



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020026054-5 A2



(22) Data do Depósito: 18/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

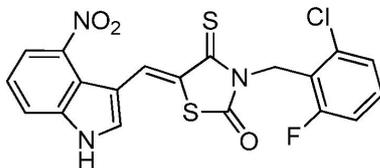
(54) **Título:** LQIT/GQS-90 COMO PROTÓTIPO APLICADO AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES CUTÂNEA E VISCERAL

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/4439; A61P 33/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA; CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE MELO; IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO; ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA; LUIZ CARLOS ALVES; FÁBIO ANDRÉ BRAYNER DOS SANTOS; LAIS LUDMILA DE ALBUQUERQUE.

(57) **Resumo:** LQIT/GQS-90 COMO PROTÓTIPO APLICADO AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES CUTÂNEA E VISCERAL. A presente invenção se refere a molécula ativa sobre as Leishmanioses Cutânea e Visceral. Mas especificamente, a molécula da presente invenção referem-se ao composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1H-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90) úteis no tratamento das Leishmanioses Cutânea e Visceral. Os resultados sugerem uma resposta leishmanicida do composto testado, onde o LQIT/GQS-90 possui como substituinte o grupamento nitro (NO₂), o que conferiu a essa molécula um efetivo potencial antiparasitário, obtendo-se IC₅₀ de 0,42 ± 0,15 µM. O composto LQIT/GQS-90 foi eficaz na diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos e no índice de sobrevivência destas formas no interior da célula, obtendo-se um IC₅₀ de 0,64 ± 0,09 µM. O índice de seletividade foi de 13,31. Comparando o grupo tratado e não tratado, o número médio de parasitos por macrófagos, diminuiu no tratamento com o composto LQIT/GQS-90 de forma significativa nas concentrações de 0,42 e 0,84 µM. O LQIT/GQS90 além de induzir a morte do parasito em baixos níveis de concentração, também foi capaz de promover uma discreta diminuição nos níveis de IL-6, TNF-α e óxido nítrico nos esplenócitos tratados, o que corrobora com um (...).



LQIT/GQS-90 COMO PROTÓTIPO APLICADO AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES CUTÂNEA E VISCERAL

1. A presente invenção se refere à molécula ativa sobre as leishmanioses cutânea e visceral. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se ao composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90), úteis no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral.

2. Leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos pela picada de insetos flebotomíneos infectados. Clinicamente, a doença pode se apresentar de quatro formas: leishmaniose visceral (LV, também conhecida como calazar), leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (OMS, 2017).

3. Apesar da leishmaniose cutânea ser a de maior ocorrência, a leishmaniose visceral é mais perigosa, apresentando caráter crônico, grave e com altas taxas de letalidade nos casos em que o diagnóstico e/ou tratamento não são realizados de forma adequada (Aguiar; Rodrigues, 2017). A situação é ainda mais crítica para a população de risco, a qual inclui crianças em idade pré-escolar, indivíduos imunocomprometidos e em casos de pacientes em situação de desnutrição (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

4. A LV é um problema crescente de saúde pública, dado o aumento no número de casos originados a partir da mudança no padrão epidemiológico, pelo aparecimento de novos focos e ao processo de expansão e urbanização do ciclo de transmissão (Werneck, 2016). Essa enfermidade afeta predominantemente as pessoas de baixa renda, sobretudo em países em desenvolvimento, fato que demanda um esforço coletivo e um compromisso compartilhado entre os governos, as

organizações, instituições e a sociedade, para seu controle (OMS, 2017). É uma parasitose em estado de expansão, com um total de 97 países em situação de endemia, o que evidencia a necessidade de estudos e acompanhamento médico, em especial nessas áreas onde existem elementos para a manutenção do ciclo da doença (Ruiz-Postigo; Grout; Jain, 2020).

5. Nos últimos anos, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS provieram de sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 1 bilhão de pessoas corram risco de infecção, vivendo em áreas endêmicas para a leishmaniose, e que ocorram 30.000 novos casos de LV a cada ano (OMS, 2020). Tal fato conduziu ao estudo do composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90) quanto ao seu potencial leishmanicida.

6. O composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90), desenvolvido e preparado conforme a presente invenção, possui o núcleo 4-tioxotiazolidina-2-ona substituída na posição 3 deste anel heterocíclico, por um radical benzílico apresentando dois substituintes, X e Y, em posição *orto* do anel fenílico, podendo ser F, Cl, Br e/ou I. E, na posição 5, um grupamento indólico, podendo ser substituído pelo grupo nitro na posição 5 do anel indol, como mostrado na Figura 1. Podendo ser seus sais, complexos de inclusão e/ou formas farmacêuticas (sólidas, semi-sólidas, soluções, emulsões, suspensões e/ou injetáveis) administrados por qualquer via de administração, incluindo: via oral, intravenosa, intra-arterial, intracraniano, intratorácica, intraperitoneal, parenteral, ocular, retal, cutânea, sub-cutânea, intradérmica, dérmica, inalatória ou intramuscular, de uso em humanos e animais.

7. No procedimento experimental, o novo composto foi preparado em quatro etapas. Inicialmente, foi obtido o núcleo tiazolidínico-2,4-diona de acordo com a metodologia descrita por Miranada *et al.*, 2004. Utilizando quantidades equimolares de ácido monocloroacético (CAS 79-11-8 - Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec ou Fluka) e a tiouréia (CAS 62-56-6 - Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec ou Fluka), em meio aquoso, seguida de reação de ciclização, que conduz à tiazolidina-2,4-diona (CAS 2295-31-0 - Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec ou Fluka). Em uma segunda etapa, foram adicionados 1mol de tiazolidina-2,4-diona e 1mol de NaOH, KOH, piperidina, morfolina, dissolvidos em etanol, metanol, dimelformamida e água. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de refluxo e acompanhada por cromatografia em camada delgada. Na terceira etapa, realizou-se a reação de substituição do átomo de oxigênio pelo átomo de enxofre na posição 4 do anel tiazolidínico, na presença do reagente de Lawesson (CAS 19172-47-5 - Sigma-Aldrich) e tolueno, dioxano, aquecidos à temperatura de refluxo. Na quarta etapa, quantidades equimolares do intermediário 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona e do 5-nitro-1*H*-indole-3-carbaldeído (CAS 6625-96-3 - Sigma-Aldrich) na presença de um catalisador ácido (ácido acético e/ou ácido clorídrico). A mistura reacional foi aquecida a refluxo, conduzindo ao composto LQIT/GQS-90.

8. Foram realizadas etapas de síntese, purificação, caracterização físico-química e elucidação estrutural do composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90), acompanhado por ensaios *in vitro* visando avaliação de seus potenciais no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral.

9. Composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90) obtido na forma sólida e de cor alaranjada (100mg, 67,97%): C₁₉H₁₁ClFN₃O₃S₂. Massa molar: 446,9914g/mol. P.F.: 208-209° C. Rf: 0,47 (sistema de eluição *n*-

hexano/AcOEt 7:3). RMN ^1H (400MHz) δ : 4.97 (s, 2H, CH_2), 7.18 (d, 1H, J = 8Hz, benzil), 7.41 (d, 1H, J = 8Hz, indol), 7.42 (t, 1H, J = 8Hz, benzil), 7.46 (d, 1H, J = 8Hz, indol), 7.96 (d, 1H, J = 8Hz, benzil), 8.09 (1H, indol), 8.26 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 8.79 (s, 1H, indol), 12.92 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHz) δ : 110.53, 118.06, 119.09, 119.43, 120.37, 120.77, 122.57, 125.73, 128.53, 130.21, 130.61, 133.18, 134.22, 139.13, 142.44, 160.17, 164.75, 170.07. IV (KBr) cm^{-1} : 3284.5 (NH), 1713.6 (C=O), 1680.9 (C=C), 1510.4 (C=S).

10. As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983), utilizando macrófagos da linhagem J774. Para tal, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol, suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich) e 1% de antibiótico, e incubadas em uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 72 horas. Após este período, foi adicionado 10 μL de MTT (5mg/mL) e incubado por 3h em estufa de 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em dimetilfulsóxido (DMSO - Sigma-Aldrich CAS 67-68-5) e sua absorbância foi determinada por espectrofotometria a 540nm. Poços contendo meio RPMI (Sigma-Aldrich) e MTT (Sigma-Aldrich) foram utilizados como controle da reação. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

11. Portanto, inicialmente foi analisado o efeito citotóxico do composto LQIT/GQS-90 sobre macrófagos da linhagem J774, através do método do MTT. O composto LQIT/GQS-90 mostrou-se o mais tóxico com CC_{50} de $8,52 \pm 1,36 \mu\text{M}$, quando comparado ao padrão, a anfotericina B, com CC_{50} de $13,41 \pm 3,97 \mu\text{M}$. Na Figura 2, descrevemos o índice de sobrevivência de formas amastigotas de *L. infantum* em macrófagos, após tratamento com LQIT/GQS-90.

12. Em conjunto ao teste de citotoxicidade, foi realizada a dosagem do sobrenadante das células, utilizando o reagente de Griess, com o objetivo de avaliar se o composto LQIT/GQS-90 testado foi capaz de induzir um aumento na produção de óxido nítrico (NO) (Figura 3). O óxido nítrico apresenta um importante papel na resposta imune contra o parasito, uma vez que é um dos principais mecanismos responsáveis pela eliminação da forma amastigota (intracelular) destes parasitos. Em culturas de células, o NO liberado pelas células é rapidamente convertido em derivados de nitrogênio, dentre estes, o nitrito é o mais estável e pode ser mensurado (Pinho *et al.*, 2011).

13. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa BH-466) foram mantidas a 26 °C em meio de Schneider (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de antibiótico, com repiques a cada três dias. Parasitos na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

14. As formas cultivadas de promastigotas de *Leishmania infantum* foram contadas e diluídas em meio de Schneider (Sigma-Aldrich), suplementado a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas, na presença de diferentes concentrações (100 µg/mL a 0,5 µg/mL) dos compostos, por 72 horas. Células incubadas apenas com meio de Schneider foram utilizadas como controle negativo, a anfotericina B foi utilizada como controle positivo. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. O parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento foi a IC₅₀, a qual corresponde à concentração do composto capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos. A IC₅₀ foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear. Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes, em triplicata.

15. O composto LQIT/GQS-90 possui como substituinte o grupamento nitro (NO₂), o que conferiu a essa molécula um efetivo

potencial antiparasitário, obtendo-se IC_{50} de $0,42 \pm 0,15 \mu M$. Na Figura 4, descrevemos a inibição causada pelo LQIT/GQS-90 no crescimento de promastigotas de *L. infantum*, no decorrer das 72 horas de tratamento.

16. Em resultados relatados na literatura (Moreira, 2015), observou-se que as concentrações de 2, 1 e $0,5 \mu M$, ao final do experimento, exibiram percentuais de inibição muito semelhantes, sugerindo que um platô de concentração farmacológico tenha sido atingido.

17. A adição do substituinte nitro (NO_2) do núcleo indólico a essa molécula contribuiu de forma positiva para a ação leishmanicida. Alguns trabalhos relatam uma maior eficiência antiparasitária em moléculas que possuam o grupamento NO_2 (Narváez, 1983; Tenório, 2005).

18. Para a avaliação *in vitro* sobre as formas amastigotas intracelulares, foram utilizados macrófagos J774 em placas de cultivo de 24 poços, a uma concentração de 3×10^5 células/mL, contendo uma lamínula de vidro, e mantidas a $37^\circ C$, numa atmosfera de 5% de CO_2 . Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e infectadas, por três horas, com formas promastigotas, na proporção de 10:1 (promastigotas/macrófago). Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e incubados em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações do composto LQIT/GQS-90. Após 24 horas de tratamento, as lamínulas foram retiradas e foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 horas de cultivo por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A IC_{50} (concentração que inibe em 50% a

infecção dos macrófagos) foi determinada através da contagem direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares em microscópio óptico convencional. O índice de sobrevivência (IS) foi obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas pelo número de amastigotas/macrófago.

19. Os resultados (Tabela 1) demonstram que o derivado LQIT/GQS-90 foi eficaz na diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos e no índice de sobrevivência (Figura 5) destas formas, no interior da célula, obtendo-se um IC_{50} de $0,64 \pm 0,09 \mu M$. O índice de seletividade foi de 13,31. Comparando o grupo tratado e não tratado, o número médio de parasitos por macrófagos diminuiu no tratamento com o composto LQIT/GQS-90, de forma significativa, nas concentrações de $0,42$ e $0,84 \mu M$.

Tabela 1 - Ação citotóxica, leishmanicida e índice de seletividade para forma amastigota de *L. infantum* tratada com LQIT/GQS-90

Composto	Macrófago J774 - CC_{50} (μM)	Amastigota Intracelular - IC_{50} (μM)	IS
LQIT/GQS-90	$8,52 \pm 1,36$	$0,64 \pm 0,09$	13,31

Legenda: IC_{50} - concentração que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas de *L. infantum*; CC_{50} - concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos macrófagos; IS (índice de seletividade) - CC_{50} macrófagos/ IC_{50} amastigotas.

20. O valor de IC_{50} e o índice de seletividade obtido para a forma amastigota foi menos efetivo que para as formas promastigotas, demonstrando, assim, uma maior eficácia do composto LQIT/GQS-90 para esta última. Uma maior efetividade de inibição das formas promastigotas em relação às amastigotas também foi observada nos estudos de Shokri *et al.* (2017) e Khalili *et al.* (2019).

21. É importante levar em conta que a ação sobre a forma amastigota é dificultada pela necessidade de permeação do composto através da membrana do macrófago, antes de chegar ao parasito no interior da célula, podendo, assim, haver perda de efetividade do composto para essa forma evolutiva (Maciel-Rezende *et al.*, 2013). Na Figura 6, é possível observar a inibição da forma amastigota nas três concentrações testadas: 0,21 μ M (C), 0,42 μ M (D) e 0,84 μ M (E).

22. Os estudos imunológicos com camundongos Balb/c esplenócitos, os ensaios imunológicos com monócitos e células linfócitos do baço de camundongos BALB/c fêmeas (6-8 semanas de idade; 5 animais) foram realizados para confirmar os resultados obtidos com a linhagem J774. Os animais foram criados e mantidos nas instalações do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições padrão de laboratório (20-22 °C e 12h, dia e noite), com acesso livre à dieta padrão (Labina/Purina, Campinas, Brasil) e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo: 0048/2016). Após a inoculação de 1mg de anestésico e eutanásia dos animais por deslocamento da vértebra, o baço de cada rato foi removido assepticamente e colocado num tubo falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal de vitelo (meio completo). Em um fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri onde eles estavam encharcados. As suspensões celulares obtidas de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10mL de meio incompleto. Os homogenatos de baço foram sobrepostos em camada Ficoll-Paque Plus, com a densidade ajustada a 1,076g/mL e centrifugados a 1000xg, temperatura ambiente durante 25min. A camada celular de interface contendo células imunológicas foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em

solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X), e centrifugada duas vezes a 500xg, durante 10min. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram usadas apenas quando a viabilidade era > 98%. As células foram cultivadas em placas (24 poços) com o composto LQIT/GQS-90 a 11 μ M, durante 24 e 48 horas.

23. O sobrenadante por cultura de esplenócitos estimulados com o composto LQIT/GQS-90 foi utilizado para medir as citocinas e a produção de NO pelas células imunológicas. As culturas foram tratadas com 11 μ M do composto LQIT/GQS-90 e, após 24 e 48 horas, os sobrenadantes foram recolhidos para realizar os ensaios. A avaliação de citocinas foi realizada utilizando kit de citocinas Th1/Th2 de camundongos II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) para detecção simultânea de sete citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ , em amostras de sobrenadantes de cultura. Todos os dados foram adquiridos pelo citômetro FACSCalibur. A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia *Cytometric Bead Array* (CBA). A análise do óxido de nitrito foi realizada através do método Griess colorimétrico (Ding *et al.*, 1988). A concentração de NO foi estimada pela curva padrão (3,12 a 100 μ mol/mL). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-EUA), em 595nm.

24. A resposta imunológica tipo Th1, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias, promovem a proteção imunológica contra a leishmaniose cutânea (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Rossi & Fasel, 2017). Entretanto, a produção excessiva dessas citocinas pode induzir estágios teciduais de hiperinflamação e promover uma imunopatologia severa da doença (Pasparakis *et al.*, 2014; Maspi *et al.*, 2016). A molécula LQIT/GQS90, além de induzir a morte do parasito em baixos níveis de concentração, também foi capaz de promover uma discreta

diminuição nos níveis de IL-6, TNF- α e óxido nítrico, nos esplenócitos tratados, o que corrobora com um favorecimento ao status anti-inflamatório *in vitro*.

25. Embora a interleucina TNF- α seja extremamente importante para a maturação dos granulomas que se formam no fígado, também é responsável pelas sequelas histopatológicas da infecção crônica da doença no baço (Stanley e Engwerda, 2007). Além disso, na leishmaniose cutânea, a produção em baixos níveis de citocinas do tipo Th2, ou ainda, a diminuição da resposta inflamatória tipo Th1, podem acelerar o processo de reparo das lesões cutâneas (Pasparakis *et al.*, 2014; Maspi *et al.*, 2016). Isso ocorre especialmente para lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*, cujos níveis de IFN- γ e TNF- α estão tão elevados no sítio inflamatório que as lesões se apresentam mais ulcerativas e de difícil reparo (Antonelli *et al.*, 2005; Maspi *et al.*, 2016). Quanto à IL-6, seu papel continua bem controverso devido a sua função pleiotrópica, Maspi *et al.* (2016) afirma, em seu estudo de revisão, que essa interleucina pode promover suscetibilidade do hospedeiro na leishmaniose cutânea, ou ainda, não apresentar qualquer tipo de diferença (para agravamento da lesão ou cura parasitológica).

26. Análise ultraestrutural de formas promastigotas de *L. infantum*, controles e tratadas nas concentrações de 0,42 μ M e 0,84 μ M do composto LQIT/GQS-90, foram lavadas em tampão fosfato-salina e fixadas *overnight*, em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), e processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Para MEV, promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após 20 minutos, as lamínulas foram lavadas no mesmo tampão para retirada das células não aderidas, e pós-fixadas por uma hora, em uma solução contendo 1% de tetróxido de

ósmio (OsO_4), em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol (Vetec - CAS 64-17-5) e submetidas à secagem, através do ponto crítico, no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), 42 cobertas com 20nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tóquio, Japão), e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tóquio, Japão).

27. Para MET, os parasitos fixados foram lavados e pós-fixados por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8% ferrocianeto de potássio, 5mM CaCl_2 em tampão cacodilato de sódio. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (Vetec - CAS 67-64-1), infiltradas e incluídas em EPON (Sigma-Aldrich, CAS 25134-21-8, St. Louis, EUA). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70nm de espessura, obtidos em ultramicrótomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha), foram contrastados em acetato de uranila (Hexis Científica - CAS 6159-44-0) e citrato de chumbo (Merck - CAS 512-26-5), e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, EUA).

28. A análise MEV mostrou as formas promastigotas não tratadas para exibir uma morfologia de corpo fusiforme com superfície topologicamente normal e comprimento flagelo preservado (Figuras 7A-B). As formas promastigotas tratadas com $0,42\mu\text{M}$ ($1 \times \text{IC}_{50}$) do composto LQIT/GQS-90 mostraram encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular (Figuras 7C-D-E). As formas promastigotas tratadas com $0,84\mu\text{M}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$) mostraram alterações nas células, como forma arredondada, inchaço e flagelos atrofiados. Alterações na topologia, com a presença de ondulações na membrana celular, também foram encontrados (Figura 7F).

29. O MET mostrou que, no grupo não tratado, a morfologia dos núcleos e organelas das formas promastigotas de *L. infantum* foram bem preservados (Figuras 8A-B). Os grupos expostos ao composto

LQIT/GQS-90 exibiram alterações ultraestruturais, não encontradas nas formas promastigotas-não tratadas. Tratamento com $0,42\mu\text{M}$ ($1\times\text{IC}_{50}$) do composto LQIT/GQS-90 levou à presença de um grande número de inclusões densas em elétrons no citoplasma, além de vários espaços eletróluscentes (Figuras 8C-D). As formas promastigotas tratadas com $0,84\mu\text{M}$ ($2\times\text{IC}_{50}$) do composto LQIT/GQS-90 mostraram rarefação celular, inchaço mitocondrial e alterações no núcleo (Figuras 8E-F).

30. Após a análise dos resultados do MEV e MET, verificamos que a função de movimentação do parasito, o flagelo e, especialmente, a bolsa flagelar, estão envolvidos em outras atividades, uma vez que há evidências morfológicas e citoquímicas de que essa é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (Souza, 2002). A membrana plasmática desempenha função de adesão do parasito às células do intestino do inseto vetor, e permite sua sobrevivência e diferenciação, além de estar envolvida no processo de interação entre o parasito e o hospedeiro (Souza, 2008; Souza, Carvalho & Barrias, 2010). Dessa maneira, é possível ressaltar a importância dessas estruturas para a viabilidade celular. No composto LQIT/GQS-90, conduziu a modificações estruturais irreversíveis, que conduziram à morte do parasito (Paula, Serrano & Tavares, 2009; Micheletti & Beatriz, 2012; Brita *et al.*, 2014; Petri & Silva, 2016).

31. Na Figura 1, estrutura química do composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90).

32. Na Figura 2, índice de sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos após tratamento com LQIT/GQS-90.

33. Na Figura 3, resultado da dosagem de NO de macrófagos tratados com o composto LQIT/GQS-90. Legenda: Os valores apresentam a média dos experimentos realizados em duplicata biológica e quadruplicata técnica \pm desvio padrão. * Corresponde a valores

significativos ($p < 0,05$). Perfil da produção de citocinas em esplenócitos tratados com o composto LQIT/GQS-90 em 24 horas de incubação. Vertical com barras representa amostras de controle (células + meio de cultura) e barras verticais pretas representam células tratadas com diferentes compostos. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

34. Na Figura 4, inibição causada pelo LQIT/GQS-90 no crescimento de promastigotas de *L. infantum*, no decorrer das 72 horas de tratamento. O derivado LQIT/GQS-90 apresenta, desde as primeiras 24h de tratamento, uma ação leishmanicida expressiva, uma vez que, já nesse tempo, quatro das cinco concentrações testadas apresentam mais de 50% de inibição. A inibição da concentração de $0,125\mu\text{g/mL}$, a menor para essa análise, obteve um resultado que pouco variou durante as 72h de experimento, mantendo o crescimento das leishmanias de forma estática.

35. Na Figura 5, macrófagos J774 infectados com *L. infantum* não tratados e tratados com o LQIT/GQS-90. Legenda: Imagens de microscopia óptica das lâminas com macrófagos J774 infectados por amastigotas intracelulares de *L. infantum*, por 24h. (A) Células não tratadas. (B) Macrófago infectado não tratado em destaque. (C) Células tratadas com $0,21\mu\text{M}$ do GQS-90 ($0,5\times\text{IC}_{50}$). (D) Células tratadas com $0,42\mu\text{M}$ do GQS-90 ($1\times\text{IC}_{50}$). (E) Células tratadas com $0,84\mu\text{M}$ do GQS-90 ($2\times\text{IC}_{50}$).

36. Na Figura 6, resposta imunomoduladora do composto LQIT/GQS-90. Determinado 24 h após tratamento pelo método de Griess. C-: não-estimuladas. C+: estimuladas e não-tratadas. (ANOVA *one-way*): $***P < 0.001$. $**P < 0.01$; $*P < 0.05$ em comparação com o C+.

37. Na Figura 7, eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com o derivado LQIT/GQS-90. Legenda: (A e B) Promastigotas controle (não tratadas). (C e D)

Promastigotas tratadas com $0,42\mu\text{M}$ ($1\times\text{IC}_{50}$) do composto GQS-90, mostrando encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular. (E e F) Promastigotas tratadas com $0,84\mu\text{M}$ ($2\times\text{IC}_{50}$) do composto LQIT/GQS-90, mostrando encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular.

38. Na Figura 8, eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com o derivado LQIT/GQS-90. Legenda: (A e B) Promastigotas não tratadas com forma fusiforme, estrutura normal do núcleo (n), bolsa flagelar (bf) e cinetoplasto (k). (C e D) Promastigotas tratadas com $0,42\mu\text{M}$ ($1\times\text{IC}_{50}$) do composto GQS-90, apresentando vários espaços eletróluscentes (*) e presença de corpos eletrondensos (seta). (E e F) Promastigotas tratadas com $0,84\mu\text{M}$ ($2\times\text{IC}_{50}$) do composto GQS-90, mostrando rarefação celular, inchaço mitocondrial (m) e alterações no núcleo (n).

→ Referências

39. Abbas, H. A. S.; El-Karim, S. S. **Design, synthesis and anticervical câncer activity of new benzofuran-pyrazol-hydrazon-thiazolidin-4-one hybrids as potential EGFR inhibitors and apoptosis inducing agentes.** *Bioorganic Chemistry*, 89, 2019.

40. Aguiar, P. F.; Rodrigues, R. K. **Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão.** *Revista Unimontes Científica*, 19:191-204, 2017.

41. Antonelli, L. R.; Dutra, W. O.; Almeida, R. P.; Bacellar, O.; Carvalho, E. M.; Gollob, K. J. **Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis.** *Immunol Lett.*, 101:226-230, 2005.

42. Maspi, N.; Abdoli, A.; Ghaffarifar, F. **Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review.** *Pathog Glob Health*, 110:247-260, 2016.
43. Mosmann, T. *et al.* **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63, 1983.
44. OMS, Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis.** Em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em 12/08/2020. *Weekly Epidemiological Record*, 92:557-572, 2017.
45. Pasparakis, M.; Haase, I.; Nestle, F. O. **Mechanisms regulating skin immunity and inflammation.** *Nat Rev Immunol.*, 14:289-301, 2014.
46. Pinho, B. R. *et al.* **Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property?** *PloS One*, 6(8):24-48, 2011.
47. Sacks, D.; Noben-Trauth, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** *Nat Rev Immunol.*, 11:845-858, 2002.
48. Rossi, M.; Fasel, N. **How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!** *International Immunology*, 30:103-111, 2017.
49. Ruiz-Postigo, J. A.; Grout, L.; Jain, S. **Global leishmaniasis surveillance, 2017-2018, and first report on 5 additional indicators.** *Weekly Epidemiological Record - OMS*, 95:265-280, 2020.
50. Stanley, A. C.; Engwerda, C. R. **Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis.** *Immunol Cell Biol.*, 85(2):138-147, 2007.
51. Torres-Guerrero, E. *et al.* **Leishmaniasis: a review.** *F1000 Research*, 6, 2017.

52. Werneck, G. L. **Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?** *Cadernos de Saúde Pública*, 32, 2016.

REIVINDICAÇÕES

1) LQIT/GQS-90 como protótipo aplicado ao tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, **caracterizada pela** obtenção do composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90) como uma alternativa para o tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, a ser utilizado na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa no tratamento da leishmaniose cutânea.

2) LQIT/GQS-90 como protótipo aplicado ao tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada por** uma resposta leishmanicida do composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90), onde o composto LQIT/GQS-90 revelou um efetivo potencial leishmanicida, obtendo-se IC₅₀ de 0,42±0,15µM; na ação citotóxica e leishmanicida, um CC₅₀ de 8,52±1,36µM; no índice de seletividade para a forma amastigota, um IC₅₀ de 0,64±0,09µM; os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados *in vitro* com o composto mostraram regulação imunológica para resposta Th1, bem como, a produção de citocinas pró-inflamatórias promove a proteção imunológica contra a leishmaniose cutânea; entretanto, a produção excessiva dessas citocinas pode induzir estágios teciduais de hiperinflamação e promover uma imunopatologia severa da doença; a molécula LQIT/GQS90, além de induzir a morte do parasito em baixos níveis de concentração, também foi capaz de promover uma discreta diminuição nos níveis de IL-6, TNF-α e óxido nítrico, nos esplenócitos tratados, o que corrobora com um favorecimento ao status anti-inflamatório *in vitro*.

3) LQIT/GQS-90 como protótipo aplicado ao tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, de acordo com as Reivindicações 1 e

2, **caracterizada por** uma resposta do composto testado, onde o LQIT/GQS-90 pode ser utilizado individualmente ou em combinação com outros agentes leishmanicidas, em profilaxia, paliativa, para produção de preparações farmacêuticas e/ou veterinárias, sob a forma de pós, grânulos, comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, soluções orais e/ou injetáveis, pomadas, cremes, elixires, xarope, emulsões, suspensões, loções, emplastros, géis, sistemas de liberação controlada como micro e nanocápsulas, micro e nanopartículas, complexos de inclusão, micro e nanoemulsões, lipossomas e hidrogéis, juntamente com um ou mais adjuvantes e/ou veículos.

DESENHOS

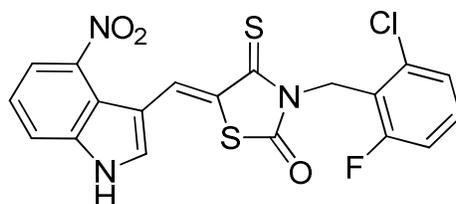


Figura 1

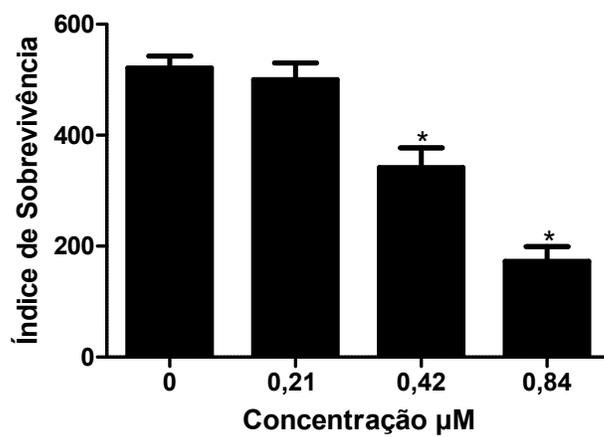


Figura 2

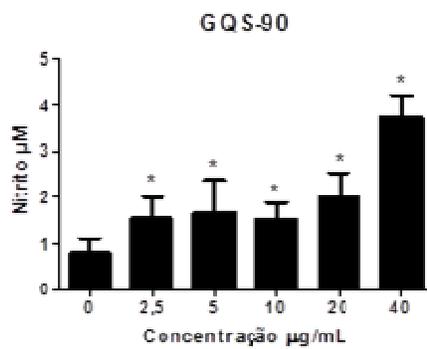


Figura 3

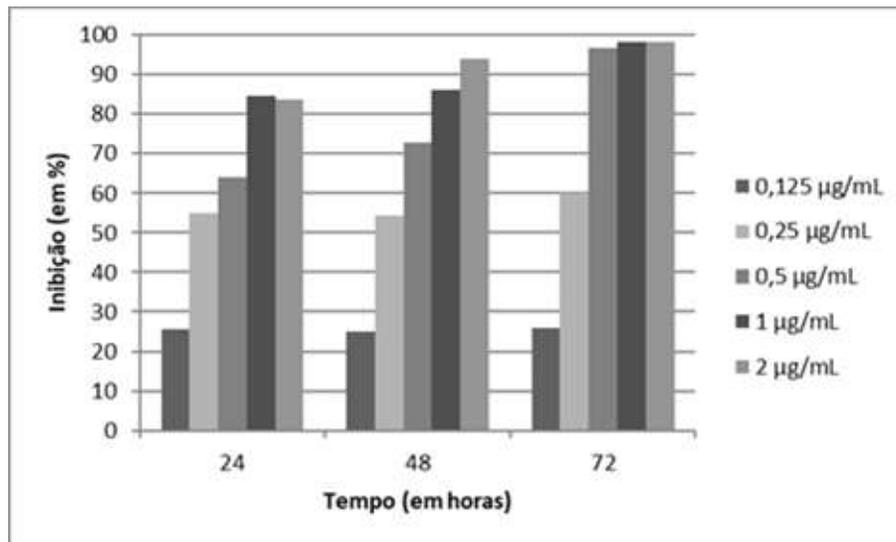


Figura 4

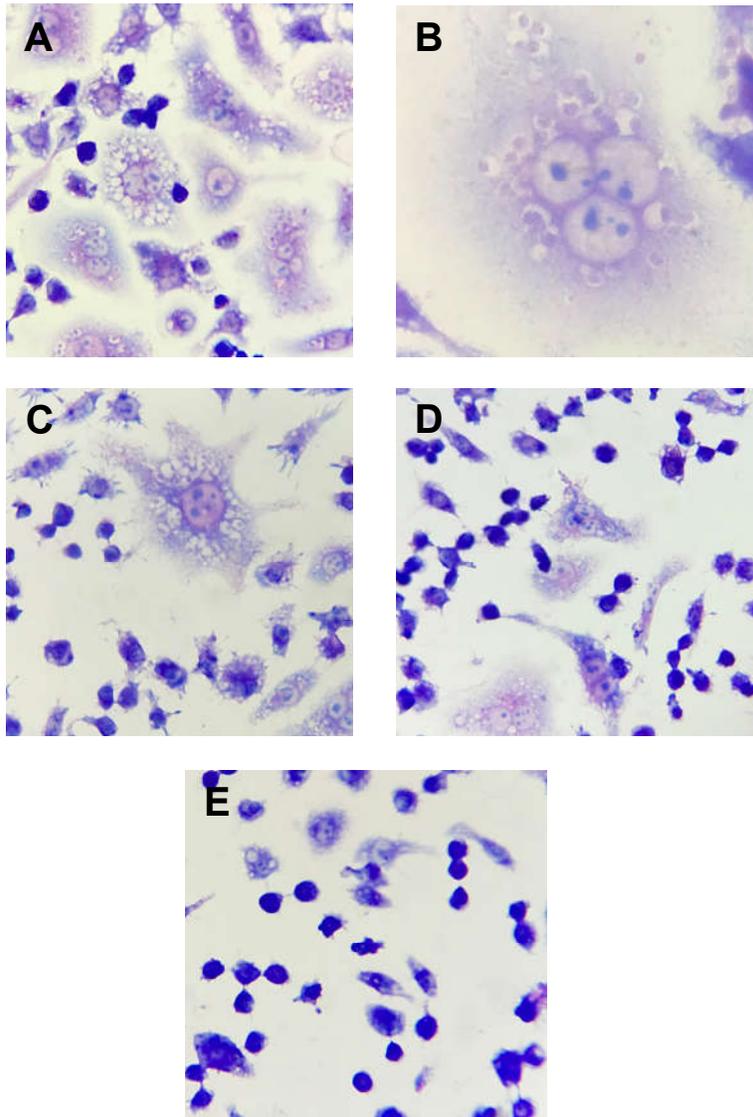


Figura 5

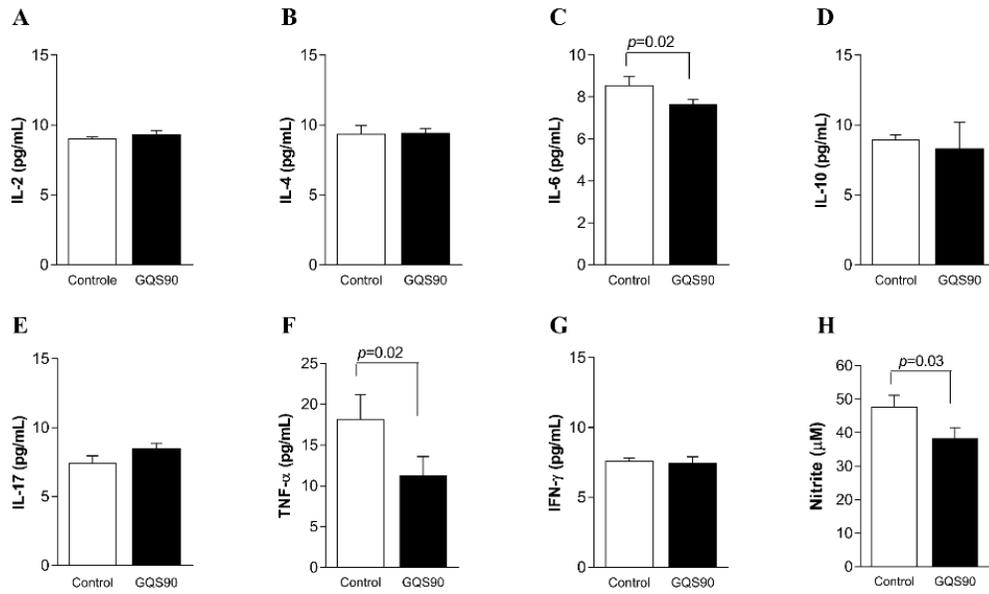


Figura 6

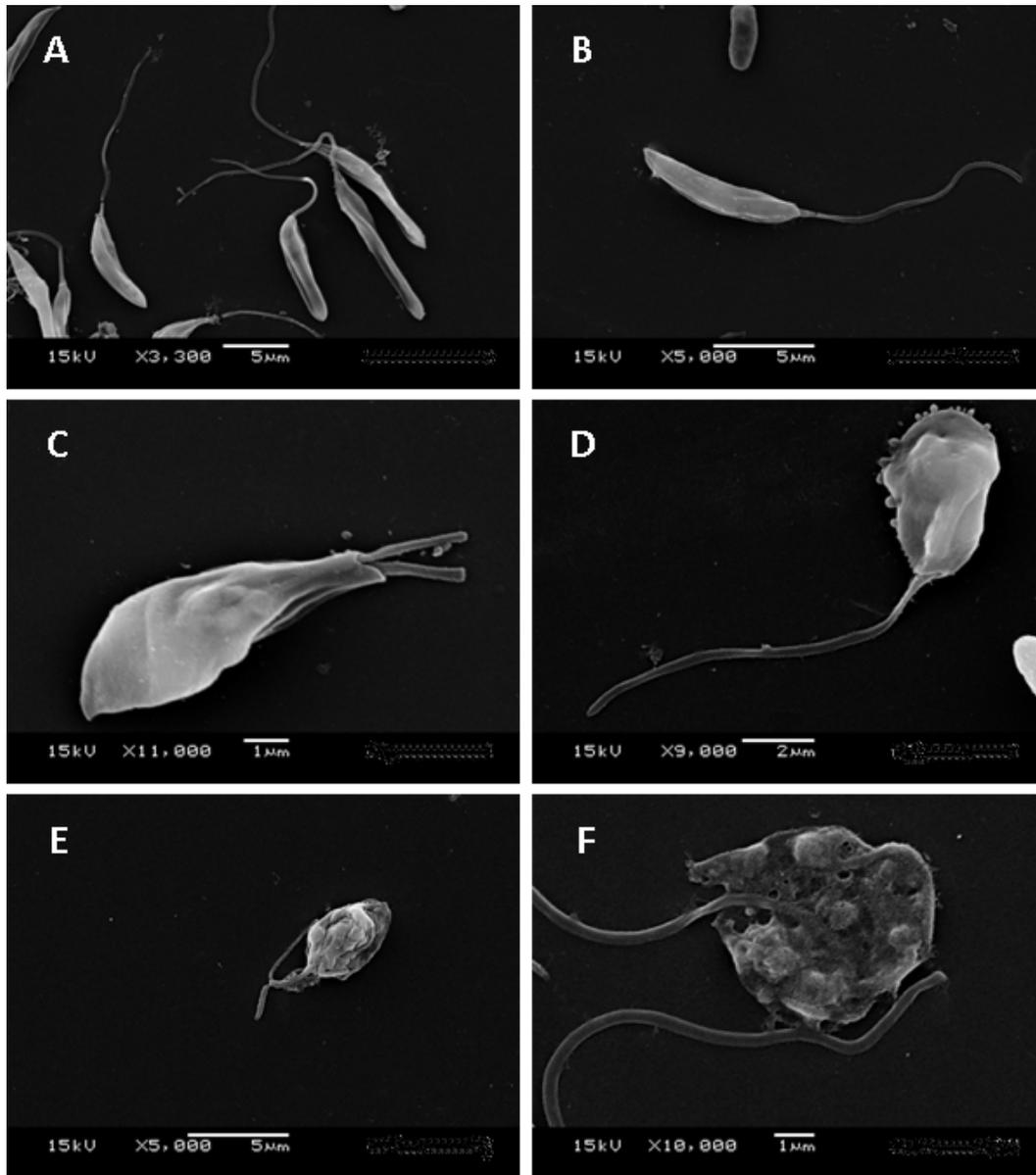


Figura 7

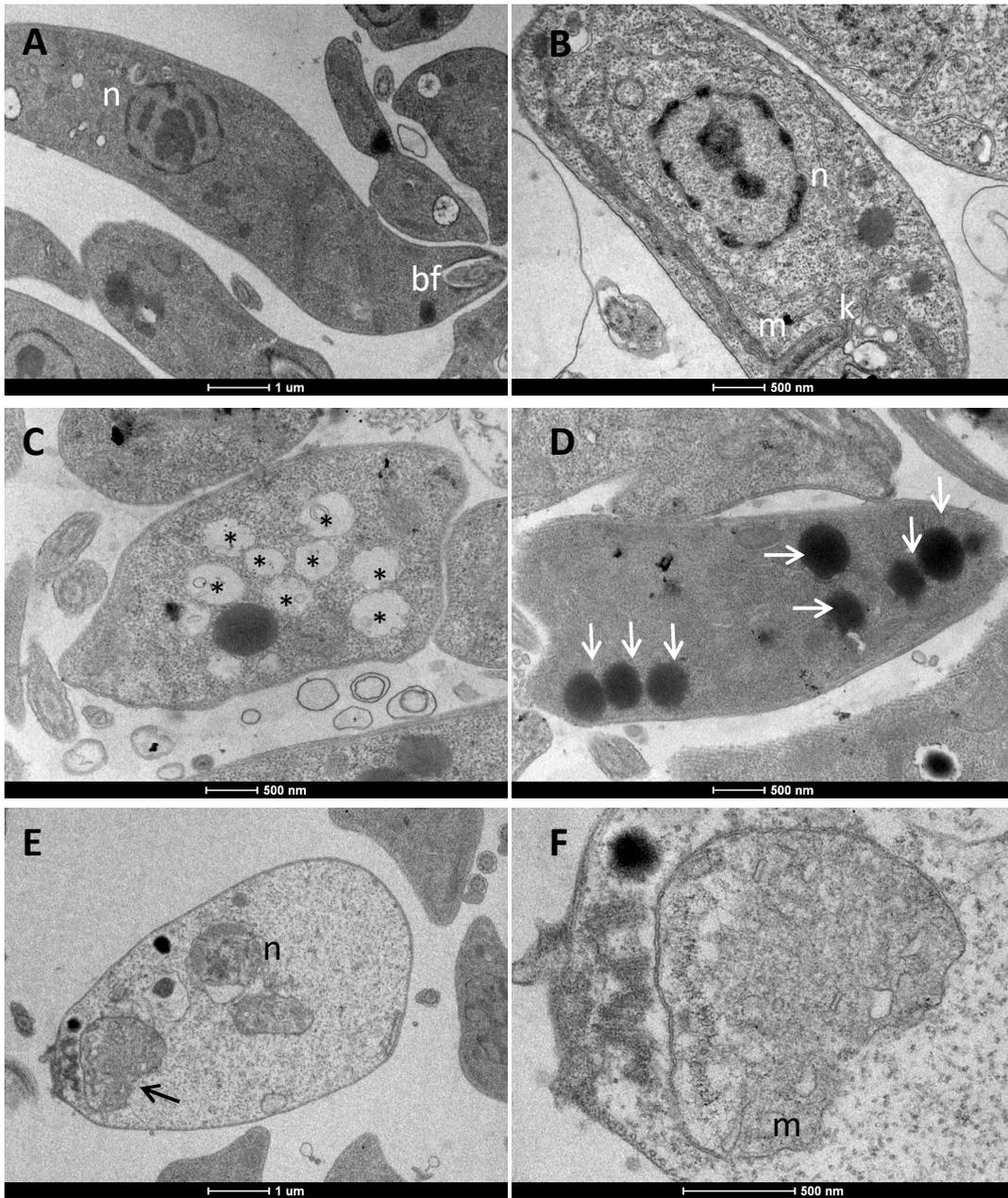


Figura 8

RESUMO

LQIT/GQS-90 COMO PROTÓTIPO APLICADO AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES CUTÂNEA E VISCERAL

A presente invenção apresenta o composto 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)-metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90), útil no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, que possui, como substituinte, o grupamento NO₂, o que conferiu a essa molécula um efetivo potencial antiparasitário (IC₅₀ = 0,42±0,15µM). Este composto foi eficaz na diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos e no índice de sobrevivência destas formas no interior da célula (IC₅₀ = 0,64±0,09µM). O índice de seletividade foi de 13,31. O número médio de parasitos por macrófagos diminuiu no tratamento com o composto LQIT/GQS-90, de forma significativa, nas concentrações de 0,42 e 0,84µM, sendo que também foi capaz de promover uma discreta diminuição nos níveis de IL-6, TNF-α e óxido nítrico, nos esplenócitos tratados, o que corrobora com um favorecimento ao status anti-inflamatório *in vitro*, reforçando a inibição do perfil Th1. A análise MEV mostrou as formas promastigotas apresentando encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular. Já o MET mostrou que os grupos expostos exibiram alterações ultra-estruturais, não encontradas nas formas promastigotas não tratadas. Tratamento com 0,42µM do composto LQIT/GQS-90 levou à presença de um grande número de inclusões densas em elétrons no citoplasma, além de vários espaços eletróluscentes, enquanto que as formas promastigotas, tratadas com 0,84µM, mostraram rarefação celular, inchaço mitocondrial e alterações no núcleo.