



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JÚLIA ARISA MORAES E SILVA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE SÍNTESE COM
POTENCIAL AÇÃO CONTRA DOENÇA DE CHAGAS E
LEISHMANIOSES:
ABORDAGENS *IN VITRO***

Recife
2025

JÚLIA ARISA MORAES E SILVA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE SÍNTESE COM
POTENCIAL AÇÃO CONTRA DOENÇA DE CHAGAS E
LEISHMANIOSES:
ABORDAGENS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Policarpo Ademar Sales Junior

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Júlia Arisa Moraes e .

Avaliação de compostos de síntese com potencial ação contra doença de Chagas e Leishmanioses: abordagens in vitro / Júlia Arisa Moraes e Silva. - Recife, 2025.

49 : il.

Orientador(a): Policarpo Ademar Sales Junior

Coorientador(a): Valéria Pereira Hernandes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Leishmania spp.. 3. Ensaios pré-clínicos. 4. Ftalimidas. 5. Piridil-tiazóis. I. Sales Junior, Policarpo Ademar. (Orientação). II. Hernandes, Valéria Pereira. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

JÚLIA ARISA MORAES E SILVA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE SÍNTESE COM POTENCIAL AÇÃO
CONTRA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES:
ABORDAGENS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Policarpo Ademar Sales Junior
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz - PE/Depto. de Imunologia

Dr. Marton Kaique de Andrade Cavalcante
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz - PE/Depto. de Imunologia

Dra. Allana Maria de Souza Pereira
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz - PE/Depto. de Imunologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Policarpo Sales e Valéria Pereira, que sempre estiveram presentes para me auxiliar em toda a jornada da iniciação científica, ensinando-me muito e contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

À Daniele Santana, minha coorientadora, e à Clara, minha parceira de laboratório, que me acolheram desde o início e me ensinaram todos os ensaios e atividades com muito carinho e paciência, além de compartilharem bons momentos comigo na sala de cultura.

Agradeço também a todos os meus colegas de laboratório, que tornaram o dia a dia mais leve, e aos funcionários do Instituto Aggeu Magalhães, que, mesmo de forma indireta, contribuíram para a realização desta pesquisa. E ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Gostaria de agradecer à minha mãe, Denise, que sempre incentivou minhas escolhas e me deu a orientação e a confiança necessárias para seguir em frente. Ao meu pai, Marco, que me apoiou e possibilitou minha permanência em Recife. À minha irmã e ao meu cunhado, Natália e Cláudio, pelo incentivo constante e apoio em todas as fases da minha trajetória.

Aos amigos queridos que conheci na graduação, minha família em Recife, especialmente Débora, Henrique, Igor, Karen, Kaylanne, Mariana, Nathália e Renata, que estiveram comigo até o fim, tornando o cotidiano mais leve e agradável, e compartilhando aprendizados e experiências. E aos meus amigos Ana Tereza e Nonato, que, apesar da distância, permanecemos inseparáveis.

Ao meu namorado, Matheus, meu grande parceiro e admirador, que me conquista a cada dia com sua paciência e ternura, e está sempre ao meu lado, pronto para me apoiar em tudo que eu almejo.

E, por fim, aos meus gatos, Antony e Tomás, que são meus maiores companheiros desde o início da minha jornada em Recife. Estiveram ao meu lado todos os dias, me oferecendo carinho e companhia constantes.

**Tenho apenas duas mãos
e o sentimento do mundo.**

Carlos Drummond de Andrade

SILVA, Júlia Arisa Moraes e. **Avaliação de compostos de síntese com potencial ação contra doença de Chagas e leishmanioses**: abordagens *in vitro*. 2025. 49 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas, respectivamente, pelos tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., que afetam milhões de pessoas, sobretudo em regiões de clima tropical, e apresentam terapias limitadas, caracterizadas por alta toxicidade e já foram identificadas cepas resistentes aos medicamentos atualmente disponíveis. Dessa forma, há uma necessidade urgente de identificar novos compostos com potencial terapêutico. Este projeto avaliou, *in vitro*, duas classes de compostos que apresentaram potencial ação tripanocida e leishmanicida na literatura, sendo elas as ftalimidias e os piridil-tiazóis. No total, foram testados 19 compostos, sendo 10 similaridade ao grupo farmacofórico ftalimida, desenhados por técnicas *in silico* e direcionados a alvos dos tripanossomatídeos, e nove, com similaridade ao grupo farmacofórico piridil-tiazol. Foram realizados ensaios para determinar a citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929, a atividade antiparasitária sobre cepas de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. transfetadas com a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli*, a produção de óxido nítrico e a quantificação de citocinas por meio do ensaio de CBA, utilizando citometria de fluxo. A partir dos valores de CC_{50} e IC_{50} , foi calculado o índice de seletividade (IS), e dos três compostos que obtiveram $IS \geq 50$, os dois com o IS mais altos foram selecionados para os ensaios de imunomodulação. Dessa forma, as ftalimidias foram testadas contra o *T. cruzi* e apresentaram baixa atividade tripanocida. Já os piridil-tiazóis foram testados contra o *T. cruzi* e a *Leishmania* spp., os nove compostos apresentaram boa atividade tripanocida, entretanto, nenhum deles apresentou atividade leishmanicida satisfatória. Deste modo, os piridil-tiazóis 7 e 10 avançaram para a avaliação de imunomodulação, na qual o composto 10 estimulou a produção de óxido nítrico, enquanto ambos induziram aumento de IL-6 e redução de IL-10, citocinas associadas à resistência e à suscetibilidade à doença de Chagas, respectivamente. Esses resultados indicam que os piridil-tiazóis 7 e 10 são promissores candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania* spp.. Ensaios pré-clínicos. Ftalimidias. Piridil-tiazóis.

SILVA, Júlia Arisa Moraes e. **Evaluation of synthetic compounds with potential activity against Chagas disease and leishmaniasis: *in vitro* approaches.** 2025. 49 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Chagas disease and leishmaniasis are neglected tropical diseases caused, respectively, by the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., which affect millions of people, mainly in tropical regions. These diseases have limited therapeutic options, characterized by high toxicity, and resistant strains to currently available drugs have already been identified. Therefore, there is an urgent need to identify new compounds with therapeutic potential. This project evaluated, *in vitro*, two classes of compounds that have shown potential trypanocidal and leishmanicidal activity in the literature: phthalimides and pyridyl-thiazoles. In total, 19 compounds were tested—10 with similarity to the phthalimide pharmacophoric group, designed using *in silico* techniques and targeted to trypanosomatid proteins, and nine with similarity to the pyridyl-thiazole pharmacophoric group.

Assays were performed to determine cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages and L929 fibroblasts, antiparasitic activity against *T. cruzi* and *Leishmania* spp. strains transfected with the *Escherichia coli* β -galactosidase enzyme, nitric oxide production, and cytokine quantification using CBA assays via flow cytometry. Based on the CC_{50} and IC_{50} values, the selectivity index (SI) was calculated, and of the three compounds that showed an $SI \geq 50$, the two with the highest SI were selected for the immunomodulation assays. Phthalimides were tested against *T. cruzi* and did not show poor trypanocidal activity. In contrast, pyridyl-thiazoles were tested against *T. cruzi* and *Leishmania* spp.; all nine compounds showed good trypanocidal activity, but none exhibited satisfactory leishmanicidal activity. Thus, pyridyl-thiazoles 7 and 10 advanced to immunomodulatory evaluation, in which compound 10 stimulated nitric oxide production, while both compounds induced an increase in IL-6 and a decrease in IL-10, cytokines associated with resistance and susceptibility to Chagas disease, respectively. These results indicate that pyridyl-thiazoles 7 and 10 are promising candidates for the development of new drugs against Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania* spp.. Preclinical assays. Phthalimides. Pyridyl-thiazoles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo da doença de Chagas	17
Figura 2 – Ciclo da leishmaniose	19
Figura 3 – Fluxograma dos ensaios pré-clínicos	26
Figura 4 – Ensaio antiparasitário sobre <i>T. cruzi</i> , cepa Tulahuen	30
Figura 5 – Ensaio antiparasitário sobre <i>Leishmania</i> spp.	32
Figura 6 – Ensaio de citotoxicidade MTT	34
Figura 7 – Ensaio de Griess	35
Figura 8 – Ensaio de CBA	37
Figura 9 – Ensaio da atividade de ftalimidas sobre <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen)	39
Figura 10 – Ensaio da atividade de piridil-tiazóis sobre <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen)	40
Figura 11 – Ensaio sobre <i>Leishmania amazonensis</i> , cepa WHOM/00LTB 0016 – piridil-tiazóis	41
Figura 12 – Ensaio sobre <i>Leishmania infantum</i> cepa, MHOM/MA/67/ITMAP-26 – piridil-tiazóis	42
Figura 13 – Produção de óxido nítrico	43
Figura 14 – Produção de citocinas	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50 %
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CO ₂	Dióxido de carbono
CPRG	Clorofenol red-β-D-galactopiranosídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
DO	Densidade óptica
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
SUS	Sistema Único de Saúde
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50 %
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
IFN-γ	Interferon gama
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IS	Índice de seletividade
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MS	Ministério da Saúde
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico

PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	14
2.1.1	Doença de Chagas	14
2.1.1.1	Visão geral da doença	14
2.1.1.2	Sinais e sintomas	15
2.1.1.3	Ciclo da doença	15
2.1.1.4	Tratamento	17
2.1.2	Leishmanioses	18
2.1.2.1	Visão geral da doença	18
2.1.2.2	Ciclo da doença	18
2.1.2.3	Leishmaniose tegumentar e leishmaniose mucocutânea	20
2.1.2.3.1	<i>Tratamento</i>	20
2.1.2.4	Leishmaniose visceral	21
2.1.2.4.1	<i>Tratamento</i>	21
2.2	ASPECTOS COMUNS ENTRE A RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS E NAS LEISHMANIOSES	22
2.3	DESAFIOS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS E AS LEISHMANIOSES	23
2.4	ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS	24
2.5	FTALIMIDAS E PIRIDIL-TIAZÓIS: COMPOSTOS PROMISSORES CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E AS LEISHMANIOSES	26
3	OBJETIVOS	
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	
4.1	COMPOSTOS	28
4.2	AValiação da atividade antiparasitária	28
4.2.1	Ensaio Tripanocida Contra as Formas Evolutivas de <i>T. cruzi</i>	29
4.2.2	Ensaio Leishmanicida com Promastigotas	30

4.2.3	Ensaio Leishmanicida sobre Amastigotas	31
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	32
4.3.1	Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos RAW 264.7 e em Fibroblastos L929.....	33
4.4	AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO.....	34
4.4.1	Quantificação de Óxido Nítrico	34
4.4.2	Dosagem de Citocinas.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA TULAHUEN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DE CULTIVO CELULAR.....	38
5.2	ATIVIDADE DE COMPOSTOS SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS E PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EXPRESSANDO A BETA-GALACTOSIDASE	40
5.3	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS ESTIMULAÇÃO COM OS PIRIDIL-TIAZÓIS 7 E 10	42
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS ESTIMULAÇÃO COM OS PIRIDIL-TIAZÓIS 7 E 10	43
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 Introdução

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) englobam um grupo de enfermidades que acometem, principalmente, populações de baixa renda e estão concentradas em regiões de clima tropical (OMS, 2025). Entre essas doenças, a doença de Chagas e as leishmanioses se destacam, sendo causadas, respectivamente, por protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi* e por parasitas do gênero *Leishmania* spp. (OMS, 2024; DNDi, 2023). Esses tripanossomatídeos compartilham diversas características estruturais e bioquímicas, o que permite a identificação de alvos moleculares comuns que podem ser explorados no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Fiocruz, [s.d.]; Barrett e Croft, 2012).

Apesar do impacto significativo dessas enfermidades na saúde pública, o interesse da indústria farmacêutica pelo desenvolvimento de novos fármacos é limitado, devido ao baixo retorno financeiro associado a essas terapias (Weng; Chen; Wang, 2018). Como resultado, as opções terapêuticas disponíveis apresentam limitações importantes, como alta toxicidade e o surgimento de cepas resistentes, sobretudo em fases crônicas da doença (DNDi, 2023).

Nesse cenário, torna-se urgente a busca por novos compostos com potencial terapêutico. Este estudo, avaliou, *in silico*, 19 compostos, pertencentes a duas classes que apresentaram potencial ação antiparasitária em estudos anteriores, sendo elas dez ftalimidas e nove piridil-tiazóis. Esses compostos foram desenhados por técnicas *in silico* e direcionados a alvos dos tripanossomatídeos (Gomes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2025).

Dessa forma, os ensaios realizados incluíram a determinação da citotoxicidade (utilizando o ensaio MTT em macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929), a atividade antiparasitária (por meio do ensaio CPRG com cepas de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. transfectadas com a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli*). Após esses ensaios, os compostos que obtiveram boa atividade antiparasitária, determinados pelo índice de seletividade, o qual deve ser maior que 50 para *T. cruzi* e maior que 20 para *Leishmania* spp., avançaram para os ensaios de imunomodulação, os quais consistiram na dosagem de óxido nítrico por ensaio colorimétrico (teste de Griess) e de citocinas via citometria de fluxo (ensaio CBA), a fim de entender os possíveis mecanismos de ação desses compostos.

Com isso, a análise em conjunto desses resultados, demonstrou que os piridiltiazóis 7 e 10 são potenciais candidatos terapêuticos contra a doença de Chagas, pois eles apresentaram elevada atividade tripanocida e foram capazes de induzir uma imunomodulação pró-inflamatória, ou seja, são compostos que, *in vitro*, levaram à eliminação do parasita.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As DTNs são um grupo de doenças causadas por diversas classes de patógenos, como bactérias, vírus e parasitas, que ocorrem, principalmente, nas regiões do planeta de climas tropicais. Estima-se que essas doenças afetem mais de 1 bilhão de pessoas, enquanto cerca de 1,6 bilhão necessitam de intervenções preventivas ou curativas (OMS, 2025).

As DTNs incluem a doença de Chagas e as leishmanioses, todas elas estão relacionadas com a pobreza, pois as más condições de vida dificultam o acesso a cuidados médicos, diagnósticos e tratamentos preventivos (DNDi, [s.d.]a). Dessa forma, observa-se a falta de atenção da indústria farmacêutica para com essas doenças, pois o retorno financeiro em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias é pouco atrativo. Portanto, foram poucos os agentes terapêuticos novos desenvolvidos nos últimos anos (Weng; Chen; Wang, 2018).

2.1.1 Doença de Chagas

2.1.1.1 Visão geral da doença

A doença de Chagas, também chamada de tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A distribuição geográfica ocorre, principalmente, em regiões tropicais, sendo endêmica em 21 países da América Latina; entretanto, com o processo de globalização, a doença tem sido encontrada em outras regiões, como América do Norte e Europa (OMS, 2024; Losada Galván *et al.*, 2021).

Estima-se que cerca de seis a sete milhões de indivíduos no mundo estejam infectados com o parasita, e que aproximadamente 75 milhões estejam em risco de infecção (OMS, 2025). No Brasil, no período de 2019 a 2023, foram registrados 1.846 casos de doença de Chagas aguda no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, [s.d.]c).

2.1.1.2 Sinais e sintomas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a aguda e a crônica. Na fase aguda, observa-se a presença de parasitas no sangue periférico; A fase aguda estende-se por cerca de dois meses após a infecção e costuma ser assintomática. Em alguns casos, é possível identificar sinais clínicos característicos, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romana (edema bipalpebral unilateral). Na fase crônica, os parasitas estão presentes nos tecidos, principalmente nos cardíacos e musculares. Assim, cerca de 20 a 30% das pessoas infectadas apresentam sintomas após algumas décadas; entre elas, aproximadamente 30% desenvolvem complicações cardíacas, como insuficiência cardíaca, e cerca de 10% apresentam complicações gastrointestinais, como dilatação do esôfago e do cólon (OMS, 2024; OPAS, [s.d.]).

2.1.1.3 Ciclo da doença

O *Trypanosoma cruzi* apresenta diversas formas evolutivas, que variam de acordo com o ambiente em que se encontra, seja no vetor invertebrado ou no hospedeiro mamífero.

As formas replicativas são as epimastigotas e as amastigotas; as não replicativas são as tripomastigotas metacíclicas e as tripomastigotas infectantes, as quais estão presentes no inseto vetor e no mamífero, respectivamente (Fiocruz, [s.d.]).

A principal forma de transmissão se dá a partir dos insetos hematófagos infectados, entretanto, há outros modos de contágio como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical e consumo de alimentos infectados (Cucunubá *et al.*, 2024).

O vetor dessa doença é o triatomíneo hematófago, conhecido como barbeiro, que habita rachaduras de casas rurais (OPAS, [s.d.]). Como visto na figura 1, o ciclo

se inicia com o inseto ingerindo as tripomastigotas advindas do sangue de um indivíduo infectado. Com isso, ocorre o processo de metaciclogênese no tubo digestivo do vetor, que consiste na transformação da forma tripomastigota em epimastigota; posteriormente, no intestino posterior, ocorre a diferenciação em tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante (Fiocruz, [s.d.]).

Dessa maneira, quando o inseto vai se alimentar de sangue novamente, ele libera o parasita na forma infectante junto com a urina e as fezes, que adentram a corrente sanguínea do ser humano no ato de coçar a área da picada (OMS, 2024). Assim, as tripomastigotas metacíclicas invadem as células presentes na região da picada, como macrófagos e fibroblastos, e se diferenciam em amastigotas. Essa forma replicativa sofre divisão binária no interior da célula e se convertem em tripomastigotas, as quais são liberadas para a corrente sanguínea após o rompimento da célula. Assim, as tripomastigotas invadem novas células tanto do sítio de infecção quanto de qualquer outro tecido, pois o parasita se dissemina através do sangue (Fiocruz, [s.d.]).

Nessa dinâmica de infecção, pode-se observar variações em relação aos tecidos afetados e ao tempo de infecção, pois fatores como o hospedeiro atingido e a cepa de *T. cruzi* envolvida promovem uma ampla patogênese. Cada cepa do parasita pode apresentar virulência, sensibilidade a drogas e tropismo tecidual diferentes (Fiocruz, [s.d.]).

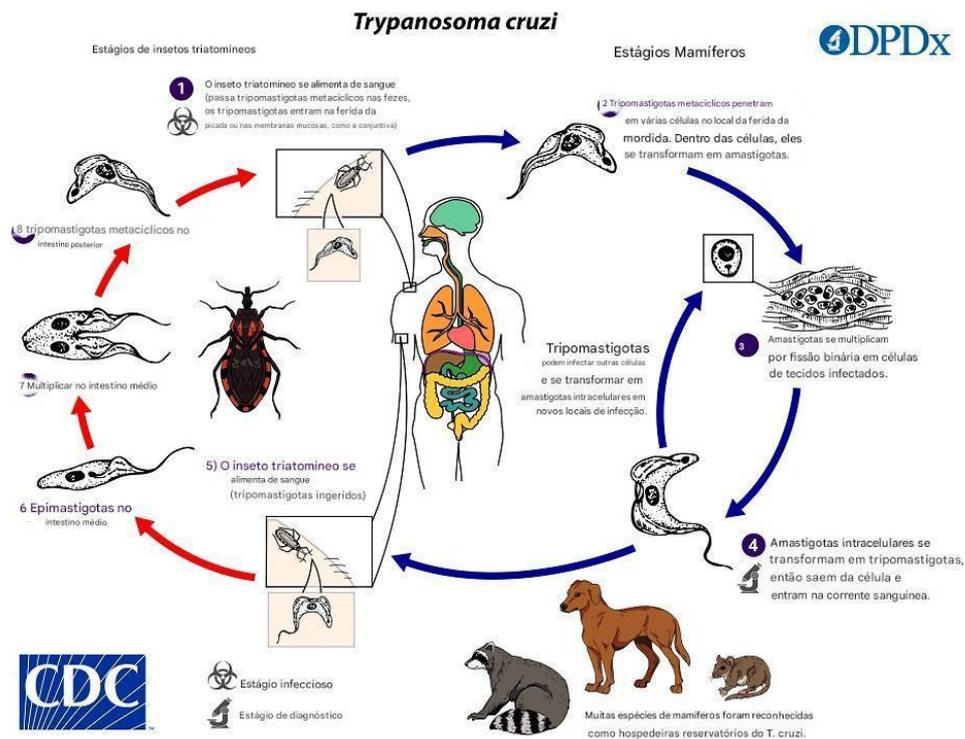


Figura 1 – Ciclo da doença de Chagas.

Fonte: Adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2021. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/modules/Chagas_LifeCycle_Ig.jpg. Acesso em: 03 mar. 2025.

2.1.1.4 Tratamento

A doença de Chagas possui opções de tratamento bastante limitadas, pois há apenas dois fármacos disponíveis no mercado: benzonidazol e nifurtimox. Ambos os fármacos são compostos nitro-heterocíclicos que apresentam eficácia de 50% a 80% na fase aguda da doença. No entanto, sua eficácia é consideravelmente reduzida na fase crônica, variando entre 8% e 20% (OMS, 2024; Sales Junior, 2017).

Os mecanismos de ação desses medicamentos ainda não foram completamente elucidados, porém, a principal hipótese sugere que seja por meio do estresse oxidativo, o qual desencadeia danos ao DNA e inibição da síntese proteica (Mansoldo, 2020).

O tratamento sempre deve ser realizado na fase aguda, após a identificação do parasita no sangue periférico. Já na fase crônica, é preciso avaliar cada caso de forma individualizada. Em crianças com idade menor ou igual a 12 anos, o tratamento é

sempre recomendado, pois elas apresentam maior tolerabilidade ao fármaco. Entretanto, em adultos, é preciso avaliar os benefícios em relação aos efeitos adversos, os quais foram descritos em até 40% dos adultos tratados. Entre os efeitos adversos, pode-se incluir a dermatopatia alérgica, a depressão da medula óssea e a polineuropatia periférica. Dessa forma, o tempo de duração do tratamento, a idade e as comorbidades que o paciente apresenta devem ser avaliadas para delinear o tratamento quimioterápico (OPAS, [s.d.]; Ferreira *et al.*, 2019).

2.1.2 Leishmanioses

2.1.2.1 Visão geral da doença

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies do protozoário *Leishmania* spp. e são transmitidas por mais de 90 espécies de fêmeas infectadas de flebotomíneos. A doença pode se manifestar em três formas principais: cutânea ou tegumentar, mucocutânea e visceral (Organização Mundial da Saúde, 2023). Essas doenças, que circulam entre diferentes espécies animais, são consideradas como antropozoonoses, uma vez que os seres humanos podem ser acometidos pela doença ao entrarem em contato com o ciclo de transmissão do parasita (MS, 2014).

2.1.2.2 Ciclo da doença

As leishmanioses são transmitidas através da picada do flebotomíneo infectado fêmea, pois somente estas são hematófagas. Esses insetos são popularmente conhecidos como mosquito palha, devido à sua coloração castanho clara (MS, 2014).

Nas Américas, as principais espécies transmissoras são do gênero *Lutzomyia*, enquanto, nos países do velho mundo, são as do gênero *Phlebotomus* (Bates, 2007). No Brasil, diversas espécies estão associadas à transmissão da leishmaniose cutânea; entretanto, apenas duas são responsáveis pela transmissão da forma visceral da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (MS, 2014).

A *Leishmania* spp. possui duas principais formas evolutivas: a amastigota, que é intracelular, e a promastigota, que é flagelada (Bates, 2007).

Como visto na figura 2, o inseto vetor se infecta com *Leishmania* spp. ao ingerir

células do hospedeiro mamífero contendo amastigotas durante o repasto sanguíneo (MS, 2014). Diversos mamíferos, incluindo humanos, animais domésticos e silvestres, podem servir como fonte de infecção para o vetor (MS, 2017). Com isso, as células infectadas, geralmente macrófagos, rompem no trato digestivo do inseto devido às condições propícias de pH e temperatura (Bates, 2007).

Assim, as amastigotas se multiplicam e se transformam em promastigotas, que se reproduzem por divisão binária, originando as paramastigotas, as quais permanecem aderidas ao esôfago e à faringe do vetor. Posteriormente, as paramastigotas se diferenciam na forma infectante do parasita, as promastigotas metacíclicas. Dessa maneira, em um novo repasto sanguíneo, as promastigotas metacíclicas são inoculadas na corrente sanguínea juntamente com a saliva do inseto e, ao atingirem a epiderme do hospedeiro mamífero, são internalizadas por macrófagos e outros fagócitos mononucleares. Assim, ocorre a diferenciação em amastigotas, que se multiplicam e são liberadas no meio extracelular quando a célula se rompe. Isso leva à infecção de novos macrófagos, propagando a infecção (MS, 2014; MS, 2017).

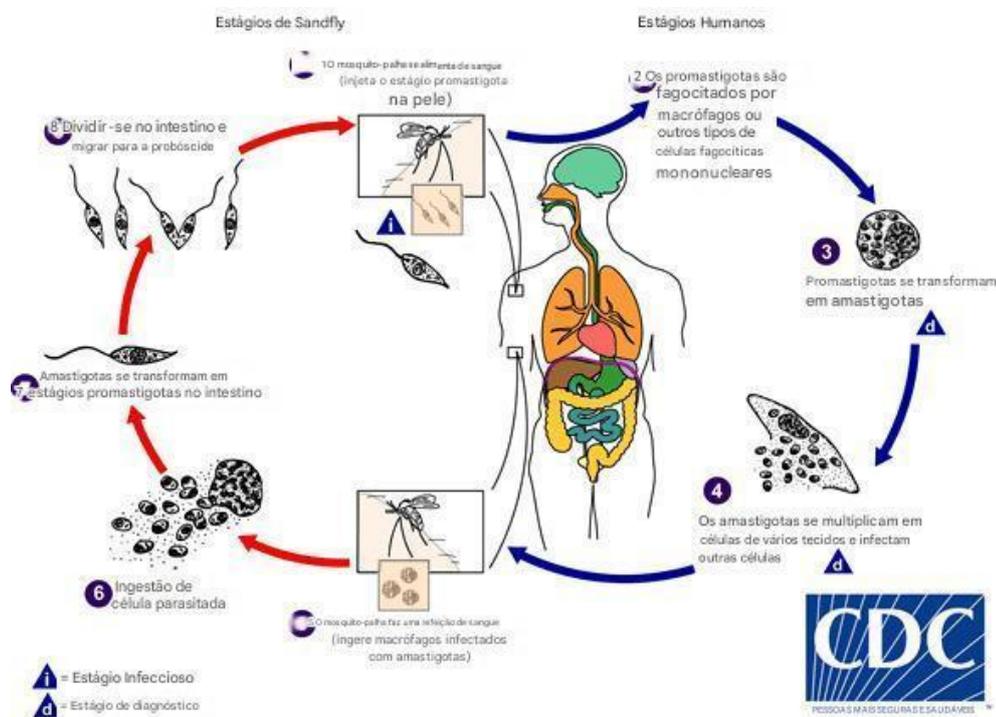


Figura 2 – Ciclo da leishmaniose

Fonte: Adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2024. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/modules/Leishmania_LifeCycle.gif?_=00703. Acesso em: 03 mar. 2025.

2.1.2.3 Leishmaniose tegumentar e leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose cutânea, também conhecida como leishmaniose tegumentar, é uma doença infecciosa e não contagiosa (MS, 2017) que se manifesta através de lesões, geralmente ulceradas e indolores, na pele e nas mucosas (MS, [s.d.]b). Apesar de não ser fatal, gera um impacto social negativo, pois as cicatrizes decorrentes das lesões são estigmatizantes, o que resulta na marginalização dos indivíduos afetados (DNDi, 2023a).

A forma mucocutânea pode surgir como uma complicação da forma cutânea, manifestando-se meses ou anos após a cicatrização das lesões; ela gera destruição das mucosas do nariz, da boca e da garganta e, diferentemente da forma cutânea, não apresenta cura espontânea (DNDi, 2023a).

A distribuição geográfica da leishmaniose cutânea concentra-se nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central, onde 95% dos novos casos foram registrados, sendo endêmica em 90 países (DNDi, 2023a). Já a forma mucocutânea registrou 90% dos casos na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. Estima-se que ocorram de 600 mil a 1 milhão de casos por ano, embora somente 200 mil sejam relatados à OMS (OMS, 2023). No Brasil, no período de 2020 a 2024, foram registrados 71.942 casos de leishmaniose tegumentar no SINAN (BRASIL, [s.d.]a).

No país, foram identificadas sete espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea, sendo as principais *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. As espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram descritas recentemente (MS, 2017).

2.1.2.3.1 Tratamento

Os tratamentos disponíveis estão longe de ser ideais, pois são longos, de alto custo e apresentam alta toxicidade, o que resulta em efeitos adversos. Esses fatores contribuem para o abandono do tratamento pelos pacientes (DNDi, 2023a).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza o antimoniato de meglumina (antimonial pentavalente), o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (antifúngicos), o isotionato de pentamidina (diamidina aromática), e a pentoxifilina, um imunomodulador que atua como coadjuvante quando associado ao antimoniato de meglumina (MS, 2017). Além disso, a miltefosina (alquilfosfocolina) foi

incorporada ao SUS em 2020 para o tratamento da leishmaniose cutânea (MS, 2020).

Os fármacos de primeira escolha, antimonial pentavalentes, apresentam como desvantagens a falha terapêutica, o curso prolongado do tratamento e relatos de resistência. Outras limitações de seu uso estão no alto custo e na necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração.

2.1.2.4 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar (OMS, 2023), é uma doença infecciosa sistêmica caracterizada pelo aumento do baço e do fígado, além de causar anemia, perda de peso e fraqueza (MS, [s.d.]a). É a forma mais severa entre as leishmanioses, pois resulta em 95% dos óbitos nos casos não tratados (OMS, 2023).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma condição de pele que pode surgir de 6 meses a 1 ano após a aparente cura da forma visceral (OMS, 2023). Embora não seja fatal, ela causa erupções cutâneas que tornam o indivíduo um potencial transmissor do parasita, além de gerar estigma social devido às lesões (DNDi, 2023b). Além disso, no Brasil, há uma alta taxa de coinfeção *Leishmania*-HIV, este cenário é preocupante, pois o risco de desenvolver a leishmaniose visceral ativa é 100 vezes maior em indivíduos vivendo com HIV (OMS, 2023; DNDi, 2023b).

A distribuição geográfica concentra-se no Brasil, no leste da África e na Índia. Estima-se que mais de 600 milhões de pessoas estejam em risco globalmente e que de 50 mil a 900 mil novos casos ocorram a cada ano; no entanto, apenas de 25% a 45% são relatados à OMS (OMS, 2023). No Brasil, no período de 2020 a 2024, foram registrados 8.996 casos da doença no SINAN (BRASIL, [s.d.]b).

As espécies mais comuns são: *Leishmania donovani* e *L. infantum* (CDC, 2024). Esta última corresponde à espécie mais presente no Brasil (MS, 2014).

2.1.2.4.1 Tratamento

Os tratamentos disponíveis para a leishmaniose visceral apresentam as mesmas limitações que os da leishmaniose cutânea, como tempo e custo elevados, baixa segurança e dificuldade de administração dos medicamentos que não são por via oral (DNDi, 2023b). O tratamento deve ser escolhido de acordo com o país de

infecção, pois a resposta varia de região para região, pois cada região está relacionada com espécies distintas (DNDi, 2018).

No mercado mundial, os fármacos disponíveis são os antimoniais pentavalentes; a miltefosina; a anfotericina B lipossomal; e a paromomicina, este último pertencente à classe dos antibióticos aminoglicosídeos (DNDi, 2023b).

No Brasil, o SUS disponibiliza o antimoniato N-metil glucamina e o desoxicolato de anfotericina B (MS, 2014), bem como a anfotericina B lipossomal (MS, [s.d.]).

2.2 ASPECTOS COMUNS ENTRE A RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS E NAS LEISHMANIOSES

Na doença de Chagas e nas leishmanioses, os parasitas na forma flagelada invadem as células do hospedeiro vertebrado e se transformam nas formas amastigotas intracelulares. Dessa maneira, as respostas imunológicas específicas e de memória são mediadas por células T (Tripathi, Singh e Naik, 2007).

A resposta contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp. se inicia com a ativação da resposta imune inata, na qual os macrófagos e as células dendríticas apresentam os antígenos dos parasitas para as células T CD4⁺ virgens, além de produzirem citocinas. Essas citocinas promovem a diferenciação das células T CD4⁺ em diferentes subpopulações que geram diferentes perfis de resposta, como o Th1, o Th2 e o Th17 (Abbas, 2019).

O controle da infecção é mediado pela resposta imune do tipo Th1, que apresenta um perfil de citocinas pró-inflamatórias (Tripathi, Singh e Naik, 2007). A citocina IL-12 promove a diferenciação das T CD4⁺ virgens em células Th1, as quais irão produzir as citocinas IFN- γ e TNF (de Alba-Alvarado *et al.*, 2024); estas, por sua vez, atuam em conjunto para ativar os macrófagos, os quais passam a produzir óxido nítrico (NO) (Pavanelli, 2008). O IFN- γ ativa os macrófagos e os diferencia para o tipo M1, caracterizado por um perfil pró-inflamatório. Como resultado, esses macrófagos passam a produzir óxido nítrico, uma molécula com potente ação citotóxica envolvida no mecanismo de eliminação dos parasitas, por meio da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de citocinas que intensificam a resposta inflamatória, como TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 β . Todas essas substâncias levam à eliminação dos parasitas, entretanto, podem ocasionar danos teciduais (Alba-Alvarado *et al.*, 2024). O TNF atua em sinergia com o IFN- γ , fornecendo um segundo sinal que intensifica a produção de

NO (Silva *et al.*,1995).

Por outro lado, a resposta Th2 está associada à imunorregulação e ao reparo tecidual; entretanto, isso pode favorecer a persistência do parasita e a progressão da doença (Tripathi, Singh e Naik, 2007). A IL-4 é a citocina indutora da diferenciação das células T CD4⁺ virgens em células Th2, as quais irão secretar IL-4 e IL-10. Essas duas citocinas promovem a diferenciação dos macrófagos para o perfil M2, o qual está associado à remodelação da matriz extracelular por meio da secreção de TGF- β . Além disso, a IL-10 exerce um papel imunorregulador ao inibir a resposta Th1 e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a diminuição do dano tecidual. No entanto, essa regulação excessiva pode comprometer a eliminação dos parasitas (Alba-Alvarado *et al.*, 2024).

Por fim, a resposta Th17 pode exercer funções pró ou anti-inflamatórias, sendo considerada um elemento central do equilíbrio imunológico (Alba-Alvarado *et al.*, 2024). As IL-6 e IL-23 são responsáveis pela diferenciação das células T CD4⁺ virgens em células Th17, as quais irão produzir IL-17. Dessa forma, na presença de citocinas pró-inflamatórias, a IL-17 pode estimular a resposta Th1; entretanto, ela também é capaz de atrair neutrófilos produtores de IL-10, citocina da resposta Th2 (Abbas, 2019). Com isso, o equilíbrio da resposta imune é essencial durante a infecção pelos parasitas, pois influencia na patogênese e na eficácia da quimioterapia (Tripathi, Singh e Naik, 2007).

2.3 DESAFIOS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS E AS LEISHMANIOSES

Por se tratar de doenças negligenciadas, não há muitos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos contra essas doenças (Weng; Chen; Wang, 2018). Observa-se isso nos medicamentos para tratar a doença de Chagas, que foram descobertos há mais de 50 anos e são as únicas opções disponíveis até os dias de hoje (DNDi, 2024). Com isso, evidencia-se que é necessária a colaboração entre as universidades, indústrias farmacêuticas, órgãos governamentais e entidades para promover o desenvolvimento de novos medicamentos contra as DTNs (Mansoldo *et al.*, 2020). Nesse contexto, destaca-se a DNDi, sigla em inglês para Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas, uma organização internacional sem fins lucrativos que promove pesquisa e desenvolvimento em tratamentos mais seguros e

eficazes para doenças como as leishmanioses e a doença de Chagas (DNDi, [s.d.]b).

Neste contexto, o processo de descoberta de novos fármacos envolve diversas etapas, como a identificação e validação de alvos do parasita, o desenvolvimento e a otimização de potenciais moléculas, a determinação da farmacocinética e farmacodinâmica, e a identificação de candidatos a fármacos por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos. Esse delineamento pode ser otimizado com métodos computacionais (*in silico*), que possibilitam a predição e a validação de alvos moleculares, bem como o desenvolvimento e aprimoramento de moléculas. Esses fatores aumentam a probabilidade de o composto apresentar potencial terapêutico (Agamah *et al.*, 2020).

A primeira etapa desse processo já representa um desafio, pois ainda não existem biomarcadores bem estabelecidos para avaliar com precisão a cura parasitológica. Além disso, a diversidade de cepas parasitárias e de linhagens celulares, a falta de padronização metodológica e as dificuldades na tradução dos achados para aplicações clínicas tornam mais complexa a determinação do potencial de um composto (Mansoldo, 2020).

Dessa maneira, a fim de diminuir a falta de padronização metodológica nos ensaios pré-clínicos, o trabalho de Romanha e colaboradores, desenvolvido pelo Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz em parceria com a DNDi, estabeleceu um protocolo para a triagem de compostos contra a doença de Chagas, com o objetivo de avaliar a eficácia de maneira otimizada, segura e reprodutível (Romanha *et al.*, 2010).

2.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

Tanto *T. cruzi* quanto *Leishmania* spp. são parasitas da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae (Neves, 2005); dessa forma, por estarem taxonomicamente relacionados, apresentam semelhanças estruturais e bioquímicas que podem ser exploradas como alvos terapêuticos (Barrett e Croft, 2012). Alguns exemplos disso são as vias de salvamento de purina/pirimidina; os análogos de nucleosídeos; os proteassomas de cinetoplastídeos e as mitocôndrias (Brindha, Balamurali e Chanda, 2021).

Diante disso, o protocolo de triagem de compostos tripanocidas desenvolvido por Romanha e colaboradores (2010) pode ser expandido, com as devidas

adaptações, para a avaliação de compostos leishmanicidas, uma vez que os parasitas compartilham alvos moleculares.

O protocolo estabelecido por Romanha propõe que o processo da etapa pré-clínica se inicie com os ensaios *in vitro*, como pode ser observado na figura 3. A primeira fase constitui os ensaios contra as formas intra e extracelulares dos parasitas. Caso o composto apresente atividade antiparasitária superior ou semelhante ao do fármaco de referência, ele avança para a próxima etapa. Nessa fase, avalia-se a citotoxicidade em células de mamíferos e, a partir dos dados obtidos sobre a toxicidade em parasitas e células, calcula-se o índice de seletividade (IS). O IS do composto é então comparado ao do fármaco de referência e, se for igual ou superior a 50 nos ensaios tripanocidas, o composto avança para os ensaios *in vivo* (Romanha, 2010). Caso apresente todos os requisitos esperados, ele segue para os ensaios pré-clínicos adicionais recomendados pela Anvisa. No caso dos ensaios leishmanicidas, 20 é o IS mínimo para que um composto seja recomendado a ensaios *in vivo* (Nwaka & Hudson, 2006).

Dessa forma, os testes *in vitro* apresentam duas abordagens: fenotípica e baseada em alvos. A primeira não estabelece qual é o mecanismo de ação envolvido na ação do composto, sendo assim, avalia-se o efeito direto do composto sobre o parasita. Já a segunda, baseia-se na identificação de alvos moleculares essenciais para a progressão da doença. Assim, busca-se o equilíbrio entre essas duas abordagens na descoberta de um novo fármaco, a fim de entender o efeito do composto sobre o parasita inteiro associado ao alvo molecular atingido (Brindha, Balamurali e Chanda, 2021).

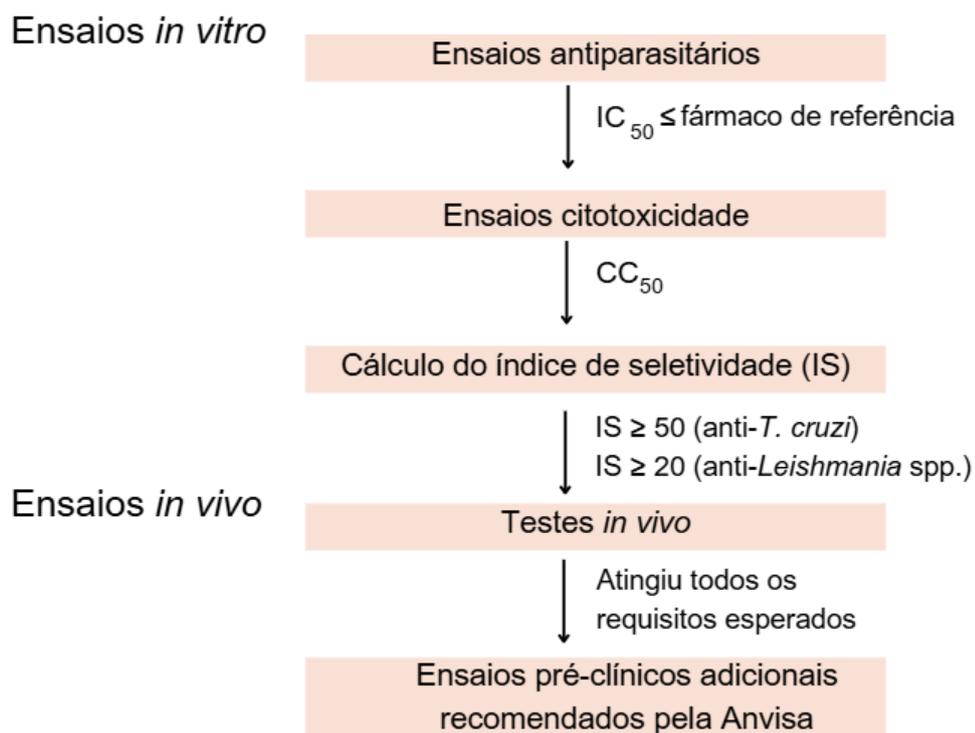


Figura 3 – Fluxograma dos ensaios pré-clínicos

Fonte: Elaborado pela autora pelo Canva, 2024.

2.5 FTALIMIDAS E PIRIDIL-TIAZÓIS: COMPOSTOS PROMISSORES CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E AS LEISHMANIOSES

Na busca por novos agentes terapêuticos contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp., os compostos contendo anéis de piridil e de tiazol na estrutura têm apresentado atividade anti-Trypanosomatidae promissora, possivelmente por inibir alvos metabólicos dos parasitas. Dessa forma, as ftalimidas e os piridil-tiazóis são compostos considerados como candidatos a fármacos contra a doença de Chagas e as leishmanioses (Gomes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2025).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através de ensaios *in vitro*, dois grupos de compostos de síntese que apresentam similaridade ao grupo farmacofórico ftalimida e ao grupo farmacofórico piridil-tiazol, como potenciais protótipos candidatos a fármacos tripanocidas e leishmanicidas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a atividade citotóxica de compostos de síntese em diferentes linhagens celulares (macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929);
- II. Determinar a atividade tripanocida, *in vitro*, utilizando a cepa transgênica Tulahuen de *T. cruzi*;
- III. Determinar a atividade leishmanicida, *in vitro*, sobre formas promastigotas de cepas transgênicas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB 0016) e *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263);
- IV. Determinar a atividade leishmanicida, *in vitro*, sobre as formas amastigotas utilizando-se macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectadas com cepas transgênicas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB 0016) e *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263);
- V. Analisar, em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 não infectados, o efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico;
- VI. Quantificar a produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 em sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7 após tratamento *in vitro* com os compostos.

4 METODOLOGIA

Neste trabalho, 19 compostos de síntese foram testados *in vitro* no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular/Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz. A síntese e a avaliação *in silico* foram obtidas em colaboração com os laboratórios de Síntese de Fármacos e de Química Teórica Medicinal, ambos do Depto. De Ciências Farmacêuticas/UFPE.

4.1 COMPOSTOS

As ftalimidas foram sintetizadas a partir da triagem e da identificação de compostos presentes em bancos de dados. Esses compostos foram selecionados por similaridade ao grupo farmacofórico ftalimida e testados *in silico* em importantes alvos de tripanossomatídeos. A síntese e os testes *in silico* foram realizados em colaboração com os laboratórios de Síntese de Fármacos e de Química Teórica Medicinal, ambos do Depto. de Ciências Farmacêuticas/UFPE.

Para os piridil-tiazóis, foram exploradas mudanças bioisostéricas, visando aumento de potência e seletividade, em moléculas dessa classe que haviam mostrado resultados promissores em ensaios tripanocidas e leishmanicidas *in vitro* (Conceição et al., 2023).

Os compostos testados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a -20°C.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Os ensaios antiparasitários foram realizados utilizando a cepa Tulahuen de *T. cruzi* e as cepas WHOM/00LTB 0016 de *L. amazonensis* e MHOM/MA/67/ITMAP-26 de *L. infantum*. Essas cepas foram modificadas geneticamente para expressar a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli*, o que permite a realização de um ensaio colorimétrico. (Buckner et al., 1996; Da Silva Santos et al., 2019).

Os ensaios antiparasitários colorimétricos são significativamente mais eficientes que os métodos tradicionais de contagem manual por microscopia, os quais apresentam baixa sensibilidade, pouca reprodutibilidade e alta demanda de tempo. A modificação genética de parasitas para expressarem a enzima beta-galactosidase de

Escherichia coli permite quantificar a carga parasitária por meio de reações colorimétricas rápidas e simples. A atividade enzimática é detectada após a adição do substrato CPRG, que muda de cor ao ser metabolizado, sendo essa alteração proporcional à quantidade de parasitas transfectados, medida por espectrofotometria. Essa abordagem permite a análise de formas flageladas (promastigotas ou tripomastigotas) e intracelulares (amastigotas), reduz o tempo dos ensaios, aumenta a sensibilidade e viabiliza a triagem de compostos em larga escala (Romanha *et al.*, 2010; Da Silva Santos *et al.*, 2019).

Com isso, os resultados dos ensaios antiparasitários são expressos em forma de IC_{50} , que representa a concentração do composto necessária para inibir 50 % dos parasitas. Mediante a isso, buscam-se compostos com uma IC_{50} inferior à dos fármacos de referência, pois isso indica que baixas concentrações do composto são suficientes para inibir metade dos parasitas, evidenciando a alta potência.

4.2.1 Ensaio Tripanocida Contra as Formas Evolutivas de *T. cruzi*

Para este ensaio, a linhagem de células, a cepa de parasita e o tempo de infecção foram baseados no protocolo estabelecido por Romanha e colaboradores (Romanha *et al.*, 2010).

As células L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços (4000 células por poço) e incubadas por 24 h a 37 °C para sua adesão e multiplicação. Após esse período, houve a infecção na proporção de 10 parasitas/célula. Após 2 h, o meio foi substituído por um novo, a fim de retirar os parasitas que não foram internalizados, e as placas foram incubadas novamente a 37 °C por 48 h. Depois desse período, o meio foi novamente substituído por um novo, e os compostos foram adicionados em oito concentrações (0,78 a 100 µg/mL). Após 96 h de incubação, foi adicionado o substrato da enzima, o CPRG (clorofenol red-β-D-galactopiranosídeo) (500 µM, 0,5 % Nonidet P-40 em tampão salino) e a placa foi novamente incubada a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (Multiskan FC da Thermo Scientific) utilizando um filtro de 570 nm, após 16-20 h. Como controle positivo foi utilizado o benzonidazol (0,78 a 100 µg/mL). Além disso, controles negativos foram utilizadas células sem tratamento e células tratadas com DMSO (concentração máxima de 1 %).

A partir dos valores de inibição do crescimento, foi determinada a concentração capaz de inibir 50 % do crescimento dos parasitas (IC_{50}) de cada composto por meio de interpolação linear com o software Excel (Microsoft Corporation). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Avaliação da atividade dos compostos contra *T. cruzi*

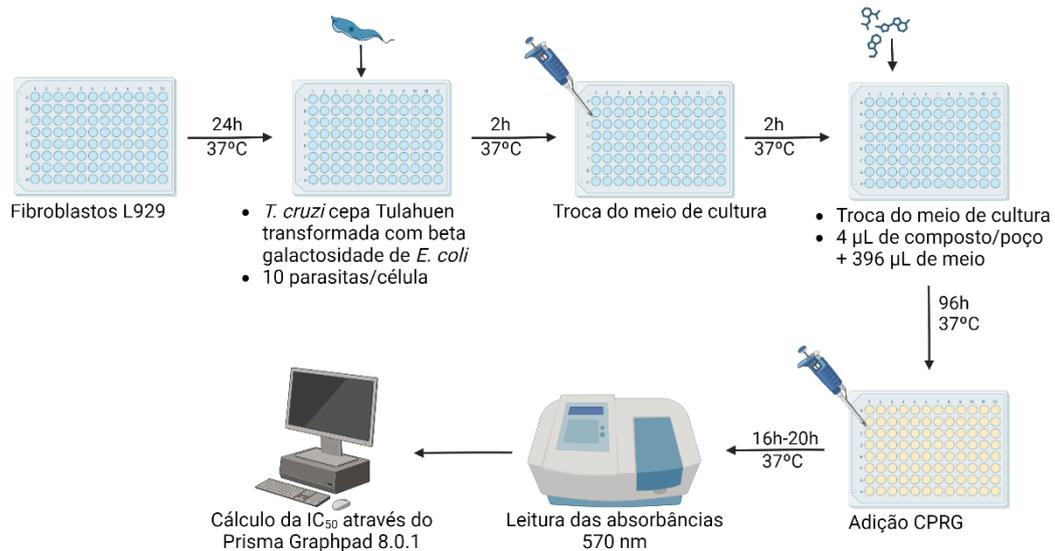


Figura 4 – Ensaio antiparasitário sobre *T. cruzi*, cepa Tulahuen

Legenda: Etapas do ensaio tripanocida utilizando a cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

Fonte: Elaborado pela autora no Biorender.com, 2024.

4.2.2 Ensaio Leishmanicida com Promastigotas

Para a realização do ensaio leishmanicida com a forma promastigota, foram utilizadas as formas promastigotas das cepas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB 0016) e de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) transfectadas com a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli*, as quais foram mantidas em meio Schneider's (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10 % de SFB (Gibco, Brasil) e 2,5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich, EUA) a 26 °C. Os parasitas utilizados estavam na fase exponencial do crescimento.

As formas promastigotas do parasita (1×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 96 poços junto com os compostos em diferentes concentrações (0,78 a 100 µg/mL) e incubadas por 72 h a 27 °C. Após esse período, foi adicionada a solução

de CPRG (500 μM , 0,5% Nonidet P-40 em tampão salino), seguida de uma nova incubação por um período de 10 min e na temperatura de 22 °C. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em um espectrofotômetro (Multiskan FC da Thermo Scientific). A partir da diminuição da atividade da beta-galactosidase das culturas tratadas em relação às não tratadas, foi determinada a IC_{50} de cada composto por análise de regressão não linear utilizando o software *Prisma Graphpad* 8.0.1. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.3 Ensaio Leishmanicida sobre Amastigotas

Para a realização do ensaio leishmanicida com a forma amastigota, foram utilizadas as cepas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB 0016) e de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) transfectadas com a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli*, as quais foram mantidas em meio Schneider's suplementado com 10 % de SFB e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina a 26 °C. Os parasitas utilizados estavam na fase exponencial do crescimento.

Inicialmente, macrófagos RAW 264.7 ($0,2 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueados e incubados a 37 °C e 5 % de CO_2 para adesão. Após 1 h, foram adicionadas as formas promastigotas na proporção de 15 parasitas/célula e as placas ficaram incubadas durante um período de 6 h a 37 °C e 5 % de CO_2 . Passado esse tempo, os poços foram lavados, para retirada de parasitas que não infectaram as células, e os compostos foram adicionados em oito concentrações (0,78–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubados por 24 h, nas mesmas condições citadas anteriormente. Dessa forma, os poços foram lavados novamente e a solução de CPRG foi adicionada e 2-6 h depois a leitura da absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC da Thermo Scientific). A análise dos resultados foi realizada da mesma maneira que no ensaio de promastigota. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Avaliação da atividade dos compostos contra *Leishmania* spp.

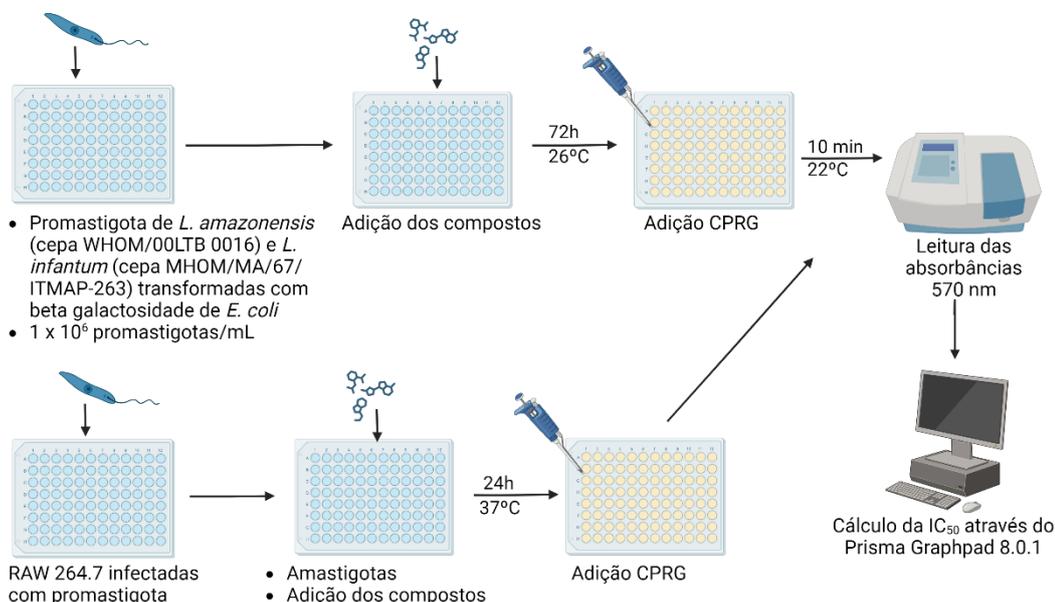


Figura 5 – Ensaios antiparasitário sobre *Leishmania* spp.

Legenda: Etapas do ensaio leishmanicida utilizando as cepas WHOM/00LTB 0016 de *Leishmania amazonensis* e MHOM/MA/67/ITMAP-263 de *Leishmania infantum*.

Fonte: Elaborado pela autora no Biorender.com, 2024.

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as linhagens de macrófagos RAW 264.7 e de fibroblastos L929. Esses tipos de ensaios visam avaliar a atividade das células metabolicamente ativas para entender se o composto apresenta toxicidade ou não para as células. O ensaio de escolha para esse estudo foi o de MTT (Tolosa, Donato e Gómez-Lechón, 2014).

O reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) é um sal capaz de atravessar a membrana de células viáveis devido à sua carga positiva e estrutura lipofílica. Uma vez no interior celular, o MTT é metabolizado por células ativas, resultando na formação de formazan, um composto insolúvel em água e de coloração violeta-azulada. Para permitir a quantificação, adiciona-se um solvente orgânico, como o dimetilsulfóxido (DMSO), que solubiliza o formazan no meio. A absorbância da solução é, então, medida a 570 nm, sendo a densidade óptica (DO) diretamente proporcional à quantidade de formazan formada. Dessa forma, valores

mais elevados de DO indicam maior atividade metabólica, refletindo, conseqüentemente, maior número de células viáveis (Ghasemi *et al.*, 2021).

Dessa forma, os resultados dos ensaios de citotoxicidade são expressos em forma de CC_{50} , que corresponde à concentração de composto necessária para inibir em 50 % a viabilidade celular. Assim, quanto maior a CC_{50} , menor é a toxicidade do composto, pois é preciso uma concentração elevada para que metade das células se tornem inviáveis. Com isso, busca-se identificar compostos com valores de CC_{50} superiores aos dos fármacos de referência, a fim de selecionar os compostos mais seguros para as células mamíferas.

4.3.1 Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos RAW 264.7 e em Fibroblastos L929

Macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929 mantidos em meio RPMI (Gibco, EUA), suplementado com 10 % de SFB (Gibco, Brasil) e GlutaMAX™ (Gibco, USA) 2 mM, e incubados a 37 °C e 5 % de CO₂ foram utilizados para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio MTT.

As células RAW 264.7 ($0,2 \times 10^5$ células/poço) e as L929 ($0,04 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h e 72 h, respectivamente, para adesão e multiplicação. Após isso, foram tratadas com oito concentrações dos compostos (0,78 a 100 µg/mL) e incubadas novamente a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 h e 96 h, respectivamente.

Após esse período, adicionou-se 20 µL/poço de solução de MTT (5 mg/mL em tampão salino) e as placas foram reincubadas por 2 h; posteriormente, o meio de cultura foi descartado e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC da Thermo Scientific). Como controle positivo foram utilizados os fármacos de referência benzonidazol para avaliação contra *T. cruzi* e miltefosina ou anfotericina B para a avaliação leishmanicida. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo e DMSO a 1 % foi utilizado como controle da toxicidade do veículo dos compostos.

A partir dos valores de inibição, foi determinada a concentração citotóxica para 50% de inibição da viabilidade (CC_{50}) de cada composto por meio de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* 8.0.1. Os ensaios foram realizados em duplicata (Silva *et al.*, 2025).

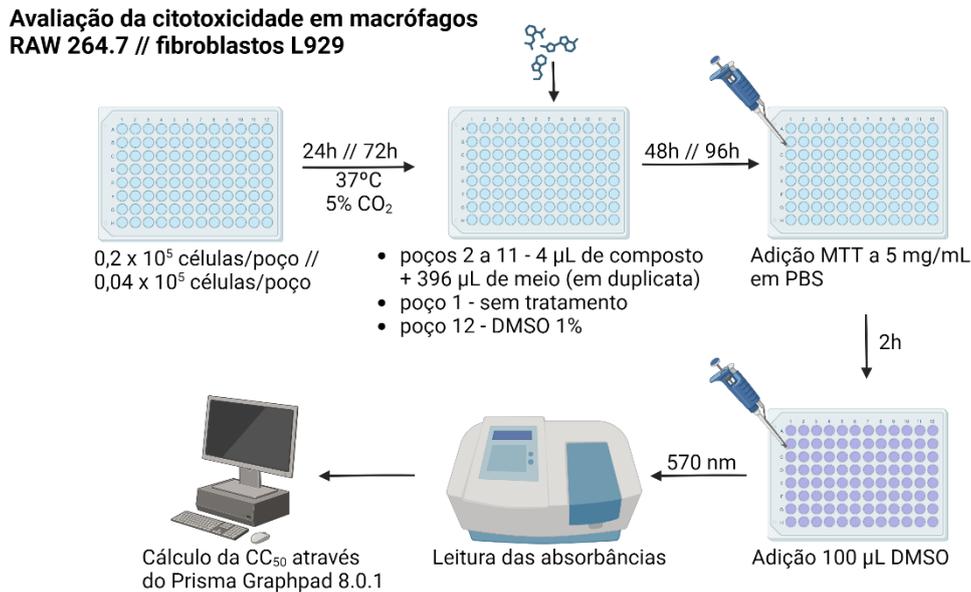


Figura 6 – Ensaio de citotoxicidade MTT

Legenda: Etapas do ensaio de citotoxicidade utilizando linhagens de macrófagos RAW 264.7 e de fibroblastos L929.

Fonte: Elaborado pela autora no Biorender.com, 2024.

4.4 AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO

A avaliação da imunomodulação foi realizada apenas com os compostos que demonstraram um índice de seletividade maior que 50 contra *T. cruzi* e maior que 20 contra *Leishmania* spp., determinado pelos ensaios de citotoxicidade e antiparasitários. Dessa forma, com os compostos selecionados foi realizada a quantificação de óxido nítrico por meio de um ensaio colorimétrico e a dosagem de citocinas através da citometria de fluxo.

4.4.1 Quantificação de Óxido Nítrico

O ensaio de óxido nítrico (NO) se baseia na quantificação indireta dessa molécula por espectrofotometria, devido à sua curta meia-vida em meio fisiológico. Isso resulta na rápida conversão em seus produtos estáveis: nitrito e nitrato. Após a

redução do nitrato a nitrito, ocorre a reação de Griess, em que há a formação de um composto colorido, cuja absorbância a 540 nm é proporcional à concentração de nitrito. Assim, é possível estimar os níveis de NO produzido pelos macrófagos após contato com os compostos, a fim de avaliar se houve estímulo para a produção dessa molécula essencial à morte parasitária (Bryan e Grisham, 2007).

Dessa forma, os macrófagos RAW 264.7, mantidos a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio RPMI suplementado com 10 % de SFB e 2,5 µg/mL de glutamina, foram semeados em placas de 96 poços (0,4 x 10⁵ células/poço) e incubados por 24 h para adesão e crescimento. Após esse período, os compostos e o controle positivo (benzonidazol) foram adicionados em diferentes concentrações: 1xIC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ sobre *T. cruzi* (cepa Tulahuen). Os sobrenadantes das células foram coletados em intervalos de 24, 48, 72 e 144 h após o tratamento das células.

Para quantificar o óxido nítrico (NO), foram transferidos 50 µL do sobrenadante de cada poço para placas de 96 poços, e um volume igual de reagente de Griess (solução contendo 1 % de sulfanilamida e 0,1 % de naftiletilenodiamina di-hidroclorato em 0,3 M de H₃PO₄); as placas foram incubadas por 10 min na bancada, sob proteção contra a luz. Após esse período, a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC da Thermo Scientific). A concentração de NO foi determinada comparando os valores obtidos com a construção de uma curva padrão preparada com nitrito de sódio (NaNO₂) em oito concentrações (400 a 3,12 µg/mL) (Silva *et al.*, 2025).

Quantificação da produção de óxido nítrico



Figura 7 – Ensaio de Griess

Legenda: Etapas do ensaio colorimétrico de quantificação de óxido nítrico por meio da reação de Griess.

Fonte: Elaborado pela autora no Biorender.com, 2024.

4.4.2 Dosagem de Citocinas

A técnica CBA (*Cytometric Bead Array*) é utilizada para quantificação simultânea de múltiplas citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares. Esta metodologia baseia-se na utilização de microesferas (*beads*) com fluorescência diferenciada, cada uma revestida com anticorpos específicos para diferentes citocinas. Ao serem incubadas com a amostra, as citocinas presentes se ligam às microesferas correspondentes. Em seguida, um anticorpo de detecção, marcado com um fluorocromo, liga-se ao complexo formado. A leitura é realizada por citometria de fluxo, na qual cada microesfera é identificada por suas características de fluorescência e tamanho, enquanto a intensidade do sinal fluorescente indica a concentração da citocina na amostra. Assim, é possível quantificar simultaneamente diversas citocinas em uma única amostra, otimizando tempo, reagentes e volume de material. Os dados são analisados comparando os sinais obtidos com curvas-padrão previamente estabelecidas (Medeiros e Gomes, 2019).

A dosagem de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 foi realizada pelo sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) (Kit CBA Camundongo-citocinas Th1/Th2/Th17 da Becton Dickinson-BD), de acordo com as instruções do fabricante. A coleta do sobrenadante foi realizada de forma paralela ao ensaio de NO, com isso, as mesmas condições citadas acima se aplicam a este ensaio. A leitura dos padrões e das amostras foi feita em citômetro de fluxo (BD FACSAria III) e a análise pelo programa *FCAP Array v3* (BD Biosciences) (Silva *et al.*, 2025).

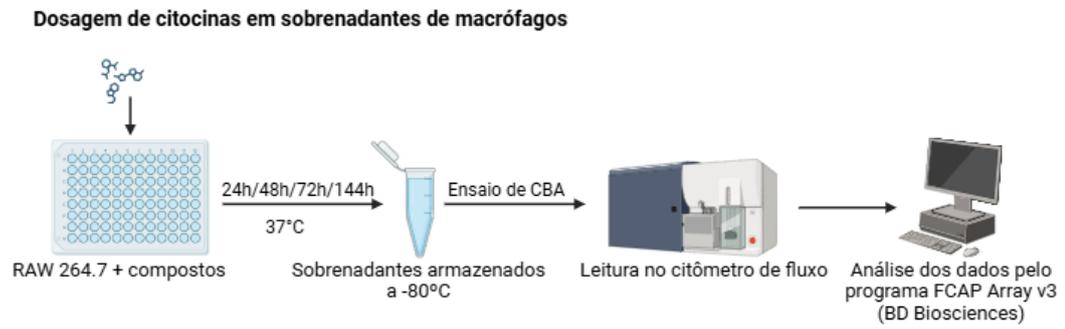


Figura 8 – Ensaio de CBA

Legenda: Etapas do ensaio de quantificação de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 por meio do sistema CBA.

Fonte: Elaborado pela autora no Biorender.com, 2024.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA TULAHUEN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DE CULTIVO CELULAR.

Nos ensaios contra *T. cruzi*, foram testados dois grupos de compostos, sendo eles as 10 ftalimidas e os nove piridil-tiazóis. Em relação às ftalimidas (quadro 1), nenhum dos 10 compostos desse grupo apresentou IC₅₀ semelhante ou inferior ao do fármaco de referência (benzonidazol). Dessa forma, o índice de seletividade (IS) maior que 50 não foi atingido por nenhuma delas, o que indica que esses compostos apresentam baixa atividade antiparasitária contra o *T. cruzi*. Já no grupo dos piridil-tiazóis (quadro 2), todos os compostos apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes ou inferiores ao do benzonidazol; além disso, os compostos 7, 8 e 10 apresentaram IS maior que 50, demonstrando a boa atividade tripanocida *in vitro*. Dessa maneira, os dois melhores compostos avançaram para a próxima etapa desse estudo, que consiste nos ensaios de imunomodulação; assim, os piridil-tiazóis 7 (IS= 520,8) e 10 (IS=257,3) seguiram para esses ensaios.

Composto	IC ₅₀ sobre o parasita ¹ (µg/ mL)	CC ₅₀ sobre L929 ² (µg/ mL)	Índice de Seletividade ³
2	22,94 ± 15,75	10,19 ± 4,36	0,44
3	36,73 ± 3,8	25,29 ± 14,02	0,69
4	26,32 ± 4,41	23,88 ± 26,26	0,91
5	26,32 ± 4,41	30,50 ± 16,35	1,39
6	25,17 ± 11,02	35,95 ± 13,09	1,43
7	19,57 ± 5,3	20,87 ± 4,37	1,07
9	24,68 ± 10,25	26,58 ± 13,93	1,08
11	23,64 ± 19,58	17,95 ± 21,93	0,76
12	28,26 ± 26,48	14,43 ± 14,32	0,51
13	19,61 ± 5,25	25,24 ± 6,2	1,29
Benzonidazol	0,82	>50	>61

Figura 9 – Ensaio da atividade de ftalimidas sobre *T. cruzi* (cepa Tulahuen)

Legenda: ¹Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário da cepa Tulahuen em 50% (amastigotas e tripomastigotas). ²Concentração do composto que inibe a viabilidade das células L929 em 50%. ³CC₅₀ do composto sobre as células L929 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasita (cepa Tulahuen). Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de interpolação linear. Os dados mostrados correspondem à Média ± Desvio-Padrão de duas ou mais réplicas biológicas.

Composto	IC ₅₀ sobre o parasita ¹ (µg/ mL)	CC ₅₀ sobre L929 ² (µg/ mL)	Índice de Seletividade ³
1	0,09	1,1	12,2
2	0,66	2,1	3,2
3	1,6	7,4	4,6
4	0,35	4,7	13,4
5	0,89	31,3	35,2
6	1,2	5,1	4,3
7	0,12	62,5	520,8
8	0,1	6,3	63
10	0,15	38,6	257,3
Benzonidazol	1,1	540	490,9

Figura 10 – Ensaio da atividade de piridil-tiazóis sobre *T. cruzi* (cepa Tulahuen)

Legenda: ¹Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário da cepa Tulahuen em 50% (amastigotas e tripomastigotas). ²Concentração do composto que inibe a viabilidade das células L929 em 50%. ³CC₅₀ do composto sobre as células L929 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasita (cepa Tulahuen). Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de interpolação linear.

5.2 ATIVIDADE DE COMPOSTOS SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS E PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* SPP. EXPRESSANDO BETA-GALACTOSIDASE.

Os ensaios contra *Leishmania amazonensis* (quadro 3) e *L. infantum* (quadro 4) das cepas transgênicas foram realizados apenas com o grupo de compostos dos piridil-tiazóis. Dentre os nove compostos testados, nenhum apresentou IC₅₀ semelhante ou inferior à do fármaco de referência (miltefosina), com isso, nenhum IS foi maior que 20. Dessa forma, os piridil-tiazóis testados não apresentaram atividade leishmanicida satisfatória. É possível que essa baixa atividade antiparasitária frente às *Leishmanias* seja por conta do desenho *in silico* dos compostos ter sido mais voltado para alvos específicos do *T. cruzi* e não para alvos compartilhados pela família Trypanosomatidae.

Composto	IC ₅₀ sobre Promastigotas ¹ (µg/ mL)	IC ₅₀ sobre Amastigotas ¹ (µg/ mL)	CC ₅₀ sobre RAW ² (µg/ mL)	IS ³ (Promastigotas)	IS ⁴ (Amastigotas)
1	2,2	2,9	1,7	0,8	0,6
2	13,1	5,0	5,0	0,4	1,0
3	24,4	10	11,7	0,5	1,2
4	Inativo	Inativo	6,2	-	-
5	59,4	Inativo	14,6	0,2	-
6	10,7	5,7	4,9	0,5	0,9
7	37,7	2,9	5,4	0,1	1,9
8	Inativo	2,5	5,4	-	2,2
10	Inativo	Inativo	12,0	-	-
Miltefosina	1,3	0,68	8,9	6,8	13,1

Figura 11 – Ensaio sobre *L. amazonensis* cepa WHOM/00LTB 0016 - piridil-tiazóis

Legenda: ¹Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário em 50%. ²Concentração do composto que inibe a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 em 50%. ³CC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre promastigotas. ⁴CC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre amastigotas. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração do composto em análise. Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de análise de regressão não linear usando o programa *GraphPad Prism* 8.0.1.

Composto	IC ₅₀ sobre Promastigotas ¹ (µg/ mL)	IC ₅₀ sobre Amastigotas ¹ (µg/ mL)	CC ₅₀ sobre RAW ² (µg/ mL)	IS ³ (Promastigotas)	IS ⁴ (Amastigotas)
1	1,6	2,6	1,7	1,1	0,7
2	6,8	4,2	5,0	0,7	1,2
3	17,3	5,8	11,7	0,7	2,0
4	Inativo	11,8	6,2	-	0,5
5	70,7	Inativo	14,6	0,2	-
6	6,9	4,1	4,9	0,7	1,2
7	1,6	30,3	5,4	3,4	0,2
8	56,4	30,1	5,4	0,1	0,2
10	Inativo	31,9	12,0	-	0,4
Miltefosina	1,3	0,7	8,9	6,8	12,7

Figura 12 – Ensaio sobre *L. infantum* cepa MHOM/MA/67/ITMAP-26 - piridil-tiazóis

Legenda: ¹Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário em 50%. ²Concentração do composto que inibe a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 em 50%. ³CC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre promastigotas. ⁴CC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre amastigotas. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração do composto em análise. Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de análise de regressão não linear usando o programa *GraphPad Prism* 8.0.1.

5.3 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS ESTIMULAÇÃO COM OS PIRIDIL-TIAZÓIS 7 E 10.

Os piridil-tiazóis 7 e 10 foram selecionados para o ensaio de óxido nítrico, pois apresentaram um IS superior a 50 nos ensaios contra *T. cruzi*. Nesse contexto, o controle positivo utilizado foi o benzonidazol. Dentre os quatro tempos avaliados, observou-se (figura 13) que a produção foi mais expressiva nos tempos de 72 e 144 h, no entanto, apenas o composto 10, na concentração de 4xIC₅₀, induziu um aumento estatisticamente significativo na produção de NO em comparação ao grupo controle não tratado.

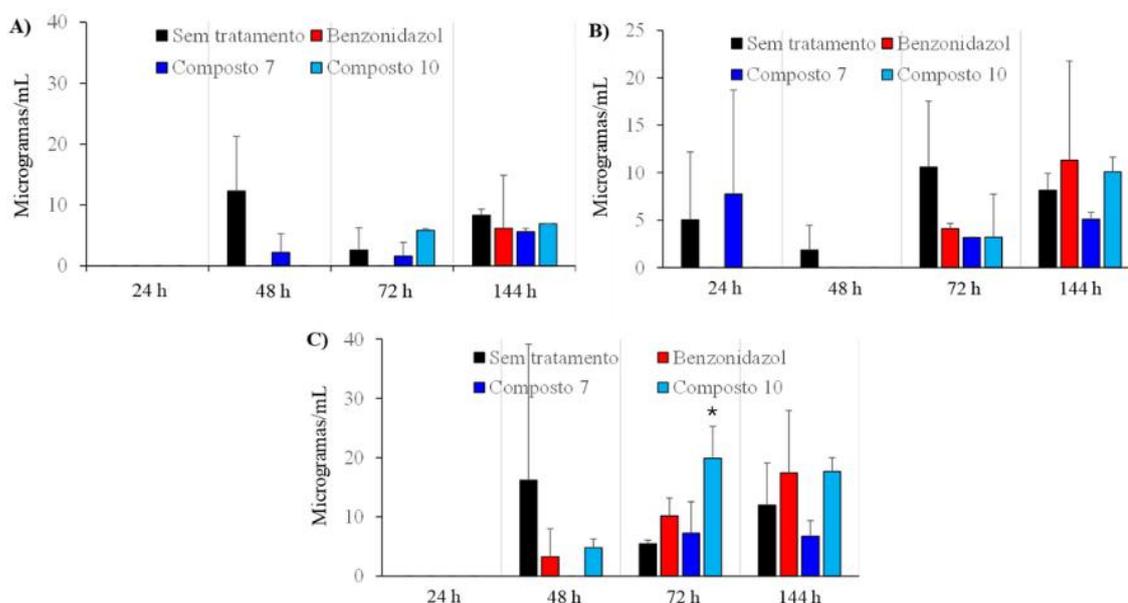


Figura 13 – Produção de óxido nítrico

Legenda: Produção de óxido nítrico ($\mu\text{g/mL}$) produzido por células RAW 264.7 após estimulação com os compostos 7 e 10, assim como o controle positivo, benzonidazol. Os sobrenadantes das culturas foram coletados em diferentes tempos pós-tratamento (24, 48, 72 e 144 h) em três concentrações dos compostos: (A) $1 \times \text{IC}_{50}$ sobre *T. cruzi* (cepa Tulahuén), (B) $2 \times \text{IC}_{50}$ e (C) $4 \times \text{IC}_{50}$. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de duas réplicas técnicas. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o grupo não tratado, utilizando ANOVA unidirecional (*One-way ANOVA*) com o teste de comparações múltiplas de Dunnett.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS ESTIMULAÇÃO COM OS PIRIDIL-TIAZÓIS 7 E 10.

Os piridil-tiazóis 7 e 10 foram selecionados para o ensaio de quantificação de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, pois apresentaram um IS superior a 50 nos ensaios contra *T. cruzi*. Nesse contexto, o controle positivo utilizado foi o benzonidazol. Os compostos piridil-tiazóis 7 e 10, assim como o benzonidazol, induziram um aumento na produção de IL-6 (figura 14 - A e B) e uma redução nos níveis de IL-10 (figura 14 - C e D), em comparação com as células não tratadas. A IL-6 está associada à resistência à infecção por *T. cruzi*, enquanto a IL-10 está relacionada à suscetibilidade, assim, esses resultados sugerem que os compostos são capazes de estimular uma resposta pró-inflamatória, o que é interessante para a eliminação do parasita. Em relação ao TNF, foi observada uma redução na produção

em células tratadas com o composto 7 (figura 14 - E), enquanto o composto 10 não apresentou efeito significativo (figura 14 - F). As demais citocinas avaliadas (IL-2, IL-4, IL-17 e IFN- γ) não foram detectadas em nenhuma das condições testadas.

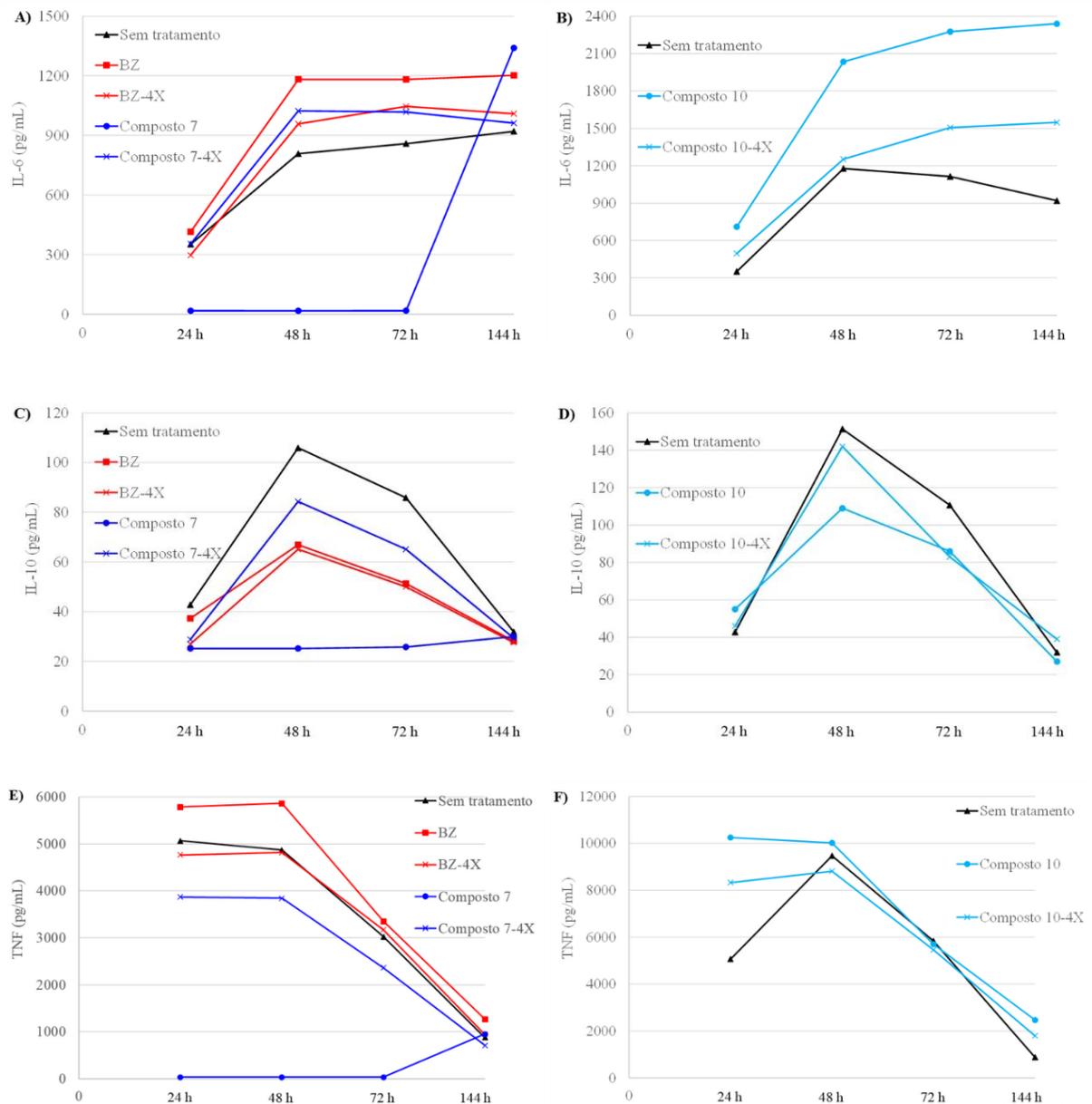


Figura 14 – Produção de citocinas

Legenda: Capacidade de modulação de citocinas (pg/mL) IL-6 (A e B), IL-10 (C e D) e TNF (E e F), produzidas por células RAW 264.7 após estimulação com os compostos 7 e 10, assim como o controle positivo, benzonidazol (BZ). Os sobrenadantes das culturas foram coletados em diferentes tempos pós-tratamento (24, 48, 72 e 144 h) com duas concentrações dos compostos: 1xIC₅₀ e 4xIC₅₀ sobre *T. cruzi* (cepa Tulahuen).

6 CONCLUSÃO

- Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com os 19 compostos do estudo, a fim de possibilitar o cálculo do índice de seletividade.
- Os ensaios tripanocidas foram conduzidos com as dez ftalimidas e os nove piridil-tiazóis, a fim de avaliar se os compostos apresentam atividade contra o *T. cruzi*. Nenhuma das dez ftalimida apresentou boa atividade antiparasitária e dos nove piridil-tiazóis, os compostos 7, 8 e 10 apresentaram alta seletividade ($IS \geq 50$).
- Os ensaios antiparasitários com promastigotas e com amastigotas de *L. amazonensis* e de *L. infantum* foram conduzidos com os nove piridil-tiazóis. Todos os compostos se mostraram inativos ou com pouca atividade leishmanicida.
- Os piridil-tiazóis 7 e 10 foram selecionados para a avaliação da produção de óxido nítrico. O composto 10, na concentração de $4 \times IC_{50}$, foi capaz de induzir o aumento na produção de NO.
- O ensaio de dosagem de citocinas foi realizado com os piridil-tiazóis 7 e 10 e com o benzonidazol. As citocinas dosadas foram IL-6, IL-10 e TNF, as outras citocinas do kit (IL-2, IL-4, IL-17 e IFN- γ) não foram detectadas. Os compostos 7 e 10 foram capazes de estimular a produção de IL-6 e diminuir a de IL-10, enquanto a produção de TNF foi induzida somente pelo piridil-tiazol 7. Esse perfil de indução é interessante, pois apresenta um caráter pró-inflamatório, o que leva à eliminação do parasita.

Mediante a esses resultados, os piridil-tiazóis 7 e 10 demonstraram serem potenciais candidatos a fármacos contra a doença de Chagas, pois, nos estudos *in vitro*, apresentaram potente atividade tripanocida e foram capazes de induzir uma imunomodulação pró-inflamatória. Dessa forma, reforça-se a necessidade de estudos adicionais, como os ensaios *in vivo*, para validar o potencial terapêutico e otimizar o perfil farmacológico desses compostos que são promissores fármacos contra a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
- AGAMAH, F. E. et al. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 1663–1675, 2020.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana: dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net [a]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 20 mar. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral: dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net [b]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 20 mar. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net [c]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/chagasbr.def>. Acesso em: 20 mar. 2025.
- BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.
- BUCKNER, F. S. *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Leishmaniasis. [S.l.], 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 25 mar. 2025.
- CONCEIÇÃO, J. M. DA *et al.* Structural design, synthesis, and anti-Trypanosomatidae profile of new Pyridyl-thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 254, n. 115310, p. 115310, 2023.
- CUCUNUBÁ, Z. M. *et al.* The epidemiology of Chagas disease in the Americas. **Lancet Regional Health Americas**, v. 37, n. 100881, p. 100881, 2024.
- DA SILVA SANTOS, A. C. *et al.* Assessment of Leishmania cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 166, n. 105732, p. 105732, 2019.

DE ALBA-ALVARADO, M. C. *et al.* The Functions of Cytokines in the Cardiac Immunopathogenesis of Chagas Disease. **Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 870, 2024.

DNDi. Chagas disease: Facts. [S.l.], 2024. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>. Acesso em: 30 mar. 2025.

DNDi. Leishmaniose cutânea [a]. [S.l.], 2023. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-cutanea/>. Acesso em: 25 mar. 2025.

DNDi. Leishmaniose visceral [b]. [S.l.], 2023. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-visceral/>. Acesso em: 25 mar. 2025.

DNDi. Making Medical History to Meet the Needs of Neglected Patients: Annual Report 2018. Geneva: DNDi, 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/07/DNDi_2018_AnnualReport.pdf. Acesso em: 16 mar. 2025

DNDi. Neglected Tropical Diseases. [S.l.], [s.d.]a. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/neglected-tropical-diseases/>. Acesso em: 25 mar. 2025.

DNDi. Our Story: 20 Years of DNDi. [S.l.], [s.d.]b. Disponível em: <https://dndi.org/about/our-story-20-years-dndi/>. Acesso em: 6 abr. 2025.

FERREIRA, A. M. *et al.* Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 27, n. 3, p. 354–362, 2019.

FIOCRUZ. Ciclo evolutivo do parasita. Disponível em: <https://web.archive.org/web/20241004064650/https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 25 mar. 2025.

GHASEMI, M. *et al.* The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

GOMES, P. A. T. M. *et al.* Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46-57, 2016.

GOUVEIA DE MELO SILVA, V. *et al.* New series of 3-pyridyl-1,3-thiazoles: *in vitro* and *in vivo* anti-Trypanosomatidae profile, *in vitro* and *in silico* mechanism of action approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 284, n. 117191, p. 117191, 2025.

J, B.; M, B. M.; CHANDA, K. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases-leishmaniasis and Chagas diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 622286, 2021.

LOSADA GALVÁN, I. *et al.* Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 19, n. 5, p. 547–556, 2021.

MANSOLDO, F. R. P. *et al.* Chagas disease: Perspectives on the past and present and challenges in drug discovery. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 22, p. 5483, 2020.

MEDEIROS, N. I.; GOMES, J. A. S. Cytometric bead array (CBA) for measuring cytokine levels in Chagas disease patients. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1955, p. 309–314, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Leishmaniose visceral [a]. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 25 mar. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). LT [b]. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>. Acesso em: 25 mar. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. [S.l.]: [s.n.], 2017. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 25 mar. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. [S.l.]: [s.n.], 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceras_1edicao.pdf. Acesso em: 25 mar. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Nota informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS-MS. [S.l.]: [s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/nota-informativa-no-13-2020-cgzv-deidt-svs-ms>. Acesso em: 25 mar. 2025. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Nota informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS-MS. [S.l.]: [s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/nota-informativa-no-13-2020-cgzv-deidt-svs-ms>. Acesso em: 25 mar. 2025.

NEVES, Davi Pereira. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 941-955, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana). [S.l.], 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 6 mar. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Leishmaniose. [S.l.]: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 25 mar. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Neglected tropical diseases. [S.l.], 2025. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 2 abr. 2025.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Doença de Chagas. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/doenca-chagas#2>. Acesso em: 31 mar. 2025.

PAVANELLI, W. R. Citocinas e óxido nítrico na Doença de Chagas. **Biosaúde**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 2008.

ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SILVA, J. S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862–4867, 1995.

SILVA, J.; OLIVEIRA, M. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Production Research**, [S.l.], v. 45, n. 8, p. 1567–1580, 2007.

TOLOSA, L.; DONATO, M. T.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1250, p. 333–348, 2015.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 67, 2018.