a 7  $\mu\text{M}$  (Figura 27A).



**Figura 27.** Avaliação da viabilidade de macrófagos derivados de células THP-1, após tratamento com os fármacos (A) anfotericina B (ANFB) (B) letrozol (LET) e (C) pamidronato (PAM), por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pela metabolização do MTT. Os resultados estão expressos como percentual de viabilidade celular, em formato de gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média, de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações dos grupos ANFB, LET e PAM em relação à cultura controle (não tratado) estão representadas pelo nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Após verificar a atividade dos fármacos letrozol e pamidronato contra as amastigotas intracelulares de *L. infantum*, bem como a citotoxicidade em macrófagos derivados de células THP-1, foi possível determinar os respectivos valores de  $CI_{50}$  para os parasitos e  $CC_{50}$  para as células, de acordo com a Tabela 6. Através desses dados, o índice de seletividade (IS) pôde ser estimado, conforme disposto na Tabela 6.

**Tabela 6.** Concentrações inibitória ( $CI_{50}$ ) e citotóxica ( $CC_{50}$ ), e índice de seletividade (IS) dos fármacos letrozol e pamidronato contra as formas amastigotas intracelulares e macrófagos derivados de células THP-1.

Fármacos	Amastigotas $CI_{50}$ , $\mu M$ (95% IC)	MØ $CC_{50}$ , $\mu M$ (95% IC)	Índice de Seletividade (IS)
Letrozol	2,11 (0,5 – 9,9)	> 500	237
Pamidronato	1,52(0,07 – 3,15)	> 500	329
Anfotericina B	0,06 (0,03 – 0,09)	56,8 (3,61- 982,6)	947

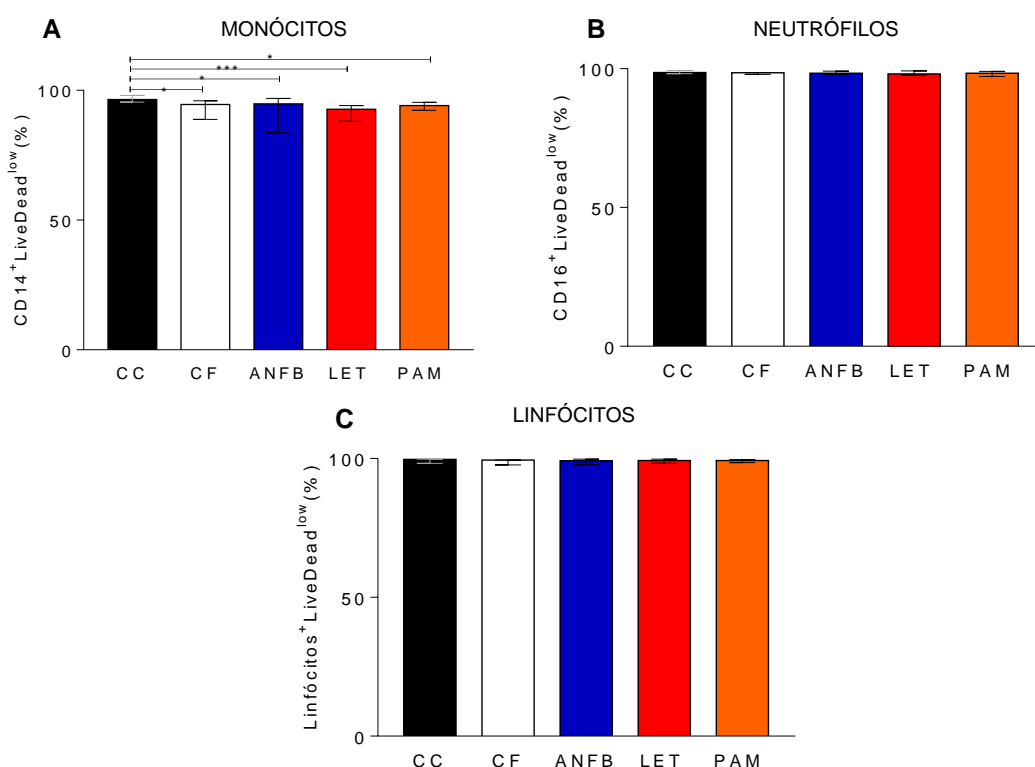
95% IC: intervalo de confiança de 95%; IS:  $CC_{50}/CI_{50}$  amastigotas; MØ: macrófagos derivados de células THP-1;  $\mu M$ : micromolar.

Não foi possível determinar o valor de  $CC_{50}$  para letrozol e pamidronato, uma vez que na maior concentração avaliada (500  $\mu M$ ), não foi observada redução em 50% da viabilidade celular. Portanto, a citotoxicidade foi considerada como maior que 500  $\mu M$  e, dessa forma, os valores do índice de seletividade puderam ser estimados, considerando o valor máximo da concentração de 500  $\mu M$  de cada fármaco utilizada no experimento. Usando esta estratégia, o IS estimado, foi de 237 para letrozol e 329 para pamidronato. Esses valores indicam que os fármacos foram mais tóxicos para os parasitos, e menos citotóxicos para a célula hospedeira.

## 5.2 Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador do letrozol e pamidronato usando o modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*

### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade celular em leucócitos do sangue periférico

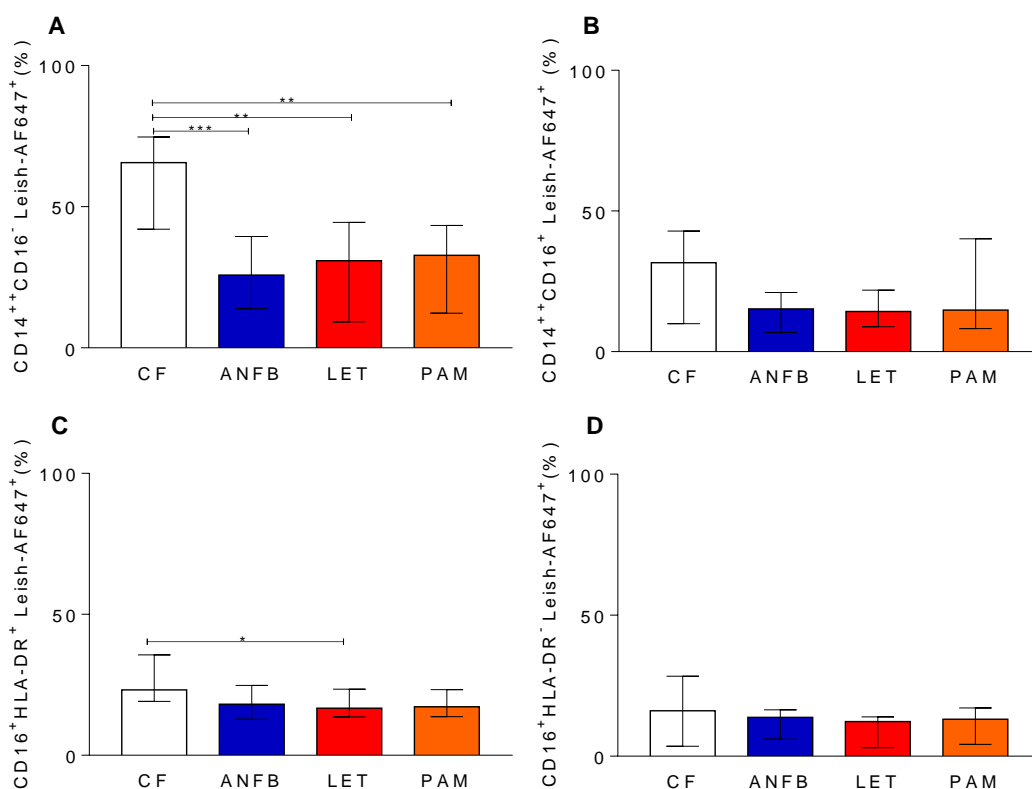
A citotoxicidade dos leucócitos do sangue periférico foi avaliada pela medida da viabilidade celular, utilizando marcador *LiveDead*. A Figura 28 mostra o percentual de viabilidade dos monócitos (CD14<sup>+</sup>), neutrófilos (CD16<sup>+</sup>) e linfócitos do sangue periférico, na ausência de parasitos e fármacos (controle de células – CC), na presença de parasitos (controle de fagocitose – CF) e na presença de células, parasitos e fármacos letrozol (LET) e pamidronato (PAM). Anfotericina B desoxicolato foi utilizada como droga de referência (ANFB). Observa-se que em todos os grupos houve redução da viabilidade da população de monócitos. No entanto, a citotoxicidade observada, foi inferior a 10%, em relação ao grupo controle de células (Figura 28A). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas da viabilidade celular das populações de neutrófilos e linfócitos (Figuras 28B e C).



**Figura 28.** Avaliação da viabilidade celular de (A) monócitos (CD14<sup>+</sup>LiveDead<sup>low</sup>), (B) neutrófilos (CD16<sup>+</sup>LiveDead<sup>low</sup>) e (C) linfócitos (Linfócitos<sup>+</sup>LiveDead<sup>low</sup>) de indivíduos (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão apresentados como percentual de células vivas (LiveDead<sup>low</sup>), em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CF, ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CC estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* (p<0,05) e \*\*\* (p<0,001).

## 5.2.2 Avaliação do potencial antileishmania dos fármacos letrozol e pamidronato nos monócitos e neutrófilos do sangue periférico

A Figura 29 representa o impacto dos fármacos letrozol (LET) e pamidronato (PAM), na redução de internalização de *L. infantum* por monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ) e não clássicos ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), bem como por neutrófilos ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{+}$ ) e não ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ). Observa-se que todos os fármacos utilizados, nas condições avaliadas, promoveram redução do percentual de células infectadas na subpopulação de monócitos clássicos (Figura 29A). LET e PAM, em relação ao controle de fagocitose, reduziram em cerca de 50% as formas internalizadas de *L. infantum* (Figura 29A). Nenhuma alteração foi observada para a subpopulação de monócitos não clássicos (Figura 29B). Com relação à atividade antileishmania dos neutrófilos, foi observado que somente o tratamento com LET promoveu redução da internalização de *L. infantum*, na subpopulação de neutrófilos ativados (Figura 29C). Nenhum dos tratamentos alterou a resposta dos neutrófilos não ativados, quando comparados ao controle de fagocitose (Figura 29D).



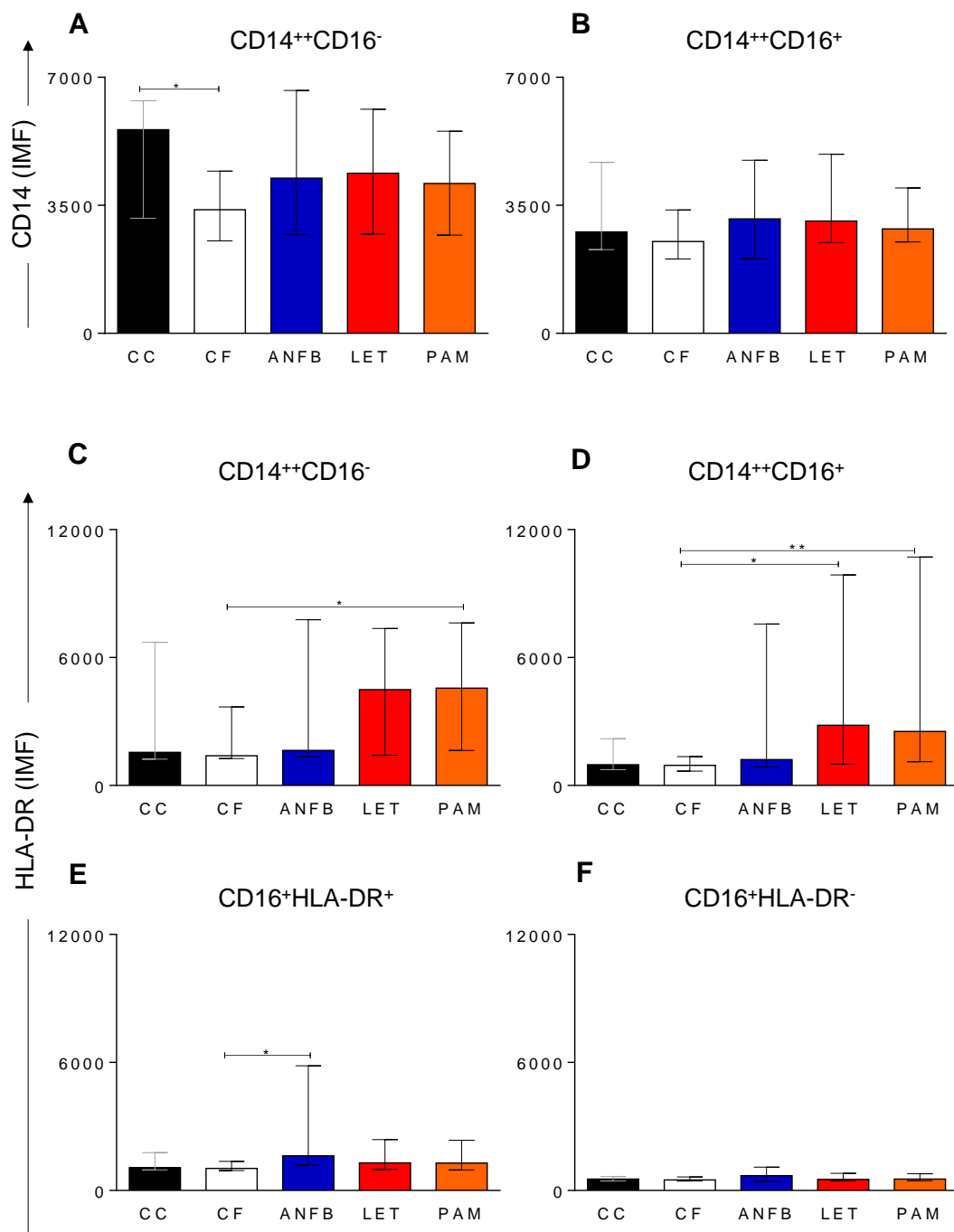
**Figura 29.** Avaliação da atividade antileishmania em (A) monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), (B) não clássicos ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), (C) neutrófilos ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{+}$ ) e (D) não ativados ( $CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão apresentados como percentual de células que internalizaram formas promastigotas de *L. infantum*, em formato de gráficos de dispersão que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,002$ ) e \*\*\* ( $p < 0,0002$ ).

### **5.2.3 Caracterização dos aspectos fenotípicos dos monócitos e neutrófilos do sangue periférico**

#### **5.2.3.1 Avaliação da expressão do receptor CD14 por monócitos e da molécula de ativação HLA-DR por monócitos e neutrófilos do sangue periférico**

A avaliação da expressão do receptor CD14 nas subpopulações de monócitos e de HLA-DR nos monócitos e neutrófilos, está apresentada na Figura 30, e foi realizada com o objetivo de verificar se a presença do parasito e os tratamentos com os fármacos em estudo, promoveriam alteração no perfil de expressão dessas moléculas.

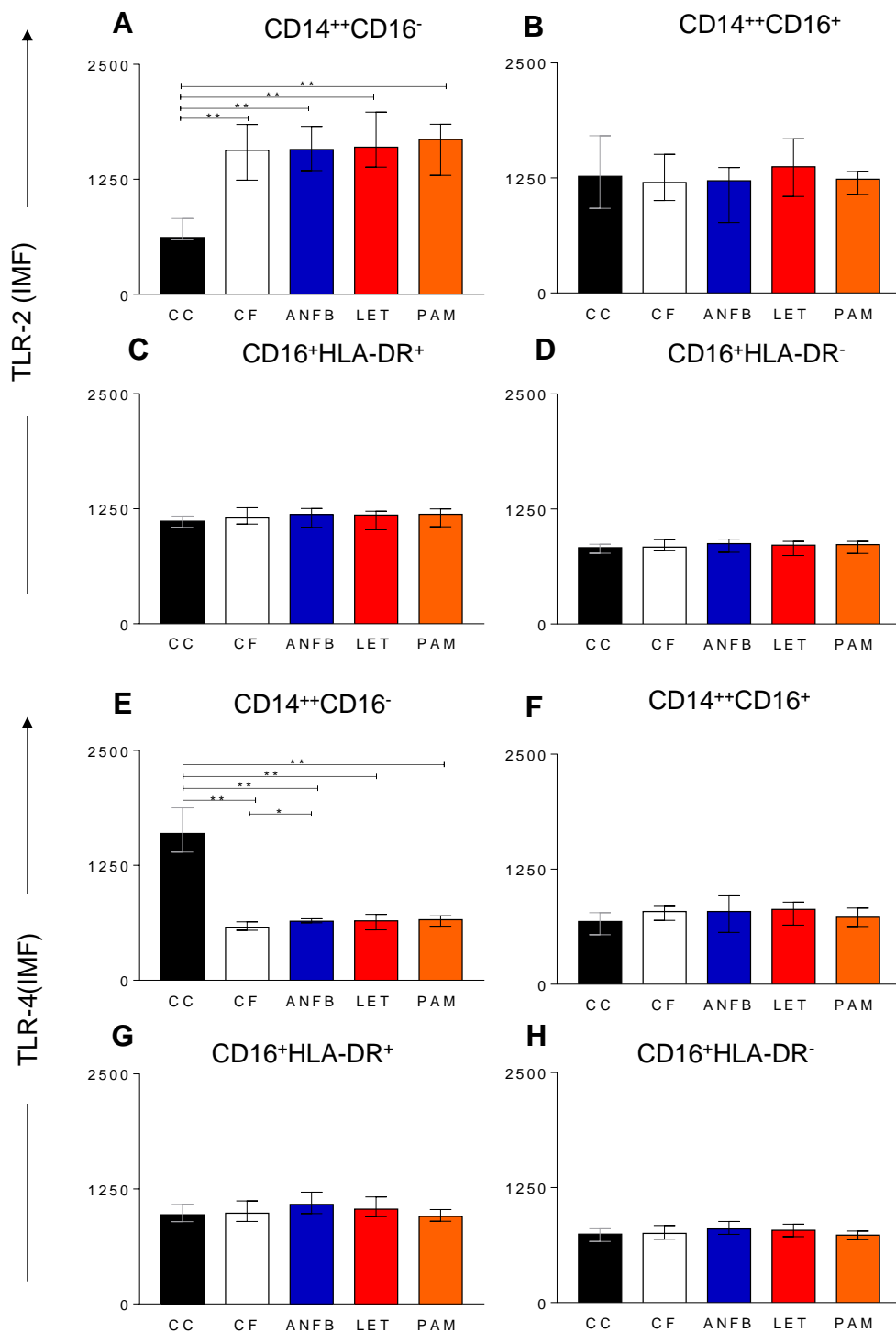
De maneira muito interessante, podemos observar que a *L. infantum* promoveu *downregulation* de CD14 na subpopulação de monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) (Figura 30A), mas que a presença dos fármacos parece ter “protegido” as células da ação do parasito, pois verificamos que a intensidade média de fluorescência (IMF) associada à expressão de CD14 voltou ao padrão basal na presença dos medicamentos (Figura 30A). Os dados mostraram ainda aumento da expressão de HLA-DR na subpopulação de monócitos clássicos após tratamento com PAM (Figura 30C) e não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) após tratamento com LET e PAM (Figura 29D). Na subpopulação de neutrófilos ativados, somente a ANFB foi capaz de aumentar a expressão desse marcador nessa subpopulação (Figura 30E). Nas condições encontradas, nenhuma alteração da expressão de CD14 na subpopulação de monócitos não clássicos (Figura 30B) e HLA-DR nos neutrófilos não ativados foi observada (Figura 30F).



**Figura 30.** Avaliação do perfil de expressão do receptor CD14 nos (A) monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e nos (B) não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), e da molécula de ativação HLA-DR nos (C) monócitos clássicos, (D) monócitos não clássicos, (E) neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e (F) neutrófilos não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>), do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão do receptor CD14 e da molécula de ativação HLA-DR, nas subpopulações de monócitos e neutrófilos, em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CC, ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF e entre os grupos CF, ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CC, estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,03$ ).

### **5.2.3.2 Avaliação da expressão dos receptores do tipo Toll 2 e 4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico**

A análise dos TLR-2 e TLR-4 teve o intuito de verificar se o tratamento com os fármacos alteraria o perfil de expressão desses receptores nos monócitos e nos neutrófilos. A Figura 31 representa o perfil de expressão dos TLR-2 e TLR-4 nos monócitos clássicos e não clássicos, bem como nos neutrófilos ativados e não ativados. Os dados demonstram que os grupos CF, ANFB, LET e PAM apresentam aumento estatisticamente significativo da IMF de TLR-2, em relação ao grupo CC, na subpopulação de monócitos clássicos (Figura 31A). Além disso, todos os grupos apresentaram redução estatisticamente significativa da expressão de TLR-4 em relação ao grupo CC (Figura 31B). ANFB, quando comparado ao grupo CF, promoveu aumento da expressão desse receptor nos monócitos clássicos (Figura 31E). Nenhuma alteração entre os grupos no perfil de expressão dos TLR-2 e TLR-4, foi observada nas subpopulações de monócitos clássicos, neutrófilos ativados e não ativados (Figura 31B, 31C, 31D, 31F, 31G e 31H).

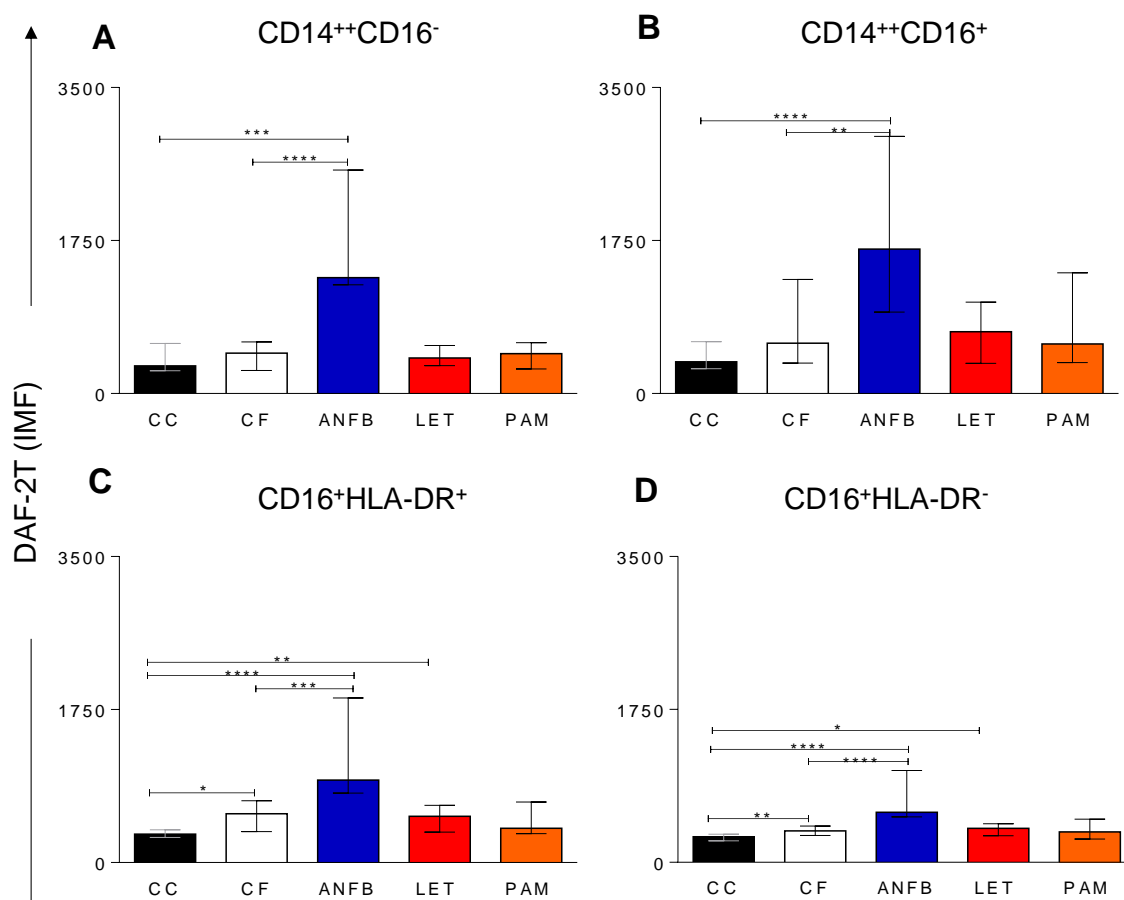


**Figura 31.** Avaliação do perfil de expressão dos receptores do tipo Toll (TLR) 2 e 4 por monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e por neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 nas subpopulações de monócitos e neutrófilos, em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CC, ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF, e entre os grupos CF, ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CC, estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \*(p<0,003) e \*\* (p<0,008).



### 5.2.4 Caracterização da produção de óxido nítrico intracelular por monócitos e neutrófilos do sangue periférico

Quanto à avaliação da produção de óxido nítrico (NO) intracelular, observa-se que mesmo após tratamento com LET e PAM, não houve alteração no perfil em nenhuma população celular em estudo, quando comparado ao grupo CF, indicando que nas condições avaliadas, esses fármacos não foram capazes de induzir produção de NO. Mas quando se analisa ANFB, os dados corroboram com os dados da literatura, pois em todas as populações analisadas a ANFB induziu a produção de NO (Figura 32).

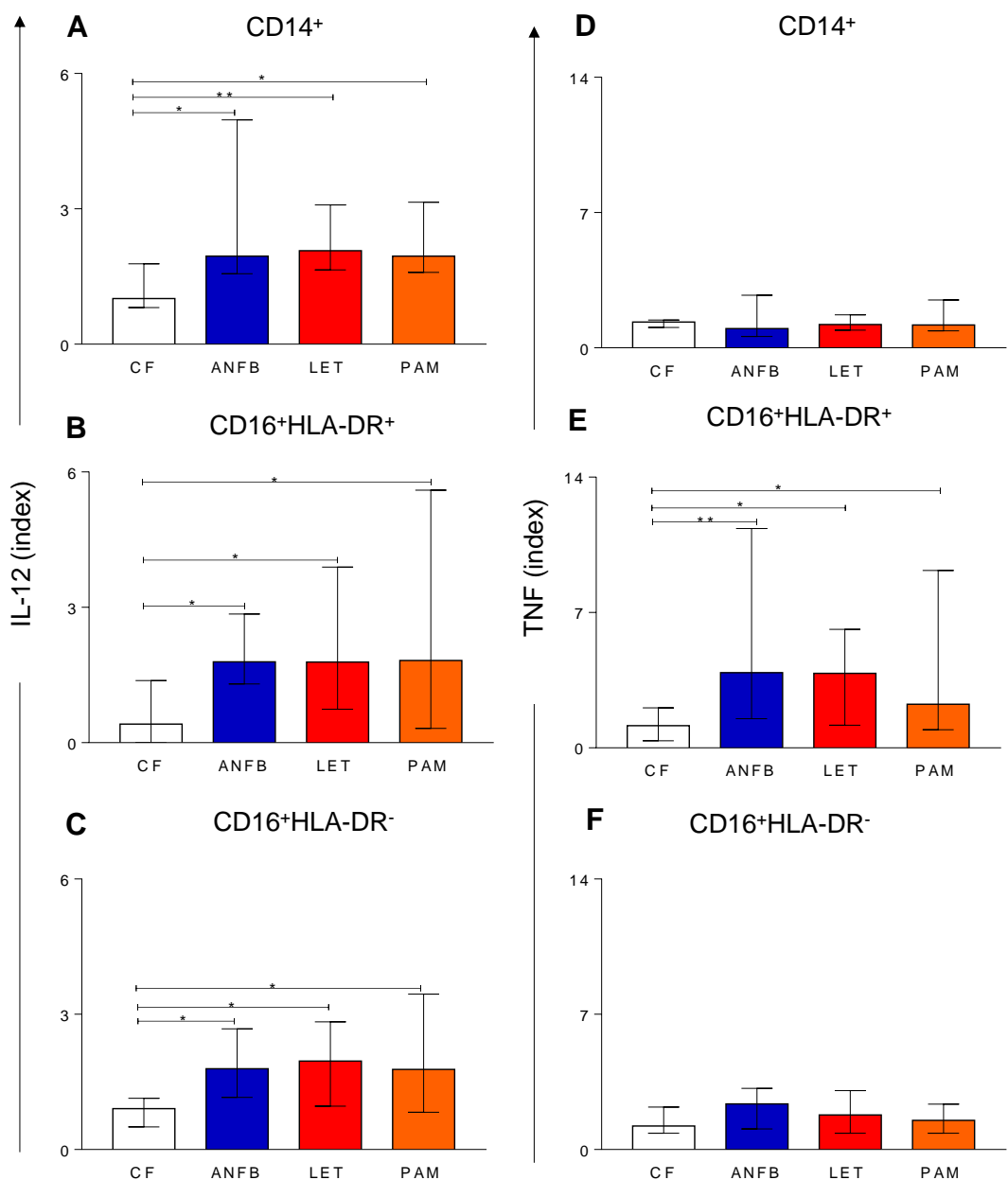


**Figura 32.** Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por (A) monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), (B) não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e por (C) neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e (D) não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de células (CC), controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de DAF-2T pelas subpopulações de monócitos e neutrófilos, em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CF, ANFB, LET, PAM em relação ao grupo CC, e entre os grupos CC, ANFB, LET, PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* (p<0,05), \*\* (p<0,005), \*\*\* (p<0,0003) e \*\*\*\* (p<0,0001).

## **5.2.5 Caracterização do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos e neutrófilos do sangue periférico**

### **5.2.5.1 Perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e neutrófilos do sangue periférico**

A Figura 33 abaixo representa os resultados obtidos para análise do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias intracitoplasmáticas por monócitos totais (CD14<sup>+</sup>) e subpopulações de neutrófilos (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico humano após infecção com as formas promastigotas de *L. infantum* e tratamento com os antitumorais letrozol e pamidronato. Os dados mostram que tanto LET quanto PAM parecem ter função pró-inflamatória pois levaram ao aumento do *index* de monócitos produtores de IL-12 (Figura 33A), importante citocina indutora de resposta Tipo 1 por linfócitos T. Observa-se ainda aumento da produção de IL-12 por neutrófilos ativados e não ativados (Figura 33B e 33C, respectivamente). Com relação à produção de TNF, somente em neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) (Figura 33E) observou-se aumento da produção dessa citocina, em todos os grupos avaliados, em relação ao grupo CF. A produção de TNF pelos monócitos e neutrófilos não ativados não apresentou alteração de perfil nos grupos avaliados (Figura 33D e 33F, respectivamente).

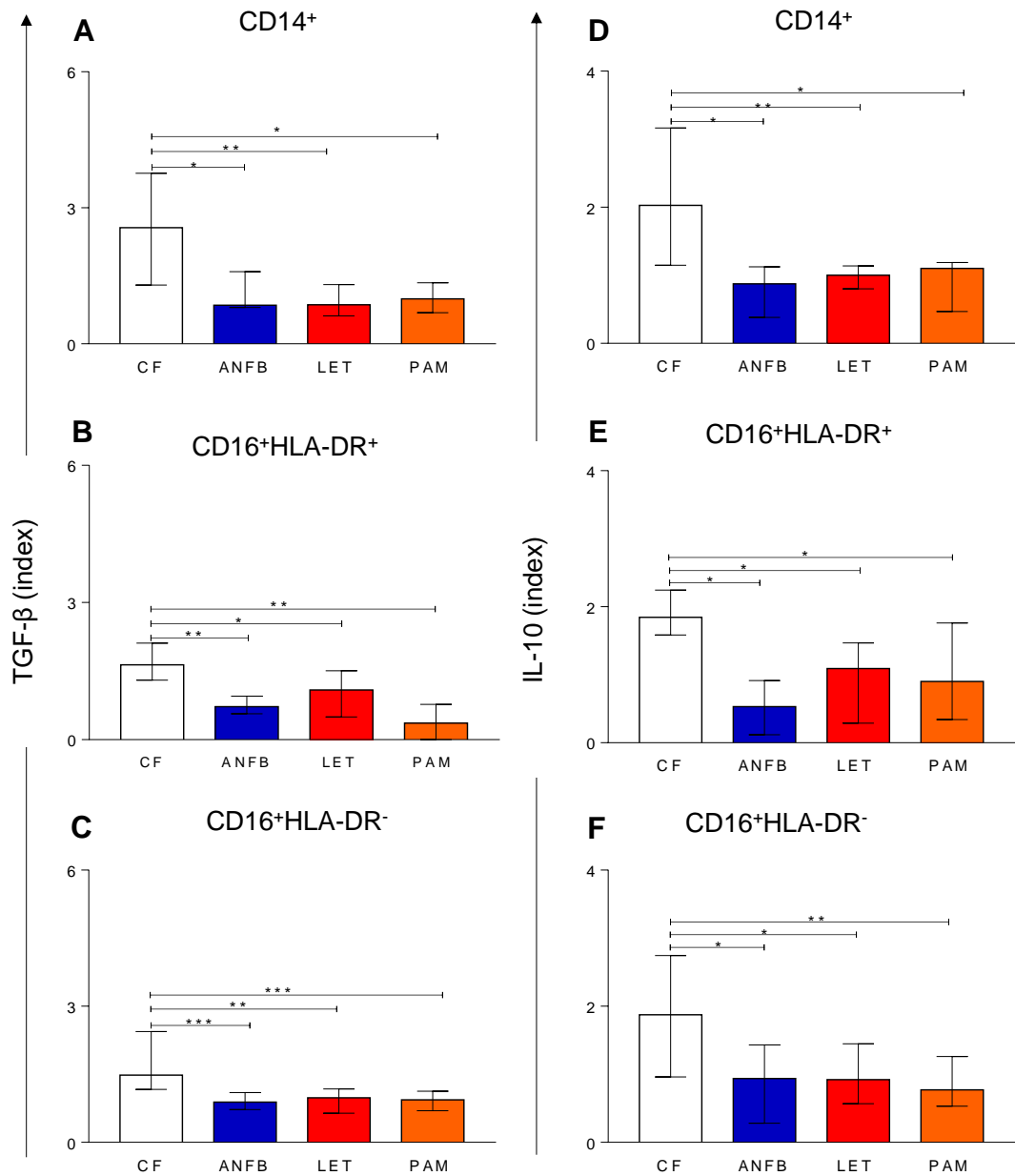


**Figura 33.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF intracitoplasmáticas, pelos monócitos totais (CD14<sup>+</sup>) e por neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão expressos como *index* (cultura exposta/cultura controle - CC), em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,001$ ).

### 5.2.5.2 Perfil de produção de citocinas moduladoras por monócitos e neutrófilos do sangue periférico

O perfil de produção de citocinas moduladoras por monócitos e neutrófilos está demonstrado na Figura 34. Os dados mostram que tanto LET quanto PAM inibem a ativação de resposta imune moduladora por monócitos e neutrófilos, uma vez que foi observada

redução do *index* de células CD14<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  (Figura 34A) e IL-10 (Figura 34D). Resultado semelhante foi observado para as subpopulações de neutrófilos (Figuras 34B, 34C, 34E e 34F, respectivamente).



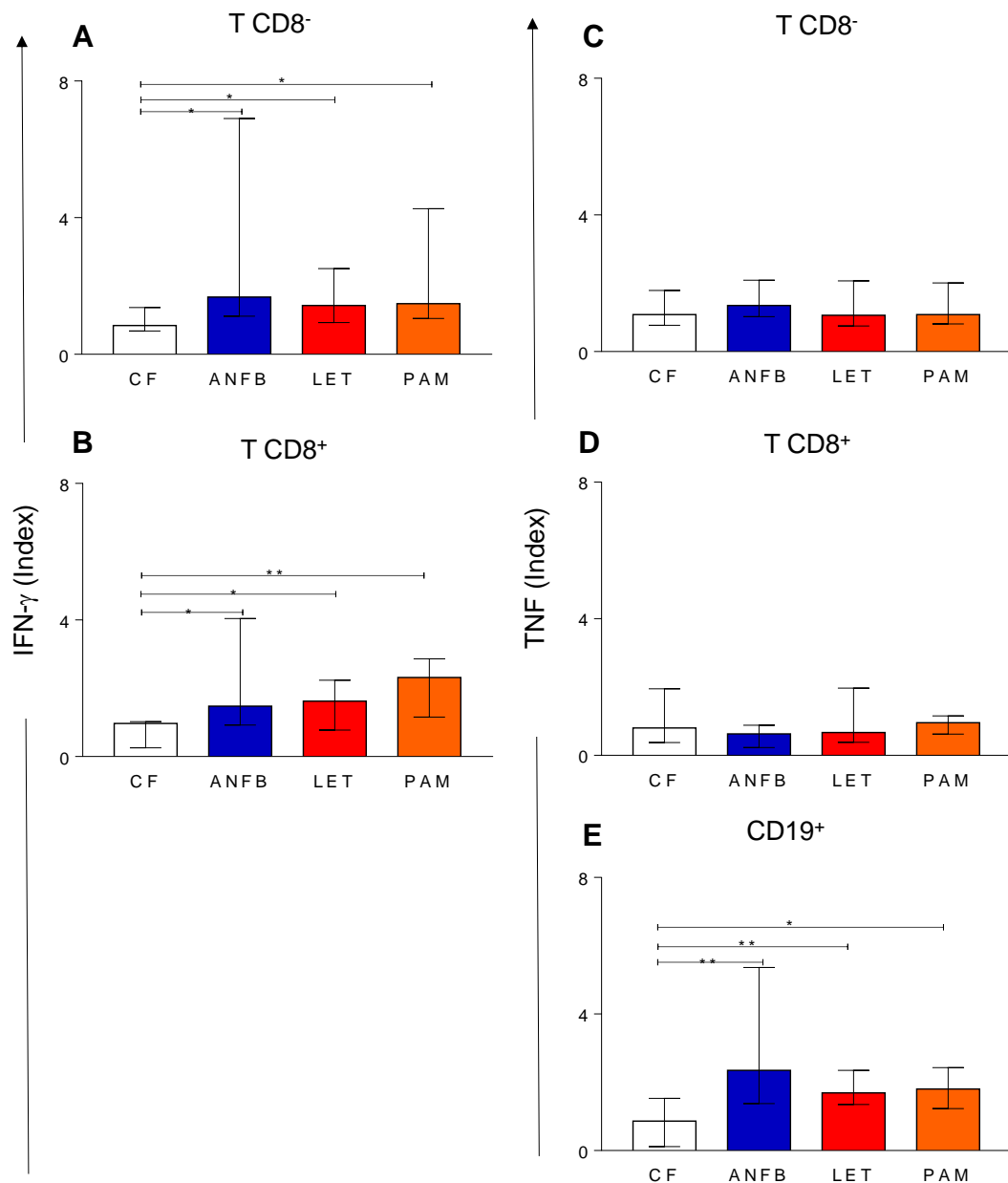
**Figura 34.** Avaliação do perfil de produção de citocinas moduladoras TGF- $\beta$  e IL-10 intracitoplasmáticas, pelos monócitos totais (CD14<sup>+</sup>) e por neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão expressos como *index* (cultura exposta/cultura controle - CC), em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ) e \*\*\* ( $p < 0,0004$ ).

## **5.2.6 Caracterização do perfil de produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos do sangue periférico**

### **5.2.6.1 Perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos do sangue periférico**

A Figura 35 representa a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>). Os dados demonstram que os tratamentos com LET e PAM induzem produção de IFN- $\gamma$  pelas subpopulações de linfócitos T (Figura 35A e 35B).

Quanto a produção de TNF, os dados demonstram aumento no percentual de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) TNF<sup>+</sup>, tanto para o grupo LET quanto PAM (Figura 35E). Nenhuma alteração do perfil de produção de TNF foi observada para as subpopulações de linfócitos T avaliadas (Figura 35C e 35D).

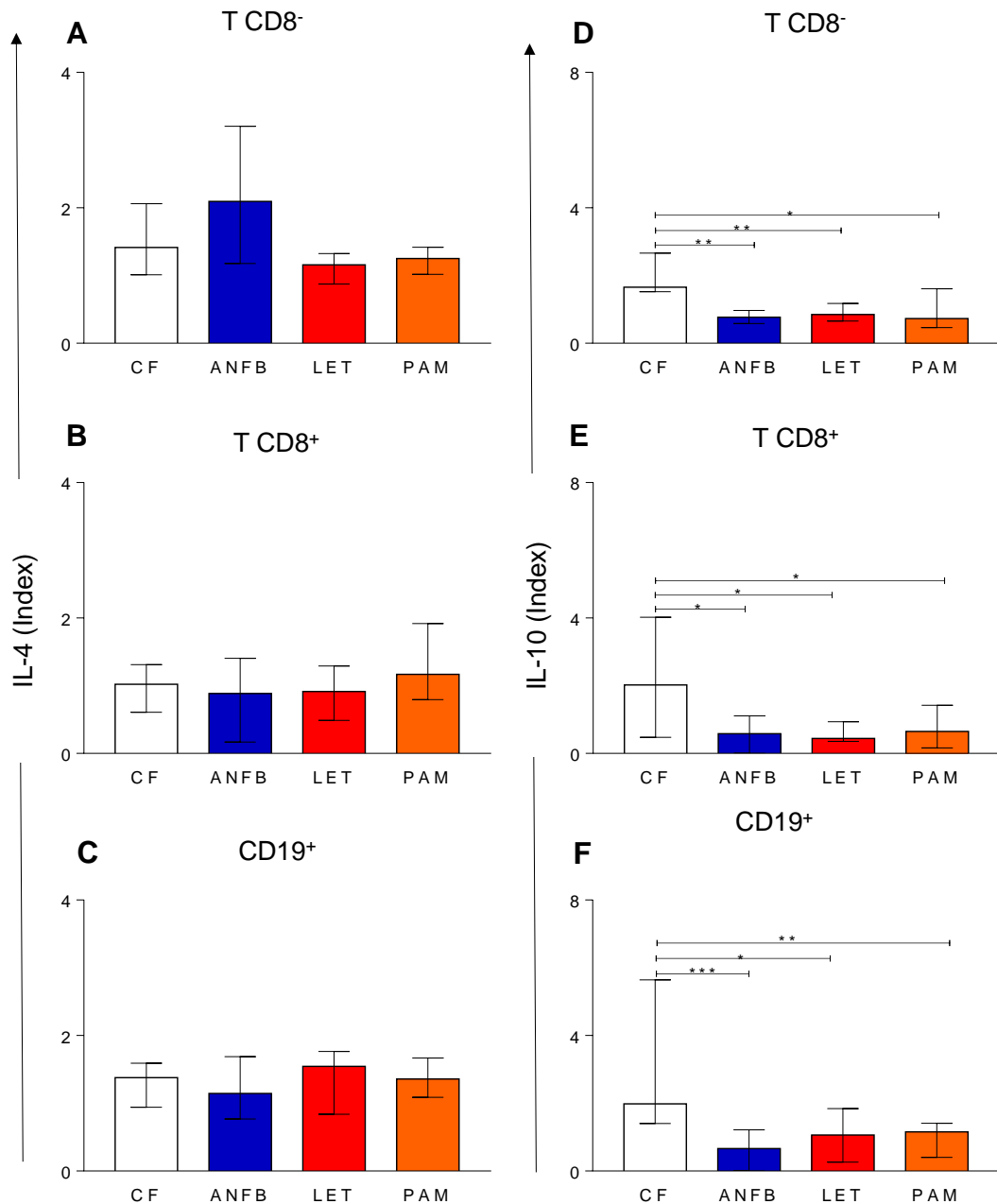


**Figura 35.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF intracitoplasmáticas, pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão expressos como *index* (cultura exposta/cultura controle - CC), em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,008$ ).

### 5.2.6.2 Perfil de produção de citocinas moduladoras por linfócitos do sangue periférico

O perfil de produção das citocinas moduladoras IL-4 e IL-10, pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, está apresentado na Figura 36. Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada no percentual de células IL-4<sup>+</sup> (Figura 36A, 36B e 36C).

Com relação à produção de IL-10, os dados demonstram que LET e PAM promoveram redução na produção dessa citocina, nas populações de linfócitos avaliadas (Figura 36D, 36E e 36F).



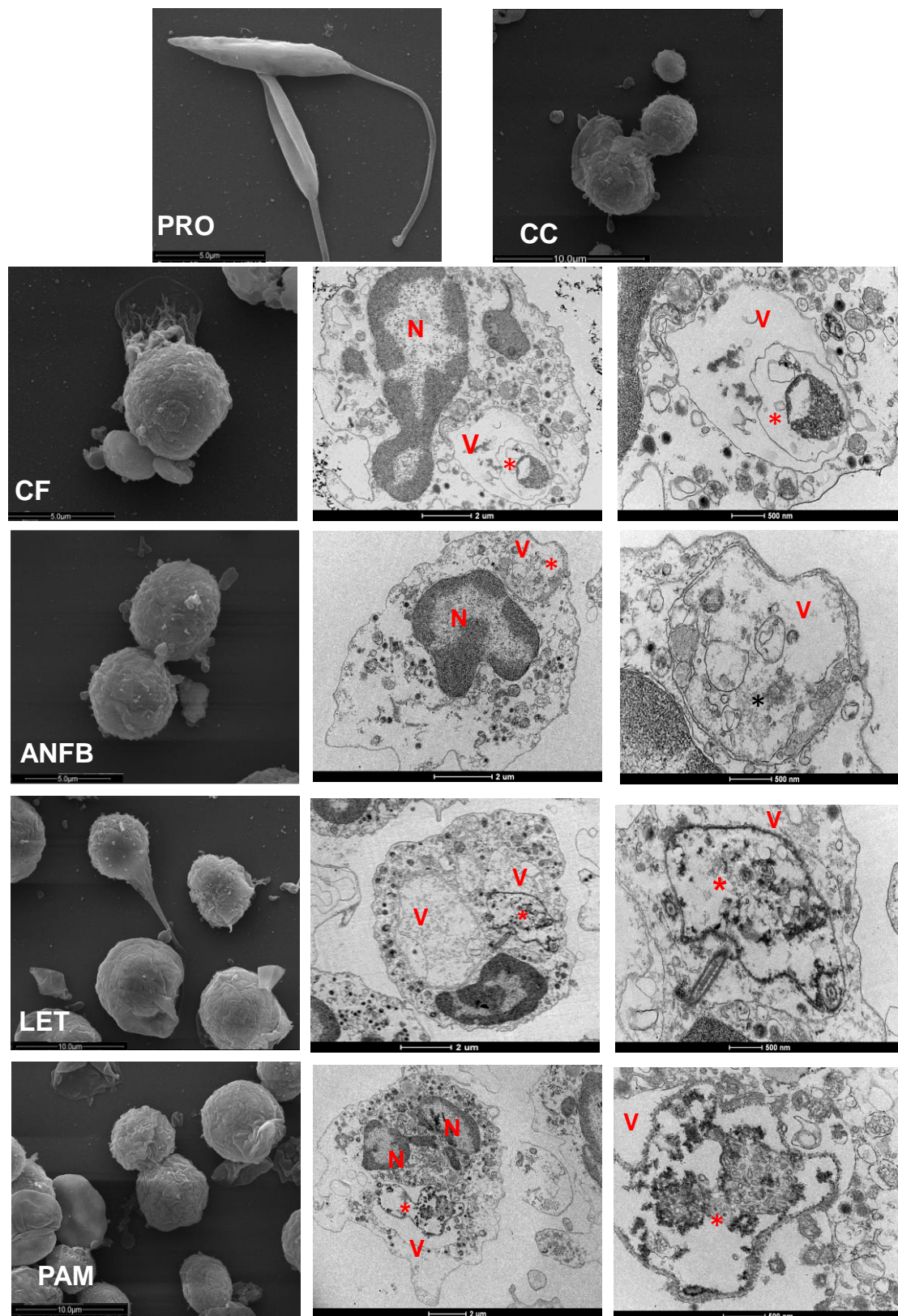
**Figura 36.** Avaliação do perfil de produção de citocinas moduladoras IL-4 e IL-10 intracitoplasmáticas, pelos linfócitos T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico de doadores voluntários (n=11) dos grupos: controle de fagocitose (CF), anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Os resultados estão expressos como index (cultura exposta/cultura controle - CC), em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB, LET e PAM em relação ao grupo CF estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,005$ ) e \*\*\* ( $p < 0,0004$ ).

### 5.2.7 Avaliação das alterações ultraestruturais e subcelulares por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural e subcelular por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), dos leucócitos humanos incubados com *L. infantum*, bem como das formas promastigotas de *L. infantum*, no tempo de 6 horas de cultura, tratados ou não com os fármacos, estão representadas nas Figuras 37 e 38.

Observa-se, na Figura 37, na primeira linha, imagens representativas de MEV, para as formas promastigotas (PRO) utilizadas nos estudos e leucócitos do sangue periférico humano da cultura controle de células (ausência de parasitos) (CC). As formas promastigotas apresentam forma fusiforme, membrana celular íntegra, sendo possível observar a presença de flagelo bem preservado. Os leucócitos da cultura controle (CC) apresentam forma arredondada característica, bem como membrana plasmática preservada. Na segunda linha da Figura 37, estão demonstradas imagens representativas do controle de fagocitose (CF) por meio da MEV, onde é possível observar um leucócito com morfologia semelhante ao da CC. Contudo, à por meio da MET, observa-se no CF a presença de um leucócito (fagócito) com o núcleo eletrodense bem delimitado (N), membrana citoplasmática preservada e a presença de um vacúolo em seu citoplasma, com material eletrodense (V, asterisco). Em aumento maior é possível observar, neste vacúolo, uma forma arredondada eletrodensa, circuncidada por uma membrana intacta, sugerindo a presença do vacúolo parasitóforo. Estes achados sugerem a presença da forma amastigota intracelular, porém sem todas as suas características visualizadas como o núcleo, cinetoplasto, mitocôndrias e outras organelas. Na terceira linha da mesma figura, após tratamento com anfotericina B (ANFB 25  $\mu\text{M}$ ) por 6 horas, a análise por MEV mostra que não houve alteração da morfologia celular quando comparado ao controle de fagocitose. Contudo, na MET observa-se o leucócito com núcleo eletrodense edentado visível (N), característica de monócitos quando analisados por MET. Observa-se em seu citoplasma restos de material menos eletrodense, circundado por membrana bem definida, formando um vacúolo sugestivo do vacúolo parasitóforo (V, asterisco). O tratamento com letrozol (LET) e pamidronato (PAM) a 100  $\mu\text{M}$  (quarta e quinta linhas da Figura 37, respectivamente) demonstra que, também, esses fármacos não induziram alterações morfológicas nos leucócitos quando comparado ao CF pela MEV. Por outro lado, análises por MET mostraram efeitos similares quanto à presença de material de menor eletrodensidade, circundado por membrana no citoplasma celular, sugerindo a presença do vacúolo parasitóforo. Especificamente para o LET, observa-se a presença de dois possíveis vacúolos parasitóforos em seu citoplasma.

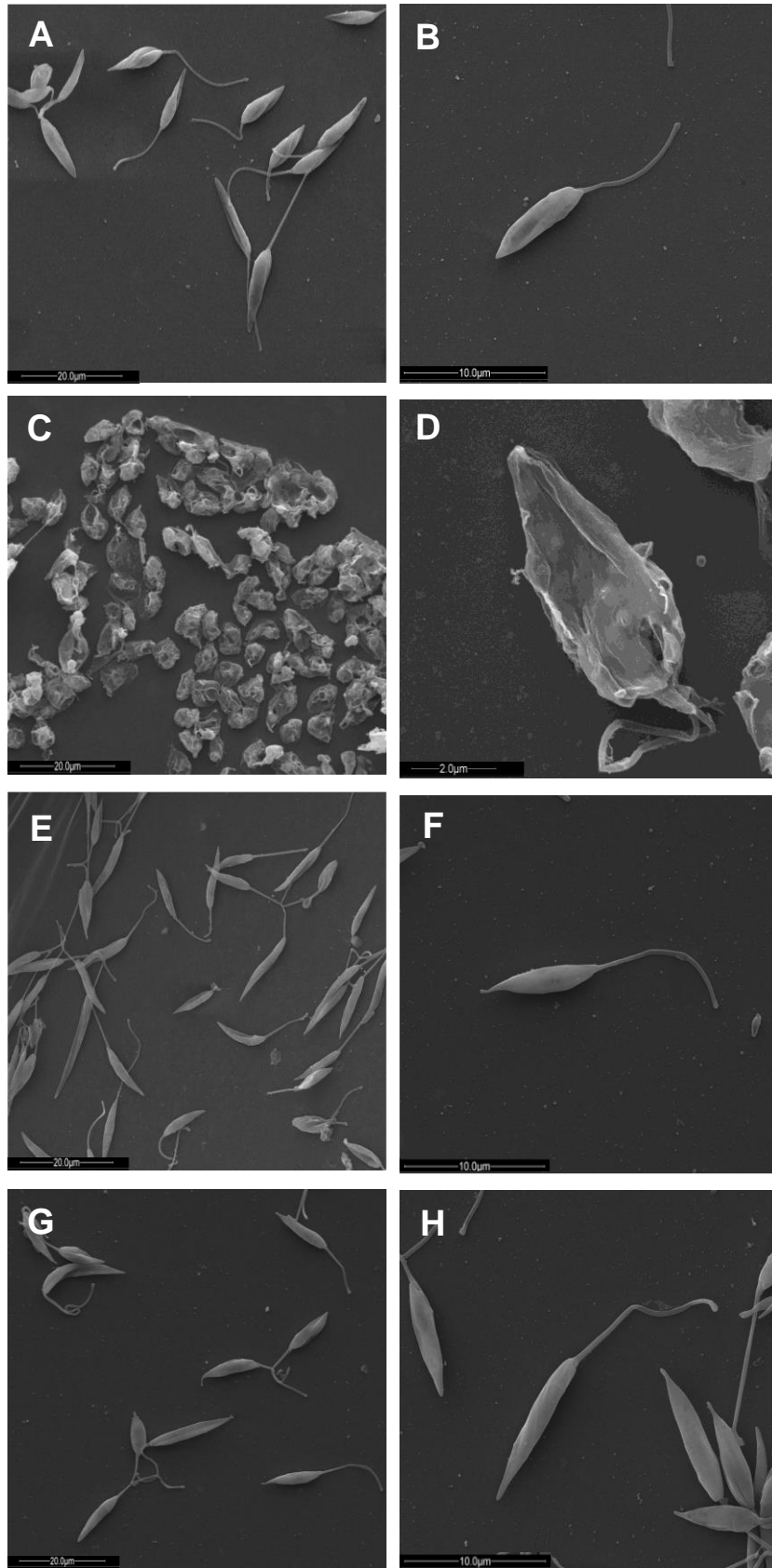




**Figura 37.** Avaliação ultraestrutural e subcelular das formas promastigotas de *L. infantum* (PRO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de leucócitos do sangue periférico humano por MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET) do controle de células (CC), do controle de fagocitose (CF) e com os tratamentos com anfotericina B (ANFB), letrozol (LET) e pamidronato (PAM), após 6 horas de cultura. Asteriscos indicam amastigotas. N: núcleo; V: vacúolo parasitóforo.

Por meio das imagens de MEV e MET, não se observa citotoxicidade para os leucócitos incubados com *L. infantum* e tratados com os fármacos, nas concentrações avaliadas, durante 6 horas de cultura. E pela análise dos leucócitos pela MET, é possível sugerir a presença de amastigotas intracelulares com alterações ultraestruturais, com perda de organelas, após tratamento com LET e PAM, quando comparados à cultura controle de fagocitose.

A morfologia das formas promastigotas de *L. infantum*, tratadas com as concentrações dos fármacos utilizadas no ensaio *ex vivo*, foram avaliadas por MEV, de acordo com a Figura 38. Essa análise foi realizada para verificar se os fármacos, nas concentrações avaliadas e no tempo de 6 horas alterariam as formas promastigotas. Observa-se nas Figuras 38A e 38B, que na cultura controle (sem tratamento), os parasitos apresentam forma fusiforme característica, membrana plasmática preservada, bem como flagelo bem definido. As Figuras 38C e 38D demonstram que após tratamento com anfotericina B a 25  $\mu\text{M}$ , ocorre degeneração celular, alteração do formato e perda de flagelo, demonstrando a toxicidade deste fármaco com 6 horas de incubação. Já a incubação das formas promastigotas com letrozol (Figuras 38E e 38F) e pamidronato (Figuras 38G e 38H) a 100  $\mu\text{M}$ , não induziram alterações morfológicas na membrana e/ou nos flagelos.



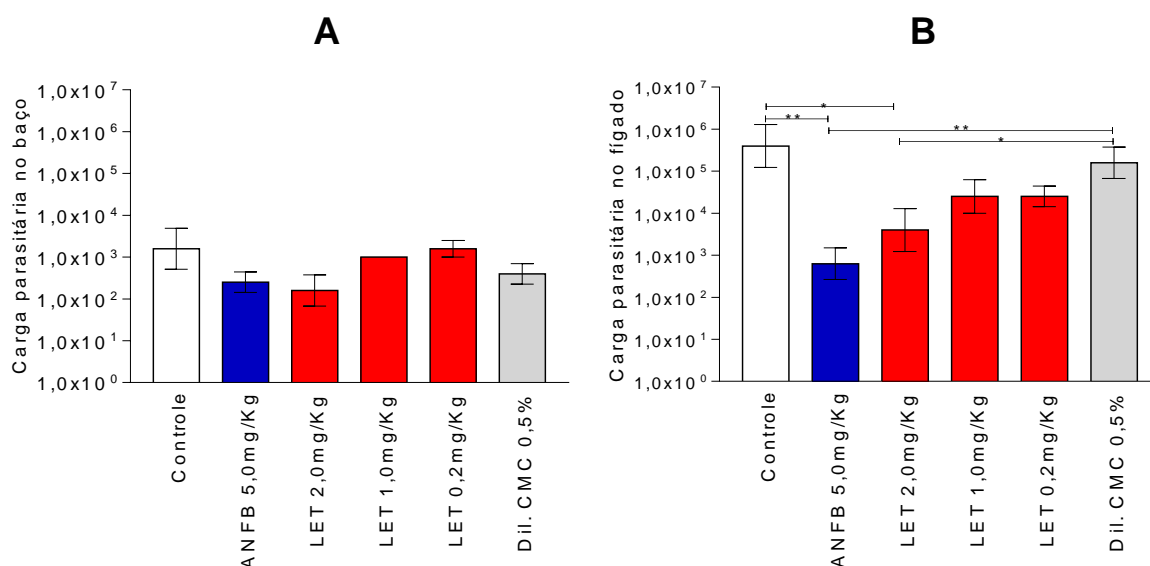
**Figura 38.** Avaliação ultraestrutural das formas promastigotas de *L. infantum* por microscopia eletrônica de varredura, da (A-B) cultura controle (sem tratamento), e tratadas com (C-D) Anfotericina B 25 µM; (E-F) itraconazol 100 µM e (G-H) pamidronato 100 µM, após 6 horas de cultura.

### 5.3 Avaliação do potencial imunomodulador e da eficácia *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental

#### 5.3.1 Avaliação da eficácia *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato

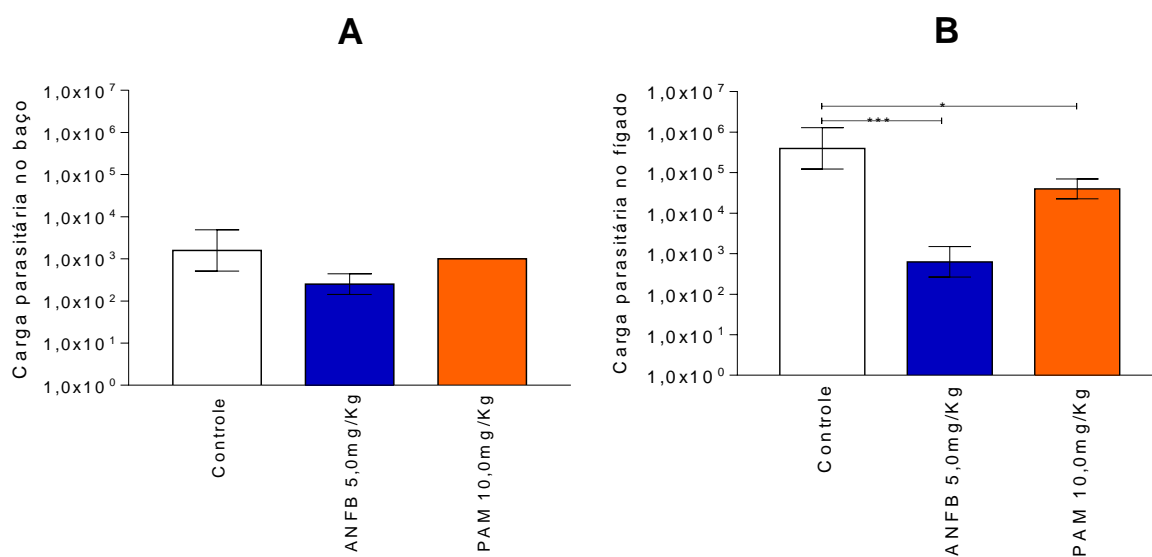
A eficácia *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato foi avaliada através da quantificação da carga parasitária no baço e fígado, por meio da metodologia de diluição limitante.

A Figura 39 abaixo, demonstra os dados referentes à quantificação da carga parasitária no baço e no fígado após tratamento com letrozol nas doses de 2,0, 1,0 e 0,2 mg/Kg/dia. Os dados demonstraram que letrozol na dose de 2,0 mg/Kg/dia reduziu a carga parasitária no fígado, apresentando diferença estatística tanto em relação ao controle não tratado quanto ao controle de diluente carboximetilcelulose 0,5% (CMC 0,5%) (Figura 39B). Não houve alteração da carga parasitária no baço (Figura 39A).



**Figura 39.** Avaliação da carga parasitária no (A) baço e no (B) fígado de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal, letrozol (LET) nas doses de 2,0, 1,0 e 0,2 mg/Kg/dia, via gavagem e diluente CMC 0,5% via gavagem, durante 5 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como o número de parasitos viáveis, em formato de gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB 5,0 mg/Kg/dia, LET 2,0 mg/Kg/dia, LET 1,0 mg/Kg/dia, LET 0,2 mg/Kg/dia e Dil.CMC 0,5% em relação ao grupo controle e entre os grupos LET 2,0 mg/Kg/dia, LET 1,0 mg/Kg/dia, LET 0,2 mg/Kg/dia em relação ao grupo Dil.CMC 0,5% estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,005$ ).

A Figura 40 representa os dados referentes à carga parasitária no baço e no fígado dos animais tratados com pamidronato a 10,0 mg/Kg/dia. Observa-se que PAM também não alterou o perfil da infecção no baço (Figura 40A), mas reduziu significativamente, a carga parasitária no fígado (Figura 40B).



**Figura 40.** Avaliação da carga parasitária no (A) baço e no (B) fígado de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia e pamidronato (PAM) 10,0 mg/Kg/dia, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como o número de parasitos viáveis, em formato de gráficos de barra que destacam a média e o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB 5,0 mg/Kg/dia e PAM 10,0 mg/Kg/dia em relação ao grupo controle estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

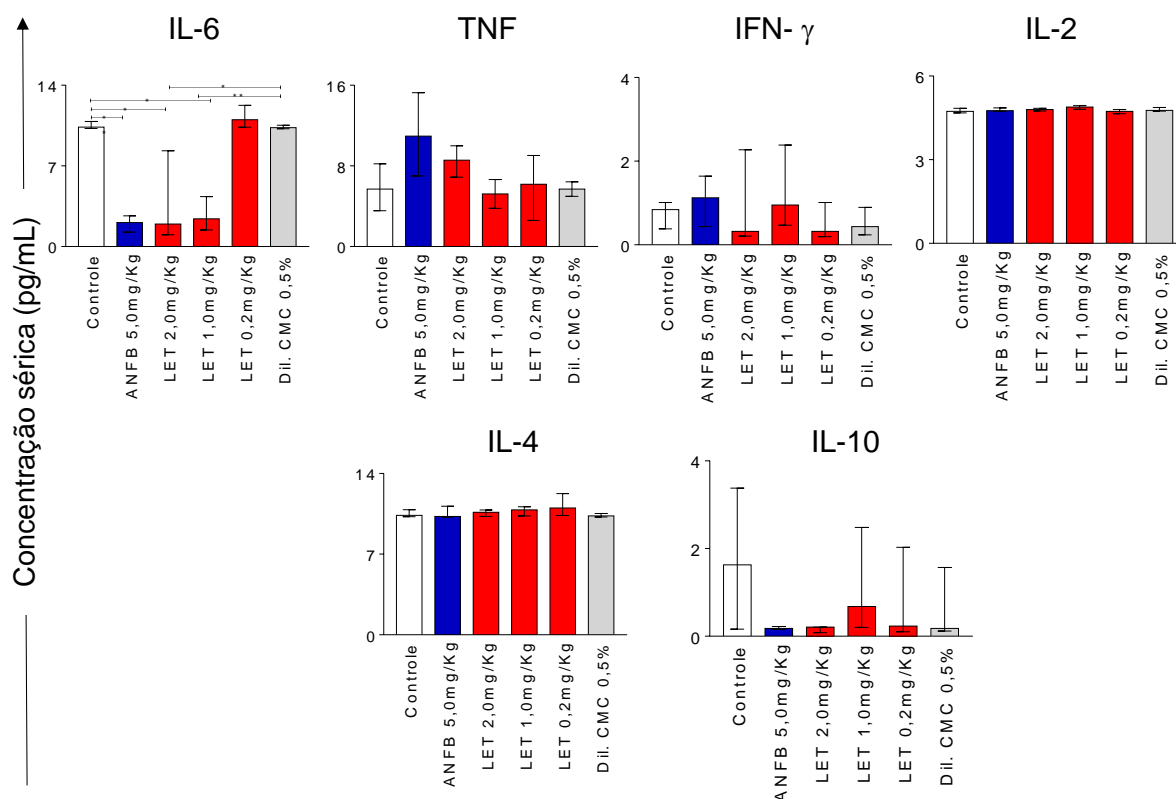
Os animais foram pesados antes e após os tratamentos como medida de avaliação de toxicidade e não foram demonstradas perdas de massa corporal significativas. Outros parâmetros que pudessem indicar alguma toxicidade, como pelo eriçado e diarreia, também não foram observadas.

### 5.3.2 Caracterização do perfil de citocinas séricas

A Figura 41 representa o perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro dos animais dos grupos controle (não tratado), controle do diluente (Dil. CMC 0,5%) e tratados com diferentes doses de letrozol. Por meio da análise do perfil de citocinas pró-inflamatórias, observamos que nas doses de 2,0 e 1,0 mg/Kg/dia, letrozol promoveu redução estatisticamente significativa de IL-6, quando comparado aos controles não tratados e do diluente. A concentração de TNF, apesar de estar elevada no grupo de animais tratados com LET 2,0 mg/Kg/dia, não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos controles. Resultado semelhante foi observado com relação à concentração de IFN- $\gamma$ . A concentração de IL-2 não foi alterada pelo tratamento com letrozol.

Com relação às citocinas moduladoras, os dados não demonstraram alteração no perfil de produção de IL-4, porém, o tratamento com letrozol a 2,0 mg/Kg/dia promoveu redução da

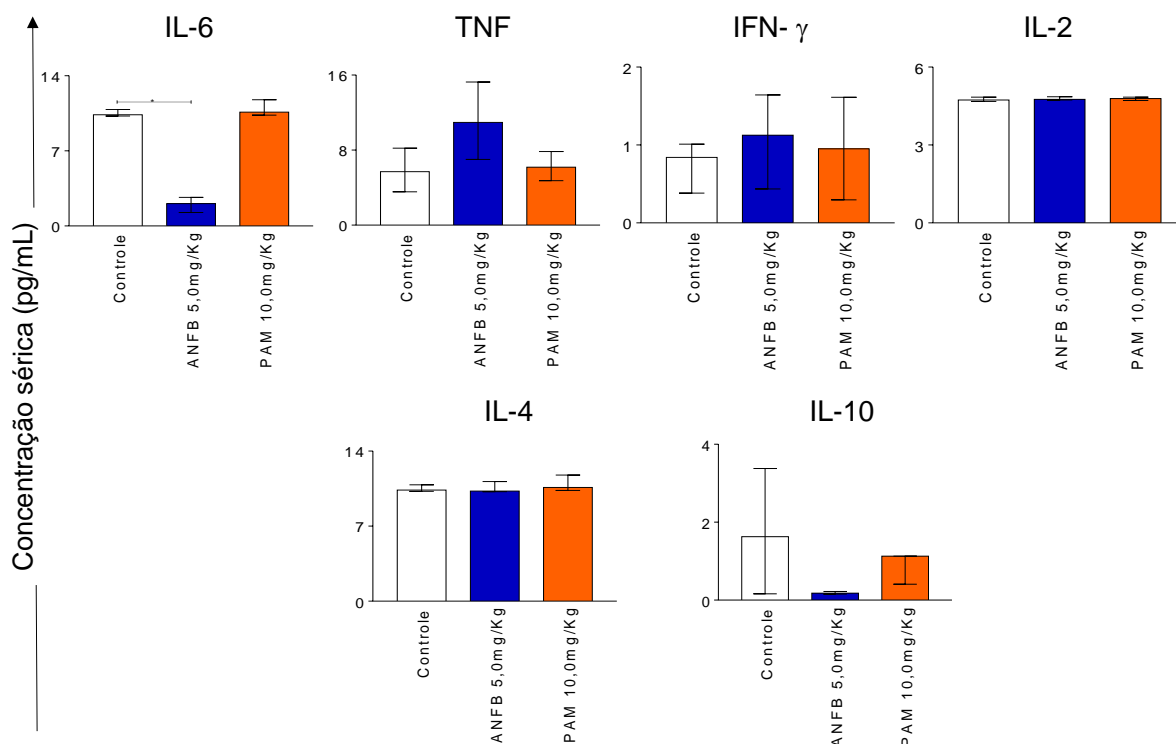
concentração sérica de IL-10. Resultados semelhantes foram encontrados no grupo de animais tratados com o controle positivo, anfotericina B.



**Figura 41.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal, letrozol (LET) nas doses de 2,0, 1,0 e 0,2 mg/Kg/dia, via gavagem e diluente CMC 0,5% via gavagem, durante 5 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como concentração das citocinas em pg/mL, em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB 5,0 mg/Kg/dia, LET 2,0 mg/Kg/dia, LET 1,0 mg/Kg/dia, LET 0,2 mg/Kg/dia e Dil.CMC 0,5% em relação ao grupo controle e entre os grupos LET 2,0 mg/Kg/dia, LET 1,0 mg/Kg/dia, LET 0,2 mg/Kg/dia em relação ao grupo Dil.CMC 0,5% estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,001$ ).

Já a Figura 42 demonstra o perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro dos animais do grupo controle (não tratado) e tratados com pamidronato 10,0 mg/Kg/dia. Por meio da análise do perfil de citocinas pró-inflamatórias, observamos que o tratamento com PAM promoveu produção de IL-6, TNF e IL-2, na mesma proporção do grupo controle não tratado. Apesar de a concentração de IFN- $\gamma$  estar elevada, quando comparado ao grupo controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Não foi observada alteração no perfil de produção de IL-4 após tratamento com PAM, entretanto, os dados demonstraram redução estatisticamente significativa dos níveis séricos de IL-10.



**Figura 42.** Avaliação do perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2) e moduladoras (IL-4 e IL-10), presentes no soro de camundongos Balb/c (n=6) infectados com *L. infantum* e tratados com anfotericina B (ANFB) 5,0 mg/Kg/dia e pamidronato (PAM) 10,0 mg/Kg/dia, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como concentração das citocinas em pg/mL, em formato de gráficos de barra que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ANFB 5,0 mg/Kg/dia e PAM 10,0 mg/Kg/dia em relação ao grupo controle estão representadas pelas linhas conectoras e o nível de significância destacado por \*( $p < 0,05$ ).

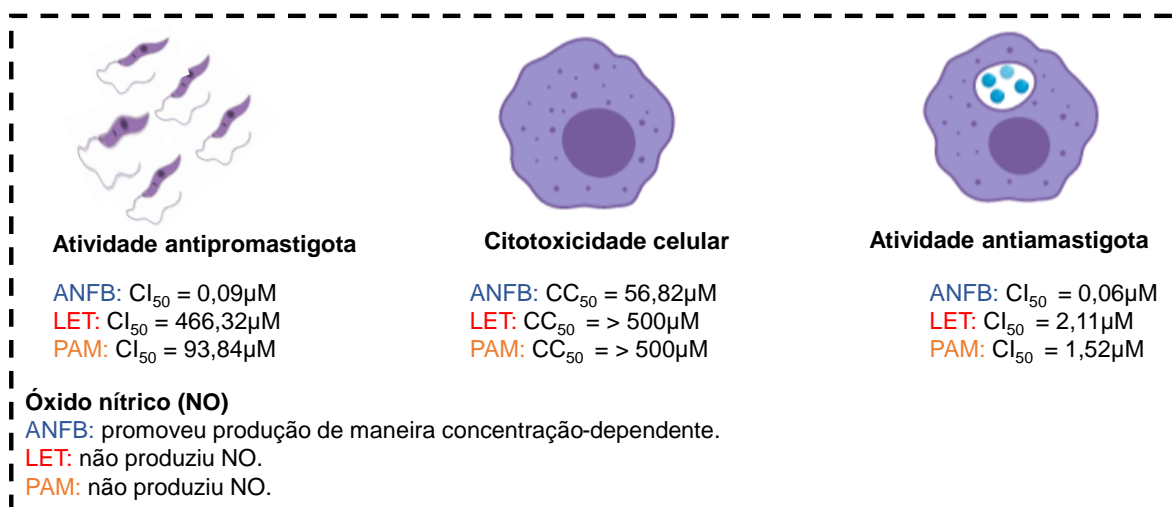
A citocina IL-17A não foi quantificada nas amostras, pois apresentaram valores indetectáveis pelo ensaio de CBA.

## 5.4 Resumo dos resultados

### 5.4.1 Avaliação da toxicidade celular e das atividades antiamastigota e antipromastigota *in vitro* dos fármacos letrozol e pamidronato

Os dados referentes aos ensaios *in vitro*, demonstraram que LET e PAM, nas condições avaliadas, apresentaram atividade tanto contra as formas promastigotas quanto contra as amastigotas de *L. infantum*, conforme esquematizado na Figura 43 abaixo. Nas concentrações avaliadas, os fármacos não foram tóxicos para os macrófagos derivados de células THP-1, nem induziram produção de óxido nítrico. O fármaco referência utilizado neste

ensaio, anfotericina B, também apresentou atividades antipromastigota e antiamastigota, bem como promoveu produção de óxido nítrico e redução da viabilidade dos macrófagos.



**Figura 43.** Síntese dos resultados obtidos da avaliação da toxicidade celular e das atividades antiamastigota e antipromastigota *in vitro* dos fármacos letrozol e pamidronato.

Estudos por MET demonstraram que LET e PAM promovem alterações nas formas promastigotas de *L. infantum*, com formação de vacúolos e modificações na morfologia do cinetoplasto e mitocôndria.

#### 5.4.2 Caracterização do potencial antileishmania e imunomodulador do letrozol e pamidronato usando o modelo preditivo de leucócitos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*

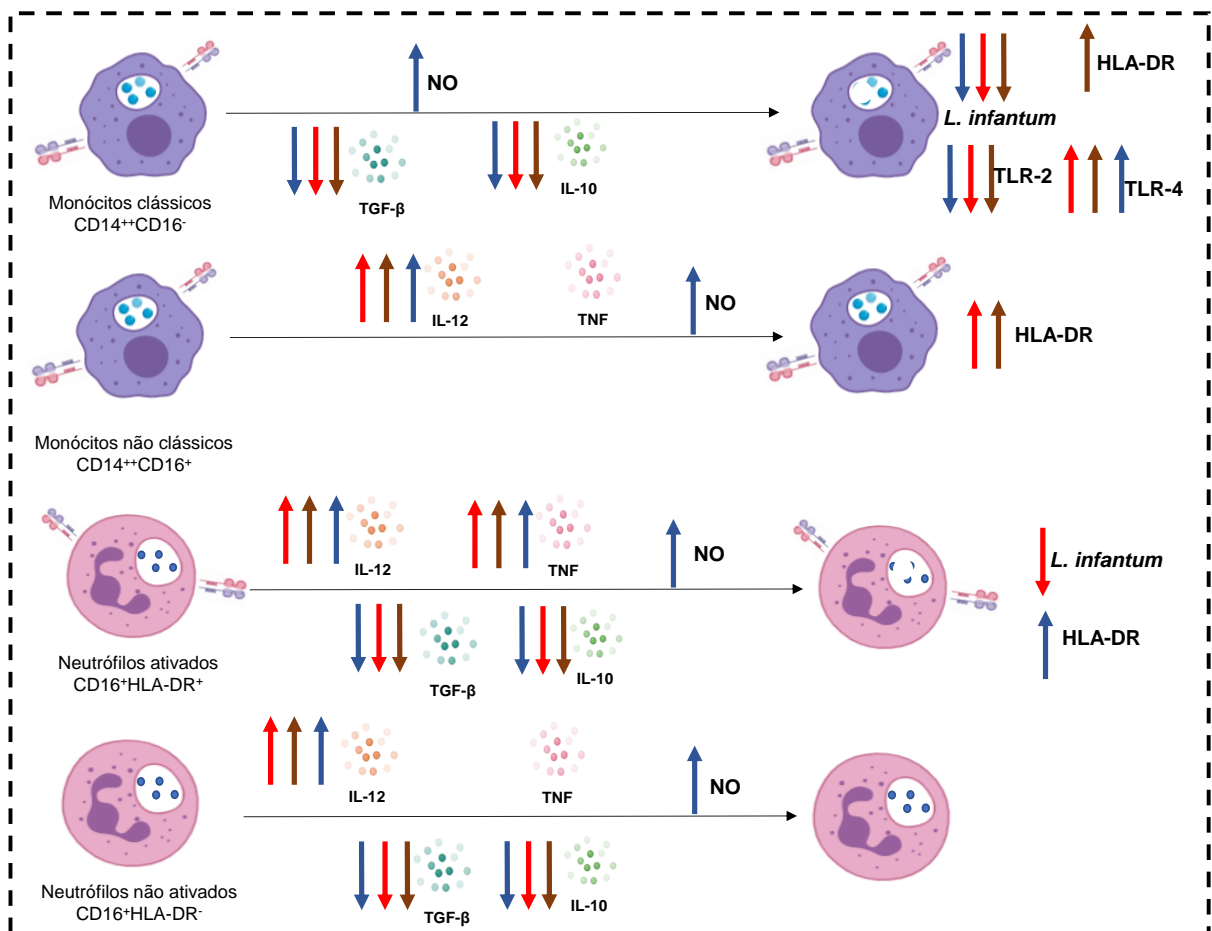
A Figura 44 demonstra os resultados referentes ao potencial antileishmania e imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato nos monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum*. Os dados mostraram que os fármacos não alteraram a viabilidade dos monócitos, neutrófilos e linfócitos. Foi possível observar redução do percentual de monócitos viáveis, provavelmente devido à presença do parasito que sabidamente promove *downregulation* da expressão de CD14 na superfície celular. As análises fenotípicas mostraram claramente que a presença de *L. infantum* regula negativamente a expressão de CD14, alteração que, de maneira interessante, foi restaurada na presença dos fármacos. LET e PAM promoveram redução da internalização de *L. infantum* na subpopulação de monócitos clássicos, enquanto LET reduziu também nos neutrófilos ativados.

PAM aumentou a expressão de HLA-DR nos monócitos clássicos, bem como nos monócitos não clássicos, juntamente com LET. A expressão de TLR-2 foi elevada em todas



as condições, nos monócitos clássicos e a de TLR-4 diminuída, também em todas as condições, em relação ao controle de células.

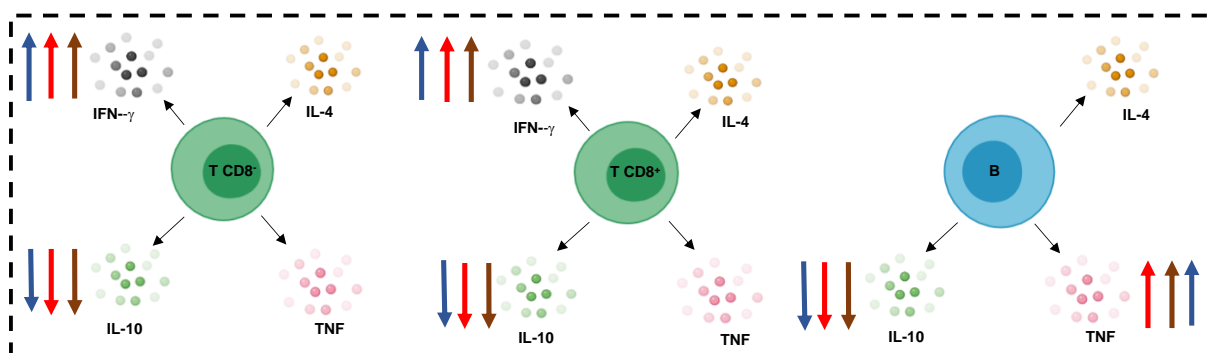
Em relação aos aspectos funcionais de monócitos e neutrófilos, foi observado que os medicamentos avaliados promoveram aumento da produção de IL-12, bem como diminuição de IL-10 e TGF- $\beta$  por monócitos, em relação ao controle de fagocitose. Elevado percentual de neutrófilos ativados IL-12<sup>+</sup> e TNF<sup>+</sup>, bem como diminuição de neutrófilos ativados IL-10<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup> foram observados. Os neutrófilos não ativados apresentaram perfil de produção de citocinas semelhante ao dos monócitos. LET e PAM não promoveram produção de NO.



**Figura 44.** Síntese dos resultados referentes ao potencial antileishmania e imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato, em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*. As setas azuis representam ANFB (fármaco de referência), as vermelhas LET e as marrons PAM. A direção das setas se refere ao efeito em cada aspecto analisado (aumento ou diminuição).

A Figura 45 representa os resultados referentes ao perfil fenotípico-funcional de linfócitos. Verificamos que nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> os tratamentos promoveram elevada produção de IFN- $\gamma$  e reduziram IL-10. Nenhuma alteração no perfil de produção de TNF e IL-4 foi observada. Os tratamentos induziram elevado percentual de

linfócitos B TNF<sup>+</sup> associado a redução na produção de IL-10. Nenhuma alteração ocorreu quanto à produção de IL-4.



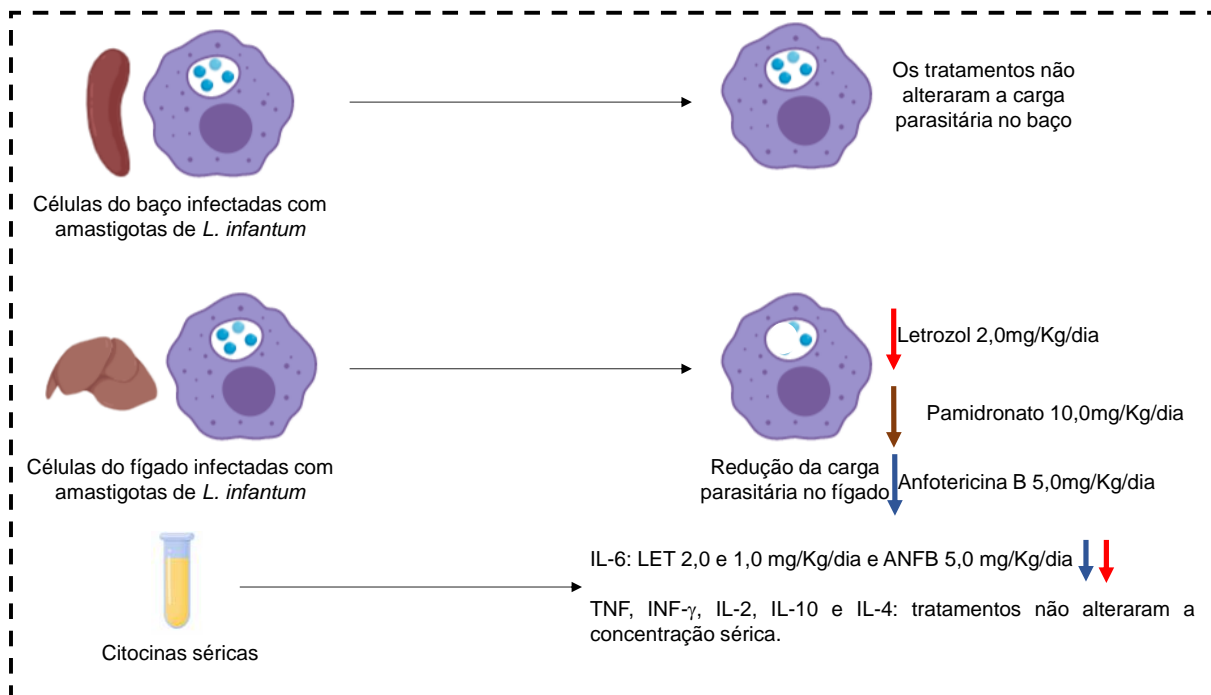
**Figura 45.** Síntese dos resultados referentes ao potencial imunomodulador dos fármacos letrozol e pamidronato em linfócitos T CD8<sup>-</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B do sangue periférico humano incubados com *L. infantum* no contexto *ex vivo*. As setas azuis representam ANFB (fármaco de referência), as vermelhas LET e as marrons PAM. A direção das setas se refere ao efeito em cada aspecto analisado (aumento ou diminuição).

Estudos realizados utilizando-se MEV demonstram que LET e PAM não promovem alterações ultraestruturais nos leucócitos do sangue periférico humano. E por meio da MET, é possível observar formas amastigotas intracelulares nos fagócitos, bem como observar que esses fármacos induzem alterações nas amastigotas.

#### 5.4.3 Avaliação da eficácia e do potencial imunomodulador *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato em modelo de leishmaniose visceral experimental

Em relação à eficácia de LET e PAM *in vivo*, em modelo experimental de leishmaniose visceral, pelo método de diluição limitante, observamos que LET na dose de 2,0 mg/Kg/dia reduziu a carga parasitária no fígado, efeito semelhante ao observado no tratamento com PAM 10,0 mg/Kg/dia. Nenhum efeito dos fármacos foi observado no baço, de acordo com a Figura 46.

De acordo com a dosagem de citocinas séricas, LET a 2,0 mg/Kg/dia promoveu redução da concentração de IL-6.



**Figura 46.** Síntese os resultados referentes à eficácia e do potencial imunomodulador *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato, através da quantificação da carga parasitária no baço e no fígado e da dosagem de citocinas séricas. As setas azuis representam ANFB, as vermelhas LET e as marrons PAM. A direção das setas se refere ao efeito em cada aspecto analisado (aumento ou diminuição).

## 6. DISCUSSÃO

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que tem sido utilizada e que demonstrou ser bem-sucedida, pois os tratamentos atuais para as leishmanioses, como anfotericina B e miltefosina, foram previamente desenvolvidos e aprovados para outras indicações terapêuticas (Nagle et al., 2014). Neste contexto, a proposta deste trabalho foi identificar novas opções terapêuticas para tratamento da leishmaniose visceral, por meio da caracterização da atividade antileishmania de dois fármacos anticâncer, letrozol e pamidronato.

Como os parasitos de *Leishmania* apresentam dois diferentes estágios de vida (promastigota e amastigota), ambos podem ser utilizados tanto para a verificação do efeito de substâncias contra os patógenos quanto para a caracterização de mecanismos de resistência (Vermeersch et al., 2009). Para avaliar a atividade de LET e PAM contra as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*, *in vitro*, utilizamos o modelo de macrófagos derivados de células THP-1, que tem sido extensivamente utilizado para triagem de compostos (Vermeersch et al., 2009; Siqueira-Neto et al., 2010; De Muylder et al., 2011; Siqueira-Neto et al., 2012; Baek et al., 2020).

O modelo de amastigota intramacrófago é o modelo considerado “padrão ouro” no que diz respeito à caracterização da susceptibilidade de substâncias no contexto *in vitro*, mas é importante ressaltar que esse tipo de ensaio apresenta robustez e complexidade limitadas (Nuhs et al., 2015), somado ao fato de que fatores relacionados ao hospedeiro humano, que são essenciais para o desenvolvimento do parasito, devem ser levados em consideração quando o objetivo é encontrar novas opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses (De Muylder et al., 2011).

Estudos de Kobayashi & De Leo (2009) mostraram que os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* spp. são de extrema importância no desenvolvimento de resposta imune celular protetora ou favorável à infecção. Neste sentido, o estudo das células da imunidade inata como neutrófilos e monócitos/macrófagos são de grande relevância para o entendimento da formação do ambiente inflamatório que promove o direcionamento da infecção (Awasthi et al., 2004).

Os monócitos são leucócitos caracterizados, principalmente, por possuírem a habilidade de reconhecer “sinais de perigo” por meio dos receptores de reconhecimento padrão, realizar fagocitose, apresentar antígenos e secretar quimiocinas e citocinas (Chiu & Bharat, 2016). Podem ser subdivididos de acordo com a expressão do receptor de reconhecimento padrão CD14 e do receptor Fc gama III CD16, em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediários/pró-inflamatórios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e patrulhadores

(CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (Chiu & Bharat, 2016; Kapellos et al., 2019). Em resposta a uma infecção ou injúria, os primeiros migram da medula óssea para o local da infecção e fagocitam patógenos, secretam várias quimiocinas e citocinas que levam ao recrutamento de outras células imunes e apresentam antígenos via MCH de classe II (Chiu & Bharat, 2016). Já os monócitos intermediários/pró-inflamatórios possuem a capacidade de fagocitar o patógeno e produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, apresentam baixa adesão a superfícies e elevada expressão de MHC de classe II (Kapellos et al., 2019). Os monócitos patrulhadores, estão envolvidos na fagocitose mediada pelo receptor Fc gama e na adesão celular (Chiu & Bharat, 2016; Kapellos et al., 2019). Já os neutrófilos, são células polimorfonucleares que possuem importante função efetora durante a inflamação induzida por dano tecidual, além de compreenderem a primeira linha de defesa contra patógenos invasores (Mortaz et al., 2018). Esses leucócitos constituem uma população heterogênea, apresentando características fenotípicas e/ou funcionais distintas, dentre elas a capacidade de expressarem em sua superfície, a molécula de MHC de classe II e outras moléculas co-estimuladoras (Li et al., 2019). No estudo atual, foi de interesse avaliar o efeito dos tratamentos (LET e PAM) em subpopulações de monócitos, que foram divididos de acordo com a expressão de CD14 e CD16 em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e monócitos não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), que compreendem as subpopulações de monócitos intermediários/pró-inflamatórios e monócitos patrulhadores. Além disso, foi possível avaliar os neutrófilos, que foram subdivididos quanto a expressão da molécula HLA-DR, em neutrófilos ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e não ativados (CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>).

A avaliação da atividade de substâncias contra as formas promastigotas de *Leishmania* é utilizada para verificar o dano e o impacto na forma extracelular dos parasitos (Gadelha et al., 2020). Observamos que ambos os fármacos apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. infantum* (Figura 22), e por meio da análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 23). Os dados sugerem que LET e PAM promovem vacuolização do citoplasma, bem como aparente modificação morfológica do citoplasma e da mitocôndria. Nossos dados, para PAM, corroboram com os resultados obtidos por Gadelha e colaboradores (2020), que demonstraram que os bifosfonatos risedronato e alendronato promovem alterações nas formas promastigotas de *L. infantum* através da desorganização do citoplasma, com formação de vacúolos e dano mitocondrial. Estudos devem ser realizados para verificar o tipo de morte induzido pelos fármacos nas formas promastigotas de *L. infantum*.

Além de apresentarem efeitos nas formas promastigotas, demonstramos que LET e PAM também agem contra as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Células fagocíticas, dentre elas macrófagos, monócitos e neutrófilos, reconhecem os parasitos do

gênero *Leishmania* e desempenham importantes funções, atuando tanto como células hospedeiras quanto efectoras, controlando a doença e eliminando os parasitos intracelulares (Awasthi et al., 2004; Meira & Gedamu, 2019). Observamos através do modelo preditivo *in vitro*, utilizando macrófagos derivados de células THP-1, que ambos os fármacos reduziram tanto o percentual de células infectadas quanto a quantidade de amastigotas intramacrófago, de maneira concentração dependente (Figuras 24 e 25). Nesse sentido, a atividade antileishmania de LET e PAM também foi observada pelo modelo *ex vivo* (Figura 29), usando leucócitos do sangue periférico humano, por meio da avaliação da redução das formas internalizadas de *L. infantum*, na subpopulação de monócitos clássicos. Interessantemente, apenas LET apresentou efeito antileishmania na população de neutrófilos ativados. Os dados são suportados pelas evidências das alterações citoplasmáticas dos leucócitos, observada pela presença de vacúolos parasitóforos, apresentando em seu interior material pouco eletrodense, sugerindo degeneração do seu conteúdo, por meio da análise por MET (Figura 37). A redução das formas internalizadas de *L. infantum* pelos leucócitos (Figura 29) após tratamento com estes fármacos, pode estar relacionada à modulação da resposta celular frente às formas amastigotas intracelulares e/ou com atuação diretamente no parasito. Contudo, o mecanismo pelo qual os fármacos LET e PAM reduzem a infecção, precisa ser elucidado em estudos futuros.

Ressalta-se que não foram observadas alterações ultraestruturais nas formas promastigotas de *L. infantum*, após tratamento com as concentrações de LET e PAM avaliadas. Durante as 6 horas de incubação não foram visualizadas nos parasitos alterações morfológicas, perda de integridade de membrana ou perda do flagelo (Figura 38). O flagelo de promastigotas é fundamental para invasão de fagócitos, como macrófagos, por diferentes espécies de *Leishmania* (Zauli et al, 2012; Sunter et al, 2019). Zauli e colaboradores (2012) demonstraram a importância do flagelo para a infecção do flebótomo pelo parasito e para sua motilidade dentro do mesmo. Neste contexto, por meio da MEV, não se observou alteração da morfologia do flagelo, em comparação à cultura controle. Cabe ressaltar que nestes experimentos, parasitos, leucócitos e fármacos foram adicionados simultaneamente. Assim, os dados indicam que LET e PAM não comprometem a capacidade das promastigotas de infectarem os leucócitos e serem internalizadas pelos mesmos.

Para o letrozol e outros medicamentos da classe dos inibidores de aromatase, não foram encontrados dados acerca de atividade antileishmania. O letrozol é um fármaco que contém em sua estrutura química, o anel 1,2,4-triazol, que age como importante farmacóforo devido ao potencial de interagir com enzimas, além de possuir habilidade para formar ligações de hidrogênio com receptores, devido à presença do grupo -NH- (Aggarwal & Sumran, 2020). Devido a essas características, esse grupamento apresenta diversas funções farmacológicas,

como antifúngica, anticâncer, anticonvulsivante (Aggarwal & Sumran, 2020) e, contra doenças negligenciadas, como doença de Chagas, malária, tuberculose e leishmaniose (El-Saghier et al., 2019; Aggarwal & Sumran, 2020). Estudos de e Naula et al., (2005), Rajasekaran & Chen (2015) e El-Saghier e colaboradores (2019), demonstraram que diversos compostos contendo 1,2,4-triazol apresentam atividade antileishmania através da inibição de diferentes vias de sinalização, dentre elas, a via PI3K/Akt/mTOR (fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B/alvo da rapamicina em mamíferos). Assim, podemos inferir que a atividade antileishmania desencadeada pelo tratamento das células com letrozol, possa ser pela modulação de vias de sinalização, notadamente a via PI3K/Akt/mTOR. A internalização da *Leishmania* pelas células promove ativação dessa via, que está intimamente relacionada com processos celulares que culminam na persistência à infecção (Ruhland et al., 2007; Kima, 2016) e os compostos 1,2,4-triazol promovem inibição da via, desencadeando redução da infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Khadir et al., 2018; Phan et al., 2020), demonstrando que essa via pode ser alvo para tratamento das leishmanioses. Ao estudarem o efeito antitumoral do letrozol, Genrali e colaboradores (2008) e Lisztwan e colegas (2008) demonstraram que um dos possíveis mecanismos antitumorais do letrozol pode ocorrer através da inibição da via PI3K/Akt/mTOR, pois essa está envolvida em processos de proliferação celular. A miltefosina age inibindo a via PI3K/Akt em células cancerígenas (Jangir et al., 2014) e Zhang e colaboradores (2018) demonstraram que um dos possíveis mecanismos antileishmania da miltefosina é a inibição da Akt, presente nos vacúolos parasitóforos. Dessa maneira, podemos especular que um dos possíveis mecanismos antileishmania observados para o letrozol, possa ser através da inibição dessa via, mas futuros experimentos devem ser realizados para verificar se o efeito antileishmania do letrozol realmente ocorre através da inibição dessa via de sinalização.

A classe dos bifosfonatos, a qual PAM é pertencente, foi estudada quanto à sua ação antiparasitária *in silico*, *in vivo* e *in vitro*, contra diversos parasitos, incluindo os tripanossomatídeos *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *L. mexicana amazonensis* e *L. donovani* (Urbina et al., 1999; Martin et al., 2001; Montalvetti et al., 2001; Yardley et al., 2002; Rodriguez et al., 2002; Sanders et al., 2003; Gadelha et al., 2020). Estudos com amastigotas de *L. infantum* intramacrófago e tratadas com pamidronato não foram encontrados na literatura, mas esse fármaco foi avaliado no modelo de células Vero com amastigotas intracelulares de *L. donovani* (Martin et al., 2001) e foi observado que PAM promoveu redução das células infectadas. Neste contexto, a redução das formas internalizadas por PAM, pode ser atribuída à inibição da enzima pirofosfatase acidocalcisômica, presente nos parasitos. De acordo com Urbina e colaboradores (1999), o pirofosfato inorgânico é o principal composto de elevada energia presente em parasitos protozoários tripanossomatídeos, sendo mais abundante que

o ATP em cerca de 5-10 vezes. A presença do pirofosfato inorgânico é concentrada nos acidocalcissomos, que são vacúolos ácidos que contém grandes quantidades de íon cálcio, magnésio, sódio, zinco e poli fosfatos de cadeia curta e longa, sendo equivalentes ao mineral ósseo em que os bifosfonatos se ligam com elevada afinidade (Docampo & Moreno, 2001). A atividade da pirofosfatase (catalisa a quebra de pirofosfato inorgânico em duas moléculas de fosfato, com liberação de altas quantidades de energia) nos acidocalcissomos, parece exercer importante função no que diz respeito à sobrevivência do parasito, pois foi demonstrado que o pamidronato bloqueia essa enzima, com conseqüente inibição da proliferação das amastigotas intracelulares (Urbina et al., 1999).

O potencial antileishmania observado para LET e PAM, tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, foi acompanhado de ausência de toxicidade celular relevante (Figuras 27 e 28, respectivamente). As imagens de MEV e MET (Figura 37) dos leucócitos do sangue periférico humano e incubados com *L. infantum* e tratados com LET e PAM por 6 horas, corroboram com os nossos achados, pois não foi observado elevada perda de viabilidade de leucócitos (<10%) após marcação com *Live/Dead* (Figura 28). Neste método, a determinação da viabilidade celular depende de propriedades físicas e bioquímicas das células viáveis, como atividade esterase e integridade de membrana celular. Assim, nas condições avaliadas, a análise de viabilidade celular, juntamente com achados ultraestruturais por MEV, não se observou citotoxicidade dos fármacos. Outros estudos conduzidos para avaliação da toxicidade de ambos os fármacos, utilizando diferentes tipos celulares, mostrou que a perda de viabilidade é dependente, principalmente, do tempo de exposição das células aos fármacos, bem como do tipo de células empregadas (Rogers et al., 1996; Martin et al., 2001; Thiantanawat et al., 2003; Haynes et al., 2003; Bhatnagar, 2007; Dunbier et al., 2013; Sabatino et al., 2014).

Dentre os aspectos funcionais das células infectadas, destacam-se as ações leishmanicidas do óxido nítrico (NO), uma molécula tóxica, que apresenta capacidade de eliminar os parasitos intracelulares (Liu & Uzonna, 2012) por meio da inibição da respiração mitocondrial, inativação de peroxidases, aumentando a susceptibilidade ao dano oxidativo, inibição da glicólise, inibição dos mecanismos de reparo e síntese de DNA além de peroxidação dos lipídios de membrana (Giudice et al., 2007). Nossos dados mostraram que o efeito antileishmania observado tanto por LET quanto por PAM, *in vitro*, é independente da produção de óxido nítrico (Figura 26). Resultado semelhante foi observado nos leucócitos do sangue periférico humano, em que tanto nas subpopulações de monócitos quanto nas de neutrófilos, não houve produção de NO pelos fármacos estudados (Figura 32). A ausência de aumento da produção de NO após tratamento com letrozol foi observada em outros estudos (Xia & Krukoff, 2004; Nevzati et al., 2015), bem como pelo pamidronato (Rogers et



al., 1996). Resultado diferente foi observado quando empregamos a ANFB, que sabidamente promove eliminação dos parasitos por induzir elevada produção de NO, como foi observado nos nossos dados e previamente descrito em outros estudos (Petri e Silva et al., 2016; Pandey et al., 2016). Podemos inferir que, talvez, a concentração e/ou o tempo de exposição ao LET e PAM, não tenha sido suficiente para induzir a produção NO pelos fagócitos. Também, outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio podem estar envolvidas no processo de eliminação do parasito, mas que não foram avaliadas neste trabalho. Outros estudos, como os de Muniz-Junqueira e colaboradores (2008), demonstraram que o efeito antileishmania observado para o antimoniato de meglumina era independente da produção de NO por monócitos, bem como Costa-Silva et al., (2017), ao estudarem o efeito antileishmania da buparvaquona.

Estudos demonstraram que tanto monócitos/macrófagos quanto neutrófilos, possuem diferentes perfis fenotípico-funcionais após um estímulo (Sharma et al., 2016; Jakubzick et al., 2017; Singh et al., 2018). O receptor de reconhecimento padrão CD14 é essencial para a ativação de monócitos e uma elevada expressão desta molécula está relacionada à atividade inflamatória (Wu et al., 2019). É sabido que na infecção experimental de monócitos com *L. infantum* bem como em pacientes com leishmaniose visceral clássica, ocorre *downregulation* da expressão desse receptor (Singh et al., 2016; Viana et al., 2018). Os achados corroboram os dados da literatura. Ao ser avaliada a densidade de expressão de CD14 na membrana celular dos monócitos por meio da análise da intensidade média de fluorescência, foi possível comprovar que se tratava de alteração associada à presença do parasito na cultura e não ação dos fármacos em teste. Os resultados observados no estudo caracterizam, portanto, um evento intimamente relacionado a infecção por *Leishmania*. A presença dos fármacos, não alterou a expressão de CD14 nos monócitos clássicos e não clássicos (Figura 30).

A molécula de HLA-DR está relacionada com o estado de ativação celular e com a apresentação de antígenos para as células T e pode estar presente de forma constitutiva ou induzida, em várias células, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, entre outras (Palojarvi et al., 2013). Os parasitos de *Leishmania*, após serem internalizados pelas células, desenvolvem mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro, dentre os quais, a *downmodulation* ou a não indução de moléculas envolvidas direta ou indiretamente na apresentação de antígenos (De Almeida et al., 2003). Essa ação do parasito é importante uma vez que a expressão de moléculas de HLA-DR pelas células fagocíticas se correlaciona com a capacidade de induzir resposta aos antígenos de *Leishmania* pelas células T (Lal et al., 1991). Nas condições avaliadas, nossos dados, interessantemente, mostram que o tratamento com PAM promoveu aumento da expressão de HLA-DR pelos monócitos clássicos, quando comparado ao grupo CF. Já LET e PAM promoveram aumento da expressão dessa molécula em monócitos não clássicos. Na subpopulação de neutrófilos

ativados, ANFB foi o único tratamento que induziu aumento da expressão de HLA-DR (Figura 30). A supressão ou a redução da expressão de HLA-DR está intimamente relacionada com o tempo e a intensidade da infecção por *Leishmania* (Reiner et al., 1987) e, assim, o aumento da expressão dessa molécula, promovido pelos fármacos, pode, ao menos em parte, contribuir para indução de uma resposta imune mediada por células. Esse sinal é paralelo e/ou aumentado pela ativação de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), que não foram avaliados nesse trabalho.

No sítio da infecção, a interação *Leishmania*-fagócito é crucial para o direcionamento da doença, com destaque para os receptores Toll (TLRs), que são importantes na vigilância e remoção dos parasitos (Sacks & Sher, 2002). Os TLRs estão envolvidos em uma variedade de fenômenos celulares, dentre eles: fagocitose, maturação, atividade microbicida via indução da expressão de iNOS, bem como produção de citocinas moduladoras e pró-inflamatórias (Singh et al., 2012). No contexto das leishmanioses, Tuon e colaboradores (2008) relatam que TLR-2 é considerado um ativador de via NF- $\kappa$ B mediado por lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania*, mas outros componentes estruturais presentes no parasito podem ativar outros TLRs, e que TLR-4 é requerido para eficiente controle parasitário provavelmente devido à atividade de iNOS. Os dados gerados nesse estudo indicaram maior densidade de expressão de TLR-2 por monócitos clássicos em todas os tratamentos avaliados na presença de *L. infantum* associada à menor densidade de expressão de TLR-4 (Figura 31). Em monócitos de pacientes com LV ativa, TLR-2 e 4 são expressos, e mesmo após o tratamento com medicamentos antileishmania, esses receptores permanecem expressos, indicando o envolvimento desses receptores no reconhecimento da *Leishmania* (Gatto et al., 2015). A interação da *Leishmania* com os TLR-2 presentes nos monócitos, leva à modulação da produção de citocinas (Cezário et al., 2011), bem como após o tratamento (Gatto et al., 2015), como o observado a partir dos resultados obtidos nesse estudo. Além disso, acerca da expressão de TLR-4, nossos dados se correlacionam com os achados referentes à produção de óxido nítrico (NO), pois não observamos produção de NO pelos fármacos LET e PAM, mas, por outro lado, a anfotericina B, promoveu aumento da produção de NO, bem como aumento da expressão de TLR-4 comparado ao grupo CF. Porém, são necessários mais estudos para se verificar a influência do tratamento com LET e PAM nos TLRs.

A resolução da infecção provocada por *Leishmania* é dependente da resposta imune mediada por células, especificamente a ativação e diferenciação de linfócitos T, que induzem a ativação de fagócitos mononucleares infectados, promovendo a eliminação do parasito (Peruhype-Magalhães et al., 2005; Gurung & Kannaganti, 2015; Meira & Gedamu, 2019), bem como da atividade antileishmania do fármaco utilizado na quimioterapia (Caetano et al., 2019).

Os linfócitos T são capazes de se diferenciarem em diferentes fenótipos, desempenhando importantes funções relacionadas à eliminação dos patógenos, o que inclui, dentre outras, reconhecimento de antígenos e secreção de citocinas e quimiocinas (Jawed et al., 2019). Os linfócitos T CD4 possuem função auxiliar, ou seja, reconhecem antígeno via MHC de classe II e ao serem ativados proliferam e regulam a resposta imune (Kumar & Nylén, 2012; Jawed et al., 2019). Já os linfócitos T CD8 possuem função citotóxica, sendo capazes de lisar as células parasitadas e promover ativação de macrófagos (Kumar & Nylén, 2012). Já os linfócitos B, além de produzirem anticorpos, também regulam a resposta imune por meio da produção de citocinas (Fatahaliha et al., 2015). Esses três subtipos de linfócitos possuem capacidades regulatórias, as quais contribuem para o controle de danos teciduais, mas que também contribuem para a replicação de parasitos (Kumar & Nylén, 2012). Ou seja, o sucesso da resposta imune celular, que permite a eliminação dos parasitos intracelulares sem danos teciduais, requer um equilíbrio entre as respostas tipo 1 e 2 mediada por citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, produzidas e secretadas no microambiente da infecção por diferentes populações celulares, especialmente os linfócitos.

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF e IFN- $\gamma$  atuam como mediadores entre as respostas imune inata e adaptativa e estão associadas a uma ação protetora no contexto das leishmanioses (Dayakar et al., 2019). IL-12 atua direcionando para uma resposta tipo 1 e induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T e células NK, além de mediar a atividade leishmanicida por meio da indução da produção de NO (Ho et al., 1994; Dayakar et al., 2019). A atividade antiparasitária de TNF se deve, principalmente, à ativação de macrófagos e produção de NO (Ho et al., 1994; Dayakar et al., 2019). Já o IFN- $\gamma$  age ativando macrófagos e monócitos e induzindo a produção de NO, TNF, IL-1- $\beta$  e IL-6 além de promover bloqueio da produção de IL-10. A redução da produção de IFN- $\gamma$  leva ao estabelecimento de uma resposta tipo 2 (Ho et al., 1994; Dayakar et al., 2019). Em contraste, as citocinas moduladoras IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 regulam negativamente as respostas imune inata e adaptativa e atuam sinergicamente para a progressão da infecção (Dayakar et al., 2019). IL-10 atua inibindo a produção de IFN- $\gamma$ , IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF, a ativação de macrófagos, a apresentação de antígenos e a produção de NO, ou seja, impede a inflamação que é requerida para a eliminação dos parasitos (Nylén & Sacks, 2007; Dayakar et al., 2019). Já, TGF- $\beta$  inibe a ativação de macrófagos, a expressão de iNOS e as funções de TNF e IFN- $\gamma$  (Ho et al., 1994; Dayakar et al., 2019). TGF- $\beta$  promove ainda a expressão de arginina e a síntese de poliaminas, favorecendo a proliferação dos parasitos (Dayakar et al., 2019). IL-4 apresenta um papel na patogênese da LV, pois atua impedindo a secreção de IFN- $\gamma$  e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e promovendo a ativação alternativa de macrófagos, contribuindo assim, para a sobrevivência dos patógenos (Ho et al., 1994; Dayakar et al., 2019).

No entanto, tem sido descrito que a IL-4 pode induzir produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Dayakar et al., 2019).

Zijlstra (2016) relata que pacientes com LV clássica, apresentam um perfil de citocinas características de uma resposta tipo 2 (moduladora), correlacionada, principalmente, com elevados níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ , que estão relacionados com elevada carga parasitária. Porém, esses pacientes podem, também, secretar IL-12 e IFN- $\gamma$ , sugerindo que não há ausência de uma resposta tipo 1 (Zijlstra, 2016; Singh et al., 2018). Durante a patogênese da LV, os monócitos apresentam fenótipo modulador, com prejuízo do eixo pró-inflamatório e produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (Singh et al., 2018), bem como neutrófilos com capacidades efectoras limitadas (Yizengaw et al., 2016). Todo esse perfil está associado também à produção de IL-10 pelos linfócitos T CD4, T CD8 e B, o que contribui para a disseminação da doença (Gautam et al., 2011; Kaushal et al., 2014; Andreani et al., 2015).

Nossos dados demonstram que os tratamentos com LET e PAM favorecem o desenvolvimento de um perfil pró-inflamatório, com elevada produção de IL-12 por monócitos e neutrófilos ativados e não ativados (Figura 33). A produção de TNF apresentou aumento apenas em neutrófilos ativados. Em paralelo, observou-se redução no percentual de células produtoras das citocinas moduladoras IL-10 e TGF- $\beta$  (Figura 34). Além disso, os dados demonstraram que os linfócitos T CD8<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup> dos grupos LET e PAM, promovem elevada produção de IFN- $\gamma$  e os linfócitos B foram responsáveis pelo aumento na produção de TNF, em relação a CF (Figura 35). Em contraste, LET e PAM, nas três subpopulações de linfócitos avaliadas, desencadearam diminuição da produção de IL-10 e não alteraram o perfil de produção de IL-4 (Figura 36). Os achados desse estudo vão de encontro com outros estudos, nos quais pamidronato e letrozol promoveram aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias sob outros estímulos (Thiebaud et al., 1997; Lim et al., 2010; Bauml et al., 2015; López-Posadas et al., 2016; Zarkavelis et al., 2016).

Assim, os resultados obtidos aqui estão em concordância com os achados da literatura, que mostram que o tratamento da LV promove propriedades imunomoduladoras, com geração de resposta tipo 1, que é caracterizada pelo aumento da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno e produção de IFN- $\gamma$  por células T, que proporcionam ativação de macrófagos, com consequente eliminação do parasito (Zijlstra, 2016). Dentre esses estudos, destaca-se a redução dos níveis de IL-10 em pacientes tratados com antimoniato de meglumina (Araújo-Santos et al., 2017), o aumento dos níveis de IL-12 acompanhado de redução dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  com o tratamento com anfotericina B (Mondal et al., 2010; Zijlstra, 2016) e a elevada produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  em pacientes tratados com miltefosina (Palic et al., 2019).

O perfil de produção de citocinas séricas pelos fármacos, no modelo *in vivo*, corrobora com os achados referentes à produção de citocinas intracitoplasmáticas pelo contexto *ex vivo*, no qual LET e PAM promovem um ambiente pró-inflamatório. Letrozol na dose de 2,0 mg/Kg/dia promove redução na concentração sérica de IL-6 (Figura 41). IL-6 é uma citocina que pode ou promover, ou suprimir ou não alterar a resposta imune protetora (Dayakar et al., 2019), sendo considerada como marcador de eficácia terapêutica (Poll et al., 1995) ou como indicador de severidade da infecção (dos Santos et al., 2016). Dessa maneira, estudos devem ser conduzidos para verificar a influência dessa citocina após o tratamento com LET e PAM. Apesar de ser observado aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-2, esse não foi estatisticamente significativo, pois talvez os tempos de infecção, tratamento e acompanhamento dos animais não foram capazes de promover elevação dessas proteínas (Figuras 41 e 42).

No contexto das leishmanioses, algumas vias de sinalização podem estar envolvidas no processo de produção de citocinas (Shadab & Ali, 2011), dentre as quais, a via PI3K/Akt/mTOR (Kima, 2016). A inibição da produção de IL-12 pelos macrófagos é devido à ativação de PI3K (Cheekatla et al., 2012), e a ativação sequencial de PI3K, Akt e mTOR promove modulação da resposta imune em camundongos infectados com *L. donovani*, *L. major* e *L. amazonensis* (Cheekatla et al., 2012; Vázquez-López et al., 2015). A inibição dessa via é um dos mecanismos utilizados na imunoterapia do tratamento de diversos tipos de câncer (Jiang et al., 2020; O'Donnell et al., 2018) e ocorre quando da utilização de LET (Genrali et al., 2008; Lisztwan et al., 2008) e PAM (Inoue et al., 2005; Tsubaki et al., 2015). Nesse contexto, podemos sugerir que o potencial imunomodulador promovido tanto por LET quando por PAM pode ser, ao menos em parte, devido à supressão dessa via de sinalização. Em camundongos infectados com *L. major* e deficientes de p85 $\alpha$ , uma subunidade reguladora de PI3K, foi observado um aumento da resposta tipo 1, indicando que essa via apresenta função na regulação do balanço entre as respostas tipo 1 e 2 (Cheekatla et al., 2012). Porém, estudos devem ser realizados para que se confirme o real mecanismo pelo qual LET e PAM promovem imunomodulação quando utilizados em modelo de leishmaniose visceral.

A avaliação da eficácia *in vivo* dos fármacos letrozol e pamidronato, em modelo de leishmaniose visceral experimental utilizando camundongos Balb/c e avaliados pelo método de diluição limitante, demonstraram que esses medicamentos reduziram a carga parasitária no fígado, sendo que esse efeito foi observado na dose 2,0 mg/Kg para o letrozol (Figura 39) e 10,0 mg/Kg para pamidronato (Figura 40). Nenhuma alteração foi observada no baço, quando comparados ao grupo controle. De acordo com Kumar & Nýlen (2012) a resposta imune desenvolvida por camundongos infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* pode, em um mesmo animal, variar entre diferentes órgãos. Após a infecção dos animais, os parasitos

se proliferam rapidamente no fígado e, durante as primeiras semanas, a infecção é controlada por meio de uma resposta imune mediada por células e pela formação do granuloma. No baço, os parasitos persistem e a infecção progride lenta e continuamente por um período mais longo, quando comparado com a infecção no fígado.

Em estudos *in vivo*, descritos na literatura, no contexto das leishmanioses, pamidronato foi avaliado em modelo experimental de leishmaniose visceral causada por *L. donovani* e foi observado que na dose 20,0 mg/Kg/dia, via intravenosa e durante 5 dias, houve 91,8% de inibição (Yardley et al., 2002). Esses autores concluíram, também, que o efeito antileishmania observado não era dependente somente da dose, mas sim da via de administração, sendo a intravenosa a mais eficaz. Rodriguez e colaboradores (2002) investigaram PAM em modelo experimental de leishmaniose cutânea, provocada por *L. mexicana amazonensis* e demonstraram que na dose de 10,0 mg/Kg/dia, via intraperitoneal e durante 5 dias, pamidronato promoveu eliminação das lesões, bem como das amastigotas intralesional. Foi demonstrado que PAM possui a capacidade de acumular em macrófagos presentes no baço e no fígado de camundongos e ratos, através de sua afinidade pelo cálcio intracelular (Monkkonen et al., 1991), associado à ligação à enzima pirofosfatase presente nos acidocalcissomos dos parasitos. Esse pode ser um possível mecanismo antileishmania do pamidronato *in vivo* (Docampo & Moreno, 2001).

Outros autores relatam que os estrógenos possuem atividade pró-inflamatória e que os hormônios testosterona e progesterona apresentam efeitos imunossupressivos (Bereshchenko et al., 2018; Kovats et al., 2016). Porém, esses mesmos autores destacam que um nível de estrogênios maior que o normal promove respostas moduladoras. Os hormônios sexuais podem interagir diretamente com células do sistema imune e desencadear diferentes respostas imunológicas (Snider et al., 2009). Estudos foram conduzidos para avaliar o efeito dos hormônios sexuais na condução das leishmanioses, e foi demonstrado por Baccan et al., (2011) que os níveis circulantes de estrogênio, tanto em mulheres quanto em homens com leishmaniose cutânea provocada por *L. braziliensis* podem estar correlacionados com desenvolvimento das lesões. Alexander (1988) demonstrou que camundongos DBA/2 machos e fêmeas infectados com *L. major* desenvolveram lesões, mas que os machos apresentaram maior resistência à infecção que as fêmeas. Neste mesmo estudo, ao avaliar os animais infectados por *L. mexicana*, foi observado que as fêmeas foram resistentes e os machos permissivos à infecção. Já Anuradha e colaboradores (1990) apontam que hamsters machos são susceptíveis à infecção por *L. donovani*, quando comparados às fêmeas. Já Travi et al., (2002), mostraram que hamsters machos apresentaram maior tamanho e gravidade das lesões provocadas por *L. panamensis* e *L. guyanensis*.

A atividade da aromatase gera altos níveis de estradiol (Simpson et al., 2002), e o tratamento com letrozol reduz a quantidade desse hormônio (Elliot et al., 2020), sendo que os efeitos regulatórios envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias variam de acordo com o tipo celular e a concentração de estrogênio (Kovats et al., 2016). Mas já foi relatado na literatura, que baixos níveis de estradiol promovem aumento dos marcadores inflamatórios (Au et al., 2016). Assim, o tratamento dos animais infectados com letrozol pode ter promovido redução de estrogênio e, assim, ter promovido resposta pró-inflamatória. Adicionalmente, a dose utilizada que apresentou efeito antileishmania *in vivo* pode ter promovido ativação ou inibição de vias de sinalização, como a via PI3K/Akt/mTOR.

Ressalta-se que estudos adicionais devem ser realizados para que se confirme o real mecanismo pelos quais ambos os fármacos exercem suas atividades antileishmania e imunomoduladora *in vivo*.

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram, pela primeira vez, o potencial do letrozol como alternativa terapêutica para tratamento da leishmaniose visceral humana, o que permitiu a proteção do uso do mesmo neste contexto, conforme o pedido de patente depositado em 2020 (BR1020200053272) (Anexo).

## **7. CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que LET e PAM apresentam ação antileishmania e imunomoduladora, fazendo com que possam ser elegíveis para avaliação como potenciais alternativas terapêuticas e/ou como protótipos para tratamento da leishmaniose visceral humana.



## 8. PERSPECTIVAS

- Investigar o mecanismo de ação antileishmania do letrozol;
- Investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no processo de imunomodulação do letrozol, observadas nos contextos *ex vivo* e *in vivo*;
- Prospectar junto à CTIT a viabilidade de repasse da tecnologia para as indústrias farmacêuticas e/ou organizações envolvidas no desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.. **Cellular and molecular immunology**. 9ª edição. Filadélfia: Elsevier, 2018.
- AGGARWAL, R.; SUMRAN, G. An insight on medicinal attributes of 1,2,4-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 205, 2020.
- ALEXANDER, J. Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. **Parasitology**, v. 96, p. 297-302, 1988.
- ANDRADE-NETO, V. V.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; DOS SANTOS FAIOES, V.; MARTINS, T. P.; SILVA, R. L.; LEON, L. L.; TORRES-SANTOS, E. C. Leishmaniasis treatment: Update of possibilities for drug repurposing. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 5, p. 967–996, 2018.
- ANDREANI, G.; OUELLET, M.; MENASRIA, R.; GOMEZ, A. M.; BARAT, C.; TREMBLAY, M. J. *Leishmania infantum* Amastigotes Trigger a Subpopulation of Human B Cells with an Immunoregulatory Phenotype. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–26, 2015.
- ANVERSA, L. S. O.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. nia B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ARAÚJO, P. S. de S.; DE OLIVEIRA, S. S. C.; D'AVILA-LEVY, C. M.; DOS SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H. Susceptibility of promastigotes and intracellular amastigotes from distinct *Leishmania* species to the calpain inhibitor MDL28170. **Parasitology Research**, v. 117, n. 7, p. 2085–2094, 2018.
- ARAÚJO-SANTOS, T.; ANDRADE, B. B.; GIL-SANTANA, L.; LUZ, N. F.; DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, F. A.; ALMEIDA, M. L.; DE SANTANA CAMPOS, R. N.; BOZZA, P. T.; ALMEIDA, R. P.; BORGES, V. M. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ARULEBA, R. T.; CARTER, K. C.; BROMBACHER, F.; HURDAYAL, R. Can we harness immune responses to improve drug treatment in leishmaniasis? **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–20, 2020.
- AU, A.; FEHER, A.; MCPHEE, L.; JESSA, A.; OH, S.; EINSTEIN, G. Estrogens, inflammation and cognition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 40, p. 87–100, 2016.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B.. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.
- BACCAN, G. C.; OLIVEIRA, F.; SOUSA, A. D.; CERQUEIRA, N. A.; COSTA, J. M. L.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 548–554, 2011.
- BAEK, K. H.; PIEL, L.; ROSAZZA, T.; PRINA, E.; SPÄTH, G. F.; NO, J. H. Infectivity and drug susceptibility profiling of different leishmania-host cell combinations. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 1–16, 2020.
- BAGCHI, G.; DASH, A. K.; KUMAR, S.; JIANG, S.; AHN, S. C.; CHATTERJEE, B.; TYAGI, R. K.. Sex steroids, cognate receptors and aging. **Models, Molecules and Mechanisms in Biogerontology**, p. 265-296, 2019.

- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BAUML, J.; CHEN, L.; CHEN, J.; BOYER, J.; KALOS, M.; LI, S. Q.; DEMICHELE, A.; MAO, J. J. Arthralgia among women taking aromatase inhibitors: Is there a shared inflammatory mechanism with co-morbid fatigue and insomnia? **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2015.
- BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunopharmacology of modern antifungals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 226–235, 2008.
- BERESHCHENKO, O.; BRUSCOLI, S.; RICCARDI, C. Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–10, 2018.
- BHATNAGAR, A. S. The discovery and mechanism of action of letrozole. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 105, p. 7–17, 2007.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.
- BOUZAHZAH, B.; JELICKS, L. A.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Risedronate in the treatment of Murine Chagas' disease. **Parasitology Research**, v. 96, n. 3, p. 184–187, 2005.
- BRAGA, S. S. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111660, 2019.
- BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C.. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 13ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2017.
- BUHAESCU, I.; IZZEDINE, H. Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9–10, p. 575–584, 2007.
- CATANEO, A. H. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; ASSOLINI, J. P.; PANIS, C.; KIAN, D.; YAMAUCHI, L. M.; COLADO SIMÃO, A. N.; CASAGRANDE, R.; PINGE-FILHO, P.; COSTA, I. N.; VERRI, W. A.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, 2019.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 01/11/2020.
- CEZÁRIO, G. A. G.; DE OLIVEIRA, L. R. C.; PERESI, E.; NICOLETE, V. C.; POLETTINI, J.; DE LIMA, C. R. G.; GATTO, M.; CALVI, S. A. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental leishmania chagasi infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 573–583, 2011.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CHARLTON, R.; ROSSI-BERGMANN, B.; DENNY, P. W.; STEEL, P. G.. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145 n. 2, p. 219–236, 2018.

CHAWLA, B.; JHINGRAN, A.; PANIGRAHI, A.; STUART, K. D.; MADHUBALA, R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant leishmania donovani. **Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.

CHEEKATLA, S. S.; AGGARWAL, A.; NAIK, S. MTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 1, p. 37–46, 2012.

CHIU, S.; BHARAT, A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 239–245, 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R.. **Leishmanioses do continente americano**.1ª edição. Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, 2014.

COSTA-SILVA, T. A.; GALISTEO, J. crossm Nanoliposomal Buparvaquone Infected Macrophages and Is Highly Effective in a Murine Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–15, 2017.

CUNA, W. R. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2012.

DAS, S.; RANI, M.; PANDEY, K.; SAHOO, G. C.; RABIDAS, V. N.; SINGH, D.; DAS, P. Combination of paromomycin and miltefosine promotes TLR4-dependent induction of antileishmanial immune response in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2373–2378, 2012.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S. V.; KALANGI, S. K. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, 2003.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.

DE MUYLDER, G.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases *initiative*. **Leishmanioses**. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>>. Acesso em: 05 de novembro de 2020.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 1, n. 1, p. 51–61, 2001.

DOS SANTOS-NOGUEIRA, F.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.

DUFFIN, J.; RENÉ, P. “Anti-moine; anti-biotique”: The public fortunes of the secret properties of antimony potassium tartrate (tartar emetic). **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 46, n. 4, p. 440–456, 1991.

DUNBIER, A. K.; GHAZOU, Z.; ANDERSON, H.; SALTER, J.; NERURKAR, A.; OSIN, P.; A'HERN, R.; MILLER, W. R.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Molecular profiling of aromatase inhibitor-treated postmenopausal breast tumors identifies immune-related correlates of resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 10, p. 2775–2786, 2013.

EISSA, M. M.; AMER, E. I.; EL SAWY, S. M. F. Leishmania major: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 382–390, 2011.

ELLIOTT, M. J.; ENNIS, M.; PRITCHARD, K. I.; TOWNSLEY, C.; WARR, D.; ELSE, C.; AMIR, E.; BEDARD, P. L.; RAO, L.; STAMBOLIC, V.; SRIDHAR, S.; GOODWIN, P. J.; CESCONE, D. W. Association between BMI, vitamin D, and estrogen levels in postmenopausal women using adjuvant letrozole: a prospective study. **npj Breast Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2020.

EL-SAGHIER, A. M.; MOHAMED, M. A.; ABD-ALLAH, O. A.; KADRY, A. M.; IBRAHIM, T. M.; BEKHIT, A. A. Green synthesis, antileishmanial activity evaluation, and in silico studies of new amino acid-coupled 1,2,4-triazoles. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 2, p. 169–181, 2019.

FATAHALIHA, M. H.; HOSSEINI, M.; RASOLZADEH, S.; BANDI, D. S.; BARADARAN, B.; JADIDI-NIARAGH, F.; YOUSEFI, M. Analysis of human B cell response to recombinant *Leishmania* LPG3. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 8, p. 624–629, 2015.

FUERTES, M. A.; NGUEWA, P. A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433–9, 2008.

GADELHA, A. P. R.; BRIGAGAO, C. M.; DA SILVA, M. B.; RODRIGUES, A. B. M.; GUIMARÃES, A. C. R.; PAIVA, F.; DE SOUZA, W.; HENRIQUES, C. Insights about the structure of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) and the activity of bisphosphonates on the proliferation and ultrastructure of *Leishmania* and *Giardia*. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2020.

GATTO, M.; DE ABREU, M. M.; TASCA, K. I.; DE GOLIM, M. A.; DA SILVA, L. D. M.; SIMÃO, J. C.; FORTALEZA, C. M. C. B.; DE SOARES, É. M. V. C.; CALVI, S. A. The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2015.

GARZONI, L. R.; CALDERA, A.; MEIRELLES, M. D. N. L.; DE CASTRO, S. L.; DOCAMPO, R.; MEINTS, G. A.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 273–285, 2004.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S. L.; FROMMEL, D.. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Tropica**, v. 3, n. 4, p. 237-245, 1992.

GENERALI, D.; FOX, S. B.; BRIZZI, M. P.; ALLEVI, G.; BONARDI, S.; AGUGGINI, S.; MILANI, M.; BERSIGA, A.; CAMPO, L.; DIONISIO, R.; VERGONI, F.; GIARDINI, R.; DOGLIOTTI, L.; BOTTINI, A.; HARRIS, A. L.; BERRUTI, A. Down-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 9, p. 2673–2680, 2008.

GENERALI, D.; BATES, G.; BERRUTI, A.; BRIZZI, M. P.; CAMPO, L.; BONARDI, S.; BERSIGA, A.; ALLEVI, G.; MILANI, M.; AGUGGINI, S.; DOGLIOTTI, L.; BANHAM, A. H.; HARRIS, A. L.; BOTTINI, A.; FOX, S. B. Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. 1046–1051, 2009.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

GHOSH, M.; ROY, K.; ROY, S. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2834–2838, 2013.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.; PEREIRA, J.; RILEY, L.; WILSON, M. E.; HO, J.; JESUS, A.; CARVALHO, E.; ALMEIDA, R.. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, 2007.

GIUDICE, A., VENDRAME, C., BEZERRA, C., CARVALHO, L.P., et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania brasiliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 29, n. 12, 2012.

GOLLOB, K.J., VIANA, A.G., DUTRA, W.O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 367-376, 2015

GRISHAM, M. B.; JONHSON, G. G.; LANCASTER, J. R.. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods in enzymology**, v. 268, 1996.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cell Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, 2015.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, p. 1–23, 2011.

HAYNES, B. P.; DOWSETT, M.; MILLER, W. R.; DIXON, J. M.; BHATNAGAR, A. S. The pharmacology of letrozole. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 87, n. 1, p. 35–45, 2003.

HO, J. L.; BADARO, R.; HATZIGEORGIOU, D.; REED, S. G.; JOHNSON, W. D. Cytokines in the treatment of leishmaniasis: From studies of immunopathology to patient therapy. **Biotherapy**, v. 7, n. 3–4, p. 223–235, 1994.

INOUE, R.; MATSUKI, N. A.; JING, G.; KANEMATSU, T.; ABE, K.; HIRATA, M. The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NF $\kappa$ B pathway in osteosarcoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 5, p. 633–641, 2005.

JANGIR, S.; BALA, V.; LAL, N.; KUMAR, L.; SARSWAT, A.; KUMAR, A.; HAMIDULLAH; SAINI, K. S.; SHARMA, V.; VERMA, V.; MAIKHURI, J. P.; KONWAR, R.; GUPTA, G.; SHARMA, V. L. Novel alkylphospholipid-DTC hybrids as promising agents against endocrine related cancers acting via modulation of Akt-pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 638–647, 2014.

JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349–362, 2017.

JAWED, J. J.; DUTTA, S.; MAJUMDAR, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, 2019.

JIANG, N.; DAI, Q.; SU, X.; FU, J.; FENG, X.; PENG, J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Molecular Biology Reports*, v. 47, n.6, p. 4587-4629, 2020.

JINGXUAN, W.; QINGYUAN, Z.; SHI, J.; MEIYAN, F.; XINMEI, K.; SHU, Z.; SHULING, L.; WENHUI, Z. Immoderate inhibition of estrogen by anastrozole enhances the severity of experimental polyarthritis. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 6–7, p. 398–405, 2009.

JOURDAN, J. P.; BUREAU, R.; ROCHAIS, C.; DALLEMAGNE, P. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 2020.

KAPELLOS, T. S.; BONAGURO, L.; GEMÜND, I.; REUSCH, N.; SAGLAM, A.; HINKLEY, E. R.; SCHULTZE, J. L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–13, 2019.

KATO, Y.; TANAKA, Y.; MIYAGAWA, F.; YAMASHITA, S.; MINATO, N. Targeting of Tumor Cells for Human  $\gamma\delta$  T Cells by Nonpeptide Antigens. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 5092–5098, 2001.

KAUSHAL, H.; BRAS-GONÇALVES, R.; NEGI, N. S.; LEMESRE, J. L.; PAPIEROK, G.; SALOTRA, P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 8–14, 2014.

KAVANAGH, K. L.; GUO, K.; DUNFORD, J. E.; WU, X.; KNAPP, S.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J.; RUSSELL, R. G. G.; OPPERMAN, U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7829–7834, 2006.

KHADIR, F.; SHALER, C. R.; ORYAN, A.; RUDAK, P. T.; MAZZUCA, D. M.; TAHERI, T.; DIKEAKOS, J. D.; HAERYFAR, S. M. M.; RAFATI, S. Therapeutic control of leishmaniasis by inhibitors of the mammalian target of rapamycin. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1–19, 2018.

KIMA, P. E. PI3K signaling in *Leishmania* infections. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 19–22, 2016.

KLINKERT, M.; HEUSSLER, V. The Use of Anticancer Drugs in Antiparasitic Chemotherapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 131–143, 2006.

KOBAYASHI, S. D.; DE LEO, F. R.. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wire Systems Biology and Medicine**, v. 1, n.3, p. 309-333, 2009.

KOJIMA H, SAKURAI K, KIKUCHI K, KAWAHARA S, KIRINO Y, NAGOSHI H, HIRATA Y, NAGANO T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, p. 373-375, 1998.

KOS, M.; ŁUCZAK, K. Osteonecrosis of the Jaws Associated with Administration of Bisphosphonate. **Advances in Clinical and Experimental Medicine** v. 17, n. 5, p. 575–581, 2008.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 63–69, 2016.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

LABRO, M. T. Immunomodulatory effects of antimicrobial agents. Part II: Antiparasitic and antifungal agents. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 3, p. 341–357, 2012.

LAL, S.; BIMAL, S.; SINHA, A. N.; PRASAD, L. S.. Role of HLA-DR antigen on T-cell activation in visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 12, p. 1101-1103, 1991.

LATHA, T, S.; REDDY, M. C.; DURBAKA, P. V. R.; RACHAMALLU, A.; PALLU, R.; LOMADA, D..  $\gamma\delta$ T cell-mediated immune responses in disease and therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 571, 2014.

LI, Y. Y.; JONES, S. J.. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Medicine**, v. 4, n. 3, p. 27, 2012.

LI, Y.; WANG, W.; YANG, F.; XU, Y.; FENG, C.; ZHAO, Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2019.

LIM, M. J.; KWON, S. R.; PARK, S. G.; PARK, W. Acute effects of intravenous administration of pamidronate in patients with osteoporosis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 9, p. 1277–1283, 2010.

LISZTWAN, J.; PORNON, A.; CHEN, B.; CHEN, S.; EVANS, D. B. The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in in vitro models of estrogen-dependent breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2008.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, 2012.

LÓPEZ-POSADAS, R.; MASCARAQUE, C.; GONZÁLEZ, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. The Bisphosphonate Pamidronate is an Intestinal Antiinflammatory Agent in Rat and Mouse Experimental Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2549–2561, 2016.

MARTIN, M. B.; GRIMLEY, J. S.; LEWIS, J. C.; HEATH, H. T.; BAILEY, B. N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CALDERA, A.; LIRA, R.; URBINA, J. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.;



- CROFT, S. L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A potential route to chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 909–916, 2001.
- MCFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; ALLENBACH, C.; CARTER, K. C.; ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 532–541, 2008.
- MEIRA, C. dos S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ANDREOLI, W. K.; MORTARA, R. A.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 526–534, 2007.
- MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, 2008.
- MIGUEL, D. C.; ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: Efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 365–368, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Biblioteca virtual em saúde. **Leishmaniose visceral**. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/>>. Acesso em: 10 de novembro de 2020.
- MIYAGAWA, F.; TANAKA, Y.; YAMASHITA, S.; MINATO, N. Essential Requirement of Antigen Presentation by Monocyte Lineage Cells for the Activation of Primary Human  $\gamma\delta$  T Cells by Aminobisphosphonate Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5508–5514, 2001.
- MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; RAHAMAN, M.; ALI, N.; GOSWAMI, R. P. A curative immune profile one week after treatment of Indian Kala-azar patients predicts success with a Short-course liposomal amphotericin B therapy. **PlosS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1–8, 2010.
- MÖNKKÖNEN, J.; VAN ROOIJEN, N.; YLITALO, P. Effects of Clodronate and Pamidronate on Splenic and Hepatic Phagocytic Cells of Mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 284–286, 1991.
- MONTALVETTI, A.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; SEVERIN, G. W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates Are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33930–33937, 2001.
- MORTAZ, E.; ALIPOOR, S. D.; ADCOCK, I. M.; MUMBY, S.; KOENDERMAN, L. Update on neutrophil function in severe inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 1–14, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURRAY, H. W.. Treatment for visceral leishmaniasis in 2010: direction for Bihar state, India. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, 2010.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1–2, p. 151–159, 2005

NEVZATI, E.; SHAFIGHI, M.; BAKHTIAN, K. D.; TREIBER, H.; FANDINO, J.; FATHI, A. R. Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells. **Acta Neurochirurgica, Supplementum**, v. 120, p. 141–145, 2015.

NOGUEIRA, F. S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.

NÜHS, A.; DE RYCKER, M.; MANTHRI, S.; COMER, E.; SCHERER, C. A.; SCHREIBER, S. L.; IOSET, J. R.; GRAY, D. W. Development and Validation of a Novel *Leishmania donovani* Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–17, 2015.

NWAKA, S.; HUDSON, A.. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Review Drug Discovery**, v. 5, n.11, p. 941-55, 2006.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.

O'DONNELL, J. S.; MASSI, D.; TENG, M. W. L.; MANDALA, M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. **Seminars in Cancer Biology**, v. 48, p. 91–103, 2018.

ORTIZ-GÓMEZ, A.; JIMÉNEZ, C.; ESTÉVEZ, A. M.; CARRERO-LÉRIDA, J.; RUIZ-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 7, p. 1057–1064, 2006.

PAHO. **Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 15/11/2020.

PALIC, S. Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through immunomodulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. 1–15, 2019.

PALJOJÄRVI, A.; PETÄJÄ, J.; SIITONEN, S.; JANÉR, C.; ANDERSSON, S. Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. **Pediatric Research**, v. 73, n. 4, p. 469–475, 2013.

PANDEY, R. K.; MEHROTRA, S.; SHARMA, S.; GUDDE, R. S.; SUNDAR, S.; SHAHA, C. Leishmania donovani-induced increase in macrophage Bcl-2 favors parasite survival. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

PENNANEN N., LAPINJOKI S., URTTI A., MÖNKKÖNEN J. Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  secretion from RAW264 cells *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 916–922, 1995.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. D. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARI, T. C. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: Analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.

PETRI E SILVA, S. C. S.; PALACE-BERL, F.; TAVARES, L. C.; SOARES, S. R. C.; LINDOSO, J. A. L.. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 163, p. 68-75, 2016.

PHAN, T. N.; BAEK, K. H.; LEE, N.; BYUN, S. Y.; SHUM, D.; NO, J. H. In Vitro and in vivo activity of mtor kinase and pi3k inhibitors against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*. **Molecules**, v. 25, n. 8, 2020.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 958–968, 2015.

RAY, A.; FICEK, M. Immunomodulatory effects of anti-estrogenic drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 2, p. 141–155, 2012.

REINER N.E.; NG, W., McMASTER, W.R.. Parasite–accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **The Journal of Immunology**, v. 138, p. 1926–1932, 1987.

RIBEIRO, J. M.; BANDEIRA, C. C.; DE FARIA, B. G.; ALVES, M. L. R.; VIEIRA, F. O.; GIUNCHETTI, R. C.; UZONNA, J. E.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. An *ex vivo* multiparametric flow cytometry assay using human whole blood to simultaneously measure cytotoxicity and leishmanicidal activities. **Experimental Parasitology**, v. 216, 2020.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania infection*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

RODRIGUEZ, N.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A.; DOCAMPO, R.. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 138-140, 2002.

ROGERS, M. J.; CHILTON, K. M.; COXON, F. P.; LAWRY, J.; SMITH, M. O.; SURI, S.; RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in

vitro by a nitric oxide-independent mechanism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 10, p. 1482–1491, 1996.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, p. 1903-1401, 1903.

RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P. E. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 84–96, 2007.

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. **Pediatrics**, v. 119, 2007.

SABATINO, R.; ANTONELLI, A.; BATTISTELLI, S.; SCHWENDENER, R.; MAGNANI, M.; ROSSI, L. Macrophage depletion by free bisphosphonates and Zoledronate-loaded red blood cells. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2014.

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

SANDERS, J. M.; GÓMEZ, A. O.; MAO, J.; MEINTS, G. A.; VAN BRUSSEL, E. M.; BURZYNSKA, A.; KAFARSKI, P.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; OLDFIELD, E. 3-D QSAR Investigations of the Inhibition of *Leishmania major* Farnesyl Pyrophosphate Synthase by Bisphosphonates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 24, p. 5171–5183, 2003.

SANGSHETTI, J. N.; KHAN, F. A. K.; KULKARNI, A. A.; AROTE, R.; PATIL, R. H.. Antileishmanial drug discovery: a comprehensive review of last 10 years. **RSC Advances**, v.41, 2015.

SANTI, A. M. M.; LANZA, J. S.; TUNES, L. G.; FIUZA, J. A.; ROY, G.; ORFANO, A. S.; CARVALHO, A. T.; FREZARD, F.; BARROS, A. L. B.; MURTA, S. M. F.; MONTE-NETO, R. L.. Growth arrested live-attenuated *Leishmania infantum* KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. **Scientific Reports**, v.8, 2018.

SANTOS, J. C. B.; SANTOS, J. C. B.; DE MELO, J. A.; DE MELO, J. A.; MAHESHWARI, S.; DE MEDEIROS, W. M. T. Q.; DE MEDEIROS, W. M. T. Q.; OLIVEIRA, J. W. D. F.; OLIVEIRA, J. W. D. F.; MORENO, C. J.; MORENO, C. J.; MORENO, C. J.; AMZEL, L. M.; GABELLI, S. B.; GABELLI, S. B.; SILVA, M. S.; SILVA, M. S.; SILVA, M. S.; SILVA, M. S. Bisphosphonate-based molecules as potential new antiparasitic drugs. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1–20, 2020.

SHADAB, M.; ALI, N. Evasion of Host Defence by *Leishmania donovani*: Subversion of Signaling Pathways . **Molecular Biology International**, p. 1–10, 2011.

SHAKYA, N.; BAJPAI, P.; GUPTA, S. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: A distinct approach towards unsatisfied treatment needs. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 2, p. 104–112, 2011.

SHARMA, S.; DAVIS, R. E.; SRIVASTVA, S.; NYLÉN, S.; SUNDAR, S.; WILSON, M. E. A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1531–1538, 2016.

SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; WAH, C. B.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase - A brief overview. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 93–127, 2002.

SINGH, R. K.; SRISVATAVA, A.; SINGH, N.. Toll-like receptors signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 445-451, 2012.

SINGH, N.; KUMAR, R.; CHAUHAN, S. B.; NYLÉN, S.; SACKS, D.; ENGWERDA, C.; SUNDAR, S. Investigating changes in monocyte phenotypes and functions in active visceral leishmaniasis patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 380–381, 2016.

SINGH, N.; KUMAR, R.; CHAUHAN, S. B.; ENGWERDA, C.; SUNDAR, S. Peripheral blood monocytes with an antiinflammatory phenotype display limited phagocytosis and oxidative burst in patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 7, p. 1130–1141, 2018.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; SONG, O. R.; OH, H.; SOHN, J. H.; YANG, G.; NAM, J.; JANG, J.; CECHETTO, J.; LEE, C. B.; MOON, S.; GENOVESIO, A.; CHATELAIN, E.; CHRISTOPHE, T.; FREITAS-JUNIOR, L. H. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. 1–8, 2010.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; MOON, S.; JANG, J.; YANG, G.; LEE, C.; MOON, H. K.; CHATELAIN, E.; GENOVESIO, A.; CECHETTO, J.; FREITAS-JUNIOR, L. H. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

SOUZA, M. A.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P.; ALMEIDA, A. F.; REIS, L. C.; SILVA, C. J.; BRITO, M. E. F.; PEREIRA, V. R. A. American tegumentary leishmaniasis: Cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 76, n. 2, p. 175–180, 2012.

SUNTER, J. D.; YANASE, R.; WANG, Z.; CATTAPRETA, C. M. C.; MOREIRA-LEITE, F.; MYSKOVA, J.; PRUZINOVA, K.; VOLF, P.; MOTTRAM, J. C.; GULL, K. *Leishmania* flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sand fly, and pathogenicity in the host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 13, p. 6351–6360, 2019.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A.; SHANKAR, P.; SINGH, S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.

THIANTANAWAT, A.; LONG, B. J.; BRODIE, A. M. Signaling Pathways of Apoptosis Activated by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens. **Cancer Research**, v. 63, n. 22, p. 8037–8050, 2003.

THIÉBAUD, D.; SAUTY, A.; BURCKHARDT, P.; LEUENBERGER, P.; SITZLER, L.; GREEN, J. R.; KANDRA, A.; ZIESCHANG, J.; IBARRA DE PALACIOS, P. An *in vitro* and *in vivo* study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. **Calcified Tissue International**, v. 61, n. 5, p. 386–392, 1997.

TITUS, R. G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, v. 7, p. 545–555, 1985.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. G. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; COELHO, A. C.; ULIANA, S. R. B. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1314–

1322, 2016.

TRINCONI, C. T.; MIGUEL, D. C.; SILBER, A. M.; BROWN, C.; MINA, J. G. M.; DENNY, P. W.; HEISE, N.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen inhibits the biosynthesis of inositolphosphorylceramide in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 475–487, 2018.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; BONANO, V. I.; ESPADA, C. R.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 490–496, 2018.

TSUBAKI, M.; TAKEDA, T.; SAKAMOTO, K.; SHIMAOKA, H.; FUJITA, A.; ITOH, T.; IMANO, M.; MASHIMO, K.; FUJIWARA, D.; SAKAGUCHI, K.; SATOU, T.; NISHIDA, S. Bisphosphonates and statins inhibit expression and secretion of MIP-1 $\alpha$  via suppression of Ras/MEK/ERK/AML-1A and Ras/PI3K/Akt/AML-1A pathways. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 1, p. 168–79, 2015.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; BACHA, H. A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M. I.; NETO, V. A.. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 866-872, 2008.

URBINA, J. A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33609–33615, 1999.

VERMEERSCH, M.; DA LUZ, R. I.; TOTÉ, K.; TIMMERMANS, J. P.; COS, P.; MAES, L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, 2009.

VIANA, A. G.; MAGALHÃES, L. M. D.; GIUNCHETTI, R. C.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Infection of human monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–12, 2018.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 11/10/2020.

WILHELM, M.; KUNZMANN, V.; ECKSTEIN, S.; REIMER, P.; WEISSINGER, F.; RUEDIGER, T.; TONY, H. P.  $\gamma\delta$  T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 200–206, 2003.

WU, Z.; ZHANG, Z.; LEI, Z.; LEI, P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 48, p. 24–31, 2019.

XIA, Y.; KRUKOFF, T. L. Estrogen induces nitric oxide production via activation of constitutive nitric oxide synthases in human neuroblastoma cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4550–4557, 2004.

XUE, H.; LI, J.; XIE, H.; WANG, Y. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.

YARDLEY, V.; KHAN, A. A.; MARTIN, M. B.; SLIFER, T. R.; ARAUJO, F. G.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S. L.; OLDFIELD, E. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate

synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 929–931, 2002.

YIZENGAW, E.; GETAHUN, M.; TAJEBE, F.; CERVERA, E. C.; ADEM, E.; MESFIN, G.; HAILU, A.; VAN DER AUWERA, G.; YARDLEY, V.; LEMMA, M.; SKHEDY, Z.; DIRO, E.; YESHANEW, A.; MELKAMU, R.; MENGESHA, B.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; MÜLLER, I.; TAKELE, Y.; KROPF, P. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–12, 2016.

ZARKAVELIS, G.; KOLLAS, A.; KAMPLETSAS, E.; VASILIOU, V.; KALTSOLOUDIS, E.; DROSOS, A.; KHALED, H.; PAVLIDIS, N. Aromatase inhibitors induced autoimmune disorders in patients with breast cancer: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 5, p. 719–726, 2016.

ZAULI, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; MOURA, A. S.; PEREIRA, L. I. A.; DA SILVA, I. A.; LEMES, L. G. N.; DORTA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. A. P.; PITALUGA, A. N.; ISHIKAWA, E. A. Y.; RODRIGUES, J. C. F.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; BIJOVSKY, A.; RIBEIRO-DIAS, F.; ULIANA, S. R. B. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.

ZHANG, N.; SAMIKSHA, P.; DESPOINTES, C. H.; YOUNG, J.; KIMA, P. E.. *Leishmania* parasitophorous vacuole membranes display phosphoinositides that create conditions for continuous Akt activation and a target for miltefosine in *Leishmania* infectious. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 11, 2018.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

## ANEXOS

### Depósito de patente



#### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 005327 2

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

#### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA LEISHMANICIDA

Utilidade (54): COMPREENDENDO LETROZOL E USO

Resumo: A presente tecnologia trata do uso de letrozol para a preparação de um medicamento para tratamento de leishmaniose visceral. O fármaco apresenta efeito leishmanicida contra as formas promastigotas de Leishmania infantum.

Figura a publicar: 2



## Produção científica durante o doutorado – tema da tese

Experimental Parasitology 216 (2020) 107940



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



### An *ex vivo* multiparametric flow cytometry assay using human whole blood to simultaneously measure cytotoxicity and leishmanicidal activities



Juliana M. Ribeiro<sup>a</sup>, Cristiano C. Bandeira<sup>a</sup>, Bruno G. de Faria<sup>a</sup>, Marina L.R. Alves<sup>b</sup>,  
Francisco O. Vieira<sup>a</sup>, Rodolfo C. Giunchetti<sup>c</sup>, Jude E. Uzonna<sup>d</sup>, Andréa Teixeira-Carvalho<sup>b</sup>,  
Vanessa Peruhype-Magalhães<sup>b</sup>, Elaine M. Souza-Fagundes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Department of Immunology, College of Medicine, University of Manitoba, R3T 0T5, Winnipeg, Manitoba, Canada

## Produção científica durante o doutorado – outros assuntos

Journal of Hazardous Materials 360 (2018) 445–451



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



### Ciprofloxacin degradation by first-, second-, and third-generation manganese porphyrins



Ana Luísa Almeida Lage<sup>a</sup>, Alexandre Moreira Meireles<sup>a</sup>, Aline Capelão Marciano<sup>a</sup>,  
Juliana Martins Ribeiro<sup>b</sup>, Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>b</sup>, Dayse Carvalho da Silva Martins<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

Environmental Research 177 (2019) 108615



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)



### Synthetic Mn(III) porphyrins as biomimetic catalysts of CYP450: Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous medium



Alexandre Moreira Meireles<sup>a</sup>, Ana Luísa Almeida Lage<sup>a</sup>, Juliana Martins Ribeiro<sup>b</sup>,  
Mirra Angelina Neres da Silva<sup>a</sup>, Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>b</sup>,  
Dayse Carvalho da Silva Martins<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química (DQ), Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

Journal of Hazardous Materials 378 (2019) 120748



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



### Efficient atrazine degradation catalyzed by manganese porphyrins: Determination of atrazine degradation products and their toxicity evaluation by human blood cells test models



Ana Luísa Almeida Lage<sup>a</sup>, Juliana Martins Ribeiro<sup>b</sup>, Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>b</sup>,  
Michelle Fernanda Brugnera<sup>c</sup>, Dayse Carvalho da Silva Martins<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900, Cuiabá, MT, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)



### Evaluation of cobalt(III) complexes as potential hypoxia-responsive carriers of esculetin



Marcos V. Palmeira-Mello<sup>a,b</sup>, Ana B. Caballero<sup>b,d</sup>, Juliana Martins Ribeiro<sup>c</sup>, Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>c</sup>, Patrick Gamez<sup>b,d,e</sup>, Mauricio Lanznaster<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Outão S. João Batista S/N, 24020-141 Niterói, RJ, Brazil

<sup>b</sup> nanoBC, Departament de Química Inorgànica i Orgànica, Secció Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 30123-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Passatge Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain



ACS  
AUTHORCHOICE

<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

### Triethylphosphinegold(I) Complexes with Secnidazole-Derived Thiosemicarbazones: Cytotoxic Activity against HCT-116 Colorectal Cancer Cells under Hypoxia Conditions

Ana P. A. Oliveira, Jennifer T. J. Freitas, Renata Diniz, Claudia Pessoa, Sarah S. Maranhão, Juliana M. Ribeiro, Elaine M. Souza-Fagundes, and Heloisa Beraldo\*

Toxicology in Vitro 65 (2020) 104772



Contents lists available at ScienceDirect

## Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)



### Lapachol acetylglycosylation enhances its cytotoxic and pro-apoptotic activities in HL60 cells



Lucas Bonfim Marques<sup>a</sup>, Flaviano Melo Ottoni<sup>b</sup>, Mauro Cunha Xavier Pinto<sup>c</sup>, Juliana Martins Ribeiro<sup>a</sup>, Fernanda S. de Sousa<sup>a</sup>, Ricardo Weinlich<sup>d</sup>, Nathalia Cruz de Victo<sup>d</sup>, Jaffar Kisitu<sup>e</sup>, Anna-Katharina Holzer<sup>e</sup>, Marcel Leist<sup>e</sup>, Ricardo José Alves<sup>b</sup>, Elaine Maria Souza-Fagundes<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>d</sup> Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup> In Vitro Toxicology and Biomedicine, Inaugurated by the Doerenkamp-Zbinden Foundation, University of Konstanz, Konstanz, Germany