



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

MARIA JULHA FELIX PEREIRA

**TRIAGEM *IN SILICO* (ADMET) NA ESTRUTURA DOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS E
ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* COMO AGENTES LEISHMANICIDAS DE *LEISHMANIA*
*BRAZILIENSIS***

Recife

2025

MARIA JULHA FELIX PEREIRA

**TRIAGEM *IN SILICO* (ADMET) NA ESTRUTURA DOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS E
ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* COMO AGENTES LEISHMANICIDAS DE *LEISHMANIA*
*BRAZILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestra. Área de concentração: Protozooses
Correspondente ao indicado na ata de defesa.

Orientador (a): Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Coorientador (a): Profa. Dra. Francisca Janaina Soares Rocha

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Pereira, Maria Julha Felix.

Triagem in Silico (ADMET) na estrutura dos Indol-Tiossemicarbazonas e atividade biológica in vitro como agentes Leishmanicidas de Leishmania Braziliensis / Maria Julha Felix Pereira. - Recife, 2025.

98f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2025.

Orientação: Vláudia Maria Assis Costa.

Coorientação: Francisca Janaina Soares Rocha.

Inclui referências, anexo e apêndice.

1. Indol tiossemicarbazona; 2. Leishmania Braziliensis; 3. In silico; 4. In vitro. I. Costa, Vláudia Maria Assis. II. Rocha, Francisca Janaina Soares. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MARIA JULHA FELIX PEREIRA

**TRIAGEM *IN SILICO* (ADMET) NA ESTRUTURA DOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS E
ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* COMO AGENTES LEISHMANICIDAS DE *LEISHMANIA*
*BRAZILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 27/02/2025

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com gratidão e carinho à minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, apoio e compreensão ao longo de toda a minha trajetória. A todos que acreditaram em mim, que me inspiraram e motivaram a seguir em frente, mesmo nos momentos de dificuldade.

Aos meus orientadores e professores, pela orientação, paciência e pelas valiosas contribuições ao longo deste processo.

E, especialmente, aos meus amigos, que compartilharam comigo alegrias e desafios ao longo dessa caminhada, tornando essa jornada ainda mais especial.

Esta dissertação é, sem dúvida, o resultado de um esforço coletivo e de muito apoio. Obrigado a todos por fazerem parte dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela graça e sabedoria que me permitiram trilhar este caminho. À minha Nossa Senhora da Assunção por interceder por mim a Deus, me cobrir com seu manto protetor de mãe e não deixar que nada de mal me acontecesse. Aos meus pais, meu irmão e meu noivo Tarso, por todo o amor, apoio incondicional e confiança ao longo de toda minha trajetória. Vocês foram minha base e motivação para seguir sempre em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha orientadora Vláudia, pela orientação, paciência, incentivo e conhecimento compartilhado. Agradeço também a minha co-orientadora Janaína Rocha e aos demais professores que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento. Em especial, gostaria de expressar minha sincera gratidão a Iranildo Cruz e à Prof. Maria do Carmo pelo fornecido dos compostos indólicos tiosemicarbazônicos, essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório Tairla e Emily, por todo o companheirismo, trocas de ideias, ensinamentos e apoio nos momentos. Juntas, enfrentamos os desafios da pesquisa com leveza.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, agregaram para o desenvolvimento da minha formação e para a conclusão deste trabalho.

“*Se não se arriscar algo por Deus, nada de grande se fará*” (São Luis Maria Grignion de Montfort).

RESUMO

A leishmaniose continua sendo um grave problema de saúde pública, agravado pelo surgimento contínuo de cepas resistentes. Predominantemente presente em países em desenvolvimento, essa doença demanda o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, seguros e acessíveis. Na América Latina, a *Leishmania braziliensis* é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea. No contexto da busca por novos tratamentos, compostos como tiossemicarbazonas e fragmentos de indol têm demonstrado potencial leishmanicida promissor. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades *in silico* de novos derivados de indol-tiossemicarbazona, bem como realizar ensaios *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos peritoneais e fibroblastos L929, ensaio da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e a determinação do índice de seletividade. As análises preditivas *in silico* de ADMET indicaram que as moléculas avaliadas apresentam alta permeabilidade intestinal, boa absorção por células Caco-2 e pela epiderme, sugerindo potencial para administração oral ou transdérmica. Nos testes de citotoxicidade, os compostos apresentaram valores de CC₅₀ entre 55 e >200 µM, indicando baixa toxicidade para células de mamíferos. Quanto à atividade contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, os valores de IC₅₀ variaram entre 6,74 e 14,09 µM. Os compostos LT79 e LT71 destacaram-se como os mais promissores da série, com índices de seletividade de 14,66 e 7,8, respectivamente. Portanto, os derivados de indol-tiossemicarbazona mostraram-se promissores como agentes leishmanicidas, combinando baixa citotoxicidade com boa eficácia antiparasitária. Essa atividade pode estar relacionada à presença do grupamento indol e a substituições na posição N-4 das tiossemicarbazonas. Como próxima etapa, a pesquisa prevê a realização de ensaios com formas amastigotas do parasita, bem como testes *in vivo* com os compostos mais promissores identificados neste estudo.

Palavras-chave: Leishmaniose; Derivados sintéticos; indol; tiossemicarbazonas.

ABSTRACT

Leishmaniasis remains a serious public health issue, exacerbated by the continuous emergence of drug-resistant strains. Predominantly affecting developing countries, this disease demands the development of more effective, safer, and affordable treatments. In Latin America, *Leishmania braziliensis* is the primary causative agent of cutaneous leishmaniasis. In the search for new treatments, compounds such as thiosemicarbazones and indole fragments have shown promising leishmanicidal potential. This study aimed to evaluate the *in silico* properties of novel indole-thiosemicarbazone derivatives, as well as to conduct *in vitro* cytotoxicity assays on peritoneal macrophages and L929 fibroblasts, alongside leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis* promastigotes and the determination of the selectivity index. *In silico* ADMET predictions indicated that the studied molecules have high intestinal permeability and good absorption through Caco-2 cells and the epidermis, suggesting potential for oral or transdermal administration. In cytotoxicity assays, the compounds showed CC₅₀ values ranging from 55 to >200 μ M, indicating low toxicity to mammalian cells. Regarding activity against *L. braziliensis* promastigotes, IC₅₀ values ranged from 6.74 to 14.09 μ M. Compounds LT79 and LT71 emerged as the most promising in the series, with selectivity indices of 14.66 and 7.8, respectively. Therefore, the indole-thiosemicarbazone derivatives demonstrated promise as leishmanicidal agents, combining low cytotoxicity with effective antiparasitic activity. This activity may be associated with the presence of the indole moiety and substitutions at the N-4 position of the thiosemicarbazones. As a next step, the research aims to conduct assays against amastigote forms of the parasite, as well as *in vivo* tests with the most promising compounds identified in this study.

Keywords: Leishmaniasis; Synthetic derivatives; indole; thiosemicarbazones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Contextos históricos	17
Figura 2 -	Fase amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 3 -	Aspectos estruturais da <i>Leishmania</i>	21
Figura 4 -	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 5 -	Mecanismo de invasão de <i>Leishmania</i>	24
Figura 6 -	Captação mediada por neutrófilos	25
Figura 7 -	Cavalo de troia	29
Figura 8 -	Resposta Imune Th1 e Th2	30
Figura 9 -	Estrutura do fármaco Antimônio de meglumina	32
Figura 10-	Estrutura do fármaco Pentamidina	33
Figura 11 -	Estrutura do fármaco Miltefosina	34
Figura 12 -	Estrutura do fármaco Paramomicina	35
Figura 13-	Estrutura do fármaco Anfotericina B	36
Figura 15 -	Estrutura da Tiossemicarbazona	38
Figura 16-	Mecanismo de formação de compostos intermediários	39
Figura 17 -	Mecanismo de formação dos indol tiossemicarbazonas	39
Figura 18 -	Estrutura geral da tiossemicabazona sintética	40
Figura 19 -	Estrutura do indol	42
Figura 20 -	Isósteros do núcleo indólico	43
Figura 21 -	Estruturas de substâncias que apresentam subunidade indol	44
Figura 22 -	Diagrama de síntese dos compostos indol tiossemicarbazonas	46
Figura 23 -	Compostos sintéticos indol tiossemicarbazonas	47
Figura 24 -	<i>Bioavailability</i> Radar	49
Figura 25 -	Gráfico BOILED – Egg	50
Figura 26-	Curva de crescimento LTB 2903 durante 10 dias	51
Figura 27 -	Fluxograma de extração de macrófagos	52
Figura 28 -	Linhagem celular de fibroblastos	53
Figura 29 -	Método colorimétrico com resazurina	55
Figura 30-	Radar de biodisponibilidade oral	58
Figura 31-	BOILLED – EGG	59
Figura 32-	Perfil inibitório dos compostos LT 71 e LTc71 sobre promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	66
Figura 33-	Perfil inibitório dos compostos LT 79 e LTc79 sobre promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	67
Figura 34 -	Citotoxicidade dos LT 79 e LTc79	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Farmacos utilizados na clínica	37
Tabela 2 -	Radicais adicionados nos compostos indol tiossemicarbazonas	48
Tabela 3 -	Resultados <i>in silico</i> para predição de solubilidade em água	56
Tabela 4 -	Propriedade fisico-químicas ADMET	57
Tabela 5 -	Perfil farmacocinético durante absorção, distribuição, metabolização, excreção e efeitos tóxicos dos compostos indol tiossemicarbazonas	60
Tabela 6 -	Atividade leishmanicida, efeitos citotóxicos contra macrófagos peritoneiais, fibroblastos e valores de índice de seletividade calculados dos compostos indol tiossemicarbazonas	66

LISTA DE TABELAS

ADMET -	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
AnB -	Anfotericina B
BBB -	Barreira Hematoencefálica
DTN -	Doenças tropicais negligenciadas
DCs -	Células Dendríticas
DMSO -	Dimetilsulfóxido
FDA -	<i>Food and drug administration</i>
HIA -	<i>Human intestinal absorption</i>
LTA -	Leishmaniose tegumentar Americana
LT -	Leishmaniose Tegumentar
LCL -	Lesões cutâneas localizadas
LV -	Leishmaniose visceral
LPG -	Lipofosfoglicano
MAC -	Complexo de ataque a membrana
MM -	Massa molar
NK -	Natural Killer
NO -	Óxido nítrico
OMS -	Organização Mundial da saúde
PBS -	Salina tamponada com fosfato
PSG -	Proteofosfoglicanos
P-gp -	Glicoproteína P
PMNs -	Neutrófilos
NK -	Natural Killer
RRRs-	Receptores de reconhecimento padrão
SFB -	Soro fetal bovino
TLRs -	Toll-like receptors
TSC -	Tiossemicarbazona
TPSA -	Superfície topológica polar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.DADOS HISTÓRICOS	17
2.2.ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	19
2.3.ASPECTOS BIOLOGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	19
2.4.CICLO BIOLÓGICO	23
2.5.RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	24
2.5.1. ATUAÇÃO DO SISTEMA IMUNE INATO	23
2.5.2. ATUAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO	29
2.5.3. INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	31
2.6. FARMACOTERAPIA	31
2.6.1 ANTIMONIAIS PENTAVALENTES	31
2.6.2 PENTAMIDINA	33
2.6.3 MILTEFOSINA	34
2.6.4 PARAMOMICINA	34
2.6.5 ANFOTERICINA B	35
2.7. TIOSSEMICARBAZONA	37
2.8. INDOL	39
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVOS GERAIS	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. METODOLOGIA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS	77
8. APÊNDICE	91
8.1 ANEXO A (ARTIGO)	91

1 INTRODUÇÃO

Leishmania (Viannia) braziliensis é uma subespécie do gênero *Leishmania* do Novo Mundo, considerada um dos principais agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar (LT) nas Américas (ALVAR et al., 2012). A infecção causada por essa espécie pode se manifestar clinicamente de forma variada, desde lesões cutâneas localizadas (LCL) até formas mucocutâneas disseminadas e graves, que podem resultar em mutilações faciais (JIMENEZ et al., 2012).

O tratamento farmacológico da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é frequentemente refratário, ou seja, muitos pacientes não respondem de forma eficaz à terapia convencional. Isso pode ocorrer devido à resistência intrínseca ou adquirida do parasito aos fármacos utilizados, à variabilidade genética das cepas e às características imunológicas do hospedeiro. Como consequência, o tratamento incompleto ou ineficaz permite a persistência do parasito no organismo, favorecendo sua disseminação para outros tecidos, como as mucosas nasais e orais, o que pode levar à forma mucocutânea grave da doença, associada a complicações como úlceras extensas, destruição tecidual e mutilações faciais (JIMENEZ et al., 2012).

Além disso, a droga de primeira escolha apresenta uso limitado devido aos efeitos colaterais severos e à alta toxicidade, o que compromete a adesão ao tratamento e aumenta o risco de falha terapêutica (SANTIAGO et al., 2021). As leishmanioses são prevalentes, sobretudo, em países em desenvolvimento, e a busca por novas alternativas terapêuticas — menos tóxicas, mais eficazes, seguras e acessíveis — tornou-se essencial para o manejo adequado da população afetada (LEPROHON et al., 2015).

As tiossemicarbazonas pertencem à família das iminas e são classificadas como bases de Schiff, por se tratarem de moléculas estáveis com potencial para diversas aplicações farmacológicas. Dentre essas atividades, destaca-se o efeito antiparasitário, amplamente descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2016; HELAL et al., 2013). Devido à possibilidade de modificação estrutural por meio da inserção de diferentes radicais, essas moléculas têm despertado o interesse da medicina moderna, pois essa versatilidade permite a obtenção de derivados com propriedades biológicas favoráveis, contribuindo para o avanço de novas abordagens terapêuticas (MENDES et al., 2019; JACOB et al., 2023).

Avanços nas pesquisas com foco em agentes anti-*Leishmania* têm correlacionado a estrutura química e a atividade biológica de diversos compostos, destacando as tiossemicarbazonas como candidatos promissores no desenvolvimento de novos fármacos (GUPTA et al., 2021). Em estudo conduzido por Thiago e colaboradores (2022), observou-se atividade significativa de

derivados de tiossemicarbazona contra formas amastigotas de *Leishmania chagasi*, com valores de IC_{50} variando entre 0,6 e 7,27 μM . Além disso, os compostos foram considerados não tóxicos às células hospedeiras (AQUINO et al., 2022). De maneira semelhante, Iris e colaboradores (2022) identificaram atividade leishmanicida dessas moléculas contra cepas de *Leishmania amazonensis*, reforçando seu potencial terapêutico.

O núcleo indol, presente na estrutura química de diversos fármacos clinicamente utilizados, é considerado um grupo farmacofórico importante, sendo amplamente reconhecido por sua versatilidade e atividade biológica (BATLOUNI, 2009). Este núcleo está presente em várias substâncias bioativas com propriedades anticancerígenas, antimicrobianas e antiparasitárias. As tiossemicarbazonas, por sua vez, são conhecidas por suas atividades antitumorais, antimicrobianas e antiparasitárias, tornando-se alvo de interesse no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A união entre o núcleo indol e a estrutura das tiossemicarbazonas representa uma estratégia promissora, capaz de gerar compostos com perfis farmacológicos potencialmente aprimorados, especialmente pela possibilidade de interação sinérgica com alvos moleculares como enzimas parasitárias (BATLOUNI, 2009; KUMAR et al., 2020).

A síntese desses compostos envolve a reação de tiossemicarbazonas com intermediários contendo o núcleo indol. Estudos realizados por Da Silva et al. (2019) avaliaram a atividade microbida de compostos indólico tiossemicarbazonas contra cepas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*.

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade dos compostos indol-tiossemicarbazonas como potenciais agentes Leishmanicida contra *Leishmania braziliensis*, bem como realizar análises *in silico* para prever as propriedades de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) desses compostos, investigando seu potencial como fármacos. Além disso, buscou-se correlacionar a estrutura química das moléculas com sua atividade biológica contra cepas de *L. braziliensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dados Históricos

A existência de espécies semelhantes ao gênero *Leishmania* é relatada desde tempos pré-históricos, inicialmente documentada por meio de fósseis. O primeiro fóssil reconhecido foi encontrado na probóscide e no trato alimentar de uma fêmea preservada em âmbar birmanês do período Cretáceo, datado de aproximadamente 100 milhões de anos (POINAR et al., 2004; STERVERDING et al., 2017). Evidências indicam que o gênero *Leishmania* evoluiu durante a era Mesozóica (SOCCOL et al., 1903), embora a diferenciação entre suas espécies ainda seja objeto de debate científico.

Figura 1 – Contextos históricos sobre a descoberta e caracterização do gênero *Leishmania*



Fonte: Autora (2025).

Tempos antigos

As leishmanioses são mencionadas em registros antigos, com relatos que datam desde o Papiro de Ebers, um dos documentos médicos mais antigos da história, encontrado no Egito, que remonta aproximadamente a 1500 a.C. Nesse texto, é descrita uma condição de pele conhecida em inglês como “Nile Pimple”, que possivelmente corresponde à leishmaniose cutânea (MASPERO et al., 1910).

Um estudo paleoparasitológico realizado em 42 múmias egípcias de uma tumba do Império

Médio em Tebas Ocidental (2050–1650 a.C.) detectou DNA de *Leishmania donovani* em quatro amostras, confirmando a presença da doença desde a antiguidade. De forma semelhante, uma análise imunológica identificou macrófagos infectados por *Leishmania* em uma múmia peruana datada de aproximadamente 800 a.C., evidenciando a ocorrência da doença também no continente americano nessa época (ZINK et al., 2006; FRÍAS et al., 2013). **(Figura 1)**

Idade Média

Na América, entre os anos 400 e 900 d.C., foi constatada a presença das doenças já sugeridas nos registros antigos, comprovada por representações em cerâmicas peruanas e equatorianas que mostram faces humanas com mutilações no nariz e nos lábios (NEVES, 1998) (Figura 1). Além disso, existem remanescentes humanos dessa época que reforçam a ocorrência dessas patologias na região.

Tempos Modernos

No século XVI, o cronista Pizarro e outros (1533) descreveram as primeiras manifestações clínicas da doença em indígenas dos Andes, relatando que ela acometia os povos nativos e causava destruição do nariz e das cavidades bucais. Somente em 1764, Bueno identificou que essa enfermidade era transmitida por um flebotomíneo (VERONESI et al., 1996; NEVES, 1998).

Paralelamente, em 1586, o clérigo Rodrigo de Loayza, ao visitar terras andinas habitadas por cultivadores de coca no Peru, nas regiões de Huánuco e Junín, comparou as doenças infecciosas locais às encontradas na região amazônica, destacando a semelhança no comprometimento da mucosa nasal (LAINSON, 2010). Segundo Lianos-Cuentas et al. (1992), essa região permaneceu endêmica para o parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* por muitos anos (DAVIES et al., 1995).

Com o passar do tempo, vários relatos de infecções cutâneas sugestivas de úlcera foram documentados, sendo que muitas dessas feridas receberam nomes relacionados ao local onde foram contraídas, como, por exemplo, a “fervura de Alepo” (MARSON, 1997). No início do século XX, em novembro de 1900, o patologista escocês William Boog Leishman, enquanto servia no Exército Britânico na Índia, observou corpos ovóides em esfregaços microscópicos. Posteriormente, ele encontrou os mesmos corpos em um rato. A primeira publicação sobre esses achados, em 1903, sugeriu que tais corpos ovóides eram formas de tripanossomíase (LEISHMAN, 1903).

Semanas depois, o médico e professor Charles Donovan publicou um artigo relatando a descoberta de corpos semelhantes em amostras esplênicas durante autópsias de povos nativos que

havia morrido com febre remitente e baço aumentado (DONOVAN, 1903). Paralelamente, o médico Ronald Ross foi designado para investigar o calazar na Índia e, em 1903, comentou sobre as publicações de Leishman e Donovan, concluindo que os corpos não eram tripanossomas, mas sim um novo protozoário, pois o quadro clínico dos pacientes assemelhava-se aos casos estudados por ele. No final de 1904, o termo *Leishmania donovani* foi adotado para denominar o parasito, reconhecido como pertencente a um novo gênero (ROSS, 1903).

Em 1914, Gaspar Vianna identificou o agente *Leishmania braziliensis* por meio da análise de numerosos casos ocorridos entre funcionários que construíam a Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, em 1908, doença que passou a ser conhecida como “úlcera-de-bauru” (YOSHIDA et al., 1990). Além da identificação do agente, Vianna foi pioneiro na elaboração da primeira farmacoterapia para a doença, oferecendo uma nova perspectiva de tratamento aos pacientes, que até então não dispunham de terapia eficaz (VIANNA, 1914) (Figura 1).

2.2 Aspectos Epidemiológicos

As Doenças Determinadas Socialmente (DDS) referem-se a um grupo de doenças infecciosas que afetam predominantemente populações com baixo nível socioeconômico, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (BRINDHA et al., 2021). Os diagnósticos e tratamentos ainda apresentam lacunas significativas, demandando amplos investimentos em pesquisa. Apesar dos avanços registrados nas últimas décadas, esses progressos não acompanham a velocidade do desenvolvimento da medicina (OLIVEIRA, 2018).

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (ELMAHALLAWY et al., 2014). Essa enfermidade é classificada como negligenciada e está presente em todos os continentes, exceto na Oceania, sendo o Brasil o único país com alta taxa de infecção para as duas formas principais: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Estudos indicam que a destruição da cobertura vegetal e as mudanças climáticas têm aproximado o inseto vetor das áreas urbanas, aumentando o número de casos de infecção (ORYAN; AKBARI, 2016). Dados recentes estimam que entre 600 milhões e 1 bilhão de pessoas estão expostas ao risco de desenvolver a infecção, sendo a leishmaniose cutânea a forma mais prevalente (DNDi, 2021). Entre 2001 e 2021, foram notificados à OPAS um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), com uma média anual de 52.645 casos. Só no Brasil, nesse mesmo período, foram registrados 15.023 casos de leishmaniose

cutânea/mucosa, representando quase 30% do total mundial (OPAS, 2022).

2.3. Aspectos Biológicos e clínico da leishmaniose cutânea

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários intracelulares, que se caracterizam por duas fases principais:

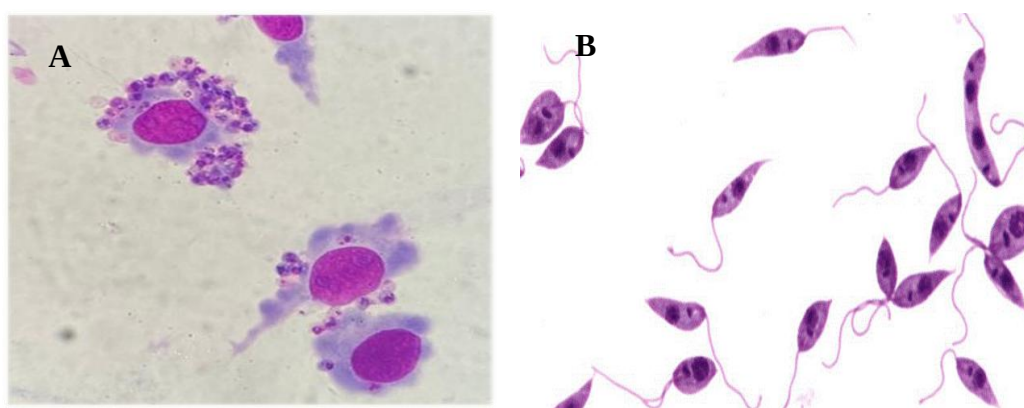
a. Amastigota

É a forma com um curto flagelo não exteriorizado, que possui corpo ovóide medindo de 2,5 a 3,5µm que se desenvolve no interior da célula hospedeira. O tamanho do parasito varia de acordo com a espécie. O núcleo da amastigota ocupa quase um terço do corpo do parasito e o cinetoplasto fica localizado próximo a bolsa flagelar (**Figura 2 A**).

b. Promastigota

Desenvolve-se no tubo digestivo do flebótomo, possuindo corpo celular afunilado, com cerca de 10µm. O núcleo é arredondado ou oval e está localizado na região mediana da célula, enquanto o cinetoplasto está situado entre a extremidade anterior e o núcleo, próximo à bolsa flagelar (**Figura 2B**) (BRASIL, 2017).

Figura 2 – Fase amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: (A) autora, 2025. (B) OPS, 2019,p.18.

Os parasitas da espécie *Leishmania* possuem um glicocálix denso, composto por diversas moléculas dispostas externamente à membrana plasmática, fixadas por uma estrutura denominada glicosilfosfatidilinositol. Entre essas moléculas, destacam-se as lipofosfoglicanas (LPG), que são

os principais glicoconjugados encontrados na superfície dos parasitas do gênero *Leishmania* (ILG, 2001). As formas promastigotas apresentam uma elevada quantidade de LPG, enquanto as amastigotas apresentam uma expressão significativamente menor dessa molécula (SILVA et al., 2014).

O citoesqueleto da *Leishmania* é composto por microtúbulos subpeliculares que percorrem paralelamente todo o corpo do parasito, sendo responsáveis pela manutenção de sua forma durante as fases de diferenciação no ciclo de vida. Outro componente importante é a actina, uma proteína fundamental para a estruturação do parasito (KOHL & GULL, 1998; BAJPAI & GUPTA, 2004).

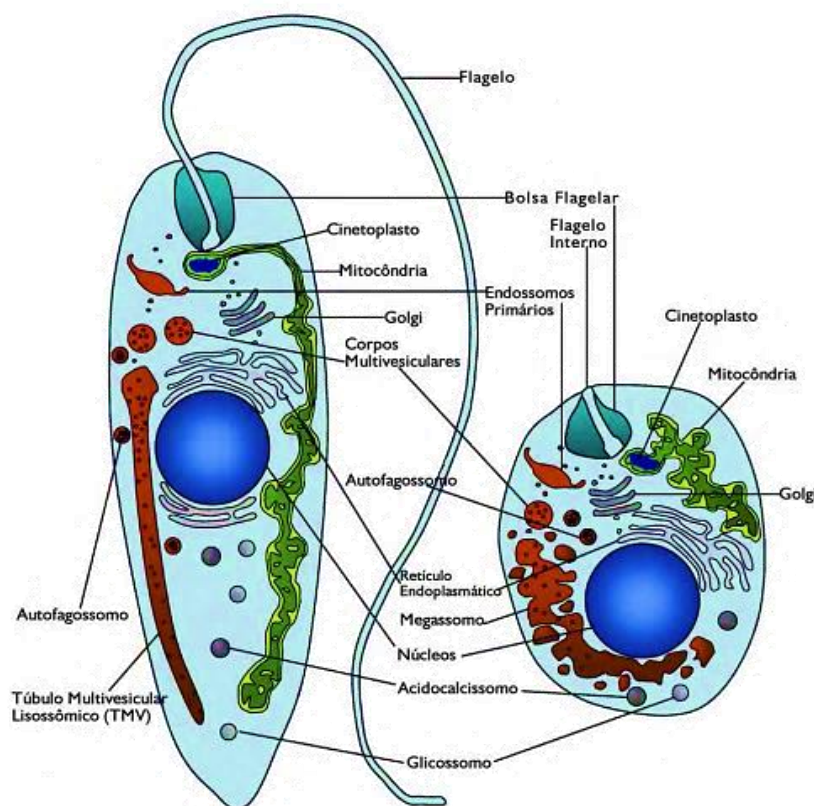
O flagelo desses parasitas desempenha diversas funções, incluindo a motilidade e a adesão às células-alvo, sendo a principal estrutura responsável pela alta mobilidade da *Leishmania*.

O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi estão associados ao transporte de organelas e à produção de moléculas. O complexo de Golgi, formado por cisternas, está localizado entre o núcleo e o cinetoplasto, na região anterior do parasito (CLAYTON; HÄUSLER & BLATTNER, 1995).

Os megassomos estão presentes nas fases amastigotas da *Leishmania*, podendo variar em tamanho. Essas organelas são caracterizadas pela presença de enzimas como fosfatase ácida e cisteína-proteinase em suas vesículas (DE SOUZA; SANT'ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009). Outras organelas capazes de secretar moléculas incluem os glicossomos e os acidocalcissomos, que contêm, respectivamente, enzimas como catalase e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de armazenarem cálcio, magnésio e outros elementos.

A mitocôndria dos parasitas do gênero *Leishmania* é única e se estende ao longo de todo o corpo do organismo. Próximo à mitocôndria encontra-se o cinetoplasto, que é a região contendo o DNA mitocondrial desses organismos flagelados (LUKES et al., 2002). Por fim, o núcleo arredondado ocupa a região central do corpo do parasito, apresentando um nucléolo central e uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas (SILVA et al., 2014).

Figura 3 – Aspectos estruturais de protozoários do gênero *Leishmania*



Fonte: PÉREZ, 2013.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), é uma doença infecciosa, com baixa mortalidade, não contagiosa, causada por protozoário do gênero *Leishmania*, dispondo como principais espécies no Brasil a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L.(Viannia) guyanensis* e *L.(V.) braziliensis* (CONITEC, 2020)

A LTA pode apresentar as seguintes formas clínicas:

- a. Leishmaniose Cutânea, caracterizada por uma pápula eritematosa que evolui para uma úlcera geralmente indolor, que aparece no local da picada do vetor. Quando curada, a lesão deixa uma cicatriz atrófica hiperpigmentada (BRASIL,2017);
- b. Leshmaniose Disseminada, que apresenta o aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme, envolvendo a face e o tronco. Essa forma é uma manifestação incomum, atingindo principalmente pacientes imunocompetentes, capazes de montar uma resposta imune contra o parasito. No entanto, possuem uma diminuição da resposta Th1, permitindo a disseminação da infecção (HASUGUCHI et al., 2016; MACHADO 2019);

c. Leishmaniose mucocutânea, caracterizada por uma lesão secundária que atinge majoritariamente a orofaringe, com o comprometimento do septo e demais áreas cartilaginosas. No Brasil a *L. (V.) braziliensis* é a espécie associada à essa forma clínica. Essa manifestação apresenta uma inflamação intensa, devido a resposta imune excessiva do tipo Th1, causando lesões infiltrativas e proliferativas com severa destruição tecidual (BRASIL, 2017);

d. Leishmaniose Cutâneo-Difusa, que inicia de maneira insidiosa, com uma única lesão e uma resposta negativa ao tratamento, que evolui para múltiplos nódulos não-ulcerados. É uma forma rara e grave gerada pela acentuada proliferação e disseminação do parasito devido à ausência da resposta celular (BRASIL, 2017/ LIMA, et al.2017).

O grande polimorfismo clínico da leishmaniose é resultado da interação entre diferentes fatores, como a espécie e, sobretudo, a resposta imune do hospedeiro (WHO,2021).

2.4 Ciclo Biológico

Como visto, o parasito *Leishmania* apresenta dois estágios principais em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. A forma promastigota é flagelada e encontrada no intestino do inseto vetor, enquanto a forma amastigota é aflagelada e se localiza no interior de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado (IRFAN et al., 2022).

A transmissão do protozoário ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, juntamente com proteínas salivares. O dano tecidual é causado pela penetração da probóscide do flebotomíneo e por substâncias presentes em sua saliva — como moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes (como a maxadilina) e imunomodulatórias — que induzem a formação de um compartimento na derme conhecido como lago sanguíneo (LEŠTINOVÁ et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2020).

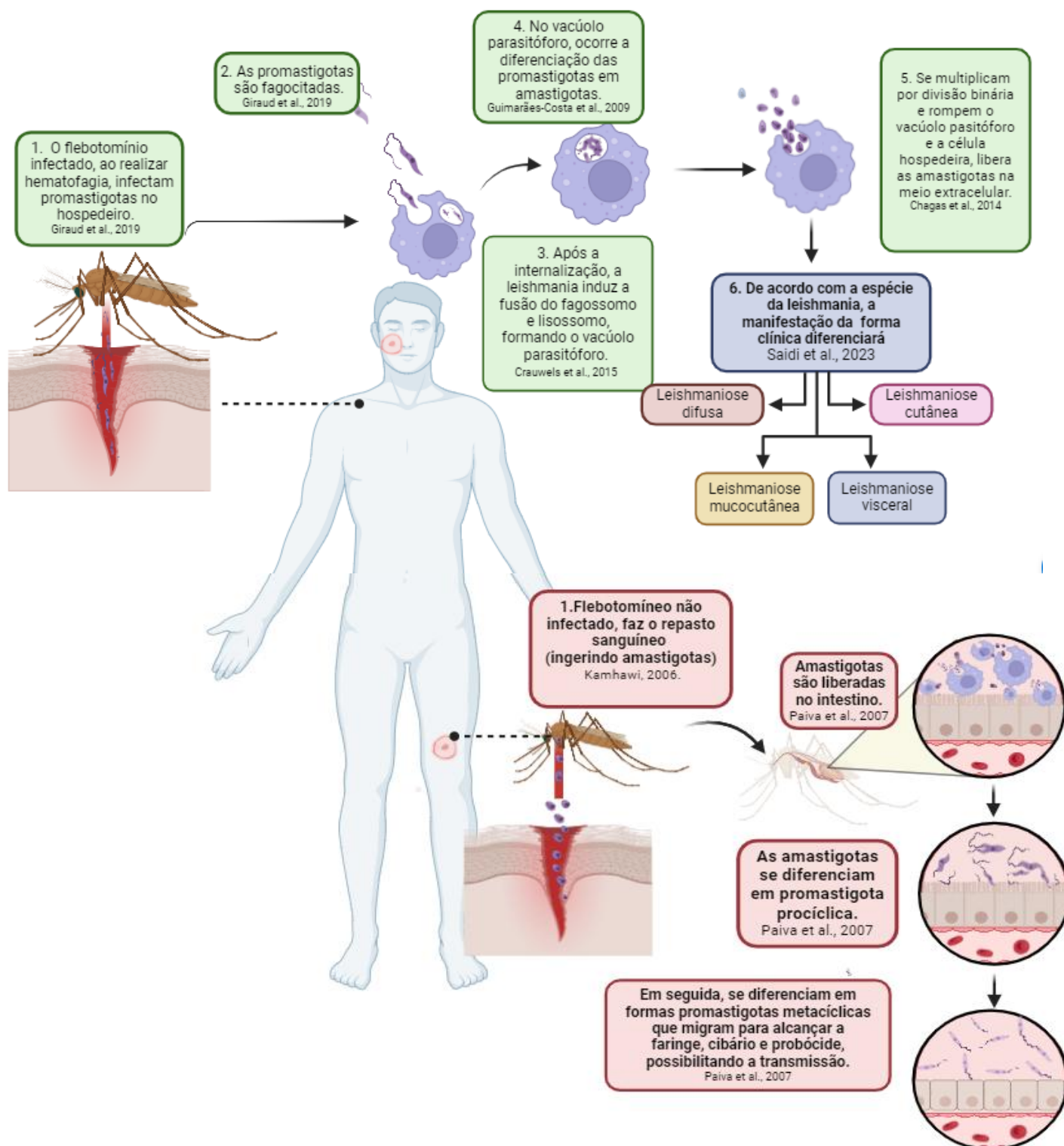
Nesse ambiente, as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos. No interior do vacúolo parasitóforo — organela formada pela fusão do fagossomo com os lisossomos — as promastigotas diferenciam-se em amastigotas (PESSOA et al., 2016). Estas, por sua vez, multiplicam-se por fissão binária até que a célula hospedeira se rompe, liberando os parasitas no meio extracelular, possibilitando a infecção de novas células (RODRIGUEZ et al., 2018), como pode ser observado na **Figura 4**, que ilustra as principais etapas do ciclo de vida do parasito.

Para a continuidade do ciclo, é necessário que o flebotomíneo realize um novo repasto em um hospedeiro infectado, ingerindo amastigotas livres ou presentes em células fagocíticas. No intestino do vetor, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, que

posteriormente amadurecem e se diferenciam em promastigotas metacíclicas, a forma infectante para vertebrados (ROSSEL; FASEL, 2017).

Durante esse processo de diferenciação, as promastigotas secretam um gel rico em proteofosfoglicanos (PSG), que provoca uma obstrução parcial do intestino médio do vetor. Isso, aliado a alterações bioquímicas na superfície dos parasitas, leva à perda da capacidade de adesão à parede intestinal. Como resultado, as promastigotas se desprendem e migram até a probóscide, de onde são regurgitadas durante um novo repasto, promovendo a infecção de outro hospedeiro (GIRAUD et al., 2019; ROGERS, 2012) permitindo a infecção de um novo hospedeiro vertebrado (**Figura 4**).

Figura 4 – Ciclo de vida de *Leshmania* spp.



Fonte: Adaptado de Murray et al., 2015.p 742; Teixeira et al., 2013. Criado pela AUTORA., 2025 com BioRender.com

2.5 Resposta imunológica contra *Leishmania*

Ao longo dos anos, *Leishmania* desenvolveu diversos mecanismos de resistência que garantem seu sucesso durante a invasão e permanência no sistema imune do hospedeiro. Esses mecanismos permitem que o parasito se instale no interior das células de defesa, especialmente os macrófagos, e resista à resposta imune protetora (HANDMAN, 2005; MADHUBALA, 2004).

A espécie *Leishmania spp.* sintetiza fatores de virulência essenciais para sua sobrevivência. Na superfície da membrana do parasito, destacam-se dois importantes glicoconjugados: a glicoproteína GP63 e o lipofosfoglicano (LPG). Esses componentes estão diretamente envolvidos na modulação da resposta imune do hospedeiro, desencadeando diferentes vias de sinalização celular que ativam tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (BHATTACHARYA; ALI, 2013; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

2.5.1 Atuação do Sistema Imune Inato

Durante a resposta imune inata, logo após a entrada do parasito na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, diferentes células de defesa são ativadas, incluindo neutrófilos, mastócitos, células Natural Killer (NK), monócitos, células dendríticas e macrófagos. Essas células atuam de maneira dinâmica e simultânea na contenção do patógeno (GOMES et al., 2017).

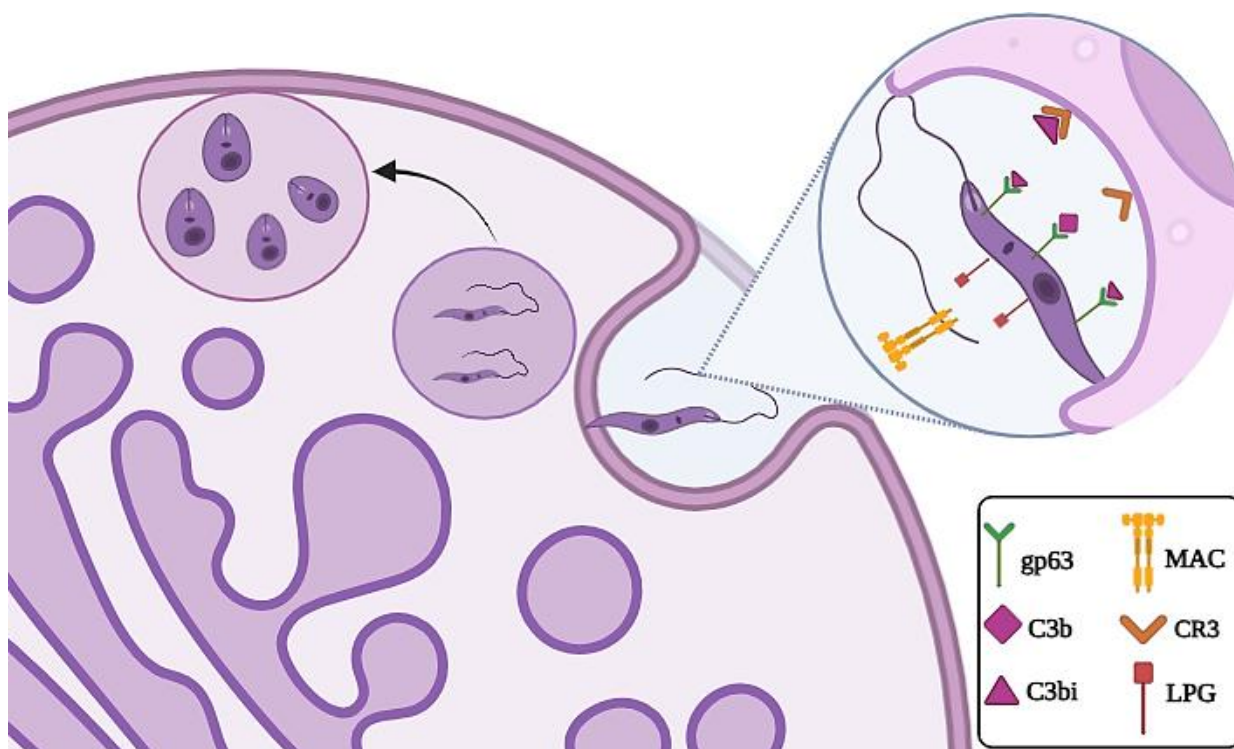
Sabe-se que os macrófagos representam as células hospedeiras definitivas de *Leishmania spp.* (DAVIES et al., 1988; HORTA et al., 2020). No entanto, os neutrófilos desempenham um papel essencial nas fases iniciais da infecção, sendo os primeiros a fagocitar promastigotas. Posteriormente, os macrófagos são infectados pela ingestão de corpos apoptóticos contendo parasitos, resultantes da morte dos neutrófilos (PETERS et al., 2008; AFONSO et al., 2008).

As células dendríticas (DCs) também são alvos da invasão parasitária, embora sua participação seja mais evidente em fases posteriores da doença. Nessa etapa, elas capturam preferencialmente formas amastigotas, por meio da ligação do receptor FcγR às imunoglobulinas do tipo IgG (KIMA et al., 2000).

A resposta imune se inicia quando o flebotomíneo infectado libera promastigotas de *Leishmania* na epiderme do hospedeiro. A saliva desses vetores possui propriedades hemostáticas e imunomoduladoras que influenciam significativamente a infectividade e a

patogênese da leishmaniose. Estudos demonstraram que a saliva de *Lutzomyia longipalpis* contém substâncias como a **maxadilan**, um potente vasodilatador, que favorece a instalação da infecção (TEIXEIRA et al., 2005).

Figura 5 - Mecanismo de invasão de *Leishmania* nas células hospedeiras



FONTE: Criado pela Autora, 2025 no *Biorender.com* com informações de WALKER AM et al., 2013.

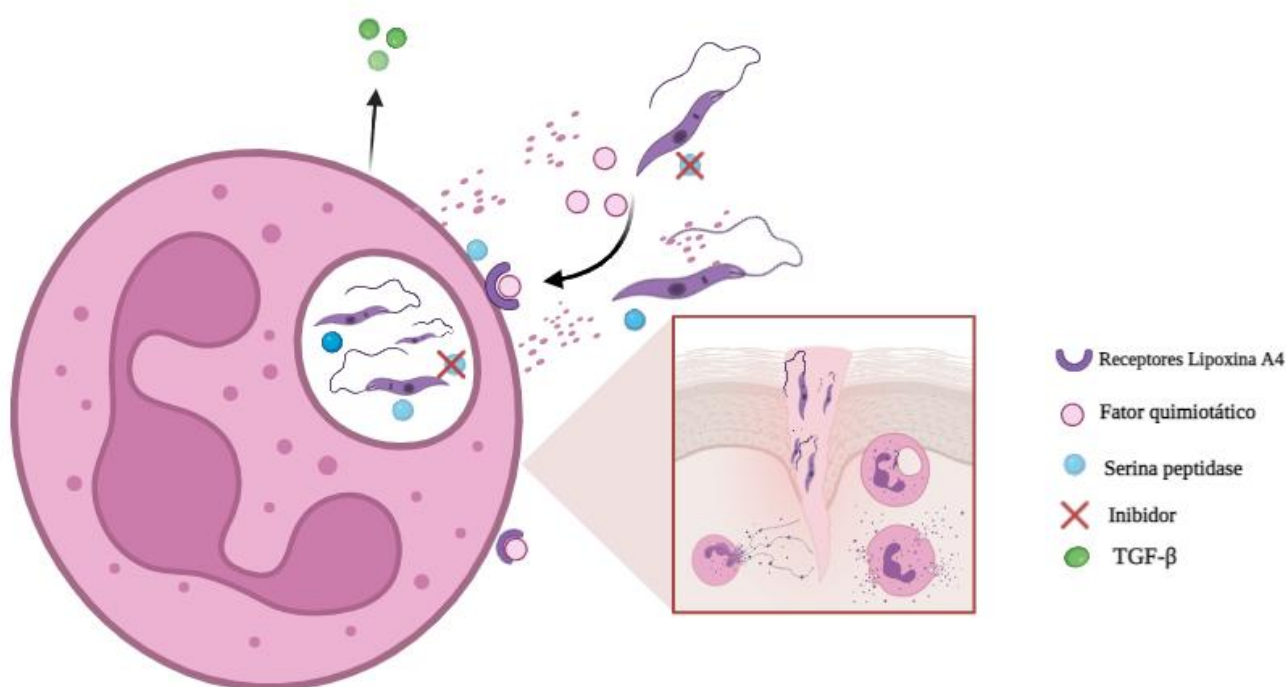
- **Captação mediada por neutrófilos**

Poucos minutos após a picada do flebotomíneo, os neutrófilos (PMNs) são as primeiras células a migrar para o local da infecção. Sinais específicos decorrentes do dano tecidual ativam esses leucócitos, indicando a presença de um agente estranho no organismo do hospedeiro (PETERS et al., 2008). Os PMNs exercem um papel fundamental na neutralização e fagocitose de promastigotas de *Leishmania in vitro* (MÜLLER et al., 2001). Essas células são as primeiras a absorver os parasitos no sítio da infecção, como já descrito em infecções por *L. major* (SUNDERKÖTTER et al., 1993) e *L. infantum* (THALHOFER et al., 2011). No entanto, a resposta mediada pelos neutrófilos pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e com o contexto imunológico do hospedeiro (HURRELL et al., 2016).

Moléculas presentes na superfície celular da promastigota da *Leishmania*, como a fosfatase ácida e o tartarato, inibe a fusão do lisossomo e a produção de espécies reativas dos neutrófilos (REMALEY et al., 1984;). Quando a forma promastigota invade o sistema, elas liberam fatores quimiotático lipídico que serve como atrativo para captação dos neutrófilos, que interagem com receptores de lipoxina A4 (ALX) (WENZEL et al., 2009).

Quando estão próximos, o neutrófilo tenta atacar liberando uma enzima denominada como serina peptidase, no entanto a *Leishmania* consegue se desvencilhar neutralizando com a proteína com o auxílio do Inibidor serina peptidase presente na membrana da *Leishmania*, sendo importante também para sobrevivência do parasito no interior da célula (FARIA et al., 2011). Dessa forma, o parasito medeia essas reações de forma silenciosa, ativando a indução do TGF-beta, por meio da inferência da ligação à anexida A5 do hospedeiro (AGA et al., 2002; VAN-ZANDBERGEN et al., 2004).

Figura 6 – Captação mediada por neutrófilos



Fonte: Criado por AUTORA *biorender*, adaptado VAN-ZANDBERGEN et al., 2004; FARIA et al., 2011; WENZEL et al., 2009.

- **Captação mediada por macrófagos**

A superfície da forma promastigota dos parasitos é envolvida por um glicocálice composto por

moléculas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteínas de membrana, lipofosfoglicano (LPG) – que atua como uma capa protetora –, a protease de superfície GP63, proteofosfoglicanos (PPGs) e glicosilinositolfosfolipídios (GIPLs), todos responsáveis pela proteção do parasito (GOROCICA et al., 2002; MANDELL et al., 2022; KAUSHAL et al., 2023). A importância dessas moléculas na internalização do parasito tem sido amplamente relatada. No entanto, estudos demonstraram que linhagens mutantes de *Leishmania* deficientes em LPG (SPATH et al., 2003) ou em GP63 (JOSHI et al., 2002) são fagocitadas com a mesma eficiência que os tipos selvagens, indicando que outros fatores também estão envolvidos nesse processo. A composição dessas moléculas varia conforme o estágio de vida do parasito: o LPG é mais abundante na forma promastigota e é drasticamente reduzido após a diferenciação para amastigota, enquanto os níveis de PPGs e GIPLs permanecem relativamente estáveis em ambos os estágios (AZEVEDO et al., 2020).

Os receptores de reconhecimento padrão (RRPs) desempenham papel fundamental na indução da resposta imune (FREITAS; PINHEIRO, 2013). Entre eles, os receptores do tipo Toll (TLRs) são os mais frequentemente associados à infecção por *Leishmania* spp., sendo responsáveis pela detecção de proteínas associadas ao patógeno e pelo início do reconhecimento imunológico (FARIA et al., 2012; KHADEM; UZONNA, 2014).

Na matriz extracelular, proteínas do sistema complemento também contribuem para a resposta imune, migrando para o local da infecção para se ligar aos microrganismos invasores. Essa ligação culmina na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que atua formando um poro na membrana do parasito, levando à lise celular (DUNKELBERGER et al., 2010).

A GP63, presente na membrana do parasito, interage com proteínas iniciais do sistema complemento, como a C3b, impedindo a formação do MAC. Essa interação leva à clivagem da C3b em C3bi (forma inativada), permitindo que a C3bi se ligue a receptores específicos na superfície do macrófago, como CR1 e CR3 (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; HORTA et al., 2020).

Além disso, outras moléculas opsonizantes, como a fibronectina, proteína C reativa e sulfato de heparano, também estão envolvidas na internalização das promastigotas pelos macrófagos (BOBMAN-SMITH et al., 2002). Quando os macrófagos internalizam os parasitos por meio do receptor CR3, a produção de IL-12 é inibida. Como a IL-12 estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e a produção de óxido nítrico (NO), sua ausência contribui para a sobrevivência do parasito, constituindo um importante mecanismo de escape (ANVERSA et al., 2017; DOS-SANTOS et al., 2016).

Esses receptores também inibem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de NO, ambas tóxicas para o parasito. Ao impedir a ativação dessas vias – por meio da inserção

da C3b na membrana e da ligação da C3bi aos receptores dos macrófagos – o parasito cria um ambiente intracelular propício à sua sobrevivência, uma vez que a ausência dessas moléculas impede a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GOLDMAN-PINKOVICH et al., 2020).

Após a fagocitose, o parasito permanece dentro do fagossomo, que normalmente se funde com o lisossomo para eliminar o invasor. No entanto, o LPG presente na membrana da *Leishmania* inibe essa fusão, interferindo na sinalização intracelular por meio da quelação de cálcio e inibição de proteína quinase, retardando a formação do vacúolo parasitóforo e permitindo a diferenciação do parasito em amastigota (ZILBERSTEIN, 2008). A *Leishmania* apresenta, portanto, dois principais mecanismos de escape da atividade microbida dos macrófagos: a inibição da fusão fagossomo-lisossomo e a supressão das vias de produção de ROS e NO.

a. A inibição da biogênese do fagolisossoma que ocorre através da ação de uma metaloproteinase, que se encontra na superfície deste parasito, que atua no bloqueio do receptor de proteína de ligação ao fator sensível à Etilmaleimida (SNARs), com o objetivo de alterar o processo fagolisossomal e impedir a apresentação (ARANGO-DUQUE E DESCOTAUX, 2015).

b. O outro é por meio da metilação do DNA, ou seja, a adição de grupos metil com a finalidade de silenciar a atividade microbida dos macrófagos, consequentemente impedir o “[aviso]” para outras células da resposta imune (ARANGO-DUQUE E DESCOTAUX, 2015).

Quando o parasito evolui para forma amastigota, tornando mais resistentes as enzimas do macrófago, inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias e de óxido nítrico (NO), o que interferirá na expressão da molécula de histocompatibilidade II (MHC-II). Em contrapartida, atuará na indução de prostaglandina E2 (PGE2), IL-10 e no fator de crescimento (CUNNIGHAM, 2002; LIU; UZONNA, 2012).

A proteína GP63 está em maior quantidade nas amastigotas. Quando as células conseguem se diferenciar de promastigotas em amastigotas, essa proteína GP63 degrada as enzimas, se multiplicam por divisão binária e rompem o vacúolo parasitóforo e a célula hospedeira, por sobrecarregar a célula infectada, consequentemente liberando as amastigotas na corrente sanguínea e, induzindo a novas infecções, acaba debilitando a resposta imune.

Alguns trabalhos indicam que a *Leishmania* pode invadir macrófagos por outras rotas além da fagocitose clássica, como foi descrito por um grupo de pesquisa onde observou que a ligação da *Leishmania* provoca um aumento do Ca^{2+} no citosol da célula, o que provoca o

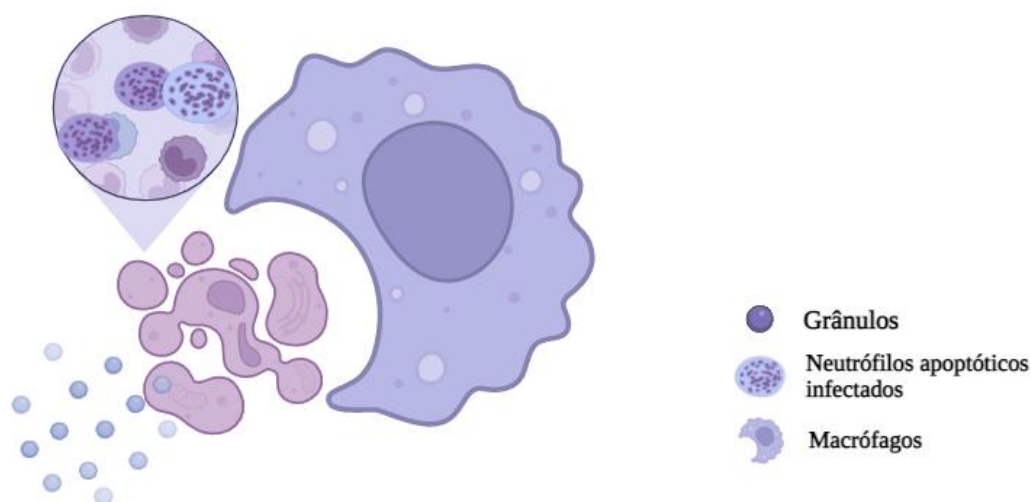
recrutamento do lisossomo da célula para o local, onde por sua vez secreta a esfingomielinase ácida (enzima capaz de ocasionar a endocitose). O parasito se fixa na parede da célula hospedeira, então se funde instantaneamente com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o meio externo por meio de microlesões induzidas pelo parasito à célula hospedeira, ocasionando a internalização dos promastigotas através dos flagelos (CAVALCANTE-COSTA et al., 2019)

- **“Cavalo de Tróia”**

Um papel dos macrófagos na imunologia, além de fagocitarem patógenos, onde ao ser internalizado irá desencadear processos para a degradação, e posteriormente apresentá-los os seus antígenos, associados ao MHC, conduzindo ao desenvolvimento da imunidade adquirida (STRAUSS et al., 2010), é a importância também na remoção de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos, visto que se os neutrófilos entram em necrose, eles poderão liberar seus grânulos no meio extracelular e causar uma inflamação estendida. Dessa forma, os macrófagos -ao fagocitarem os neutrófilos- impedem a inflamação e aumentam o seu arsenal microbida por receber o conteúdo granular dos mesmos (TEO et al., 2003).

Como visto anteriormente, os neutrófilos são as primeiras células que chegam na infecção por *Leishmania* e após serem internalizadas agem nessas células como hospedeiras temporárias até levar à morte dos neutrófilos. Sabendo que os macrófagos irão agir nessas células, pois o seu papel na resposta imune também é ater essas células apoptóticas, quando fagocitadas a *Leishmania* contida no interior dessas células consegue invadir os macrófagos de forma silenciosa, sem a ativação dos mecanismos de defesa (GER VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Figura 7 - Cavalo de tróia, macrófagos fagocitando os neutrófilos infectados com amastigota de *Leishmania*.



Fonte: Criado no *Biorender.com*. Adaptado de GER VAN ZANDBERGEN et al., 2004.

2.5.2 Atuação do Sistema Imune Adaptativo

Após a resposta inicial pelo sistema imune inato, é gerado um antígeno específico pelas células dendríticas epidérmicas, que capturaram o parasito e migram em direção aos linfonodos regionais para se diferenciarem em células dendríticas apresentadoras de antígeno (DOS SANTOS et al., 2016). Essas células agem apresentando os antígenos aos linfócitos T virgens, induzem a produção de IL-12, que em consequência ativa células Natural killer, CD8 e promove a diferenciação das células T CD4, em linfócitos Th1 (COSTA et al., 2013; RITTER e KORNER, H et al 2002).

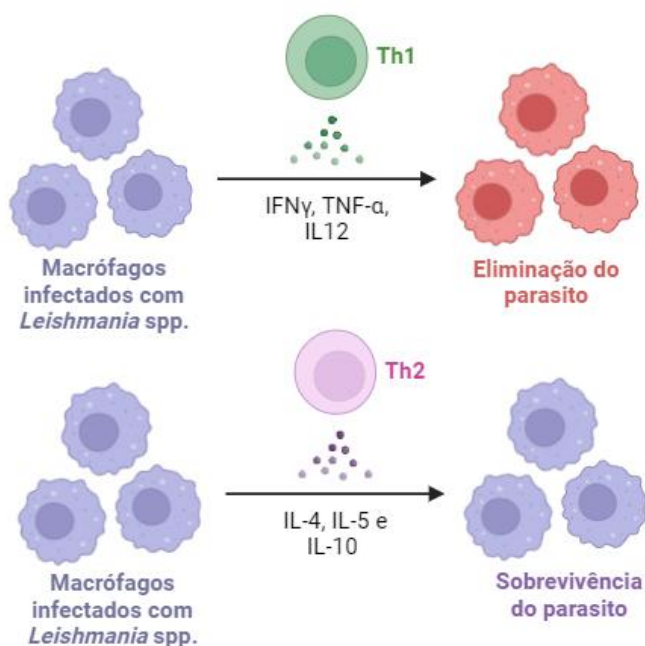
A apresentação de antígeno e a produção de IL-12 ocorrem pelas células dendríticas, que são essenciais para a indução de células T CD4 e CD8 para mediar a resposta contra *Leishmania* (BACELLAR et al., 2008). No entanto, em um estudo *in vivo* por células dendríticas murinas, a infecção com os parasitos *L. mexicana* e *L. amazonensis* não conseguiu induzir a produção de IL-12 (BENNETT et al., 2001; XIN L et al., 2008).

Com os linfócitos Th1 ativados, eles se direcionam ao local da infecção, e ao se instalarem, intensificam a fagocitose, aumentando a produção de INF- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α), e induz a produção de IL-2 (SCOTT et al., 2016; BLACKWELL et al., 2018). O IFN- γ ativa os macrófagos e induz a secreção de mais IL-12, promovendo uma atividade Leishmanicida (ALMEIDA et al., 2013).

Quando o perfil Th2 é estimulado durante a infecção associadas por *Leishmanias* dermatóricas, visto que a ativação pela via alternativa têm o objetivo da reparação tecidual, síntese de colágeno, fibrose, ou seja, atividades que estão mais voltadas para a epiderme. Dessa forma, as células Th2 induzem citocinas diferentes das secretadas nas células Th1, sendo definidas como citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (SCOTT et al., 2016; BLACKWELL et al., 2018).

Na *Leishmaniose*, essa polaridade é muito importante (Th1 e Th2). Esta resposta geralmente ocorre de forma mista, ou seja, as duas atuam dinamicamente; no entanto, a resposta Th1 está associada à resistência a *Leishmania*; ou seja, quando se têm uma resposta Th1 elevada, o hospedeiro conseguirá se curar melhor; por outro lado, quando se têm uma resposta Th2 mais polarizada, conseqüentemente induz citocinas que desativam o macrófago, o que impede funções efetoras como a produção de óxido nítrico, espécies reativas em favor da sobrevivência do parasito e da progressão da doença (SHER et al., 1992).

Figura 8 – Resposta Imune Th1 e Th2



Fonte: Criado com *Biorender.com* e adaptado de OLIVEIRA et al., 2021.

A morte da *Leishmania* está muito dependente da ativação do IFN-γ (CARVALHO et al., 1994), formado na resposta Th1. No entanto, se existe uma exacerbação da Th1, o hospedeiro possui um quadro inflamatório mais intenso, podendo levar a lise do tecido. Se existe uma polarização da resposta Th2, existe um maior crescimento do parasito. No caso da

Leishmania visceral (calazar) acontece a supressão da resposta Th1 e o aumento da resposta Th2, consequentemente levando esse crescimento do parasito nos órgãos como baço, medula óssea, fígado. No caso da *Leishmaniose* tegumentar, quando ocorre a polarização para Th2, promove -ao invés de ulcerações- nódulos disseminados pelo corpo repletos de parasitos (OLIVEIRA et al., 2021)

Quando o hospedeiro apresenta imunidade adquirida contra *Leishmania*, os macrófagos respondem as células Th1, onde irão participar na eliminação dos parasitos, as quais são responsáveis por mediar o agente intracelular. Elas induzem citocinas do tipo IL-12 e IFN- γ . Por outro lado, Th2 são ativados quando as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 são liberadas, promovendo uma resposta desfavorável ao hospedeiro, pela deficiência no controle parasitário. O crescimento parasitário, o sistema imune do hospedeiro, variações genéticas, estado nutricional, virulência do parasito e meio de transmissão estão diretamente interligados na resposta imunológica (CONCEIÇÃO et al., 2014; HOSEIN et al., 2017;). Sendo assim, a resposta imune para o controle da carga parasitária dependeria da ativação de linfócitos CD4+ de Th1, sendo ativados pela expressão da enzima NOS-2 e a consequente produção de NO. A partir do aminoácido L-arginina, a enzima celular: óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) catalisa a síntese de óxido nítrico (DAYAKAR et al., 2019; SANMARCO et al., 2017).

2.5.3 Infecção por *L. braziliensis*

As lesões ocasionadas em pacientes infectados por *L. braziliensis* levam a um ambiente na epiderme extremamente inflamado, sendo assim, esses pacientes apresenta uma maior polarização da resposta Th1, o que leva essa inflamação excessiva e dano tecidual (CARVALHO et al., 2012). Altos níveis de IFN- γ e TNF- α são descritas na LC, causada por essa espécie, embora o IFN- γ pode induzir uma ação protetora (SANTOS et al., 2013), há evidência também de apoiar o papel na patologia de lesões cutânea e mucosa (FARIA et al., 2015; CARVALHO et al., 2007; GOLLOB, 2008; MIRANDA et al., 2015).

Na leishmaniose cutânea, o desenvolvimento de uma infecção não cicatrizante é associado por um perfil imunossupressor, com aumento da atividade da arginase I (BOGDAN, 2020), uma substância que favorece o metabolismo antioxidante dos parasitos, e que paralelamente compete com a iNOS pelo substrato L-arginina, impactando na diminuição do NO (COLOTTI et al., 2011).

Pesquisas anteriores, demonstraram que as amastigotas de *L.braziliensis*, se replicam melhor na ausência de ROS, identificando essas moléculas como importantes reguladoras da proliferação do parasito dentro das células hospedeiras (NOVAIS et al., 2014)

2.6 Farmacoterapia

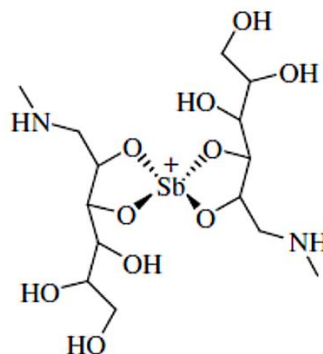
Considerando a permanência de novos casos clínicos envolvendo a *Leishmania*, o tratamento assim como seu diagnóstico, deveria ser seguro e eficaz, contudo, a realidade da farmacoterapia é totalmente controversa, demonstrando ser, tóxico, com baixa eficácia, alto custo e dificuldade na administração (SANTIAGO et al.,2021). Existem algumas drogas Leishmanicida disponíveis para o controle da doença, sendo que o sucesso do tratamento aplicado, assim como a eficiência, varia conforme o sistema imune do paciente, bem como a forma clínica de leishmaniose e a espécie envolvida na infecção (VAN GRIENSVEN & DIRO, 2019).

2.5.1 Antimoniais Pentavalentes

São os fármacos de primeira escolha para tratamentos, utilizado na clínica desde 1945, que incluem o antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio (SANGSHETTI et al. 2015), esses fármacos apresentam uma elevada toxicidade concomitante ao uso, sendo descritos casos de pancreatite (GASSER JR et al, 1994) e insuficiência renal (ZAGHLOUL, 2004) além do tempo de tratamento/exposição ser longo, agravando o quadro e prejudicando células saudáveis.

Os mecanismos de ação da classe de desses fármacos não estão bem elucidados, porém sabe-se que eles são um pró fármaco, ou seja, fármacos que dependem da administração para serem ativos (HANSEN et al., 2011). Esses compostos agem nas formas amastigota da *Leishmania*, impedindo a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, e reduzindo a produção de ATP e GTP (BRAZIL, 2017). Outros estudos sugerem que os antimoniais pentavalente são capazes de induzir a apoptose através do estresse oxidativo, inibindo a enzima tripanotona redutase, responsável pela defesa do parasito contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KIP et al., 2018; SINGH & KUMAR,2012)

Figura 9 - Estrutura do fármaco Antimônio de meglumina



Fonte: Google imagens

A farmacoterapia recomendada pela OMS, é a administração parenteral de 10 a 20 mg/Sb⁺⁵ por quilograma ao dia, durante 20 dias. Caso o paciente não se cure completamente durante três meses do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido, no entanto, a duração será prolongada para 30 dias. Persistindo o insucesso, segue para droga de segunda escolha, Anfotericina B ou Pentamidina (BRASIL, 2017).

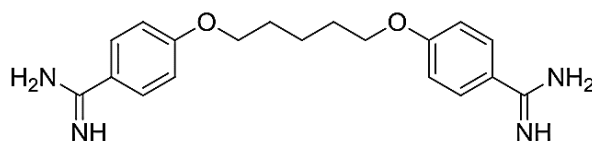
O uso dos antimoniais pentavalentes apresentam limitações, como os efeitos colaterais sistêmicos, que necessitam de um acompanhamento médico muito minucioso (ZUCCA et al., 2013). Para as gestantes o uso dessa classe é abolido, devido à capacidade de atravessar a barreira placentária podendo impactar na má formação no sistema nervoso central do feto, além disso, existem restrições para o uso em idosos acima de 50 anos, portadores de comorbidades, como, cardiopatias, nefropatias, doença de chagas e hepatopatias (BRASIL, 2017). Embora exista evidência de eficácia, há um crescente demonstrando resistência à terapia medicamentosa, estando atrelada a espécie de *Leishmania* (ALMEIDA et al., 2005). Nesses casos de ineficácia terapêutica, a solução é empregar drogas de segunda escolha.

A segunda linha de fármacos utilizados, são os antibióticos anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, a miltefosina paramomicina e pentamidina (SANGSHETTI et al. 2015), eles exibem uma toxicidade inerente, e graves efeitos colaterais, como, por exemplo o caso da Miltefosina, onde estudos descreveram a manifestação de hepatotoxicidade, toxicidade renal e distúrbio gastrointestinais (SANGSHETTI et al. 2015),

2.5.2 Pentamidina

A Pentamidina foi descoberta na mesma década de 40 que os antimoniais pentavalentes, apenas na década de 80 que foi empregada como tratamentos para LV (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). O mecanismo de ação do fármaco é baseado na inibição da cadeia respiratória do complexo II, rompimento da membrana mitocondrial e comprometimento da síntese de DNA (YANG et al., 2016)

Figura 10 - Estrutura do fármaco Pentamidina



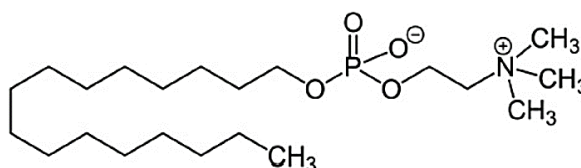
Fonte: CAVALHO et al., 2015

No entanto, com estudos sendo realizado em várias espécies de *Leishmania*, observou-se à redução de eficácia da Pentamidina, em espécies como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, foi relatado uma eficácia de apenas 71,05% e 58,1% respectivamente (NEVES et al., 2011), sendo assim, o fármaco não é recomendado para o tratamento da leishmaniose por infecção dessas duas espécies citadas.

2.5.3 Miltefosina

A Miltefosina foi o primeiro e único fármaco para uso oral, aprovado em 2002 para o uso a na clínica contra a leishmaniose. Inicialmente o composto foi produzido para o tratamento de metástase cutânea. A dose recomendada é de 2,5mg/kg/dia durante 28 dias (BRASIL, 2016). O mecanismo de ação do fármaco é baseado pela inibição de esterol e fosfolipídios induzindo a apoptose (DORLO et al., 2012)

Figura 11 - Estrutura do fármaco Miltefosina



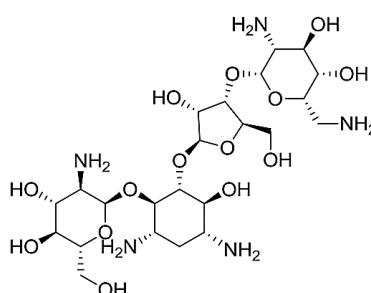
Fonte: Google imagens

A terapia com a Miltefosina também apresenta limitações, principalmente em relação ao alto custo do tratamento, além dos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, tonturas, dor de cabeça, diarreia, toxicidade renal e hepática, teratogênica e abortífera (KEVRIC et al. 2015). Estudos realizados, relataram que em relação à leishmaniose visceral a Miltefosina demonstrou 97% de cura (SUNDAR et al., 2002) No entanto, esses valores caem drasticamente quando comparada ao tratamento contra espécies do novo mundo, como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, variando de 21% e 91% de cura (VELEZ et al., 2010; CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011).

2.5.4 Paramomicina

A Paromomicina foi um composto registrado em 2006 para ser utilizado na clínica da leishmaniose visceral, é um antibiótico que apresenta 95% de eficácia (SUNDAR et al., 2007). É utilizado na forma parenteral com dose recomendada de 15mg/kg/dia durante 21 contínuos e na formulação tópica o medicamento possui 15% de Paromomicina e 12% de cloreto de metilbenzetônio, aplicada duas vezes ao dia durante 3 a 6 semanas (KEVRIC et al., 2015).

Figura 12- Estrutura do fármaco Paromomicina



Fonte: CARVALHO et al., 2015

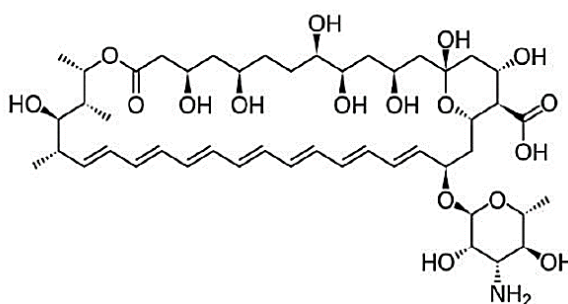
Quando utilizado em forma tópica, é necessário que seja concomitantemente associado o *Glucantime* ao uso parenteral, visto que estudos relataram o aumento de 90% da eficácia da terapia em casos de infecção por *L. panamenses* (SALAH et al., 2013). O mecanismo de ação do fármaco, está ligado pela ligação com o ergosterol, possuindo ação nas duas formas evolutivas da leishmaniose, amastigota e promastigota (VERMEERSCH et al., 2009). Contudo,

o uso do fármaco, está associado a efeitos extremamente tóxicos, por induzir produção de mediadores como TNF- α , prostaglandinas e óxido nítrico sendo vistas em estudo *in vitro* (CAMACHO et al., 2004).

2.5.5 Anfotericina B

A Anfotericina (AnB) é um fármaco antibiótico utilizado na clínica contendo um amplo espectro. Essencialmente, é um composto natural, produzindo por uma bactéria *Streptomyces nodosus*, caracterizada e isolada na década de 50 (GOLD et al., 1956). O mecanismo de ação da AnB, acontece por diferentes vias, tanto por via membrana, quanto de forma intracelular (MESA ARANGO et al., 2012).

Figura 13 - Estrutura do fármaco Anfotericina B



Fonte: PASQUALOTTO, 2015.

I. Ao nível da região externa da membrana, o fármaco age se ligando a moléculas como o ergosterol, sendo o principal esterol encontrado na membrana dos fungos e alguns parasitos, como no caso da *Leishmania*. Quando ocorre essa ligação, o fármaco forma poros, o qual permitem a passagem de eletrólitos, e outros componentes extracelulares citoplasmáticos, sendo assim levando a apoptose. Outra forma, é quando o Anb, ao se ligar ao esterol, impede que ele exerça suas funções biológicas na membrana celular, dessa forma, impedindo processos como; endocitose, manutenção da fluidez e fusão de vacúolos (ODDS et al., 2003; MATSUMORI et al., 2009; MESA ARANGO et al., 2012).

II. Quando se trata da ação na Anfotericina ao nível intracelular, o fármaco age pela indução de estresse oxidativo, sendo assim, ocasionando o acúmulo de radicais livres na célula do parasito. Dessa forma, resultando em efeitos que prejudicam as funções como a produção

de DNA e proteínas que são responsáveis pela “saúde” do parasito, enfim levando a morte celular (MESA-ARANGO et al., 2014; SANGALLI-LEITE et al., 2011)

A anfotericina oferece um potente efeito imunomodulador, ou seja, um composto com mecanismo de ação alternativa. No entanto, esse mesmo efeito, está associado a toxicidade inerente ao uso do fármaco, o que debilita ainda mais os pacientes infectados que fazem o uso (CAMACHO et al., 2004). Diante dessa toxicidade, e do conhecimento da química, estudos observaram que a Anb é um composto anfipático, e a parte lipofílica da molécula para ser administrada, precisa estar associada a um meio aquoso para aumentar a lipofilicidade e assim melhorar a distribuição no organismo humano, visto isso, a molécula atualmente possui quatro formulações aprovados para o uso clínico: AnB desoxicolato de sódio, complexo lipídico de AnB, formulação com dispersão coloidal de AnB e formulação lipossomal, com o objetivo de melhorar o composto e suas características inerentes relacionadas ao perfil químico do fármaco (SAAG et al., 2000; WANESS et al., 2009)

Tabela 1 – Fármacos utilizados na clínica

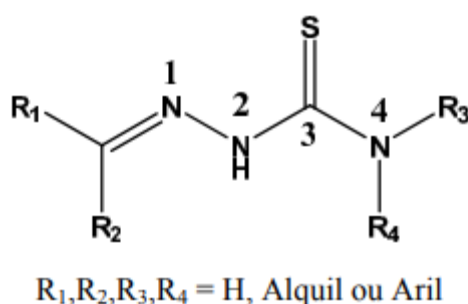
Fármaco	Mecanismo de Ação	Via de administração	Efeitos colaterais
Antimoniais pentavalentes	Pró-fármaco, agem inibindo glicólise e oxidação de ácidos graxos	Intramuscular ou endovenosa	Náuseas, eritema, dor abdominal, toxicidade (hepática, pâncreas, renal, muscular) leucopenia
Paromomicina	Inibição da biossíntese de proteínas	Tópico para leishmaniose cutânea e parenteral para leishmaniose visceral	Eritema, dores, edema e danos ao ouvido
Pentamidina	Inibe a síntese de DNA e modifica a morfologia do cinetoplasto	Intramuscular ou endovenosa	Dores, náuseas, vômitos, tonturas, mialgia, hipertensão, dor de cabeça
Miltefosina	Interfere com a biossíntese de fosfolípidos e metabolismo alquil-	Oral	Náuseas, vômitos, diarreia, creatinina elevada

	lipídico em <i>Leishmania</i>		
Anfotericina B	Ligação aos esteróis da membrana do parasito e muda a permeabilidade seletiva para K^+ e Mg^{2+}	Endovenosa	Febre, náuseas, anorexia, leucopenia, falha renal, problemas cardíacos

2.6. Tiossemicarbazona

As Tiossemicarbazona (TSC) são moléculas que possuem estrutura básica, $C=N-NH-CS-NH_2$, cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas pela Química Medicinal. São obtidos pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas. A estrutura química e a respectiva numeração dos átomos segundo IUPAC (PANICO, POWELL & RICHER, 1993; JACOB et al., 2023) é demonstrada a seguir:

Figura 14 - Estrutura da Tiossemicarbazona



Fonte: IRIS et al., 2021.

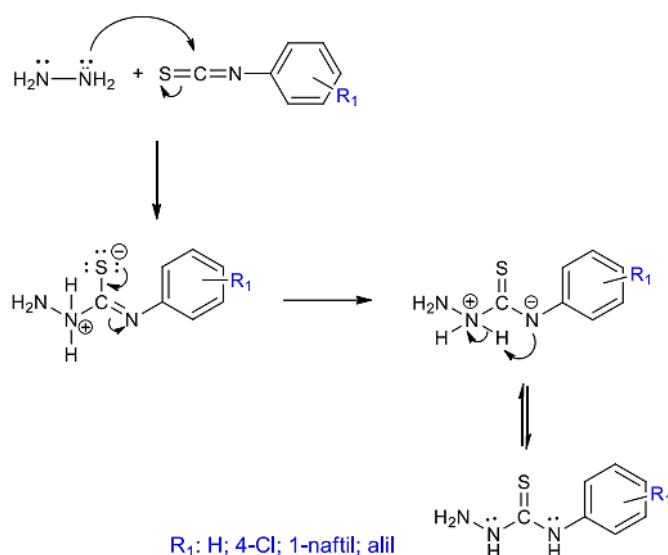
A síntese das Tiossemicarbazona é explorada por sua facilidade de obtenção, geralmente altos rendimentos, baixo custo, além da sua versatilidade na aplicação como intermediários de núcleos na Química Medicinal (JABOB. et al 2023). Os mecanismos para obtenção iniciam-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, em seguida de ataque ao núcleo por uma molécula de nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário protonado. Este perde uma molécula de água e,

após neutralizado, forma-se a Tiossemicarbazona (COSTA et al, 2003; SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

1ª Etapa - Reação de adição nucleofílica e formação das tiossemicarbazonas.

O mecanismo geral a seguir representa a formação dos compostos intermediários, ou seja, das tiossemicarbazidas substituídas. Caracteriza-se por um ataque simultâneo do nitrogênio do hidrato de hidrazina ao carbono da tiocarbonila, e deslocalização dos elétrons π para o nitrogênio vizinho, conduzindo aos derivados tiossemicarbazônicos (Esquema 1) (Tenório et al., 2005; IRIS, 2021).

Figura 15 - Mecanismo de formação dos compostos intermediários

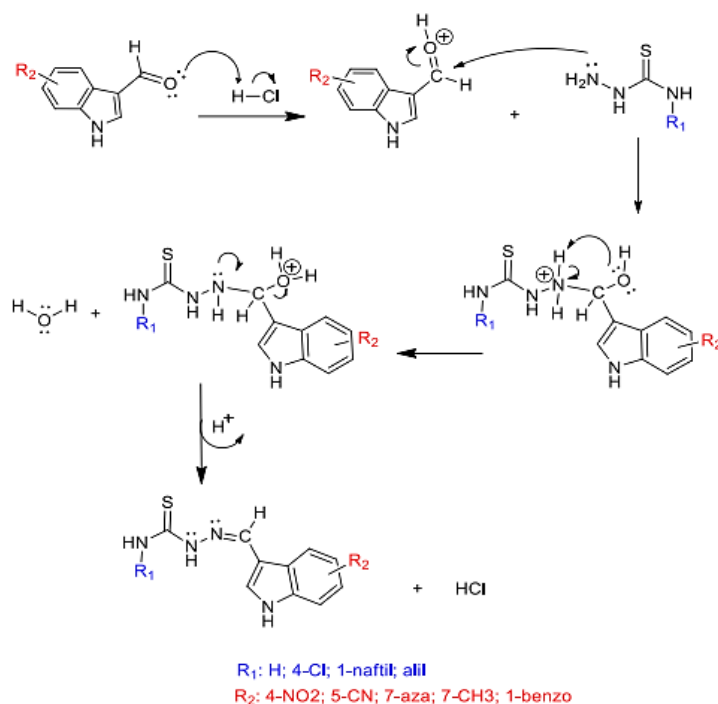


Fonte: Adaptado IRIS, 2021.

2ª Etapa - Reação de condensação e formação das tiossemicarbazonas.

A etapa da síntese para obtenção dos compostos finais caracteriza-se por uma reação de condensação. Ocorre uma ativação, por meio de um ácido, da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no nitrogênio da hidrazina, ataca o carbono positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo (**Esquema 2**) (Aquino, et al., 2008).

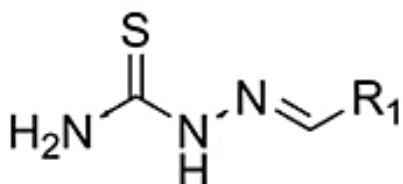
Figura 16 - Mecanismo de formação dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos.



Fonte: Adaptado IRIS, 2021.

Muitos exemplos foram sendo descritos nos últimos 50 anos, revelando atividade antitumoral (OLIVEIRA et al., 2015); FEUN et al., 2002; WADLER et al., 2004; RAMACHANDRAN et al., 2009), antibacteriana (COSTELLO et al., 2008; RAMACHANDRAN et al., 2009), antifúngica (RAMACHANDRAN et al., 2009), antiviral (MISHRA et al., 2002; FINKIELSZTEIN et al., 2008) e antiprotozoário (GREENBAOUM et al., 2004; ABID et al., 2008).

Figura 18 - Estrutura geral de uma tiossemicarbazona sintética



Fonte: BRAGA et al., 2016

A versatilidade farmacológica, se deve aos compostos agirem como inibidores de enzimas, interagindo com o DNA ou inibindo a sua síntese (KURUP & JOSEPH, 2003), além

disso, estudos explorando a síntese de Tiossemicarbazona complexadas com metais, demonstraram um amplo espectro de aplicação terapêutica, dessa forma sua ação resultar na formação de quelatos com íons metálicos, resultando um composto com vantagens, como a melhoria da farmacodinâmica, farmacocinética e mimetizando substratos endógenos (KALINOWSKA-LISA et al., 2008).

Atividade anti-tripanosomastídeo tem sido relatada em estudos que mostram a eficácia dessas moléculas contra *Leishmania* e *T. cruzi* (DA SILVA SANTOS et al., 2017; LINCIANO et al., 2018). Possíveis alvos biológicos e mecanismos de ação também são alvos desses estudos. As tiossemicarbazonas heterocíclicas são reconhecidas por ser inibidores potentes da atividade da enzima ribonucleosídeo redutase (RR). Esta enzima existe em todas as células vivas e apresenta a função de catalisar a formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos, um fator limitante para a síntese de DNA. Assim, RR vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer e doenças parasitárias. Dessa forma, o efeito antiproliferativo de derivados de tiossemicarbazona contra *L. donovani* parece ser mediado pelo bloqueio da síntese de DNA (DODD et al., 1989).

Algumas pesquisas demonstraram que uma Tiossemicarbazona derivada do limoneno demonstrou um efeito sobre as células de *L. amazonenses*, causando despolarização da membrana e aumento da peroxidação lipídica das células (BRITTA et al., 2012), em um outro estudo por Scariot e colaboradores, realizaram testes associados com a miltefosina, onde o tratamento forneceu dados células e mitocondriais ao parasito, da mesma forma que não foi tóxico à célula hospedeira (SCARIOT et al., 2017). Derivados tiossemicarbazonas em testes, de variados estudos apresentam baixa toxicidade em macrófagos peritoneais murino e linhagens J774, que induziram ação anti-*L. amazonensis*, através da modulação de citocinas e óxido nítrico.

Em um outro estudo realizado, com *L. infantum*, para avaliar a atividade anti-leishmania com compostos indol-tiossemicarbazonas, a pesquisa observou que *L. infantum* obteve valores de IC₅₀ foi entre 4,36 e 5,60 µM, além disso, os estudos com microscopia de varredura relatou um encolhimento do corpo celular desses parasitos, encurtamento e perda do flagelo, vacuolização do citoplasma e inchaço mitocondrial. Comparativamente em relação à toxicidade esses compostos demonstraram ser tóxicos apenas para a célula parasitária, visto que as células do hospedeiro se mantiveram saudáveis (DA SILVA et al., 2020).

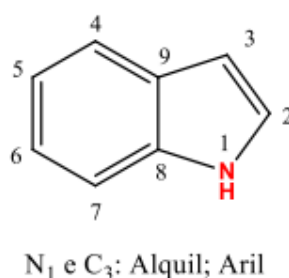
Derivados de tiossemicarbazonas demonstram a capacidade de inibir as cisteínas proteases da *Leishmania*, enzimas diretamente relacionadas à nutrição, ao processo de invasão do parasito, evasão dos mecanismos da resposta imune e replicação, além de ter um papel fundamental na diferenciação de promastigotas para amastigotas (SCHRÖDER et al., 2013.).

Outros trabalhos mostram que alguns derivados de tiossemicarbazona induzem a morte das leishmanias por apoptose (DA SILVA et al., 2017).

2.7 Indol

O Indol é um composto orgânico aromático heterocíclico que possui a fórmula estrutural C_8H_7N . Possui um anel benzênico ou anel aromático e uma estrutura bicíclica, ou seja, uma molécula que apresenta dois anéis ligados entre si, assim ambos compartilham uma ligação dupla. Os compostos indol estão amplamente distribuídos no ambiente natural, distribuído em aspectos fisiológicos como; presentes em hormônios (serotonina e melatonina), além disso, estudos realizados observaram que várias bactérias possuíam a capacidade de produzir esse tipo de composto (NOREEN et al., 2017)

Figura 19 - Estrutura do 1*H*- indol.



Fonte: JACOB, 2018.

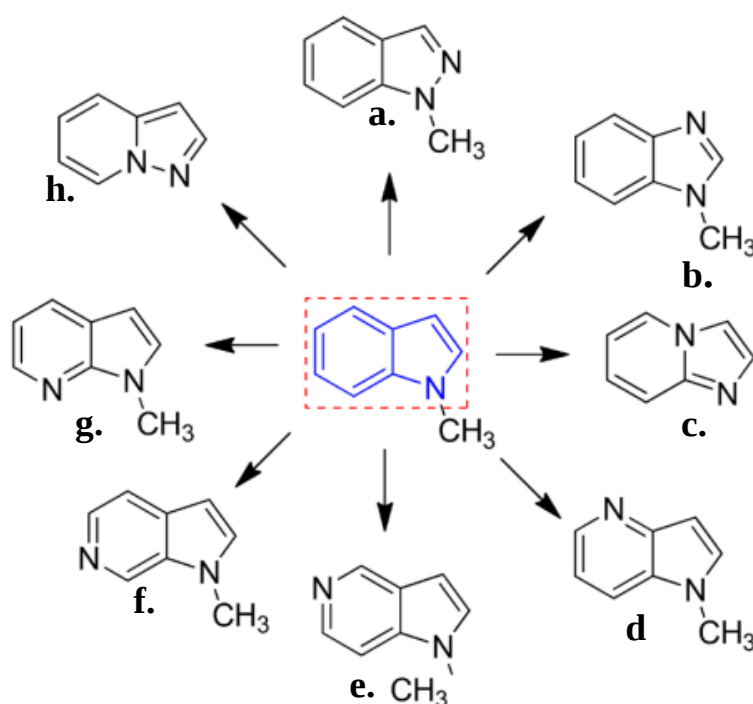
O núcleo indólico presentes em produtos naturais e sintéticos se caracteriza por ser uma estrutura heterocíclica aromática, sendo uma fusão dos núcleos benzênico e pirrólico (COLLIN, HÖKE, 2000) (**Figura 13**). O indol é uma molécula de sinalização interespecífica mais importante (LEE, 2015). A molécula é incorporada às proteínas na forma de aminoácido, fornece estrutura em neurotransmissores como serotonina e melatonina, além disso é um modelo estrutural comum em uma variedade de composto naturais e sintéticos (HÉNYKOVÁ et al., 2016; ESTEVÃO, 2010).

Uma das estratégias utilizadas durante o planejamento de novos candidatos a fármacos, é o bioisosterismo, que se trata de uma maneira de realizar modificações estruturais na substância utilizada como protótipo, afim de por meio da troca de determinado fragmento da molécula, por outro, que possua propriedades físico-químicas semelhantes (CHACALTONA, 2015).

Nesse contexto, é possível afirmar que o núcleo indólico constitui um heterociclo relevante, pois apresenta a capacidade de formar diferentes bioisómeros de anel. Esses isómeros podem ser

gerados pela substituição de um átomo de carbono por um átomo de nitrogênio, o que resulta na formação de oito variações estruturais do núcleo indólico (BLANCO et al., 1999; FDA, 2025; CAPASSO et al., 2012; YAMADA, et al., 2003; BARREIRO, et al., 2008; DESIMONE, et al., 2004; DE SA ALVES et al., 2009) (**Figura 16**)

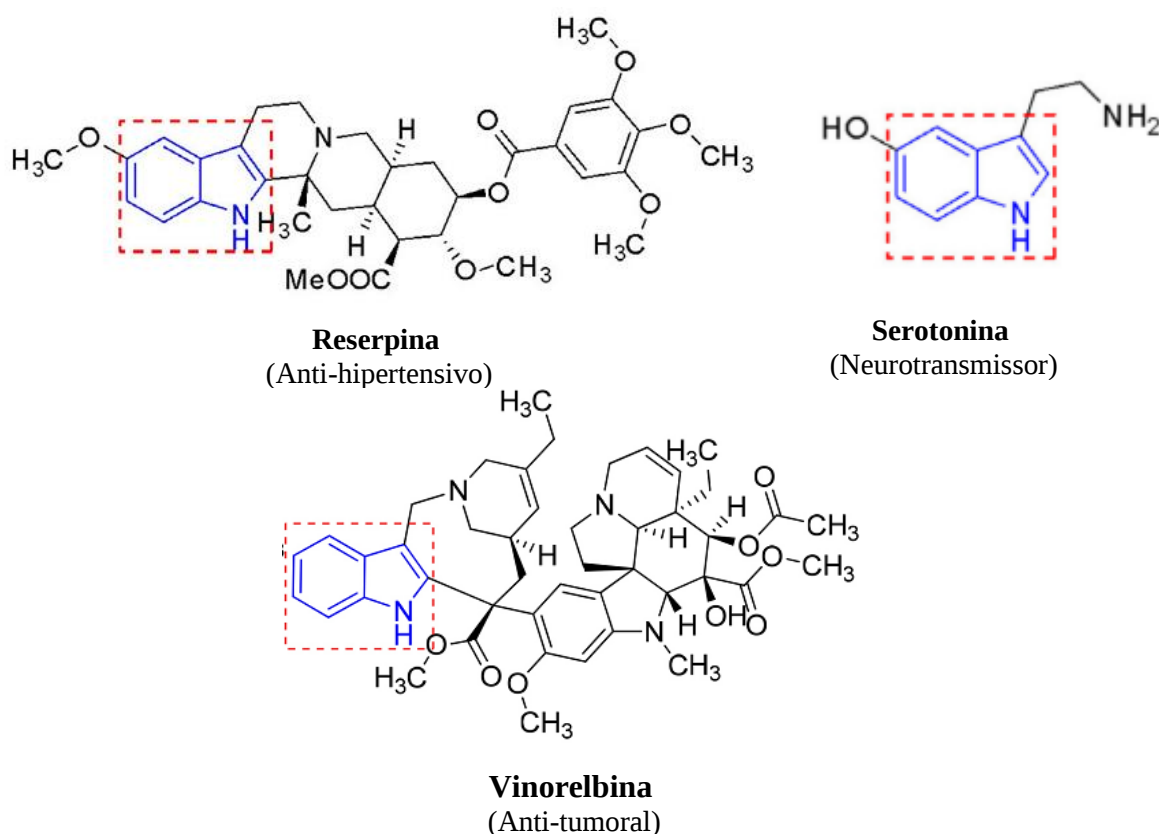
Figura 20 - Isósteros do núcleo indólico obtidos por meio da substituição de um átomo de carbono por um átomo de nitrogênio



Fonte: BLANCO, et al., 1999 (**a.**); FDA, 2025 (**b.**); DRUGBANK, 2025 (**d.**); CAPASSO et al., 2021 (**d.**); YAMADA, et al., 2003 (**e.**); BARREIRO, et al., 2008 (**f.**); DESIMONE, et al., 2004 (**g.**); DE SA ALVES, et al., 2009 (**h.**).

Segundo a plataforma Integrity (CORTELLIS, 2025), existem 121 fármacos lançados no mercado que contêm o núcleo indólico, sendo que 36 deles (30%) foram aprovados pelo FDA entre os anos de 2000 e 2021 (FDA, 2021). Atualmente medicamentos contendo o anel indólico estão disponíveis na clínica médica como os: o Repersine, um alcaloide indólico utilizado para tratamento de hipertensão; a vimblastina e a vinorelbina para tratamento tumoral (CHEN, HUANG, 2005; CHADHA, SILAKARI, 2017) (**Figura 18**).

Figura 21 - Estruturas de substâncias que apresentam a subunidade indol.



Fonte: Adaptado KAUSHIK, et al., 2013.

Já na atividade antiparasitária o grupamento indólico apresenta diversas possibilidades com novas moléculas ativas frente protozoários (MEZENECV et al., 2009; FARAHAHAT et al, 2017; SHARMA et al., 2014). Compostos contendo indol demonstram excelente potencial leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, revelando ainda que os derivados induzem a morte dos parasitos por apoptose (PANDEY et al., 2016). O grupo de pesquisa em inovação terapêutica-GPIT/UFPE, destacou que os derivados híbridos indol-tiofeno e indol-tiazolidina-4-tiona apresentou atividade anti-leishmania frente formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* frente formas promastigotas e amastigotas, respectivamente (FÉLIX et al., 2016; GOUVEIA, 2019).

Sendo assim as tiossemicarbazonas e o núcleo indólico com diferentes substituintes se apresentam como uma estratégia adequada para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários. De acordo com a metodologia adaptada de Tenório et al. (2005), a variabilidade na forma de obtenção, o baixo custo de síntese, a aplicação como intermediário de núcleos importantes, rapidez de síntese, altos rendimentos e a sua comercialização fazem com que a

tiosemicarbazonas se tornem quimicamente atraentes para realização de estudos (DU et al, 2002; HANG, BERTOZZI, 2001).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Analisar a ação Leishmanicida dos derivados sintetizados heterocíclicos e não cíclicos da indol-Tiossemicarbazona contra espécie de *L. braziliensis* e predizer *in silico* a atividade como potencial fármaco.

3.2 Objetivo específico

- a. Caracterizar *in silico* propriedades farmacodinâmicas e farmacocinética dos sintéticos;
- b. Avaliar *in vitro* o efeito do tratamento sobre promastigotas de *L. braziliensis* com compostos sintéticos identificados em experimentos LT-71, LTc-71, LT-79, LTc-79 e LTc 85;
- c. Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintéticos em cultura de macrófagos peritoneiais e linhagens de células L929 (Fibroblastos);
- d. Avaliar o índice de seletividade dos compostos indólico tiossemicarbazônicos a partir de macrófagos peritoneais e promastigotas de *Leishmania braziliensis*;

4. METODOLOGIA

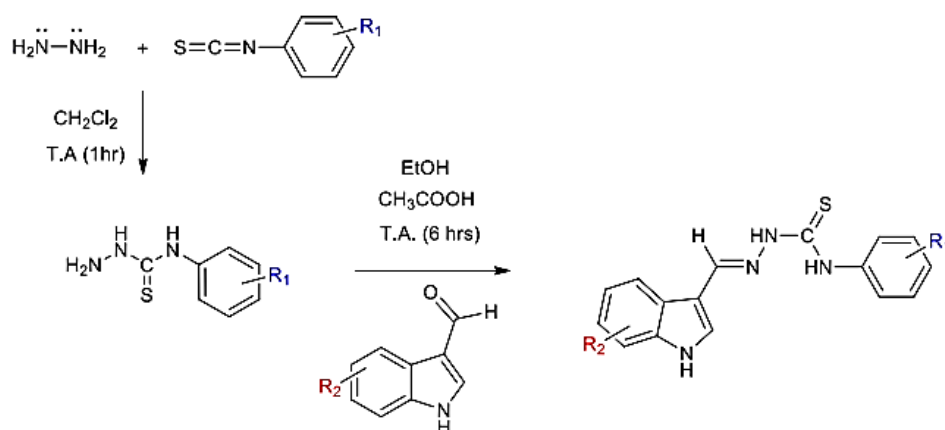
4.1 Estudo *in silico*

4.1.1 Compostos sintéticos derivados indol Tiossemicarbazona

Na primeira parte deste trabalho os derivados indólicotiossemicarbazonas já previamente sintetizados e caracterizados por espectroscopia ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13, infravermelho e espectrometria de massas, e avaliados quanto a atividade antioxidante pelo método de DPPH. Os 5 compostos foram provenientes do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e estão demonstrados na **figura 14**.

Os indol tiossemicarbazona foram obtidos segundo metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LQIT (IRIS, 2018). As moléculas indólicos-tiossemicarbazonas, foram sintetizadas a partir de isoticionatos substituídos e hridrazina hidratada, e indolcarboxaldeídos substituídos, foram obtidos os derivados tiossemicarbazônicos.

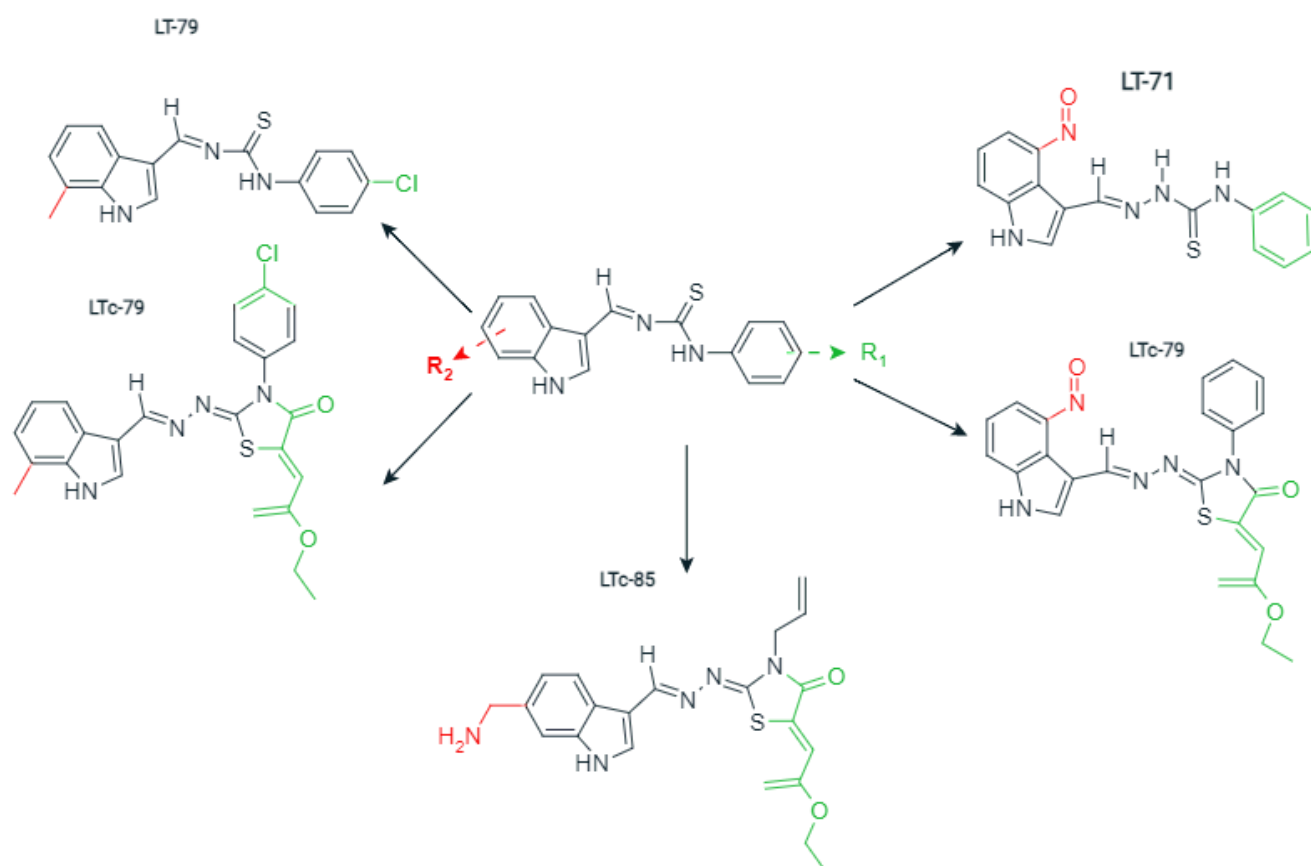
Figura 22– Diagrama de síntese dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas



Fonte: IRIS et al., 2018

Com a fusão destas duas partes, os compostos finais obtidos, foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados de 2°C a 8°. Esta solução foi então dissolvida em meio de cultura para obter as diferentes concentrações para realização dos demais experimentos.

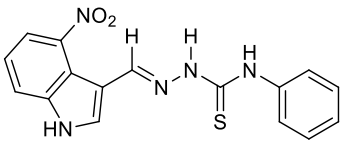
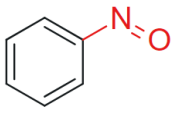
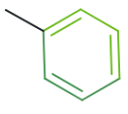
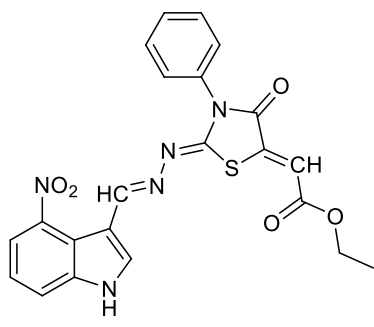
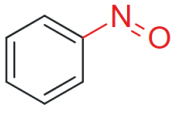
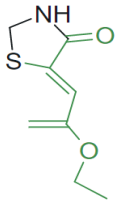
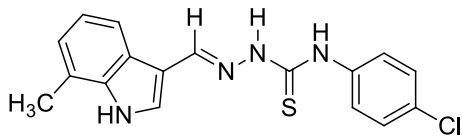
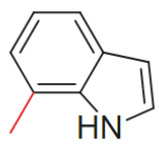
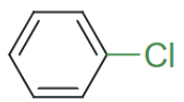
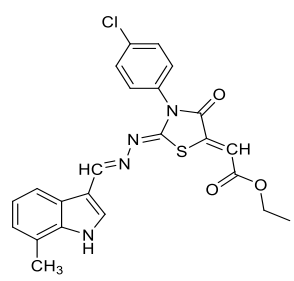
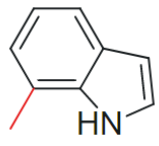
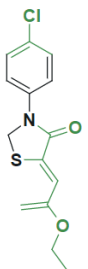
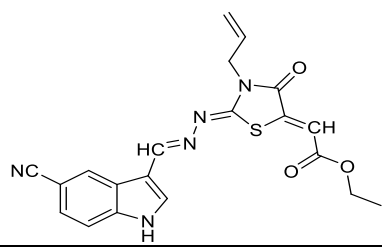
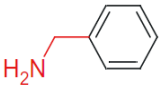
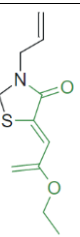
Figura 23 – Compostos sintéticos indólicos-tiossemicarbazonas



Fonte: Autora (2025)

A síntese permitiu a formação de 5 compostos descritos na **tabela 2**, os quais foram identificados levando em consideração as regras propostas pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Tabela 2 – Radicais adicionados com compostos indólicos tiossemicarbazonas

	Nomenclatura IUPAC	Radical 2	Radical 1
LT71 	2-((4-nitro-1H-indol-3-yl)methylene)-N-phenylhidrazinacarbotoamida		
LTc-71 	Etil-2-(2-((4-nitro-1H-indol-3-yl)methylene)hidrazona)-4-oxo-3-feniltiazolidin-ilideno) acetato		
LT-79 	N-(4-clorofenil)-2-((7-metil-1H-indol-3-yl)methylene)-N-fenilhidrazinacarbotoamida		
LTc-79 	Etil-2-(3-(4-clorofenil)-2-(((7-metil-1H-indol-3-yl)methylene)hidrazona)-4-oxotiazolidin-5-ilideno)acetato		
LTc-85 	Etil-2-(3-alil-2-(((5-ciano-1H-indol-3-yl)methylene)hidrazona)-4-oxotiazolidin-5-ilideno)acetato		

4.1.2 Determinação do perfil ADMET

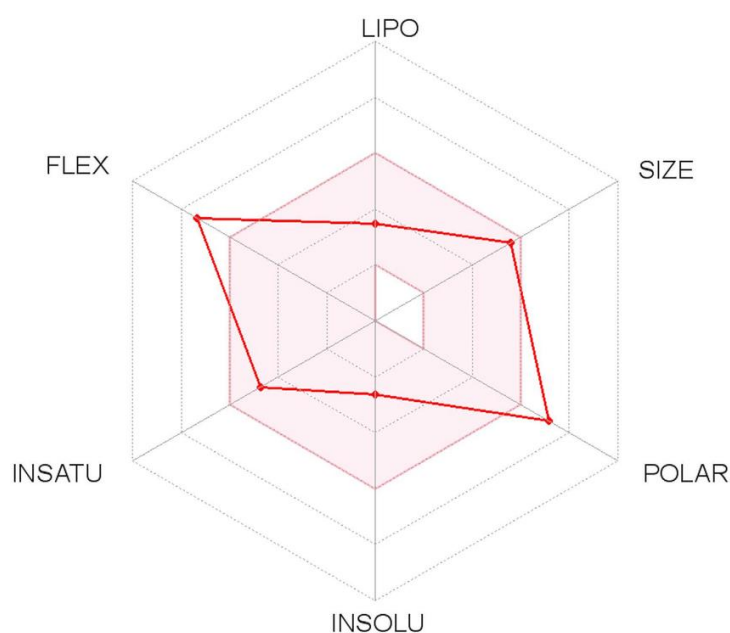
Os estudos *in silico* são fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos, por prever as propriedades físico-química, bem como o perfil ADMET das moléculas estudadas. Os parâmetros da área de superfície topológica polar (TPSA), solubilidade em água (LogS), toxicidade, coeficiente de partição ostanol/água (LogP), massa da molécula (g/mol), número de

grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (regra de Lipinski) foram avaliadas através do *software* SwissADME e pkCSM. Além desses a partir da TPSA foi calculado a porcentagem de absorção parcial gastrointestinal pela fórmula (ZAHO et al., 2000):

$$\%ABS: 109-[0,345 \times TPSA]$$

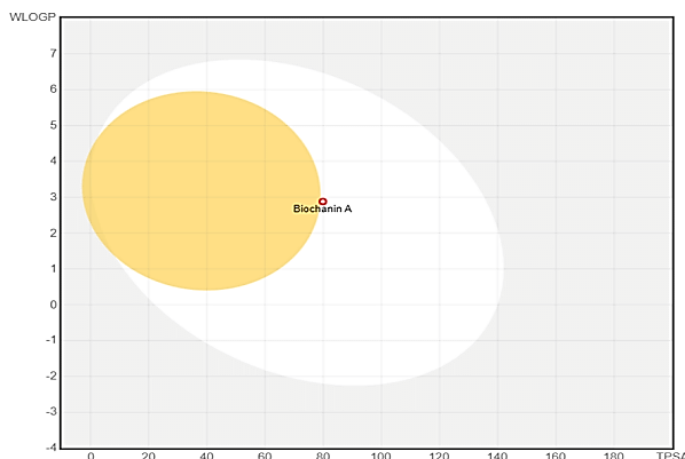
O programa SwissADME permitiu a apresentação de dados na forma do gráfico de *Bioavailability Radar*, responsável por demonstrar um conjunto de propriedades para uma excelente biodisponibilidade do fármaco, baseado nas seis características: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação, sendo assim a área rosa representa o intervalo ideal para cada tipo de propriedade, neste exemplo da **figura 19** preve-se que o composto não seja biodisponível oralmente, porque é muito flexível e muito polar (DAINA, MICHIELIN, ZOET, 2017).

Figura 24 – Bioavailability Radar: Gráfico de perfil ideal de biodisponibilidade (área rosa)



Fonte: DAINA, MICHIELIN, ZOET, (2017).

Também foi possível detectar utilizando o *software* SwissADME, a obtenção do gráfico *BOILED-Egg* (**figura 16**) para avaliar a absorção gastrointestinal passiva (HIA), (correspondendo a área elipsoide branca), a permeabilidade na barreira hematoencefálica (círculo amarelo), e avaliar a possibilidade dos sintéticos serem substratos da P-gp (glicoproteína P) (DAINA;ZOETTE, 2016).

Figura 25 – Gráfico BOILED – Egg

Fonte: Autora, (2025).

O círculo amarelo são moléculas que podem atravessar a barreira hematoencefálica, a elipse branca, são moléculas que apresentam possíveis características para absorção gastrointestinal passiva, e a região cinza, com perfil farmacocinético indesejável.

Para avaliar o perfil de toxicidade, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e propriedades físicas para um potencial terapêutico, foi utilizado o software pkCSM, afim de obter resultados qualitativos e quantitativos

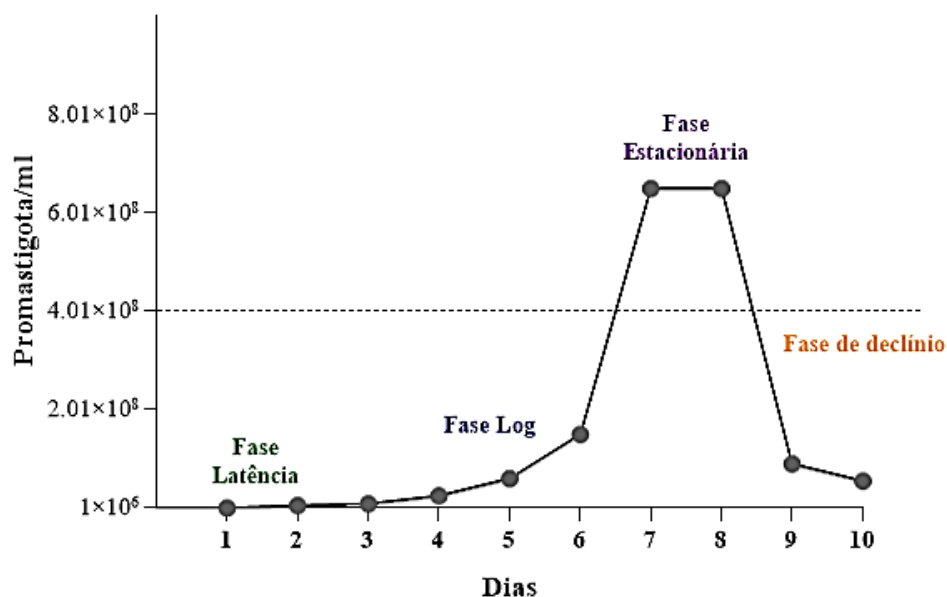
4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

A cepa da espécie *Leishmania braziliensis* LTB2903, pela professora Dra. Regina do departamento de Microbiologia, da FIOCRUZ IAM. As formas promastigotas dessa espécie foram mantidas *in vitro* em meio Schneider (Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/ml e estreptomicina 0.1 mg/ml – Gibco, BR). As culturas foram mantidas a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ na incubadora (BOD) e repicadas semanalmente, não excedente dez repiques, para que dessa forma fosse mantida a infectividade celular (MATHEUS, 2018).

As culturas de promastigotas em início da fase estacionária, identificadas através da curva de crescimento (**figura 26**) de dez dias, foram criopreservadas em SFB e 5% de DMSO e então armazenadas em freezer a -80°C para futuras utilizações. E de acordo com a necessidade, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 500 μl foram colocadas em 5 ml de meio Schneider suplementado e mantidos em estufa de BOD à $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Gráfico 26 – Curva de crescimento LTB 2903 durante 10 dias.



Fonte: AUTORA, 2025.

4.2.2 Animais e Aspectos Éticos

Camundongos BALB/c machos com 5 a 10 semanas de idade foram utilizados nos experimentos. Estes animais foram obtidos do biotério do Instituto Keizo Asami (iLIKA-UFPE), aprovados pelo comitê de ética do (Proc. No. 0085/2022).

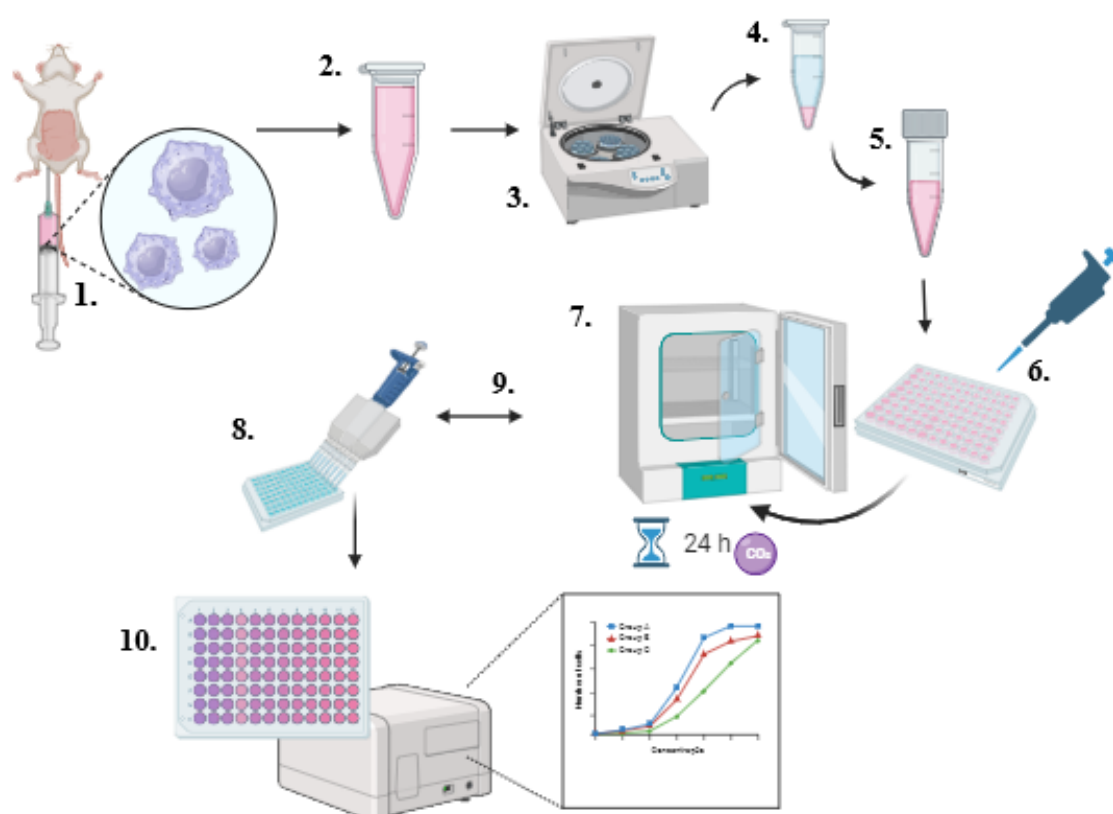
4.2.2.1 Extração de Macrófagos peritoneiais

Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Pernambuco - Instituto Keizo Asami (iLIKA). Os macrófagos foram obtidos por meio do lavado peritoneal de camundongos BALB/c estimulados com 5mL de solução estéril de salina tamponada com fosfato (PBS) gelado (Fonseca et al., 2016).

Os macrófagos em meio PBS, foram centrifugados por 5 min, à 1500 RPM. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, e foi ressuspensos com meio RPMI suplementado (SFB 10%; Antibiótico 1%). As células foram coradas com azul de *trypan*, e foram quantificadas na câmara de Neubauer, e em seguida, os macrófagos foram diluídos para a concentração 1 x

$10^6/\text{mL}$, distribuídas numa placa de 96 poços, e incubadas à 37°C , 5% de CO_2 . Após 24 horas de aderência, as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos derivados indólicos tiossemicarbazônicos. Depois de 24 horas de tratamento, as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade celular, através do reagente Resazurina.

Figura 27 – Fluxograma de extração de macrófagos

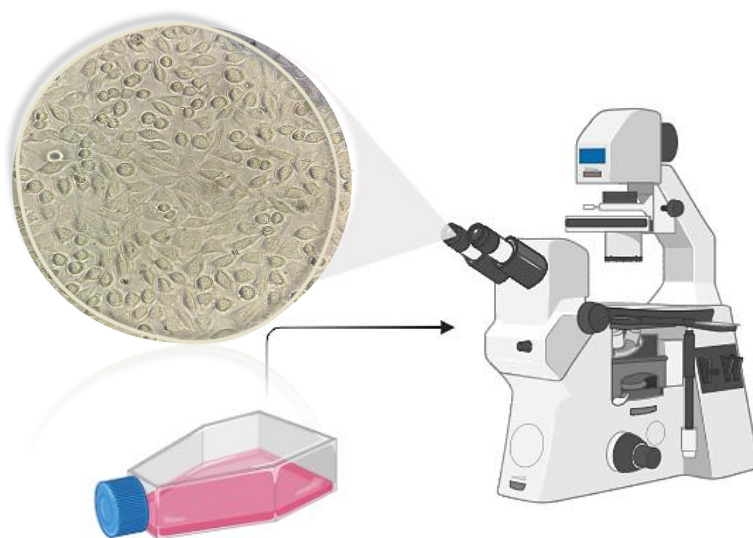


Legenda: 1. Extração dos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB-C, com meio RPMI gelado estéril não suplementado; 2. Manter em tubos falcons, em temperatura baixa; 3. Centrifugar à baixa temperatura, por 5min em 1500 BPM, para formação do pellet; 4. Desprezar o sobrenadante; 5. Ressuspender o pellet formado, com meio RPMI suplementado (SFB 10% e antibióticos 1%); 6. Adição/distribuição do volume para cada poço, em placa de 96 wells; 7. Manter a placa na estufa à 37°C , 5% de CO_2 por 24 horas; 8. Ao observar a bicamada dos macrófagos peritoneais aderidos no fundo do poço, retirar o meio RPMI mantido nessas 24 horas e adicionar as concentrações dos compostos que foram estabelecidas; 9. Retornar para a estufa a placa por 24 horas; 10. Com a adição do reagente para avaliar a viabilidade celular, realizar a leitura com o leito de elisa, nas ondas de comprimento estabelecidas.

4.2.3 Cultura de linhagens celulares

Foi utilizada linhagens celulares de L929, fibroblastos (CINTRA, et al., 2017). As células foram cultivadas em meio RPMI, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiotico (Penicilin e estreptomicina) em frascos de 25cm², em incubadora à 37°C, 5% de CO₂. Quando as culturas atingiram a semiconfluência, as células foram tripsinizadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscopia de luz invertido, e alíquotas foram congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade do experimento (**Figura 17**).

Figura 28 – Linhagem celular de fibroblastos (L929)



Fonte: Autora, 2025.

4.2.3.1 Tripsinização

As culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, foram adicionados a solução de tripsina a 0,25% e 0,05 de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e incubadas a 37°C. Sob observação microscópica, foi observado a dissociação das células da garrafa. A reação de tripsina foi interrompida pela adição de 5,0 mL de meio suplementado. A suspensão celular foi coletada em um tubo falcon de 15 ml, e centrifugado a 2000 RPM por 7 minutos, em temperatura 4°C. O meio sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspendidas em meio suplementado. Após efetuar a contagem celular, e efetuar a diluição das células para 1×10^6 , foram distribuídas nas placas de 96 poços.

4.2.4 Contagem de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em câmara de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização de cultura celular desejada. Para o cálculo da concentração de células utiliza-se a fórmula:

$$\text{Número de Células/mL} = \frac{\text{Número total de células} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Para determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma aliquota de células com solução de Azul de tripan a 0,1% (Diluição 1:1). Células híidas excluem o corante.

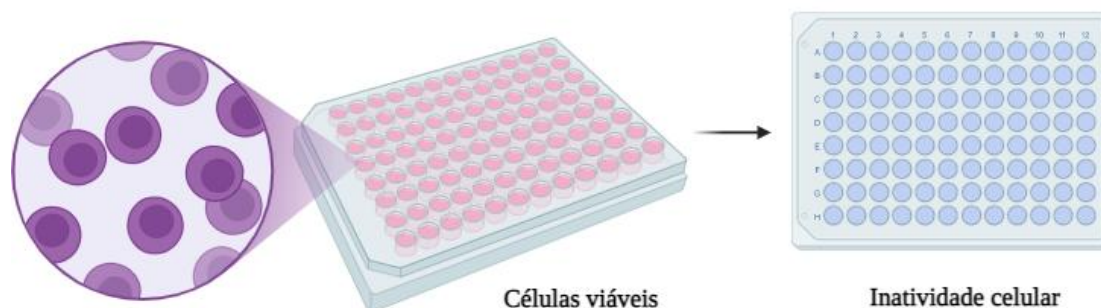
4.2.5 Viabilidade celular medida por resazurina

As células foram plaqueadas, em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^6 células/mL para as linhagens de L929. Cada poço recebeu 100 µl de meio contendo célula. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, 5% de CO₂. Após este período, foram adicionados as concentrações diferentes dos derivados indólicos tiossemicarbazônicos diluídos em meio. Os controles deste ensaio foi o branco, contendo apenas meio de cultura, controle positivo (anfotericina B) e controle negativo (células sem tratamento).

Após o período de 24 horas, foram adicionado resazurina sódica 0.01% em todos os poços 10 µl da solução em cada poço e esperando-se 3-4 horas, observou a modificação colorimétrica e realizou a leitura da placa em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão) (**Figura 28**).

A viabilidade dos parasitos verificada através da resazurina, método colorimétrico, é um corante azul oxidado, não fluorescente, que é reduzido à resofurina de cor rosa altamente fluorescente pelas hidrogenases mitocondriais quando as células estão viáveis, caso o contrário, se mantém na coloração azul (RAMPERSAD, 2012).

Figura 29 – Método colorimétrico com resazurina para viabilidade celular.



Fonte: Autora, 2025.

4.2.5.1 Cálculo da concentração inibitória de 50% das células

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi determinado utilizando regressão não linear: logaritmo da concentração da dose versus a resposta normalizada (porcentagens de células viáveis) determinados pelos programas GraphPad Prism 5.0 e Microsoft Office Excel 2018.

4.2.5.2 Índice de seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada e serviu para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto. O IS indica a seletividade de cada composto contra o parasito, sem prejudicar a viabilidade da célula do hospedeiro.

$$IS = \frac{\text{Concentração inibitória de 50\% dos macrófagos peritoneiais (CC}_{50})}{\text{Concentração inibitória de 50\% de promastigotas (IC}_{50})}$$

4.3 Análise estatística

Os valores de concentração inibitória de 50% (IC_{50}), concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foram calculados usando o programa software Graph Pad Prism 5.0. A análise estatística foi realizada usando regressão não linear. Os ensaios foram realizados em triplicata e três experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com teste post hoc Tukey em um nível de significância ($p < 0,05$).

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigo (Apêndice A) que será enviado ao periódico REVISTA BRASILEIRA DE QUIMICA -Qualis A2

5.1 Resultados e Discussão

Análise In Silico

A maioria das moléculas apresentou solubilidade em água moderada, conforme mostrado na Tabela 2. A solubilidade em água, uma das principais propriedades físico-químicas consideradas durante o desenvolvimento de novos fármacos, foi prevista utilizando três métodos diferentes: os modelos ESOL [20], Ali [21] e SILICOS-IT. A solubilidade dos compostos orgânicos foi representada por logS, onde S é a concentração do composto em mol/L.

Tabela 2. Resultados in silico para a solubilidade em água prevista dos compostos testados.

Moléculas	ESOL	Ali	SILICOS-IT
LT 71	Soluble	Moderately Soluble	Soluble
LTc 71	Moderately Soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble
LT 79	Moderately Soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble
LTc 79	Poorly soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble

Source: Author, 2025.

O uso de múltiplos modelos preditivos permite uma avaliação mais robusta e confiável das propriedades de solubilidade. Cada método possui características distintas em relação ao tipo de modelo utilizado, aos descritores moleculares considerados e à precisão geral (Tabela 3). A comparação das previsões desses métodos fornece uma estimativa mais abrangente do comportamento do composto em ambientes aquosos, auxiliando na seleção e otimização de candidatos a fármacos com perfis biofarmacêuticos aprimorados. A concordância entre os modelos aumenta a confiança nos valores previstos, enquanto eventuais discrepâncias podem indicar a necessidade de investigações adicionais ou validação experimental.

Tabela 3. Principais diferenças entre os modelos de predição de solubilidade ESOL, Ali e SILICOS-IT

Model	Model Type	Parameters Used	Accuracy	Complexity	Best For
Esol	Linear regression	logP,molecular weight,heavy atoms	Medium	Low	Quick initial estimates
Ali	Multiple regression	Molecular descriptors (logP,rotatable bonds)	Good	Medium	Screening in drug discovery pipelines
Silicos-It	Machine learning	Fingerprints + structural descriptors	High	High	More refined <i>in</i> <i>silico</i> analysis

Os resultados obtidos para a previsão da solubilidade dos derivados em água demonstraram que eles variam de moderadamente solúveis a ligeiramente solúveis. Devido à presença de grupos fenólicos orto-substituídos, indol [23] e ao comprimento da cadeia carbônica, esses derivados apresentam um perfil mais hidrofóbico [24].

Na Tabela 4, as indol-tiossemicarbazonas foram analisadas quanto às suas propriedades físico-químicas, e observou-se que as moléculas sintéticas não violaram a Regra dos Cinco de Lipinski (Ro5) [25]. Os compostos LT 71 e LTc 71 apresentaram diferenças significativas em alguns dos parâmetros analisados, conforme descrito na Tabela 4.

A área de superfície polar topológica do LTc 71 mostrou-se maior devido ao comprimento da cadeia, o que também influenciou sua capacidade de aceitar e doar ligações de hidrogênio. Observou-se que esse composto aceita mais ligações de hidrogênio do que doa. Em ensaios de desenvolvimento de fármacos, quanto mais um composto doa ligações de hidrogênio, mais forte tende a ser sua interação com os receptores celulares-alvo [26].

Tabela 4. Propriedades Físicoquímicas ADMET

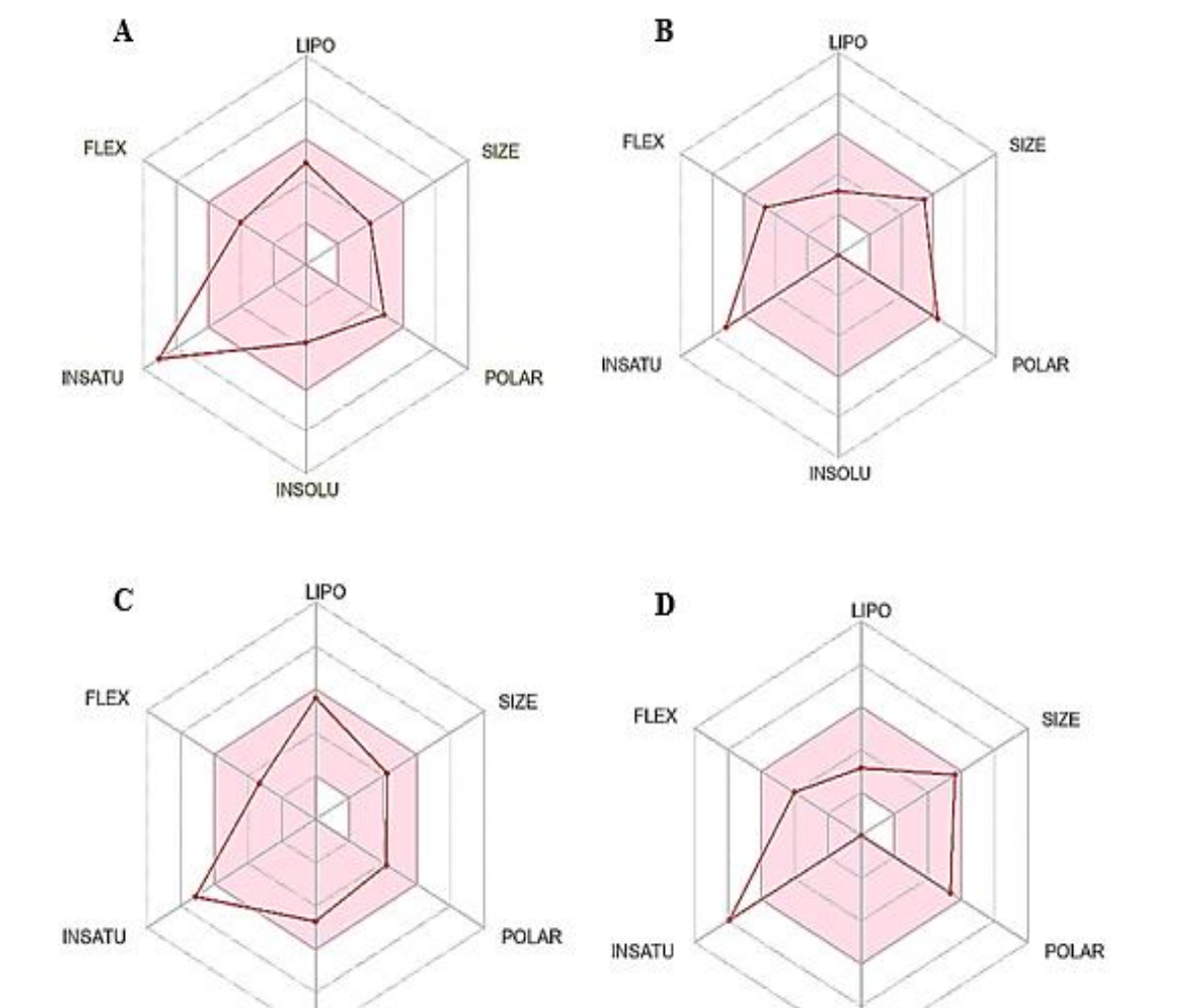
Molecules	MM (g/mol)	Nº Rotation	DH	TPSA (Å²)	LogP	AH
LT 71	323,37	6	3	113,73	2,46	3
LTc 71	447,47	7	1	141,85	4,10	7
LT 79	344,86	5	3	80,54	3,19	1
LTc 79	466,94	6	6	112,42	4,67	5

Legenda: MM: massa molecular; No. Rot: número de ligações rotacionáveis; AH: número de aceptadores de ligações de hidrogênio; DH: número de doadores de ligações de hidrogênio; TPSA: área de superfície polar topológica; LogP: coeficiente de partição octanol/água. -2,81 / solúvel.
Fonte: Autor, 2025.

Além disso, é preferível que os fármacos apresentem estruturas químicas tanto polares quanto apolares para otimizar o processo farmacocinético. Isso porque, quanto mais uma substância é solubilizada no meio, melhor é sua interação com as membranas celulares, potencializando a ação do fármaco [24].

Ao avaliar os compostos LT 79 e LTc 79, observou-se que ambos apresentaram uma área de superfície polar topológica menor em comparação com LT 71 e LTc 71. Essa diferença deve-se à presença do halogênio (cloro), o que confere a esses derivados uma maior permeabilidade em regiões polares [27].

Figura 1. Radar de Biodisponibilidade Oral dos Compostos



Legenda: LIPO (lipofilicidade), INSOLU (solubilidade), INSATU (saturação), FLEX (flexibilidade), SIZE (tamanho – peso molecular) e POLAR (polaridade). LT 71 (A); LTc 71 (B); LT 79 (C); LTc 79 (D).

Fonte: Autor, 2025.

Além disso, é preferível que os fármacos apresentem estruturas químicas tanto polares quanto apolares para otimizar o processo farmacocinético. Isso porque, quanto mais uma substância é solubilizada no meio, melhor é sua interação com as membranas celulares, potencializando a ação do fármaco [24].

Ao avaliar os compostos LT 79 e LTc 79, observou-se que ambos apresentaram uma área de superfície polar topológica menor em comparação com LT 71 e LTc 71. Essa diferença deve-se à presença do halogênio (cloro), o que confere a esses derivados uma maior permeabilidade em regiões polares [27].

Os seis parâmetros apresentados na **Figura 1** para os quatro compostos indicaram, principalmente, que as indol-tiosemiocarbozonas são moléculas adequadas para administração oral. Em todos os compostos analisados, observa-se a presença de cadeias insaturadas, caracterizadas por ligações duplas ou triplas. Essas ligações se conectam de forma covalente, tornando a degradação desses derivados mais difícil [28].

Por outro lado, a principal vantagem de um fármaco que forma ligações covalentes com seu alvo biológico é sua alta potência e longa duração de efeito. Ao contrário das interações não covalentes, como as ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals, as ligações covalentes são fortes, garantindo que o fármaco permaneça ativo por um período prolongado [29,30]. Apesar dessa estabilidade, esses compostos ainda são considerados adequados para administração oral. De acordo com a Regra de Lipinski, um fármaco pode violar até duas de suas diretrizes e ainda assim ser viável para absorção oral [31].

Fármacos covalentes administrados por via oral representam uma abordagem terapêutica inovadora e eficaz para o tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, infecções virais e distúrbios inflamatórios [30,32]. A administração oral de medicamentos é preferida devido a fatores clínicos e farmacológicos, como facilidade de uso, conveniência, maior adesão do paciente, segurança, menor risco de infecção e a possibilidade de alcançar um metabolismo mais controlado e liberação gradual do fármaco [33,34].

A ferramenta online **pkCSM** previu a trajetória e as atividades esperadas desses compostos por meio da avaliação de sua estrutura molecular, conforme descrito na Tabela 5.

	LT-71	LTc-71	LT-79	LTc-79	Unit
Absorption					
Water solubility	-3,61	-5.615	-4.745	-6.02	(log mol/L)
Caco2 permeability	0,532	0.0082	1.359	0.801	(log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Intestinal absorption	87.115	96.928	85.856	91.767	(%Absorbed)
Skin Permeability	-2,743	-2.921	-2.875	-2.93	(log Kp)
P-glycoprotein substrate	No	Yes	Yes	Yes	(Yes/No)
P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	(Yes/No)
P-glycoprotein II inhibitor	No	Yes	No	Yes	(Yes/No)
Distribution					
VDssa	0,308	0	0.486	0.145	(log L/kg)
Fraction unbound	0	0.009	0.096	0,018	(Fu)
BBB permeability	Não	-0.904	0.169	-0.714	(log BB)
CNS permeability	-1,836	-2.261	-1.474	-1.85	(log PS)
Metabolism					
CYP3A4 substrate	Yes	Yes	Yes	No	(Yes/No)
CYP1A2 inhibitor	Yes	No	Yes	Yes	(Yes/No)
CYP2C19 inhibitor	Yes	Yes	Yes	No	(Yes/No)
CYP2C9 inhibitor	Yes	Yes	No	Yes	(Yes/No)
CYP2D6 inhibitor	No	No	Yes	No	(Yes/No)
CYP3A4 inhibitor	Yes	Yes	No	Yes	(Yes/No)
Excretion					
Total clearance	-0,252	0.0338	0.406	0.054	(log mL/min/kg)
Renal OCT2 substrate	Yes	No	No	No	(Yes/No)
Toxicity					
AMES toxicity	Yes	No	Yes	No	Categorical (Yes/No)
Maximum tolerated dose	-0,019	-0,223	-0,094	-0.148	Numeric (log mg/kg/day)
hERG I inhibitor	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
hERG II inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Categorical (Yes/No)
Oral rat acute Toxicity	2.536	2.866	2.729	2.746	Numeric (mol/kg)
Oral rat chronic Toxicity	1.111	1.2	1.756	1.001	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Hepatotoxicity	No	Yes	No	Yes	Categorical (Yes/No)
Skin Sensitization	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
<i>T. Pyriformis</i> toxicity	1.065	0.388	1.781	0.625	Numeric (log µg/L)
Minnow toxicity	-0,414	-1,947	1.015	-2.86	Numeric (log mM)

Tabela 5. Perfil farmacocinético dos compostos indol-tiossemicarbazonas durante a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e seus efeitos tóxicos

As moléculas apresentaram baixa solubilidade em água, alta permeabilidade intestinal (>90%), permeabilidade para células Caco-2 e epiderme, sugerindo que elas podem ser candidatas para administração oral ou transdérmica. Em relação à P-glicoproteína, o LT 71 foi identificado como substrato dessa proteína, enquanto o LT 79 e o LTc 71 foram classificados como inibidores da P-glicoproteína II.

Medicamentos transdérmicos para leishmaniose são uma alternativa promissora para o tratamento da doença, principalmente devido à sua capacidade de fornecer a medicação de forma controlada e menos invasiva [35]. Embora a maioria dos tratamentos convencionais para leishmaniose seja administrada por via parenteral (intravenosa ou intramuscular), pesquisas recentes exploram sistemas transdérmicos para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos adversos [36-37].

Nenhuma das moléculas pode ser considerada permeável à barreira hematoencefálica (BHE) ou ao sistema nervoso central (SNC), o que pode descartar a ocorrência de efeitos colaterais em outras atividades biológicas na região cerebral. A solubilidade de um fármaco em ambientes aquosos e lipofílicos é essencial para sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Essa característica influencia diretamente a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica da substância [38].

O LTc 71 e o LTc 85 foram considerados não-inibidores da isoforma CYP1A2, enquanto LT 71, LTc 71 e LT 79 foram previstos como inibidores da CYP2C9. Além disso, o LT 79 foi identificado como inibidor da isoforma CYP3A4. Quase todas as moléculas foram previstas como substratos da CYP3A4, uma das principais enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, indicando um possível metabolismo hepático para essas moléculas. Em relação à excreção, foi descrito que apenas o LT 71 foi substrato do OCT2.

Os testes de toxicidade apresentaram um perfil favorável para o desenvolvimento de fármacos, entretanto, uma previsão desfavorável para o LT 71 e LT 79 foi seu potencial mutagenicidade. Por outro lado, esses compostos não foram previstos como hepatotóxicos nem inibidores dos canais hERG I e hERG II (human ether-related gene). O hERG é um alvo antagônico comum e significativo no desenvolvimento de fármacos devido à sua associação com efeitos cardíacos adversos.

Ensaio *In Vitro*

Investigamos cinco compostos de indol-tiosemiocarbonazonas quanto à sua eficácia contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, avaliando também a citotoxicidade contra macrófagos peritoneais e fibroblastos L929. Este estudo teve como objetivo identificar os compostos mais ativos e seletivos contra o parasita. Os derivados que apresentaram atividade mostraram valores de IC₅₀ variando de 6,14 µM a 14,09 µM. A Tabela 6 descreve os valores de IC₅₀, EC₅₀ e CC₅₀ para fibroblastos e macrófagos peritoneais.

Tabela 6. Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos contra macrófagos peritoneais e valores de índice de seletividade calculados para indol-tiossemicarbazonas

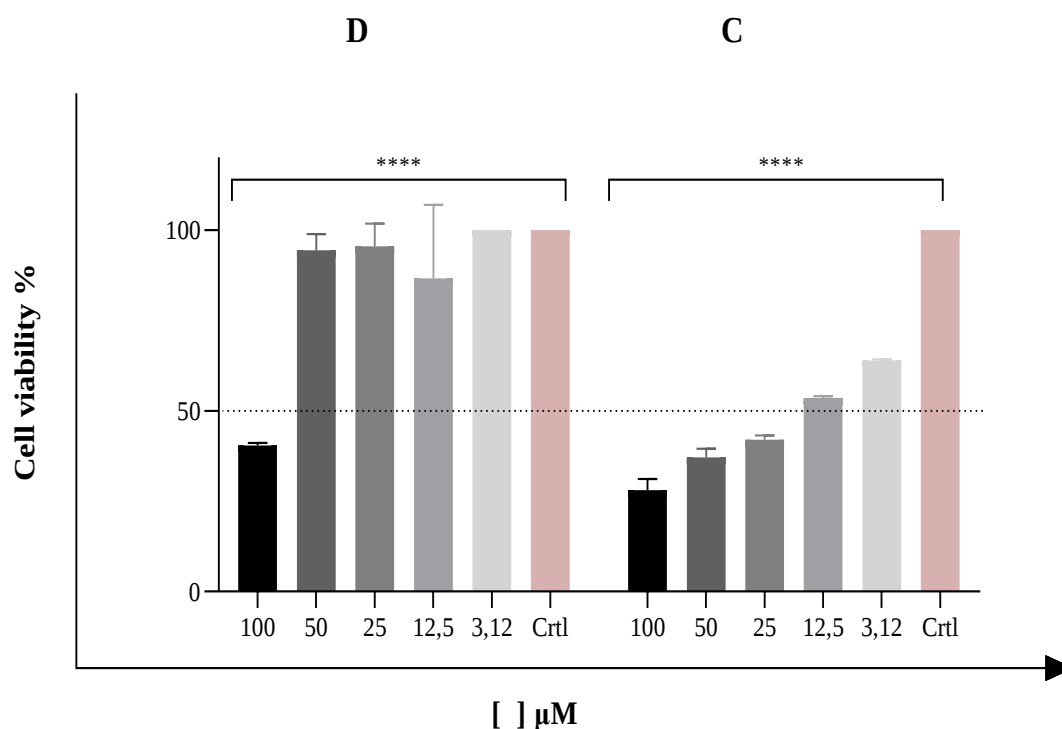
Molecules	Murine peritoneal	Fibroblasts	<i>L. braziliensis</i> (LTB2903)	
	macrophages	L929	CI ₅₀ <i>pro</i>	IS
	CC ₅₀ (µM ± DP)	CC ₅₀ (µM ±DP)	CI ₅₀ <i>pro</i> (µM ± DP)	IS <i>pro</i>
LT 79	55 µM ± 3.9	> 100 µM	12,80 ± 3.8	4,29
LTc 79	5,29 ± 3.5	> 100 µM	6,74 ± 2,88	0,78
LT 71	> 200 µM	> 100 µM	14,09 ± 1,05	13,42
LTc 71	> 200 µM	> 100 µM	13,64 ± 0,41	14,66
Anfotericina B	0,5 ± 0,1		0,27 ± 0,33	2,3

Legend: Data were presented as mean ± from experiments conducted in triplicate, with cytotoxicity assays performed in duplicate. CC₅₀: half-maximal cytotoxic concentration; IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration; SI: selectivity index. SI = CC₅₀ / IC₅₀.

Os derivados de indol-tiossemicarbazonas demonstraram baixa citotoxicidade em macrófagos, sugerindo um perfil de segurança favorável para futuras investigações terapêuticas, corroborando os achados de Moreira et al. [54] e Silva et al. [8]. Apenas o derivado LTc 79 apresentou alta citotoxicidade em macrófagos peritoneais, o que pode ser atribuído à presença do *cloro* em sua estrutura.

Embora os halogênios, em geral, facilitem a passagem das moléculas através das membranas celulares, o cloro, especificamente, é um elemento altamente reativo [55]. Sua capacidade de induzir processos redox e sua tendência a se ligar a outros elementos, especialmente ao hidrogênio, podem ter promovido interações celulares que desencadearam estresse oxidativo por meio de reações redox [55,31].

Figure 4. Citotoxicidade das indol-tiosemiocarbonazonas LTc 79 (C) e LT 79 (D) em células de



mamíferos em 24 horas de tratamento

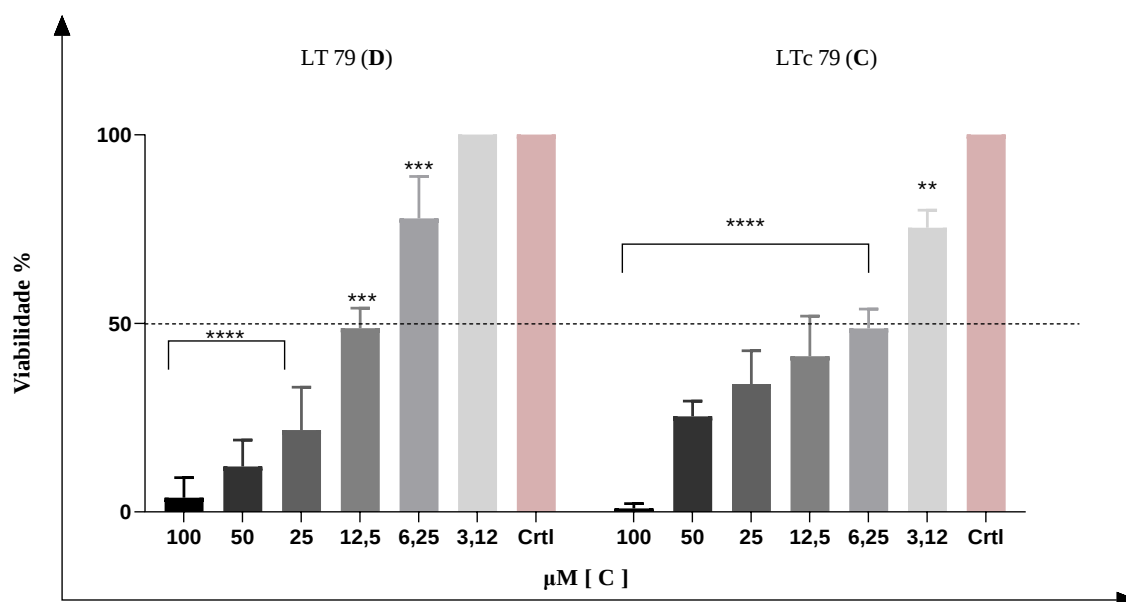
Legenda: Efeitos citotóxicos dos compostos LTc 79 (C) e LT 79 (D) em macrófagos peritoneais. Ctrl: células não tratadas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (****) indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle não tratado ($p < 0,0001$).

Citotoxicidade das indol-tiossemicarbazonas em células de mamíferos foi determinada em macrófagos peritoneais (Figura 4). Observou-se que, nas concentrações de 12,5 μM, 25 μM e 3,12 μM do LT 79 (D), os macrófagos apresentaram 100% de viabilidade celular em comparação ao controle. Quanto ao composto LTc 79 (C), houve redução respectiva, com a viabilidade celular diminuindo para 45%, 53% e 60% nas mesmas concentrações (Figura 4).

A anfotericina B apresentou um IC_{50} menor do que os compostos indol-tiossemicarbazonas; entretanto, o índice de seletividade obtido indicou alta toxicidade às células hospedeiras. As moléculas sintéticas foram menos tóxicas para macrófagos e fibroblastos, apresentando maior seletividade para o parasita. O composto LTc 71 apresentou o melhor índice (14,66) (Tabela 5).

A inibição dos derivados sintéticos contra *Leishmania braziliensis* revelou três pontos importantes na relação estrutura-atividade desses compostos. Primeiro, os compostos LTc 71 e LT 71 não apresentaram diferenças significativas em eficácia, sugerindo que a cadeia ligadora não desempenha papel relevante na atividade antiparasitária. Segundo, esses mesmos compostos demonstraram maior seletividade, apresentando ação efetiva contra *Leishmania braziliensis* sem causar toxicidade significativa às células hospedeiras. Finalmente, os compostos LTC 79 e LT 79 exibiram maior eficácia contra o parasita, o que pode ser atribuído à presença do halogênio em sua estrutura, que potencializa sua atividade.

Figura 2. Perfil inibitório dos compostos LT 79 e LTc 79 sobre *Leishmania braziliensis* após 24 horas de tratamento.



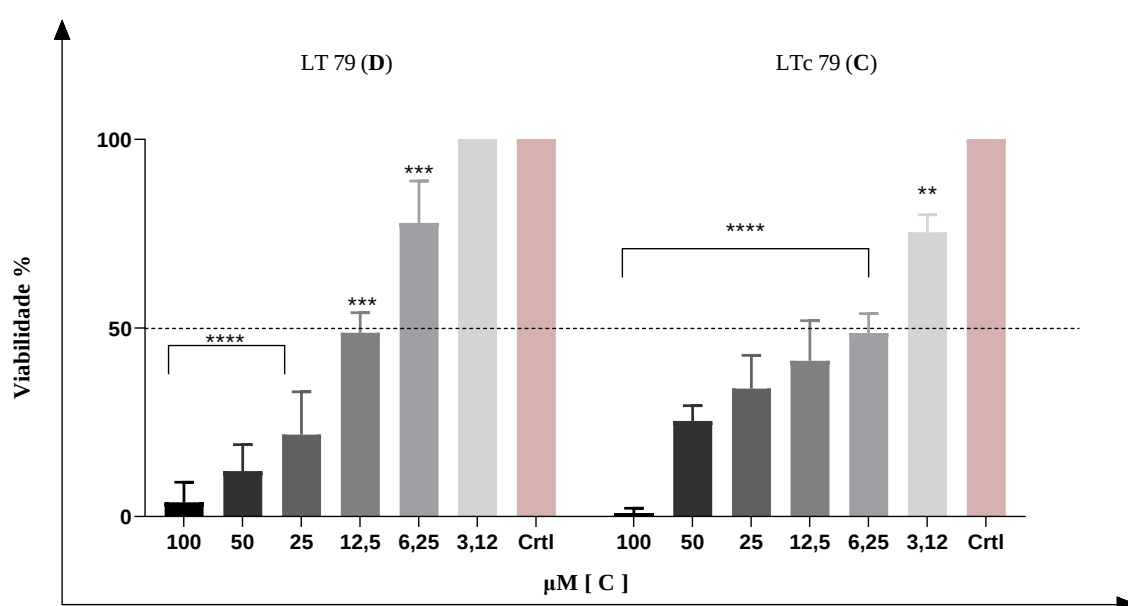
Legenda: Efeito dos compostos LTc 79 e LT 79 sobre os promastigotas de *Leishmania braziliensis*. LTc 79 (C) e LT 79 (D). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle não tratado ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Os compostos LTC 79 e LT 79 demonstraram atividade significativa contra *Leishmania braziliensis* em baixas concentrações, destacando-se como potenciais agentes terapêuticos contra o parasita. Entretanto, a avaliação de toxicidade revelou que, embora esses compostos apresentem atividade eficaz contra *Leishmania*, LTC 79 e LT 79 foram tóxicos para macrófagos em baixas concentrações, sem apresentar efeitos tóxicos nos fibroblastos, indicando um grau de seletividade celular.

A análise estrutural sugeriu que a presença do oxazolidina e do grupo acetato na estrutura do LTC

79 foi crucial para potencializar sua atividade antiparasitária, tornando-o mais eficaz contra *Leishmania* em comparação ao LT 79. Esses grupos funcionais, juntamente com o halogênio, provavelmente facilitam a interação do composto com o parasita, aumentando sua atividade biológica e tornando o LTC 79 mais eficiente mesmo em doses menores.

Figura 3. Perfil inibitório dos compostos LT 71 e LTc 71 sobre *Leishmania braziliensis* após 24 horas de tratamento.



Legenda: Efeito dos compostos LTc 71 e LT 71 sobre os promastigotas de *Leishmania braziliensis*. LTc 71 (A) e LT 71 (B). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (), () e () indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle não tratado ($p < 0,1$; 0,01 e 0,001, respectivamente).

Os compostos LTC 71 e LT 71 apresentaram o melhor índice de seletividade, fator crucial para uma terapia eficaz contra a leishmaniose, especialmente quando comparados ao fármaco padrão utilizado na prática clínica. Esses derivados contêm um grupo nitro ligado a um anel benzênico, estrutura conhecida por sua capacidade de induzir morte celular. Segundo Britta et al. (2014), essa configuração molecular estimula a produção de radicais ânions superóxidos mitocondriais, mecanismo que contribui para a morte do parasita, reforçando o potencial terapêutico promissor desses compostos contra *Leishmania*.

Assim, a conformação química, o tipo de ligação e a composição atômica foram determinantes-chave das propriedades únicas de cada composto. As moléculas testadas diferem

principalmente nas substituições dos radicais indol e nas modificações na estrutura da tiosemicarbazona. Essas variações estruturais influenciaram diretamente o comportamento individual de cada composto, impactando sua atividade biológica e potencial terapêutico.

6. CONCLUSÃO

Compostos sintéticos de tiosemicarbazona de indol mostraram potencial promissor como agentes terapêuticos contra *Leishmania braziliensis*, destacando a importância da busca por novos tratamentos para a leishmaniose e a necessidade de alternativas eficazes e seletivas.

O uso de estudos in silico provou ser uma ferramenta essencial para prever a atividade desses derivados, auxiliando na identificação de compostos com perfis farmacológicos melhores mesmo antes dos testes biológicos. Entre os compostos avaliados, aqueles com um grupo nitro substituindo o anel pirrol do indol se destacaram por formar uma molécula altamente seletiva e eficaz contra o parasita.

No entanto, derivados contendo halogênios, como o cloro, embora exibam maior eficácia antiparasitária, também promoveram estresse oxidativo nas células hospedeiras, o que pode representar um desafio para o uso terapêutico. Esses achados enfatizam a necessidade de pesquisas adicionais para otimizar a estrutura química desses compostos, visando equilibrar eficácia e segurança no tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniose no mundo e estimativas globais de sua incidência. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALANAZI, A. D.; SAID, M. B. Plant Bioactive Ingredients in Delivery Systems and Nanocarriers for the Treatment of Leishmaniasis: An Evidence-Based Review. *Iranian Journal of Parasitology*, 10 dez. 2022.

ABDELBASSET, A.; FARAHAT, A.A.; ISMAIL, M.A.; KUMAR, A.; WENZLER, T.; MOHAMED, A.; Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.143, p.1590-1596, 2018.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2 ed. Editora Elsevier, 2007.

ANSELMO, L. B.; BARBUTO, J. A. M. Liberação de óxido nítrico (NO) por células peritoneais de camundongos imunizados com BCG sob estímulo com células tumorais. *Resumos*, 2001.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current Opinion in Microbiology*, v. 26, p. 32–40, ago. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*. Brasília: Ministério da Saúde, 2017

BRASIL. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*. 2017, Brasília – DF, 1ª ed., pag. 1-191

BRASIL. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Preços máximos de medicamentos por princípio ativo, para compras públicas preço fábrica (pf) e preço máximo de venda ao governo (PMVG). [Brasília?]: ANVISA, [s.d.].

BAECHER-ALLAN, C.; WOLF, E.; HAFLER, D. A. MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 8, p. 4622–4631, 3 abr. 2006.

BRANHAM, M. L.; ROSS, E. A.; GOVENDER, T. Predictive models for maximum recommended therapeutic dose of antiretroviral drugs. *Comput Math Methods Med*, 2012, p. 469769, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, 2a. ed., Artmed: Porto Alegre, 2008.

Blanco, F. J.; Guitian, R.; Moreno, J.; de Toro, F. J.; Galdo, F.; Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *The Journal of Rheumatology* 1999, 26, 1366. [PubMed]

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 74, n. 1, 10 set. 2008.

BATISTA, DA G. J. et al. Arylimidamide DB766, a Potential Chemotherapeutic Candidate for Chagas' Disease Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 7, p. 2940–2952, jul. 2010.

BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 3, p. 751S755S, 1 mar. 2007.

BENNETT, C.L. et al. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European Journal of Immunology*, v. 31, n. 3, p. 876–883, 1 mar. 2001.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Front. Chem.*, v. 9, 12 Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>. Acesso em 02 de Jul 2023.

BOROSKI, M. et al. ANTIOXIDANTES - Princípios e Métodos Analíticos. 1. ed. Curitiba:[s.n.], 2015.

BOGDAN, C. Macrófagos como células hospedeiras, efetoras e imunorreguladoras na leishmaniose: Impacto do microambiente tecidual e do metabolismo. *Cytokine X* 2020 , 2 , 100041.

CARVALHO LP, PASSOS S, SCHRIEFER A, CARVALHO EM. Respostas imunes protetoras e patológicas na leishmaniose tegumentar humana. *Front Immunol* (2012) 3:301. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301

CARVALHO, A. M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. *Pathogens*, v. 11, n. 4, p. 466, 14 abr. 2022.

CAMACHO, M. et al. Modification of prostanoid secretion in endothelial cells by amphotericin B acting synergistically with interleukin-1beta: possible explanation of proinflammatory effects. *The Journal of infectious diseases*, v. 190, n. 5, p. 1026–32, 2004.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, et al. Regulação imunológica diferencial de células T ativadas entre leishmaniose cutânea e mucosa como modelo de patogênese. *Parasite Immunol* (2007) 29(5):251–8. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00940.x

Capasso, A.; Vinorelbine in cancer therapy. *Current Drug Targets* 2012, 13, 1065.

CHACALTANA, C. Química Medicinal As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos (Eliezer J. Barreiro etc.) (z lib.org). [s.l: s.n.].

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873–882, nov. 2007.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia)

guyanensis in Manaus, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 84, n. 2, p. 255–260, 2011.

COSTA, André Tetzl. Ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) em área de ocorrência de leishmanioses na terra indígena Xakriabá, Minas Gerais–Brasil. 2017

COSTA, D. L. et al. CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in Leishmania braziliensis infection. Journal of Leukocyte Biology, v. 100, n. 2, p. 423–432, 1 ago. 2016.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. Experimental and Molecular Pathology, [s.l.], v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002. doi: 10.1006/exmp.2002.2418.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CRUZ FILHO, I. J. D. et al. Synthesis of 4-(4-chlorophenyl)thiazole compounds: in silico and in vitro evaluations as leishmanicidal and trypanocidal agents. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 95, p. e20220538, 1 maio 2023.

Cortellis Drug Discovery Intelligence Platform | Clarivate. Disponível em: <<https://clarivate.com/life-sciences-healthcare/research-development/discovery-development/cortellis-pre-clinical-intelligence/>>. Acesso em: 17 fev. 2025.

Colotti, G.; Ilari, A. Metabolismo de poliamina em Leishmania : da arginina à tripanotona. Amino Acids 2011 , 40 , 269–285

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Local, 2

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a Free web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 10, n. 670, p. 1–23, 2019

DA SILVA, P. R. et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies. Chemico-Biological Interactions, v. 315, p. 108899, jan. 2020.

DA SILVA, C. F. et al. Phenotypic evaluation and in silico ADMET properties of novel arylimidamides in acute mouse models of Trypanosoma cruzi infection. Drug Design, Development and Therapy, v. Volume11, p. 1095–1105, abr. 2017.

Davies, Clide R. et alii 1995 'Leishmaniose cutânea nos Andes peruanos: um estudo epidemiológico de infecção e imunidade'. Epidemiologia e Infecção, n o 114, pp. 297-318.

DELVES, P.J. et al. Roitt, fundamentos de imunologia. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013

DESIMONE, R.; CURRIE, K.; MITCHELL, S.; DARROW, J.; PIPPIN, D. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2004, 7, 473.

DE SA ALVES, F.; BARREIRO, E.; MANSSOUR FRAGA, C.; From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a 'Privileged Structure'; *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2009, 9, 782. [CrossRef] [PubMed]

DIREKEL, Ş.; UNVER, Y.; AKDEMİR, C. Antileishmanial Activity of New Synthesized Schiff and Mannich (Morpholine) Base Compounds. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2020 Dec 2;44(4):216-220. doi: 10.4274/tpd.galenos.2020.6900. PMID: 33269563.

De Lima, S. K. S., Cavallone, I. N., Oliveira, K. S., Passero, L. F. D., Laurenti, M. D., Jesus, J.A., ... & Mari, R. D. B. (2021). Infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* Changes the Morphology and Myenteric Neurons of the Jejunum of Golden Hamsters. *Parasitologia*, 1(4), 225-23

DE LUCA, L. et al. Discovery of benzimidazole-based *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB2.8ΔCTE inhibitors as potential therapeutics for leishmaniasis. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 92, n. 3, p. 1585–1596, 2018

DODD, R. H. et al. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-β-carbolines. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, n. 6, p. 1272–1276, 1 jun. 1989.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. e0004375, 27 jan. 2016.

DONOVAN C. Sobre a possibilidade da ocorrência de tripanossomíase na Índia. *Br Med J.* 1903;2:79.

Mitocôndrias no cenário da resposta imune inata exercida por macrófagos | Revista Eletrônica Acervo Saúde. acervomais.com.br, 29 maio 2019.

DE MELO CRUVINEL, W. et al. Sistema Imunitário -Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DONOVICK R, GOLD W, PAGANO JF, S. HA. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot Annu.*, v. 3, p. 579–86, [s.d.].

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune

responses. *Cell Research*, v. 20, n. 1, p. 34–50, 15 dez. 2009.

DUTTA, A.; VENKATAGANESH, H.; LOVE, P. E. New Insights into Epigenetic Regulation of T Cell Differentiation. *Cells*, v. 10, n. 12, p. 3459, 8 dez. 2021.

EDUARDA RAMOS VANDERLEY, S.; SILVA SANTOS GREISON, W. .; ANDRÉ DE ARAÚJO SILVA, L.; VALCÁCIA SILVA, S. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE *Zingiber officinale* R. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1029–1032, 2021. DOI: 10.18378/REBAGRO.V12I2.8801. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/8801>. Acesso em: 22 mar. 2023.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, Sassari, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014. doi: 10.3855/jidc.4310

FREITAS, J.C.C.; NUNES- PINHEIRO, D.C.S. Leishmaniose: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, n. 7, p. 193- 204, 2013. doi: 10.21708/avb.2013.7.3.335

E. Hényková , HP Vránová , P. Amakorová , T. Pospíšil , A. Žukauskaite , M. Vlčková , L. Urbánek , O. Novák , J. Mareš , P. Kaňovský , M. Strnad , J. *Chromatogr. A* 2016 , 1437 , 145 . <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.009>

FROLOV, R. V.; IGNATOVA, I. I.; SINGH, S. Inhibition of HERG potassium channels by celecoxib and its mechanism. *PLoS One*, 6, n. 10, p. e26344, 2011.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr., Schrieffer A, Machado PR, Lessa H, et al. A expressão in situ diminuída do receptor de interleucina-10 está correlacionada com as respostas inflamatórias e citotóxicas exacerbadas observadas na leishmaniose mucosa. *Infection Immun* (2005) 73(12):7853–9. doi: 10.1128/iai.73.12.7853-7859.2005

FREITAS; PINHEIRO. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, p. 11-21, 2010.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters?. *Journal Of Parasitology Research*, [s.l.], v. 2012, p. 1- 12, 2012. doi: 10.1155/2012/930257.

FARIA, M. S. et al. *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 186, n. 1, p. 411–422, 1 jan. 2011.

FRÍAS L, LELES D, ARAÚJO A. Estudos sobre protozoários em vestígios antigos - uma revisão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:1–12

FERREIRA DE ALMEIDA, A. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES Mestrado Acadêmico em Saúde Pública AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH17, TH1 E TH2 POR LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA RECIFE 2013. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/14498/Disserta?sequence=2>>. Acesso em: 26

out. 2023.

GASSER JR, R. A. et al. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 83-90, 1994.

GAMAL, A. A. El. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1-25, jan. 2010. doi: 10.1016/j.jsps.2009.12.001.

GARIMA CHOUHAN et al. Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory potential and therapeutic cure in vivo. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, 26 mar. 2015.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*, v. 113, n. 1, p. 1–14, set. 2004.

GOLDMAN-PINKOVICH, A. et al. Sensing Host Arginine Is Essential for *Leishmania* Parasites' Intracellular Development. *mBio*, v. 11, n. 5, 27 out. 2020.

Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO. Mecanismos imunorreguladores e subpopulações de células T Cd4-Cd8- (duplo negativo) na leishmaniose cutânea humana: Um ato de equilíbrio entre proteção e patologia. *Int Immunopharmacol* (2008) 8(10):1338–43. doi: 10.1016/j.intimp.2008.03.016

GUPTA, O. et al. Recent advancements in anti-leishmanial research: Synthetic strategies and structural activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 223, p. 113606, nov. 2021.

GOMES, A. H. S. et al. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunology*, v. 39, n. 4, p. e12423, abr. 2017.

HANDLER, M. Z. et al. Leishmaniose cutânea e mucocutânea: diagnóstico diferencial, diagnóstico, histopatologia e tratamento. *Jornal da Academia Americana de Dermatologia*, v. 73, n. 6, pág. 911-926, 2015.

HANDMAN, E.; ELSO, C.; FOOTE, S. Genes and Susceptibility to Leishmaniasis. *Advances in Parasitology Volume 59*, [s.l.], p. 1-75, 2005. doi: 1016/s0065-308x(05)59001-8.

HORTA, M. F. et al. Cell invasion by intracellular parasites – the many roads to infection. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 4, p. jcs232488, 15 fev. 2020.

HUBER, M. et al. Effective and Long-Lasting Immunity against the Parasite *Leishmania major* in CD8-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 8, p. 3968–3970, 1 ago. 1998.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 392–401, maio 2016.

IMUNE, RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO NA RESPOSTA; LTA, À. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. *Leishmanioses do continente americano*, p. 357, 2014.

Review on Leishmaniasis: A Neglected Global Disease - Scilit. Disponível em: <<https://www.scilit.net/publications/398f314370b5b4a315a4b63f3f7e2438>>. Acesso em: 3 out. 2023.

JACOB, I. T. et al. Interaction study with DNA/HSA, anti-topoisomerase II α , cytotoxicity and in vitro antiproliferative evaluations and molecular docking of indole-thiosemicarbazone compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 234, p. 123606, 15 abr. 2023.

JANEWAY JR, C. A. et al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-937701>>. Acesso em: 22. out. 2023.

J. H. Lee , TK Wood , J. Lee , *Tendências Microbiol.* 2015 , 23 , 707 .

JIRMANUS, Lara et al. Alterações epidemiológicas e clínicas na leishmaniose tegumentar americana em uma área de transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ao longo de um período de 20 anos. *The American journal of tropical medicine and hygiene* , v. 86, n. 3, p. 426, 2012

Janeway's Immunobiology, Ninth Edition - ProQuest. Disponível em: <<https://www.proquest.com/openview/b47b67a7c8b162d64cdd751be39531e6/1?pq-origsite=gscholar&cbl=5538018>>. Acesso em: 17 out. 2023.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatologic Clinics*, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

Kaushik, N. K.; Kaushik, N.; Attri, P.; Kumar, N.; Kim, C. H.; Verma, A. K.; Choi, E. H.; Biomedical importance of indoles. *Molecules* 2013, 18, 6620.

KHADEM, F.; UZONNA, J. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiology*, London, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014. doi: 10.2217/fmb.14.43.

KLUSKA, M. et al. Analytics of Quinine and its Derivatives. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 46, n. 2, p. 139–145, abr. 2015.

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

LAL, J. et al. Design and synthesis of novel halogen rich salicylanilides as potential antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 246, p. 114996, 15 jan. 2023. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114996

Lima JR de. Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. 2017. 146f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017

Loayza, Rodrigo de 1889 (1586) 'Memorial das cosas do Peru tocantes aos Índios'. Em Marquéz de Fuenzalida del Valle'. *Coleções de documentos inéditos para a história da Espanha*. Madri, t.. 94, pp.

Lainson R. As espécies neotropicais de *Leishmania* : uma breve revisão histórica de sua descoberta,

ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1:13–32.

Leishman WB. Sobre a possibilidade da ocorrência de tripanossomíase na Índia. *Br Med J*. 1903;1:1252–4.

LIU, Y. et al. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes to Cells*, v. 15, n. 4, p. 315–325, abr. 2010.

MATSUMORI, N. et al. Direct Interaction between Amphotericin B and Ergosterol in Lipid Bilayers As Revealed by ^2H NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 33, p. 11855–11860, 26 ago. 2009.

MARQUESI, K. F.; REIGOTA, K. C. DA F. R.; BUENO, A. P. DE O. RESPOSTA IMUNE E QUIMIOCINAS: BREVE REVISÃO DA LITERATURA. *Revista Científica*, v. 1, n. 1, 9 nov. 2018.

Machado, P. R. L., Araújo, M. I. A. S., Carvalho, L., & Carvalho, E. M.. (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 79(6), 647–662. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>

MATHEUS. O papel do IFN- na infecção por *Leishmania amazonensis*. *Ufmg.br*, 2018.

MENDES, E. P. et al. Evaluation of Novel Chalcone-Thiosemicarbazones Derivatives as Potential Anti-*Leishmania amazonensis* Agents and Its HSA Binding Studies. *Biomolecules*, v. 9, n. 11, p. 643, 23 out. 2019.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 1–10, 2012.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.

MIRANDA LESSA M, ANDRADE LESSA H, CASTRO TWN, OLIVEIRA A, SCHERIFER A, MACHADO P, ET AL. Leishmaniose mucosa: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Braz J otorrinolaringol* (2007) 73(6):843–7. doi: 10.1016/s1808-8694(15)31181-2

Motohashi H, Inui K. Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney. *AAPS J*. 2013 Apr;15(2):581-8. doi: 10.1208/s12248-013-9465-7. Epub 2013 Feb 22. PMID: 23435786; PMCID: PMC3675737.

MURRAY, H. W. Prevention of Relapse after Chemotherapy in a Chronic Intracellular Infection: Mechanisms in Experimental Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 8, p. 4916–4923, 6 abr. 2005.

MÜLLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of

Leishmania major infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 190, n. 1-2, p. 73–76, 21 ago. 2001.

Martins CR, Lopes WA, Andrade JB de. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Quím Nova* [Internet]. 2013;36(8):1248–55. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>

M. S. Estevão , LC Carvalho , D. Ribeiro , D. Couto , M. Freitas , A. Gomes , LM Ferreira , E. Fernandes , MMB Marques , *Eur. J. Med. Química*. 2010 , 45 , 4869 .

Maspero G. *O Amanhecer da Civilização - Egito e Caldéia*. 5ª ed. Londres: Sociedade para a Promoção do Conhecimento Cristão; 1910. p. 218.

Novais, FO; Nguyen, BT; Beiting, DP; Carvalho, LP; Glennie, ND; Passos, S.; Carvalho, EM; Scott, P. Monócitos clássicos humanos controlam o estágio intracelular de *Leishmania braziliensis* por espécies reativas de oxigênio. *J. Infect. Dis.* 2014 , 209 , 1288–1296.

NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, v. 6, n. 9, p. 754–765, 1 set. 2008.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu, 1998. 524 p.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.

NIELSEN, M.; ANDREATTA, M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, 30 mar. 2016.

Organization WH. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, Switzerland, 22–26 March 2010. WHO technical report series. 2010;(949).

OLIVEIRA, Kamila Kassia . Investigação da resposta imune induzida por veneno de *Bothrops erythromelas* em cultura de células mononucleares infectadas com *Trypanosoma cruzi*: *Trypanosoma cruzi*. ATTENA, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/30971>. Acesso em: 01 ago. 2023.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

Organização Pan-Americana da Saúde. *Estratégia de Cooperação do País 2022 – 2027 — Brasil*. Versão revisada. Brasília, D.F.; Organização Pan-Americana da Saúde; 2022

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, [s.l.], v. 9, n. 10, p.925-932, 2016. doi: 1016/j.apjtm.2016.06.021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO). Weekly epidemiological record, 91th. n. 22, p. 285-296, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/wer/2016/wer9122>

OLIVEIRA, Roberta Gondim. Meanings of Neglected Diseases in the Global Health agenda: the place of populations and territories. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p. 2291-2302, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018237.09042018>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232018000702291&script=sci_arttext&tlng=en

OMS. Neglected Tropical Diseases. Disponível em: https://www.who.int/healthtopics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [s.l.], v. 11, n. 12, p. 1-24, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.

PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem*, 58, n. 9, p. 4066-4072, May 14 2015.

PÉREZ, V. 2013. Nuevos piridofanos simétricos con actividad antiproliferativa y leishmanicida. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Granada-España.

POINAR JR G, POINAR R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) do âmbar birmanês do Cretáceo. *Protista*. 2004;155:305–10.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. W1, p. W449–W454, 14 maio 2020.

ROSS R. Outras notas sobre os corpos de Leishman. *Br Med J*. 1903;2:1401.

RITTER, U.; KORNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis*. *Parasite Immunology*, v. 24, n. 6, p. 295–301, jun. 2002.

REMALEY, A. T. et al. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n. 18, p. 11173–11175, 25 set. 1984.

ROCHA, F. J. S. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 1 ago. 2007.

ROSSI, Matteo; FASEL, Nicolas. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. *International Immunology*, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017.

RESEARCH, C. FOR D. E. AND. **Drug Approvals and Databases**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/drug-approvals-and-databases>>.

ROHTAGI, A. et al. Blood, bone marrow and splenic lymphocyte subset profiles in Indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 4, p. 431–434, 1996.

CM, R.; CB, T. B-cell development and maturation. *Seminars in oncology*, v. 25, n. 4, 1 ago. 1998.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 30, n. 4, p. 710–718, 2000

SANTIAGO, AS; PITA, SS da R.; GUIMARÃES, ET Tratamento da leishmaniose, limitações terapêuticas actuais e novas exigências alternativas: Uma revisão narrativa. *Investigação, Sociedade e Desenvolvimento*, [S. l.], v. 10, n. 7, pág. e29510716543, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i7.16543. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16543>. Acesso em: 18 mar. 2023.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 5, p. 457–467, 2011.

SALIH, N. A. W. et al. Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kalaazar) in eastern Sudan: How effective is treatment for this neglected disease? *Tropical Medicine and International Health*, v. 19, n. 2, p. 146–152, 2014

SANTAMARIA, J. et al. Antigen-presenting cells and T-lymphocytes homing to the thymus shape T cell development. *Immunology Letters*, v. 204, p. 9–15, 1 dez. 2018.

SEN, S. et al. Restoration of IFN γ R Subunit Assembly, IFN γ Signaling and Parasite Clearance in *Leishmania donovani* Infected Macrophages: Role of Membrane Cholesterol. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 9, p. e1002229, 8 set. 2011.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology*, v. 10, p. 385–409, 1992.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, v.16, n.9, p.581-92, 2016

SILVA, C.G., SILVA, R.M.M., DINIZ, V.A., and CÔRTE-REAL, S. Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 53-67. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0004>.

SHRESTHA, P.; ADHIKARI, S.; LAMICHHANE, B.; SHRESTHA, B. G. Phytochemical Screening of the Medicinal Plants of Nepal. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, v.1, n. 6., p. 11-17, 2015. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento, Introdução à análise fitoquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUZA, Luis Roberto de. Condicionantes sociais na delimitação de espaços endêmicos de hanseníase. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; SILVA SANTOS, S.; SANTANA, L. A. Parasitologia: fundamentos e prática clínica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020

SANMARCO, L. M. et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Amsterdam, v. 1863, n. 4, p. 857–869, 2017.

SANGSHETTI, Jaiprakash N. et al. Antileishmanial drug discovery: Comprehensive review of the last 10 years. *Rsc Advances*, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.

Steverding, D. A história da leishmaniose. *Parasitas Vetores* 10 , 82 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. Lesão tecidual mediada por Cd8(+) granzima b(+) vs. morte de parasitas mediada por Cd4(+)Ifn γ (+) na leishmaniose cutânea humana. *J Invest Dermatol* (2013) 133(6):1533–40. doi: 10.1038/jid.2013.4

SANTIAGO, Alexandre Silva; DA ROCHA PITA, Samuel Silva; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p.e29510716543-e29510716543, 2021.

SINGER, A.; ADORO, S.; PARK, J.-H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 10, p. 788–801, out. 2008.

STERN, L. J.; POTOLICCHIO, I.; SANTAMBROGIO, L. MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, n. 1, p. 64–69, fev. 2006.

SHYAM SUNDAR, T.K. et al. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis s. *Medicine*, v. 342, n. 22, p. 1462–1471, 2002

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Current Molecular Medicine*, v. 4, p. 667–679, 2004. doi: 10.2174/1566524043360203

SUNDAR, S. (BANARAS H. U.; CHAKRAVARTY, J. (BANARAS H. U. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis Shyam. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2002.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 151, n. 9, p. 4891–4901, 1 nov. 1993.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 1, p. 108–117, 1 jan. 2011.

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Origem monofilética do gênero *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1993;68:107–8..

Teo, Z. W. P. (2003). The Role of Macrophages in Apoptosis: Initiator, Regulator, Scavenger. *Reviews in Undergraduate Research*, 2, pp. 7-11.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6

TOUGH, D. F. et al. Epigenetic Regulation of T Cell Memory: Recalling Therapeutic Implications. *Trends in Immunology*, v. 41, n. 1, p. 29–45, jan. 2020.

VAN DEN BROEK, T.; BORGHANS, J. A. M.; VAN WIJK, F. The full spectrum of human naive T cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 6, p. 363–373, 8 mar. 2018.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dez. 2004.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010.

VERMEERSCH, M. et al. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, 2009.

Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). *Brás Méd*. 1911;25:411.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*, São Paulo: Editora Atheneu, 2V., 1996.

WENG, Hong-Bo; CHEN, Hai-Xia; WANG, Ming-Wei. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infectious Diseases of Poverty*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 67, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0444-1>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29950174/>.

Weathers PJ, Cambra HM, Desrosiers MR, Rassias D, Towler MJ. Artemisinin the Nobel Molecule: From Plant to Patient. *Studies in Natural Products Chemistry*. 52: Elsevier; 2017. p. 193–229

WYLIE, C. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine*, [s.l.], v. 117, n. 1, p. 7-18, 2014a. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.

WENZEL, A.; VAN ZANDBERGEN, G. Lipoxin A4 receptor dependent leishmania infection. *Autoimmunity*, v. 42, n. 4, p. 331–333, jan. 2009.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molecular Immunology*, v. 45, n. 12, p. 3371–3382, jul. 2008.

Yamada, Y.; Asanuma, F.; Yamada, T.; Suzuki, T.; Hiraku, O.; Tsutsumi, D.; Hayashi, M.;

Antitumor activity of vinorelbine against human breast carcinomas. *Japanese Journal of Chemotherapy* 2003, 51, 71.

ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 98, n. 8, p. 793- 800, 2004.

Zilberstein, D. (2020). Cultura in vitro para simulação de diferenciação de *Leishmania* spp. *Métodos Mol. Biol.* 2116, 39–47. doi: 10.1007/978-1-0716-0294-2_3

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, v. 28, n. 1, p. 445–489, mar. 2010.

Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniose no Antigo Egito e na Alta Núbia. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1616–7.

ZHAO, S. et al. Cloning, genome structure and expression analysis of MHC class I gene in Korean quail. *British Poultry Science*, p. 1–7, 25 out. 2021.

APÊNDICE A

Artigo Submetido – *Revista Brasileira de Química*

In Silico* Screening of Indole-Thiosemicarbazone Structures and *In Vitro* Biological Activity as Inhibitors of *Leishmania braziliensis

Pereira, MJF¹; Aires, AL¹; Diniz, E¹; Gonçalves, T¹; Aranda, F¹; Filho, IJ²; Lima, MC²; Rocha FJS¹, Costa, VMA¹;

¹Academic Area of Tropical Medicine, UFPE, Recife - PE.

²Laboratory of Chemical and Therapeutic Innovation, UFPE, Recife - PE.

³Graduate Program in Tropical Medicine at UFPE, Recife - PE.

Corresponding Author: Pereira, MJF; e-mail: Maria.julha@ufpe.com

ABSTRACT. Leishmaniasis remains a serious public health problem due to the constant emergence of resistant strains. Predominantly found in developing countries, these infections require more effective, safer, and accessible medications. In Latin America, *Leishmania braziliensis* is the primary causative agent of cutaneous leishmaniasis. In the search for new treatments, compounds such as thiosemicarbazones and indole fragments have shown promise for leishmanicidal activity. The present study proposes to evaluate the *in silico* characteristics of new indole-thiosemicarbazone derivatives, as well as to conduct *in vitro* assessments through cytotoxicity assays using peritoneal macrophage and fibroblast (L929) activity against promastigote forms of *Leishmania braziliensis*, as well as the selectivity index against the parasite. The prediction of the *in silico* tests in ADME revealed that the compounds have potential as orally administered drugs. In the cytotoxicity evaluation, the indole-thiosemicarbazone compounds presented CC50 values between 55 and > 200 μ M. Regarding the evaluation against promastigote forms of *L. braziliensis*, the IC50 values ranged between 6.74 and 14.09 μ M. The compounds LT79 and LT71 tested against *L. braziliensis* were the most promising of the series, as they presented the selectivity index between 7.8 and 14.66, respectively. Therefore, indole-thiosemicarbazone compounds are promising because they have low cytotoxicity to mammalian cells and act as leishmanicidal agents.

1. Introduction

It is estimated that 3.5 billion people worldwide are exposed to *Leishmania*, with an annual incidence of 0.7–1.0 million new cases in endemic areas [1]. Between 2001 and 2021, a total of 1,105,545 cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) were reported to the PAHO, with an average of 52,645 cases reported per year. In Brazil alone, 15,023 cases of cutaneous/mucosal leishmaniasis were recorded during this period, accounting for nearly 30% of the total cases worldwide [2]

Primarily the disease affects populations prone to poverty [3]. Drug therapy for the infection has limitations due to side effects, which contribute to *Leishmania braziliensis* resistance, as well as the parenteral administration route of the main drugs (Glucantime®, amphotericin B, and pentamidine), which also complicates treatment adherence [4]. Additionally, *L. braziliensis* is characterized by variable infectivity, virulence, and response to anti-leishmanial therapy [5-6].

Tiosemicarbazones are organic compounds that exhibit proven biological properties against bacteria, fungi, viruses, and protozoa, including leishmanicidal effects. Some studies suggest that tiosemicarbazones could act on mitochondrial depolarization, leading to parasite death through

apoptosis [7-8]. Felix, MB, and collaborators (2016) demonstrated leishmanicidal activity of this compound with the insertion of indole compounds into its structure [9].

The synthesis and structural modification/insertion of indole-thiosemicarbazone compounds have shown promise due to their biological and pharmacological activity in cancer cells [10-11] and parasites [12-13]. Some of these compounds have already been evaluated *in vivo* by via oral administration in mice for carcinoma therapy, yielding promising results, which highlights the potential of this administration route for leishmaniasis treatment [14].

Da Silva and colleagues [8] observed the leishmanicidal activity of indole-thiosemicarbazone compounds against *L. infantum* and *L. amazonensis* strains, which were capable of inducing ultrastructural changes in promastigote-phase cells, leading to their inviability, in addition to reducing the parasite load in infected macrophages.

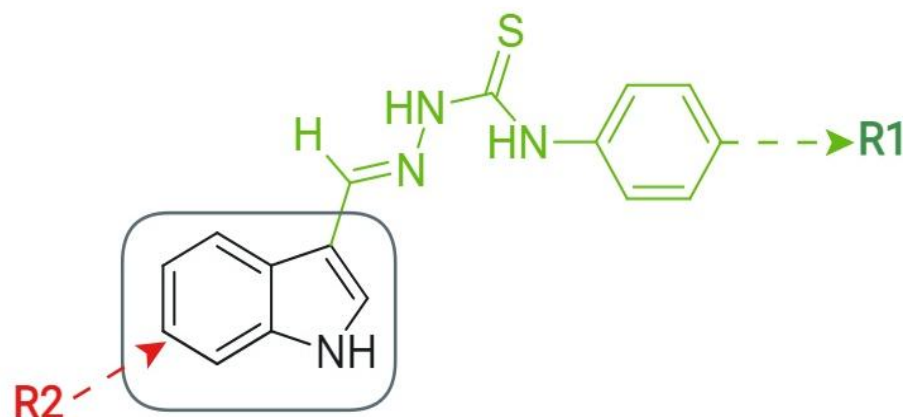
In this study, we evaluated the *in vitro* activity of indole-thiosemicarbazone compounds as potential leishmanicidal agents and to conduct an *in silico* assessment of their absorption, distribution, metabolism, and excretion as potential drug candidates, furthermore we analyzed together the compounds structure and their activity for *L. braziliensis* strain.

2. Materials and Methods

2.2. Chemistry

All tested compounds were obtained from the Laboratory of Therapeutic Innovation Chemistry at the Federal University of Pernambuco (UFPE). Indole-thiosemicarbazones were synthesized following a methodology developed by the LQIT research group. These molecules were synthesized from substituted isothiocyanates, hydrazine hydrate, and substituted indolecarboxaldehydes, resulting in indole-thiosemicarbazone derivatives [8,14] (**Figure 1**).

Figure 1. Indole-thiosemicarbazone derivatives



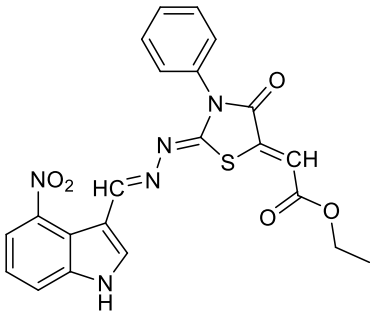
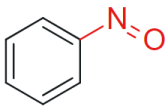
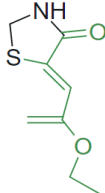
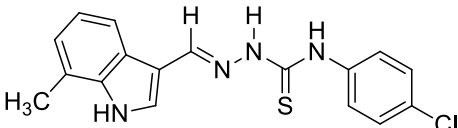
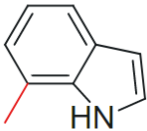
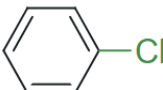
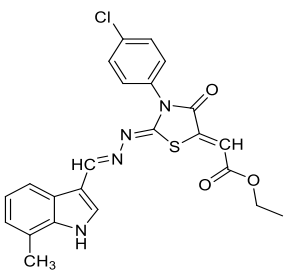
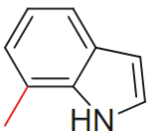
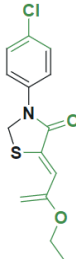
Caption: Indole (**R2**) and Thiosemicarbazone (**R1**)

Source: Author, 2025.

The synthesis resulted in the formation of four compounds, described in Table 1, which were identified following the rules proposed by IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Table 1. Radicals added to thiosemicarbazone indolic compounds

		IUPAC nomenclature	Radical 2	Radical 1
LT71		2-((4-nitro-1H-indol-3-yl)methylene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide		

<u>LTc-71</u> 	Ethyl-2-(2-((4-nitro-1H-indol-3-yl)methylene)hydrazono)-4-oxo-3-phenylthiazolidin-5-ylidene)acetate  
<u>LT-79</u> 	N-(4-chlorophenyl)-2-(((7-methyl-1H-indol-3-yl)methylene)-N-phenylhydrazinacarbithioamide  
<u>LTc-79</u> 	Ethyl-2-(3-(4-chlorophenyl)-2-(((7-methyl-1H-indol-3-yl)methylene)hydrazono)-4-oxothiazolidin-5-ylidene)acetate  

Source: Author, 2025.

2.2.1. ADME Profile Determination

Molecular in silico studies were conducted to evaluate their potential as drug candidates. The ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) profiles of these compounds were investigated using the web-based platforms SwissADME [15] and pkCSM [16].

2.3. Biological Section

In Vitro Studies

2.3.1. Compound Preparation

For *in vitro* assays, the substances were initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mg/mL. For each test, the stock solution of each substance was subsequently diluted in the appropriate culture medium to achieve the desired concentrations.

2.3.2. Cytotoxicity in Peritoneal Macrophages

Peritoneal macrophages were obtained through peritoneal lavage of BALB/c mice (Proc. No. 0085/2022). The cells were incubated in 96-well plates at a density of 2×10^6 cells/well in RPMI medium. The compounds were solubilized in DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) and tested at different concentrations. Amphotericin B was used as a positive control, while the negative control wells received only RPMI medium. Plates were incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO₂. Subsequently, 20 µL of Alamar Blue were added to each well, and the plate was incubated for another 4 hours. Absorbance was measured using a plate reader at 570 and 600 nm [17].

2.3.3. L929 Fibroblasts

L929 fibroblasts were obtained from the Fiocruz cryobank at UFPE and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics, maintained at 37°C in an incubator with 5% CO₂. The cells were also exposed to the tested compound concentrations, in the presence of Amphotericin B and in the absence of treatment.

2.3.4. Parasites

Leishmania braziliensis (MHOM/BR/LTB2903) in the promastigote stage was cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics, in 25 cm² flasks at 27°C for six days. Parasites were incubated in 96-well plates at a concentration of 1×10⁶ parasites/well and exposed to different concentrations of the synthetic indole-thiosemicarbazone compounds. For comparison, we tested the effects of amphotericin B (AmB) as positive control and untreated cells as a negative control.

2.3.5. Cell Viability

Parasite viability was assessed using resazurin, a non-fluorescent blue oxidized dye that was reduced to highly fluorescent pink resorufin by mitochondrial dehydrogenases in viable cells [18]. After cell treatment, 10% resazurin was added to each well, and after an incubation period of 3–4 hours, the plate was read using a spectrophotometer at 560 nm (excitation) and 590 nm (emission).

2.3.6. Selectivity Index

Selectivity index (SI) was determined by the CC₅₀/IC₅₀ ratio. Samples with an SI value greater than 10 are considered effective and selectively active against *Leishmania* [19].

2.3.7. Statistical Analysis

Both 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) values were calculated using GraphPad Prism 5.0 softwares. Statistical analysis was performed using nonlinear regression. All assays were conducted in triplicate and included three independent experiments. Statistical differences between treatments were assessed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test at a significance level of $p < 0.05$. Data were presented as mean $\pm$ standard deviation.

2.4. Ethical Statement

All experiments complied with relevant laws, institutional guidelines, and ethical standards. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco, LIKA Brazil (Proc. No. 0085/2022).

3. Results and Discussion

In Silico Analysis

Almost all molecules were found to be moderately soluble in water as described in **table 2**. Water solubility, one of the main physicochemical properties observed during the development of new drugs, was predicted by this tool using three different methods: ESOL [20], Ali [21], and SILICOS-IT models. Solubility of organic compounds was represented by logS, being S the concentration of the compound in mol/L. The scale adopted for classifying the solubility parameter was: insoluble (below -10); poorly soluble (between -6 and -10); moderately soluble (between -4 and -6); soluble (between -2 and -4); very soluble (between 0 and -2); and highly soluble (above 0) [22].

Table 2. *In silico* results for the predicted water solubility of the tested compounds.

Moléculas	ESOL	Ali	SILICOS-IT
LT 71	Soluble	Moderately Soluble	Soluble
LTc 71	Moderately Soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble
LT 79	Moderately Soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble
LTc 79	Poorly soluble	Moderately Soluble	Moderately Soluble

Source: Author, 2025.

The results obtained for predicting the solubility of the derivatives in water demonstrated that they range from moderately soluble to slightly soluble. Due to the presence of ortho-substituted phenol groups, indole [23], and the length of the carbon chain, these derivatives exhibit a more hydrophobic profile [24].

Furthermore, it is preferable for drugs to have both polar and nonpolar chemical structures to optimize the pharmacokinetic process. This is because the more a substance is solubilized in the medium, the better its interaction with cell membranes, thereby enhancing drug action [24].

In **Table 3**, the indole-thiosemicarbazones were analyzed for their physicochemical properties, and it was observed that the synthetic molecules did not violate Lipinski's Rule of Five (Ro5) [25]. The compounds LT 71 and LTc 71 showed significant differences in some analyzed parameters, as described in **Table 3**.

The topological polar surface area of LTc 71 was found to be larger due to the chain length, which also influenced its ability to accept and donate hydrogen bonds. This compound was observed to accept more hydrogen bonds than it donates. In drug design assays, the more a compound donates hydrogen bonds, the stronger its interaction with target cell receptors [26].

Table 3. ADMET Physicochemical Properties

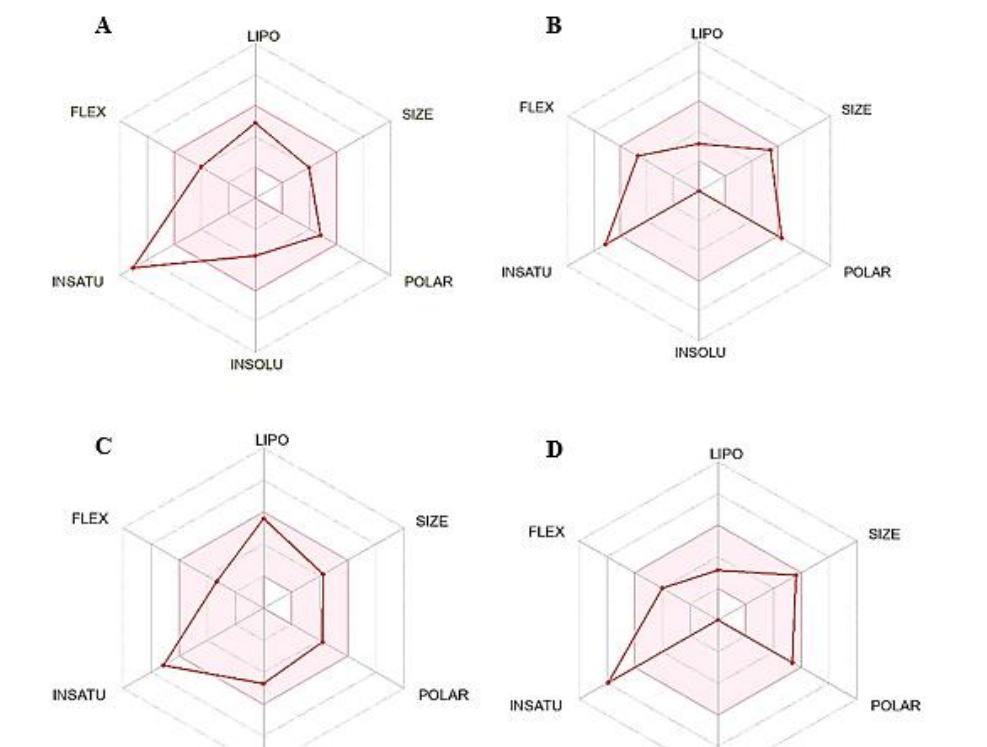
Molecules	MM (g/mol)	Nº Rotation	DH	TPSA (Å²)	LogP	AH
LT 71	323,37	6	3	113,73	2,46	3
LTc 71	447,47	7	1	141,85	4,10	7
LT 79	344,86	5	3	80,54	3,19	1
LTc 79	466,94	6	6	112,42	4,67	5

Legend: MM: molecular mass; No. Rot: number of rotatable bonds; AH: number of hydrogen bond acceptors; DH: number of hydrogen bond donors; TPSA: topological polar surface area; LogP: octanol/water partition coefficient. -2.81 / soluble.

Source: Author, 2025.

When evaluating the compounds LT 79 and LTc 79, it was observed that both exhibited a smaller topological polar surface area compared to LT 71 and LTc 71. This difference is due to the presence of the halogen (chlorine), which grants these derivatives greater permeability in polar regions [27].

Figure 1. Oral Bioavailability Radar of the Compounds



Caption: LIPO (lipophilicity), INSOLU (solubility), INSATU (saturation), FLEX (flexibility), SIZE (size – molecular weight), and POLAR (polarity). LT 71 (A); LTc 71 (B); LT 79 (C); LTc 79 (D). Source: Author, 2025.

Six parameters presented in **Figure 1** for the four compounds mainly indicated that the indole-thiosemicarbazones were suitable molecules for oral administration. In all the analyzed compounds, the presence of unsaturated chains, characterized by double or triple bonds, is observed. These bonds connect covalently, making the degradation of these derivatives more difficult [28].

On the other hand, the main advantage of a drug that forms covalent bonds with its biological target is its high potency and prolonged duration of effect. Unlike non-covalent interactions, such as hydrogen bonds or Van der Waals forces, covalent bonds are strong, ensuring that the drug remains active for an extended period [29,30]. Despite this stability, these compounds are still considered suitable for oral administration. According to Lipinski's Rule, a drug can violate up to two of its guidelines and still be viable for oral absorption [31].

Orally administered covalent drugs represent an innovative and effective therapeutic approach for treating various diseases, including cancer, viral infections, and inflammatory disorders [30,32]. Oral drug administration is preferred due to clinical and pharmacological factors such as ease of use, convenience, improved patient adherence, safety, lower risk of infection, and the ability to achieve more controlled metabolism and gradual drug release [33,34].

Online tool pkCSM predicted the trajectory and expected activities of these compounds by evaluating their molecular structure, as described in **Table 4**.

Table 4. Pharmacokinetic profile of the indole-thiosemicarbazone compounds during absorption, distribution, metabolism, and excretion, as well as their toxic effects.

	LT-71	LTc-71	LT-79	LTc-79	Unit	
Absorption						
Water solubility	-3,61	-5.615	-4.745	-6.02	(log mol/L)	
Caco2 permeability	0,532	0.0082	1.359	0.801	(log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	
Intestinal absorption	87.115	96.928	85.856	91.767	(%Absorbed)	
Skin Permeability	-2,743	-2.921	-2.875	-2.93	(log Kp)	
P-glycoprotein substrate	No	Yes	Yes	Yes	(Yes/No)	
P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	(Yes/No)	
P-glycoprotein II inhibitor	No	Yes	No	Yes	(Yes/No)	
Distribution						
VDssa	0,308	0	0.486	0.145	(log L/kg)	
Fraction unbound	0	0.009	0.096	0,018	(Fu)	
BBB permeability	Não	-0.904	0.169	-0.714	(log BB)	
CNS permeability	-1,836	-2.261	-1.474	-1.85	(log PS)	
Metabolism						
CYP3A4 substrate	Yes	Yes	Yes	No	(Yes/No)	
CYP1A2 inhibitor	Yes	No	Yes	Yes	(Yes/No)	
CYP2C19 inhibitor	Yes	Yes	Yes	No	(Yes/No)	
CYP2C9 inhibitor	Yes	Yes	No	Yes	(Yes/No)	
CYP2D6 inhibitor	No	No	Yes	No	(Yes/No)	
CYP3A4 inhibitor	Yes	Yes	No	Yes	(Yes/No)	
Excretion						
Total clearance	-0,252	0.0338	-0.406	0.054	(log mL/min/kg)	
Renal OCT2 substrate	Yes	No	No	No	(Yes/No)	
Toxicity						
AMES toxicity	Yes	No	Yes	No	Categorical (Yes/No)	
Maximum tolerated dose	-0,019	-0,223	-0,094	-0.148	Numeric (log mg/kg/day)	
hERG I inhibitor	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)	
hERG II inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Categorical (Yes/No)	
Oral rat acute Toxicity	2.536	2.866	2.729	2.746	Numeric (mol/kg)	
Oral rat chronic Toxicity	1.111	1.2	1.756	1.001	Numeric (log mg/kg_bw/day)	
Hepatotoxicity	No	Yes	No	Yes	Categorical (Yes/No)	
Skin Sensitization	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)	
<i>T. Pyriformis</i> toxicity	1.065	0.388	1.781	0.625	Numeric (log µg/L)	
Minnow toxicity	-0,414	-1,947	1.015	-2.86	Numeric (log mM)	

Molecules exhibited low water solubility, high intestinal permeability (>90%), permeability to Caco-2 cells and epidermis, suggesting that they could be candidates for oral or transdermal administration. Regarding P-glycoprotein, LT 71 was identified as a substrate for this protein, while LT 79 and LT 71 were classified as P-glycoprotein II inhibitors.

Transdermal drugs for leishmaniasis are a promising alternative for treating the disease, particularly due to their ability to deliver medication in a controlled and less invasive manner [35]. While most conventional treatments for leishmaniasis are administered parenterally (intravenously

or intramuscularly), recent research explores transdermal systems to enhance efficacy and reduce adverse effects [36-37].

None of the molecules can be considered permeable to the blood-brain barrier (BBB) or the central nervous system (CNS), which may rule out the occurrence of side effects in other biological activities within the brain region. The solubility of a drug in aqueous and lipophilic environments is essential for its absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME). This characteristic directly influences the bioavailability and therapeutic efficacy of the substance [38].

LTc 71 and LTc 85 were considered non-inhibitors of the CYP1A2 isoform, while LT 71, LTc 71, and LT 79 were predicted to inhibit CYP2C9. Additionally, LT 79 was identified as an inhibitor of the CYP3A4 isoform. Almost all molecules were predicted to be substrates of CYP3A4, one of the main hepatic enzymes responsible for drug metabolism, indicating a possible hepatic metabolism for these molecules. Regarding excretion, it was described that only LT 71 was a substrate for OCT2.

Toxicity tests produced a favorable profile for drug development, however an unfavorable prediction for LT 71 and LT 79 was their potential mutagenicity. On the other hand, these compounds were not predicted to be hepatotoxic or inhibitors of hERG (human ether-related gene) I and hERG II. hERG was a common and significant antitarget in drug discovery due to its association with adverse cardiac effects.

In Vitro assay

We investigated five indole-thiosemicarbazone compounds for their efficacy against promastigote forms of *L. braziliensis*, while also assessing cytotoxicity against peritoneal macrophages and L929 fibroblasts. This study aimed to identify the most active and selective compounds against the parasite.

Derivatives that exhibited activity showed IC₅₀ values ranging from 6.14 μ M to 14.09 μ M. **Table 5** described IC₅₀, EC₅₀, and CC₅₀ values for fibroblasts and peritoneal macrophages.

Table 5. Antileishmanial activity, cytotoxic effects against peritoneal macrophages, and calculated selectivity index values for indole-thiosemicarbazones.

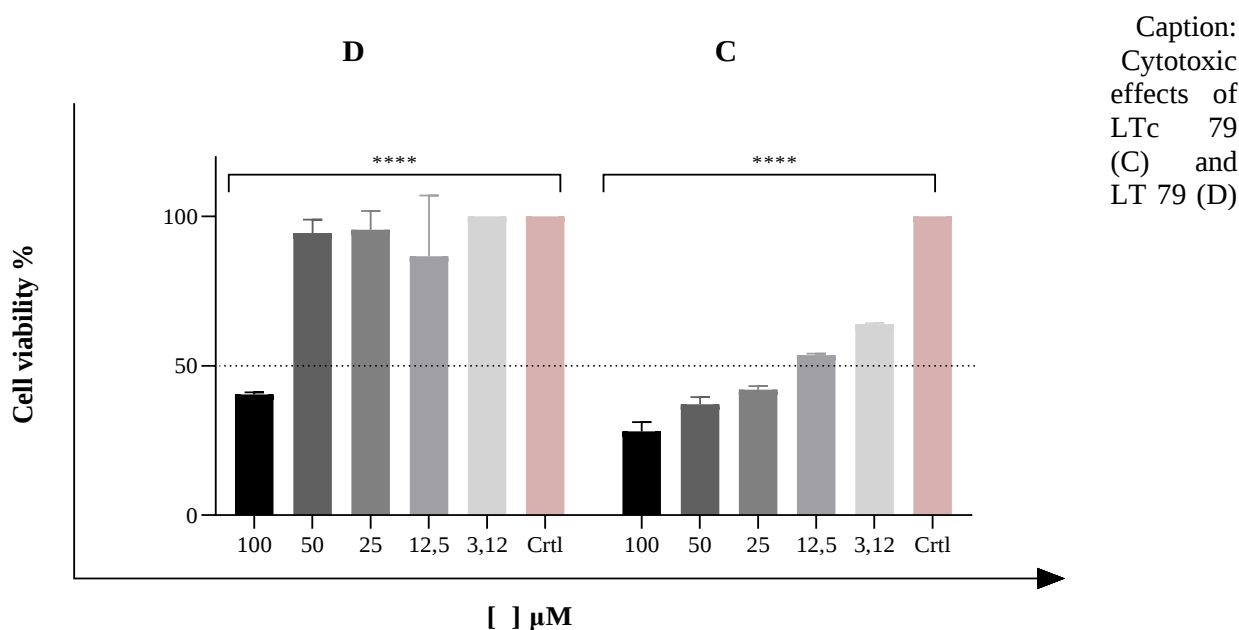
Molecules	Murine peritoneal	Fibroblasts	L. braziliensis (LTB2903)	
	macrophages	L929		
	CC ₅₀ (μ M $\pm$ DP)	CC ₅₀ (μ M $\pm$ DP)	CI ₅₀ pro (μ M $\pm$ DP)	IS pro
LT 79	55 μ M $\pm$ 3.9	> 100 μ M	12,80 $\pm$ 3.8	4,29
LTc 79	5,29 $\pm$ 3.5	> 100 μ M	6,74 $\pm$ 2,88	0,78
LT 71	> 200 μ M	> 100 μ M	14,09 $\pm$ 1,05	13,42
LTc 71	> 200 μ M	> 100 μ M	13,64 $\pm$ 0,41	14,66
Anfotericina B	0,5 $\pm$ 0,1		0,27 $\pm$ 0,33	2,3

Legend: Data were presented as mean $\pm$ from experiments conducted in triplicate, with cytotoxicity assays performed in duplicate. CC₅₀: half-maximal cytotoxic concentration; IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration; SI: selectivity index. SI = CC₅₀ / IC₅₀.

Indole thiosemicarbazone derivatives demonstrated low cytotoxicity in macrophages, suggesting a favorable safety profile for future therapeutic investigations, supporting the findings of Moreira et al. [54] and Silva et al. [8]. Only the LTc 79 derivative exhibited high cytotoxicity in peritoneal macrophages, which may be attributed to the presence of chlorine in its structure.

Although halogens, in general, facilitate the passage of molecules through cell membranes, chlorine, specifically, is a highly reactive element [55]. Its ability to induce redox processes and its tendency to bind with other elements, especially hydrogen, may have promoted cellular interactions that triggered oxidative stress through redox reactions [55,31].

Figure 4. Cytotoxicity of indole-thiosemicarbazones LTc 79 and LT 79 in mammalian cells.



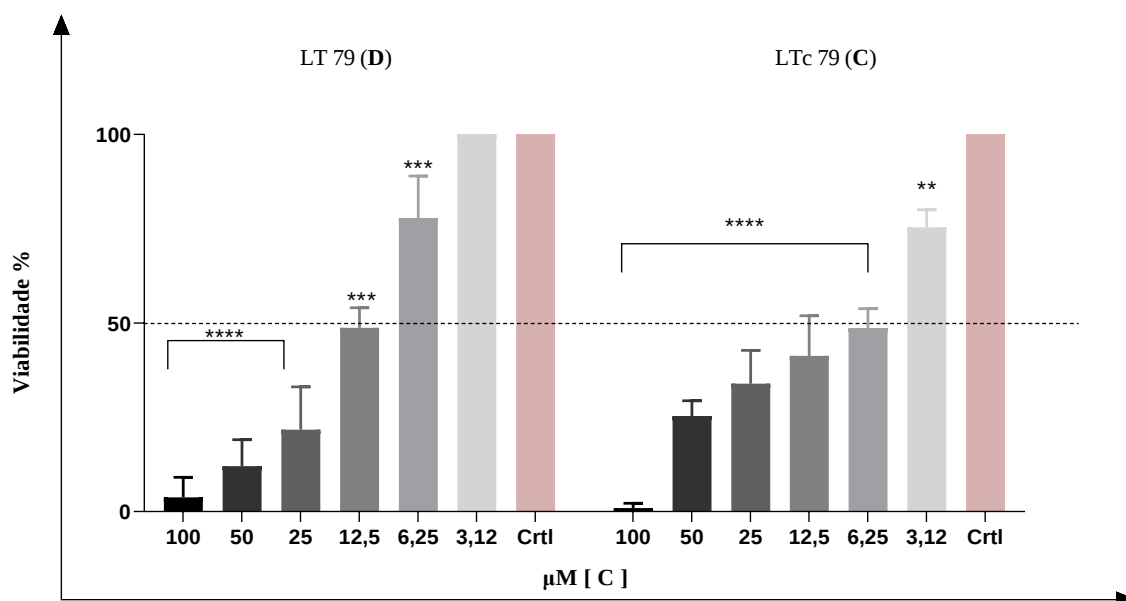
compounds in peritoneal macrophages. Ctrl: untreated cells. The results represent the mean and standard deviation from three independent experiments conducted in triplicate. (****) indicates a statistically significant difference compared to the untreated control ($p < 0.0001$).

Cytotoxicity of indole-thiosemicarbazones in mammalian cells was determined in peritoneal macrophages (**Figure 4**). It was observed that at LT 79 (D) concentrations of 12.5 μM, 25 μM, and 3.12 μM, macrophages exhibited 100% cell viability compared to the control. Regarding the LTc 79 (C) compound, there was a respective reduction, as cell viability decreased to 45%, 53%, and 60% at the same concentrations (**Figure 4**).

Amphotericin B exhibited a lower IC_{50} than the indole-thiosemicarbazone compounds; however, the obtained selectivity index indicated a high toxicity to host cells. Synthetic molecules were less toxic to macrophages and fibroblasts while being more selective toward the parasite. LTc 71 compound had the best index (14.66) (**Table 5**).

The inhibition of synthetic derivatives against *Leishmania braziliensis* revealed three important points in the structure-activity relationship of these compounds. First, the LTc 71 and LT 71 compounds showed no significant differences in efficacy, suggesting that the linker chain does not play a relevant role in antiparasitic activity. Second, these same compounds demonstrated greater selectivity, exhibiting effective action against *Leishmania braziliensis* without causing significant toxicity to host cells. Finally, the LTC 79 and LT 79 compounds displayed higher efficacy against the parasite, which may be attributed to the presence of the halogen in their structure, enhancing their activity.

Figure 2. Inhibitory profile of compounds LT 79 and LTc 79 on *Leishmania braziliensis* in 24 hours of treatment

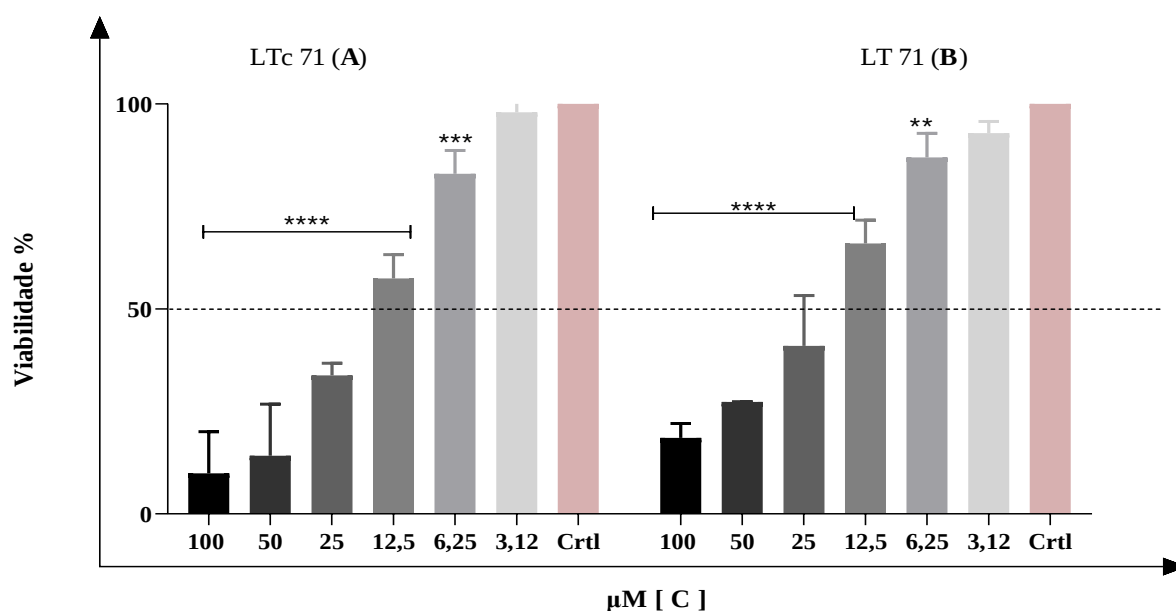


Caption: Effect of LTc 79 and LT 79 on *Leishmania braziliensis* promastigotes. LTc 79 (C) and LT 79 (D). The results represent the mean $\pm$ standard deviation from three independent experiments conducted in triplicate. (*) and (**) indicate statistically significant differences compared to the untreated control ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively).

The LTC 79 and LT 79 compounds demonstrated significant activity against *Leishmania braziliensis* at low concentrations, standing out as potential therapeutic agents against the parasite. However, toxicity evaluation revealed that, although these compounds exhibit effective activity against *Leishmania*, LTC 79 and LT 79 were toxic to macrophages at low concentrations, while showing no toxic effects on fibroblasts, indicating a degree of cell selectivity.

Structural analysis suggested that the presence of oxazolidine and the acetate group in the LTC 79 structure was crucial for enhancing its antiparasitic activity, making it more effective against *Leishmania* compared to LT 79. These functional groups, along with the halogen, likely facilitate the compound's interaction with the parasite, increasing its biological activity and making LTC 79 more efficient even at lower doses.

Figure 3. Inhibitory profile of compounds LT 71 and LTc 71 on *Leishmania braziliensis* in 24 hours of treatment.



Caption: Effect of LTc 71 and LT 71 on *Leishmania braziliensis* promastigotes. LTc 71 (A) and LT 71 (B). The results represent the mean $\pm$ standard deviation from three independent experiments conducted in

triplicate. () and (*) indicate statistically significant differences compared to the untreated control ($p < 0.1$, 0.01, and 0.001, respectively).

The LTC 71 and LT 71 compounds exhibited the best selectivity index, a crucial factor for effective leishmaniasis therapy, especially when compared to the standard drug used in clinical practice. These derivatives contain a nitro group attached to a benzene ring, a structure known for its ability to induce cell death. According to Britta et al. (2014), this molecular configuration stimulates the production of mitochondrial superoxide anion radicals, a mechanism that contributes to parasite death, further reinforcing the promising therapeutic potential of these compounds against *Leishmania*.

Thus, the chemical conformation, bond type, and atomic composition were key determinants of the unique properties of each compound. The tested molecules primarily differ in the substitutions of the indole radicals and modifications in the thiosemicarbazone structure. These structural variations directly influenced the individual behavior of each compound, impacting their biological activity and therapeutic potential.

Conclusions

Synthetic indole thiosemicarbazone compounds have shown promising potential as therapeutic agents against *Leishmania braziliensis*, highlighting the importance of seeking new treatments for leishmaniasis and the need for effective and selective alternatives.

The use of in silico studies has proven to be an essential tool for predicting the activity of these derivatives, aiding in the identification of compounds with better pharmacological profiles even before biological testing. Among the evaluated compounds, those with a nitro group replacing the pyrrole ring of the indole stood out for forming a highly selective and effective molecule against the parasite.

However, derivatives containing halogens, such as chlorine, while exhibiting greater antiparasitic efficacy, also promoted oxidative stress in host cells, which may pose a challenge for therapeutic use. These findings emphasize the need for further research to optimize the chemical structure of these compounds, aiming to balance efficacy and safety in leishmaniasis treatment.

FUNDING: This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) – Funding Code 001; CNPq, and PROPG/UFPE.

References

1. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. World Health Organization. World Health Organization: WHO; 2023. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis - PAHO/WHO | Pan American Health Organization [Internet]. www.paho.org. Available from: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>
3. Quaresma PF, Ferreira C, Jeronimo de J, Rodrigo, Moreno EC, et al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Parasitology*. 2018 Mar 12;145(9):1161–9.
4. eBioMedicine. Leishmania: an urgent need for new treatments. *eBioMedicine*. 2023 Jan;87:104440.
5. Rego, FD, Da Rocha Lima, A., Pereira, AAS, Quaresma, PF, Pascoal-Xavier, MA, Shaw, JJ, et al. (2018). Genetic variant strains of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* exhibit distinct biological behaviors. *Parasitol. Res.* 117, 3157–3168. doi: 10.1007/s00436-018-6014-4

6. Patino LH, Muskus C, Ramírez JD. Transcriptional responses of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the presence of trivalent sodium stibogluconate. *Parasites & Vectors*. 2019 Jul 12;12(1).
7. Qi F, Qi Q, Song J, Huang J. Synthesis, Crystal Structure, Biological Evaluation and in Silico Studies on Novel (E)-1-(Substituted Benzyldiene)-4-(3-isopropylphenyl)thiosemicarbazone Derivatives. *Chemistry & Biodiversity*. 2020 Dec 22;18(2).
8. da Silva PR, de Oliveira JF, da Silva AL, Queiroz CM, Feitosa APS, Duarte DMFA, et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies. *Chemico-Biological Interactions*. 2020 Jan;315:108899.
9. Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2022 Apr 4];143:60–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24846006>
10. Alice Liberato Ribeiro Sales. Theoretical Approach To The E/Z Equilibrium Of Thiosemicarbazones Derived From 2-Acetylthiophene [Internet]. 2017 [Cited 2025 Feb 12]. Available From: http://Repositorio.Ufla.Br/Jspui/Bitstream/1/15309/3/Disserta%C3%87%C3%83o_Abordagem%20te%C3%B3rica%20do%20equil%C3%Adbrio%20ez%20de%20tiosemicarbazonas%20derivadas%20do%202-Acetiltiofeno.Pdf
11. Arlan, Santos, Simplicio SS, Délis Galvão Guimarães, Melo R. ONE-POT SYNTHESIS PROPOSAL: EXPERIMENTAL PRACTICES IN ORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY BASED ON THE PREPARATION OF THE THIAZOLE HETEROCYCLE. *Química Nova* [Internet]. 2024 Sep 27 [cited 2025 Feb 12]; Available from: <https://www.scielo.br/j/qn/a/wSqZGg9JKctr7QRmPHfLmtv/>
12. Ribeiro A, Jamerson, Silva, Rubens, Junior, Lemos A, et al. In vitro activity, ultrastructural studies and in silico pharmacokinetic properties of indol-3-yl-thiosemicarbazones derivatives and analogues against juvenile and adult worms of *S. mansoni*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019 Jul 5;
13. Santos R, Bernardo VG, Robert, Cesar D, Leandro M, Pontarolo R, et al. 2-Aminothiophene Derivatives—New Drug Candidates Against Leishmaniasis: Drug Design, Synthesis, Pharmacomodulation, and Antileishmanial Activity. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2025 Jan 17;18(1):125–5. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/18/1/125>
14. Iris J. 3-Indol-thiosemicarbazones: synthesis, structural elucidation, and investigation of anti-inflammatory potential. *Ufpebr* [Internet]. 2018 [cited 2025 Feb 12]; Available from: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/30657>
15. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. 2017 Mar 3;7(1):1–13.
16. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2015 Apr 22;58(9):4066–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434528/#ref1>
17. Plutín A, Alvarez A, Raúl Mocolo, Ramos R, Osmar Sánchez, Castellano E, et al. Structure/Activity of PtII/N,N-Disubstituted-N'-acylthiourea Complexes: Anti-Tumor and Anti-Myco bacterium tuberculosis Activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2025 Feb 12]; Available from: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/ZrxVqqNFbhhkVDRP8zCzFwRd/?lang=en>
18. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*. 2012 Sep 10;12(9):12347–60.
19. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 2003 Jan;10(6-7):499–503.
20. Delaney JS. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 2004 May;44(3):1000–5.

21. Ali J, Camilleri P, Brown MB, Hutt AJ, Kirton SB. Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012 Jan 13;52(2):420–8.
22. Sun N, Agyei D, Ji D. Medicinal Chemistry Friendliness of Pigments from *Monascus*-Fermented Rice and the Molecular Docking Analysis of Their Anti-Hyperlipidemia Properties. *Fermentation*. 2020 Nov 19;6(4):111.
23. Neidle S. Lipinski's Rule of Five - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. www.sciencedirect.com. 2012. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/lipinskis-rule-of-five>
24. Sabt A, Eldehna WM, Al-Warhi T, Alotaibi OJ, Elaasser MM, Suliman H, et al. Discovery of 3,6-disubstituted pyridazines as a novel class of anticancer agents targeting cyclin-dependent kinase 2: synthesis, biological evaluation and in silico insights. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 1;35(1):1616–30.
25. Martins CR, Lopes WA, Andrade JB de. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova* [Internet]. 2013;36(8):1248–55. Available from: http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol36No8_1248_25-ED12977_cor.pdf
26. Ullah A, Prottoy NI, Araf Y, Hossain S, Sarkar B, Saha A. Molecular Docking and Pharmacological Property Analysis of Phytochemicals from *Clitoria ternatea* as Potent Inhibitors of Cell Cycle Checkpoint Proteins in the Cyclin/CDK Pathway in Cancer Cells. *Computational Molecular Bioscience*. 2019;09(03):81–94.
27. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017 Oct 13;13(11):1147–58.
28. Santiago AS, Pita SS da R, Guimarães ET. Treatment of leishmaniasis, limitations of current therapy, and the need for new alternatives: A narrative review. *Research, Society and Development* [Internet]. 2021 Jun 22;10(7):e29510716543–e29510716543. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16543>
29. Lombardo F, Desai PV, Arimoto R, Desino KE, Fischer H, Keefer CE, et al. *In Silico* Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017 Jun 27;60(22):9097–113.
30. Motohashi H, Nakao Y, Masuda S, Katsura T, Kamba T, Ogawa O, et al. Precise comparison of protein localization among OCT, OAT, and MATE in human kidney. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013 Sep;102(9):3302–8.
31. Branham ML, Ross EA, Govender T. Predictive Models for Maximum Recommended Therapeutic Dose of Antiretroviral Drugs. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2012;2012:1–9.
32. Frolov RV, Ignatova II, Singh S. Inhibition of hERG Potassium Channels by Celecoxib and Its Mechanism. Baud O, editor. *PLoS ONE*. 2011 Oct 24;6(10):e26344.
33. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2015 Apr 22;58(9):4066–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434528/#ref1>
34. Zhong H. Editorial (Hot Topic: ADME and Toxicity in Early Drug Discovery). *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2013 Jun 1;13(11):1255–6.
35. Pacheco PAF, Santos MMM. Recent Progress in the Development of Indole-Based Compounds Active against Malaria, Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Molecules*. 2022 Jan 5;27(1):319.
36. Croft S, Yardley V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*. 2002 Feb 1;8(4):319–42.
37. Magalhaes Moreira DR, de Oliveira ADT, Teixeira de Moraes Gomes PA, de Simone CA, Villela FS, Ferreira RS, et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic

- parasite death. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2014 Feb 3;75:467–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523414001214?via%3Dihub>
38. Sanjida Anjom Tamanna, Md. Abdul Alim, Md. Faridul Islam, Md. Rakibul Hasan, Md Esrafil, Md. Nannur Rahman, et al. Effect of drying methods on physicochemical quality of dehydrated jackfruit bulbs. *Food and humanity*. 2023 Dec 1;1:723–30.
39. Marcelo Zaldini Hernandez, Melo S, Magalhães R, Filgueira W, Cristina A. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Current Drug Targets*. 2010 Feb 28;11(3):303–14.
40. Jindaniya V, Mishra R, Mazumder A, Tyagi S. Synthesis and Diverse Pharmacological Actions of Thiosemicarbazide Analogs: A Review. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2024 Sep;21(12):2302–34.
41. Manzano JI, Cochet F, Boucherle B, Gómez-Pérez V, Boumendjel A, Gamarro F, et al. Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry* [Internet]. 2016 Oct;123:161–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27475107/>
42. YI, W. Refinement of the arylthiosemicarbazone pharmacophore in the inhibition of mushroom tyrosinase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 4330–4335, 2011.
43. DA SILVA, E. B. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents, new thiazole derivatives that induce apoptotic death of the parasite. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 130, pp. 39–50, 2017.
44. TEMRAZ, M. G. Click-modifiable thiosemicarbazones for anti-leishmania activity: design, synthesis, biological evaluation, and *in silico* studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 151, pp. 585–600, 2018.

ANEXO A – TEXTO TEXTO TEXTO TEXTO

[ANEXO é um elemento opcional. O conteúdo dos anexos deve ter sido elaborado por outra pessoa.]