



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE COMPLEXOS METÁLICOS A BASE DE PRATA**

**CONTRA *Leishmania* spp. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**

**PAULINE DE FARIA SOLDERA**

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE -**  
**COSAS**

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE COMPLEXOS METÁLICOS A BASE DE PRATA**  
**CONTRA *Leishmania* spp. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**

**PAULINE DE FARIA SOLDERA**

**Orientação: Antonia Maria Ramos Franco, INPA, BR**

**Co-orientação: Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski**

**Marina Porchia, ICMATE, IT**

**2022**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S684e Soldera, Pauline de Faria  
Estudos pré-clínicos de complexos metálicos a base de prata  
contra Leishmania spp. (KINETOPLASTIDA:  
TRYPANOSOMATIDAE) / Pauline de Faria Soldera . 2022  
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco Pereira  
Coorientadora: Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski  
Coorientadora: Marina Porchia  
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose. 2. Tratamento. 3. Complexos metálicos. 4.  
Prata. I. Pereira, Antonia Maria Ramos Franco. II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

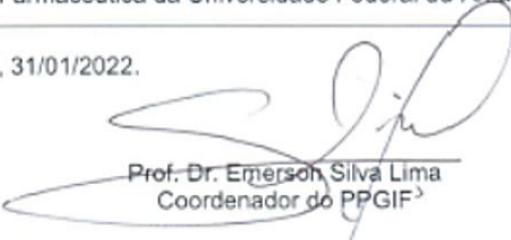
**"Estudos pré-clínicos de complexos metálicos a base de prata contra  
Leishmania spp. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)"**

**DISCENTE: PAULINE DE FARIA SOLDERA**

**PARECER:**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 31/01/2022.

  
Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coordenador do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes  
professores:

  
Antonia Maria Ramos Franco Pereira, DSc.  
Pesquisador Sênior II, Produtividade CNPq 2  
CSAS/Lab. Leishmaniose e Doença de Chagas - INPA  
Av. André Araújo, no. 2936, Aléio  
Tel +55 (92) 3643-3068/3065, Fax +55 (92) 3643-3061  
e-mail: atreiros@inpa.gov.br

Antonia Maria Ramos Franco Pereira  
Pesquisador Sênior II  
SAPF nº 132408  
8993807

Profa. Dra. Antonia Maria Ramos Franco Pereira  
orientadora e presidente da banca



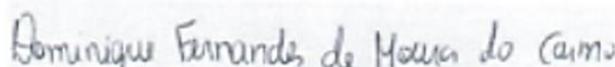
Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares  
Membro (UFTM)



Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva  
Membro (Fiocruz)

  
Profa. Dra. Helyde Albuquerque Marinho - INPA

Profa. Dra. Helyde Albuquerque Marinho  
Membro (INPA)



Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo  
Membro (UFAM)

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a mim e as forças superiores, pela determinação e força para finalizar o doutorado;
- À minha orientadora, Dra. Antonia Maria Ramos Franco Pereira, por ter me aceito como aluna ainda no mestrado, ter acreditado em mim e, mesmo com o tempo curto em meio a uma pandemia conseguir arrumar tempo para me ensinar sempre mais. Muito Obrigada!!
- À co-orientadora Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski. pela paciência, amizade e ensinamentos. Muito obrigada!! MAY THE FORCE BE WITH YOU =);
- À querida co-orientadora Dra. Marina Porchia do ICMATE, da Itália, pela ajuda na parte química, ensinamentos, torcida e por tudo que fez e ainda está fazendo por mim. GRAZIE;
- À Maricleide Farias Naiff, dona Mari, pelos puxões de orelha, ensinamentos, carinho, amizade, conselhos e elogios. Obrigada por ter sido a mãe do laboratório para mim e para todos;
- À minha mãe, Rose, minha inspiração de vida, ao Joaquim, meu padrinho que assumiu o papel de pai, minha tia-mãe Fátima, e minhas primas-irmãs, Thaís e Laís alguns familiares que me incentivaram e ajudaram de todas as formas possíveis e impossíveis, aturando meu mau humor e estresse em tempos de qualificar e defender. Muito obrigada, vocês são a razão do meu viver;
- À Ana Flávia da Silva Chagas, amiga, companheira, parceira de todas as horas e situações, não importando qual era a emergência. MUITÍSSIMO obrigada por toda ajuda, nos experimentos e no lado pessoal e emocional, acho que sem tua ajuda e incentivo, teria sido mais difícil conseguir terminar o mestrado. Conte sempre comigo, porque a amizade vai durar muito tempo. Muito obrigada por tudo!
- À Anny Maiza Vargas Brasil, amiga querida, por seu companheirismo, ajuda na bancada, risadas, força, choro e comemorações. Sem você, não teria conseguido. Conta comigo para o que der e vier, muito obrigada!

- Aos eternos PIBICS, Breno Mota, Theodora Paiva, Carol Nunes, Rayane Matsuhi, principalmente Joyara Matos e Colleen Luise, obrigada por ensinamentos que proporcionaram, por me ensinarem a ensinar a orientar, pelo companheirismo, cafezinhos no fim de tarde, ajuda na bancada, incentivo, sem ajuda de vocês nada disso teria sido possível;
- Á todos os técnicos, principalmente a Dra. Francimeire Gomes Pinheiro e Lourival Maciel por todos os ensinamentos. Sou muito grata por tudo que me ensinaram. Muito obrigada!!
- Aos amigos Vivianne Pena, Lincoln Rayath, Wellison Brito, Andreia Rocha, Jorge Viana, Clodoaldo Junior, Fabiana Viana, Ingrid Marques, Lenara Bahia, Glauciane Arruda, Sanderson Fernandes, Natalielli Ferreira, Vera Vasconcelos pelo incentivo e torcida. Muito obrigada!!
- Aos amigos que conheci através do DistopiaNerd, principalmente Thiago por incentivo, amizade, carinho, parceria, risadas no Gartic com os “melhores” desenhos, desespero quando um 100d10 era jogado no meio do RPG. Vocês me ajudaram, mesmo que indiretamente, no meio dessa árdua campanha chamada doutorado. Subi de level, mestre? =D
- Aos amigos da turma do doutorado: Ana Flávia, Marcos Túlio, Edna Márcia e Fabrício Rolim companheiros de disciplinas, almoços, desespero, nervoso e felicidades. Conseguimos gente, conseguimos mesmo! Obrigada por tudo;
- Aos meus amigos, de longa data, por entenderem quando não tinha tempo para sair ou conversar. Obrigada por me apoiarem!
- Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida;
- Á Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade dessa Pós-graduação;
- Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica - PPGIF
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA;
- A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente.

MUITO OBRIGADA!

*Eu continuo acreditando no destino, mas acho que os seres humanos são fortes para mudarem seus destino, quaisquer que sejam eles. Lute, nunca se entregue, lembre – se que você pode conseguir tudo que quiser.*

**IKKI DE FÊNIX**

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada de flebotomíneo fêmea infectado. Infecções humanas podem manifestar-se de diferentes formas, como leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). O tratamento se dá por antimoniais pentavalentes que, apesar da eficácia, apresentam efeitos colaterais e vias de administração com necessidades de internação e acompanhamento clínico por profissionais da área de saúde. A Química Inorgânica Medicinal oferece possibilidades de pesquisa, e os metais apresentam vantagens sobre fármacos já existentes, dentre os quais a prata e seus íons destacam – se por sua diversidade de atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade relatados. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade citotóxica, o efeito *in vitro* de complexos metálicos a base de prata (Ag1 e Ag2) contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*, e avaliar a atividade de dois géis, um contendo o complexo Ag1 e outro contendo complexo Ag2 incorporados, no tratamento de lesões causadas por essas espécies em animais de experimentação - hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). Os complexos foram sintetizados pela equipe do ICMATE, Pádua - IT e encaminhados para os testes biológicos no INPA. Os complexos foram avaliados *in vitro* frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp., estas últimas interiorizadas em cultivos primários - macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos. A atividade citotóxica dos complexos à essas células foi realizado por método colorimétrico, com reagente Alamar Blue®. Para os teste *in vivo*, foram preparados géis base e incorporados os complexos metálicos. Os animais foram infectados com promastigotas de *Leishmania* spp. Após aparecimento da lesão foi iniciado o tratamento tópico por 30 dias seguidos, com os géis formulados. Contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, ambos complexos apresentaram redução no número de parasitas viáveis, principalmente para o complexo Ag2 (IC<sub>50</sub> <10), já contra formas amastigotas, o complexo Ag1 apresentou maior redução de macrófagos e monócitos infectados (IC<sub>50</sub> 6.09 e 23.28, respectivamente). Contra a espécie *L. (V.) guyanensis* o complexo Ag2 apresentou atividade anti-*Leishmania* em formas amastigotas interiorizadas em macrófagos, com redução das células infectadas. Em testes citotóxicos o complexo Ag2 não apresentou citotoxicidade para ambos os tipos celulares. O complexo Ag2 apresentou o índice de seletividade (IS) mais tolerável dentre todos, quando avaliados em macrófagos peritoneais. Quanto ao tratamento tópico, o melhor resultado foi utilizando o complexo Ag2 em infecção causada por *L. (L.) amazonensis*, com redução do volume da lesão após o 14º dia de tratamento, a qual também apresentou menor carga parasitária em cultivo parasitário. Com base nesses resultados, é possível inferir atividade anti-*Leishmania* pelos complexos de prata, devendo-se levar em consideração que tal atividade está relacionada com a espécie, forma evolutiva do parasita e o tempo de tratamento.

Palavras – chave: Leishmaniose, Tratamento, Complexos metálicos, Prata

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of an infected female sandfly. Human infections can manifest in different ways, such as Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Visceral Leishmaniasis (VL). Treatment is by pentavalent antimonials that, despite their effectiveness, have side effects and routes of administration that require hospitalization and clinical follow-up by professionals. Medicinal Inorganic Chemistry offers research possibilities, and metal have advantages over existing drugs, among which silver and its ions stand out for their reported diversity of antimicrobial activity and low cytotoxicity. The objective of this work was to study the cytotoxic activity, the *in vitro* effect of metallic complexes based on silver (Ag1 and Ag2) against the promastigote and amastigote forms of *Leishmania Leishmania) amazonensis* and *L. (Viannia) guyanensis*, and evaluate the activity of two gels, one containing the Ag1 complex and the other containing the Ag2 complex incorporated, in the treatment of lesions caused by these species in experimental animals - golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). The complexes were synthesized by the ICMATE team, Padua – Itália and sent for biological tests at INPA. The complexes were evaluated *in vitro* against promastigote and amastigote forms of *Leishmania* sp., the latter internalized in primary cultures - murine peritoneal macrophages and human monocytes. The cytotoxic activity of the complexes to these cells was performed by colorimetric method, with Alamar Blue<sup>®</sup> reagent. For *in vivo* tests, base gels were prepared and metal complexes were incorporated. The animals were infected with *Leishmania* sp. After appearance of the lesions, the topical treatment was started for 30 consecutive days, with the formulated gels. Against promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, both complexes showed a reduction in the number of viable parasites, mainly for the Ag2 complex (IC<sub>50</sub> <10), whereas against amastigote forms, the Ag1 complex showed a greater reduction in infected macrophages and monocytes (IC<sub>50</sub> 6.09 and 23.28, respectively). Against the species *L. (V.) guyanensis*, the Ag2 complex showed anti-*Leishmania* activity in amastigote internalized in macrophages, with reduction in infected cells. In cytotoxic teste, the Ag2 complex did not show cytotoxicity for both cell type. The Ag2 complex showed the most tolerable selectivity index (IS) among all when evaluated in peritoneal macrophages. As for topical treatment, the best result was using the Ag2 complex in infection caused by *L. (L.) amazonensis*, with a reduction in the volume of the lesion after the 14th day of treatment, which also showed a lower parasitic load in parasite culture. Based on these results, it is possible to infer anti-*Leishmania* activity by silver complexes, taking into account that such activity is related to the species, evolutionary forms of the parasite and time treatment.

Keywords: Leishmaniasis; Treatment, Metal complexes, Silver

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número total de casos no mundo de Leishmaniose Cutânea em 2020 .....	18
Figura 2: Forma promastigota (A) forma amastigota (B). .....	20
Figura 3: Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i> .....	24
Figura 4: Formas clínicas da leishmaniose tegumentar. A: leishmaniose cutânea; B. Leishmaniose cutânea-mucosa; C: leishmaniose difusa; D: leishmaniose disseminada .....	26
Figura 5: Fluxograma de atividades propostas no projeto .....	39
Figura 6: Estrutura molecular dos ligantes e complexos utilizados no estudo .....	40
Figura 7: Esquema de delineamento experimental. ....	46
Figura 8: Atividade dos complexos Ag1 e Ag2 contra formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em quatro concentrações (160–20µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	51
Figura 9: Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas promastigotas de <i>L. (V.) guyanensis</i> em quatro concentrações (160 – 20 µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	52
Figura 10: Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos em quatro concentrações (160 – 20 µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	56
Figura 11: Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> interiorizadas em monócitos humanos em quatro concentrações (160 – 20 µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	57
Figura 12 Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de <i>L. (V.) guyanensis</i> interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos em quatro concentrações (160 – 20 µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	58
Figura 13: Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> interiorizadas em monócitos humanos em quatro concentrações (160 – 20 µmol/mL) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h .....	59
Figura 14: Géis incorporados com complexos metálico. A: gel com incorporação de Ag1; B: gel com incorporação de Ag2; C: gel sem adição de nenhum complexo (placebo) .....	60

- Figura 15: Efeito do tratamento tópico na lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (L.) amazonensis*, com géis contendo complexos metálicos incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados, animais tratados com Glucantime® IM 3 mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>-1</sup>. Os dados representam a média ± DP..... 61
- Figura 16: Evolução do tratamento tópico de lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (L.) amazonensis*, usando géis contendo complexos metálicos incorporados (0,3 mg/dia), gel sem adição de complexos (placebo), tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup> em relação aos grupos infectado e não tratado e não infectado..... 62
- Figura 17: Índice de infecção e amastigotas quantificados em lesão em *Mesocricetus auratus* infectados por *L. (L.) amazonensis*..... 63
- Figura 18: Valores absolutos de células do sistema imunitário encontradas em esfregaço sanguíneo de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com géis contendo complexos metálicos, Ag1 e Ag2, incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup>..... 64
- Figura 19: Aspecto de órgão, fígado, de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* tratados com Ag1 (A) e Ag2 (B). No detalhe é possível visualizar áreas esbranquiçadas nos lobos dos órgãos ..... 65
- Figura 20: Efeito do tratamento tópico na lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (V.) guyanensis*, com géis contendo complexos metálicos incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>-1</sup>. Os dados representam a média ± DP..... 65
- Figura 21: Evolução do tratamento tópico de lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (V.) guyanensis*, usando géis contendo metálicos incorporados (0,3 mg/dia), gel sem adição de complexos (placebo), tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup> em relação aos grupos infectado e não tratado e não infectado..... 66
- Figura 22: Índice de infecção e amastigotas quantificados em lesão em *Mesocricetus auratus* infectados por *L. (V.) guyanensis*, tratados com géis contendo complexos metálicos, animais infectados sem tratamento e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>).kg.dia<sup>-1</sup>..... 67
- Figura 23: Valores absolutos de células do sistema imunitário encontradas em esfregaço sanguíneo de animais infectados com *L. (V.) guyanensis* tratados com géis contendo complexos metálicos, Ag1 e Ag2, incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup>..... 68
- Figura 24: Aspecto de órgão, fígado, de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* tratados com Ag1 (A) e Ag2 (B). No detalhe é possível visualizar áreas esbranquiçadas nos lobos dos órgãos. .... 68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: : Principais espécies do gênero <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> que causam doença em humanos e suas formas clínicas. ....	19
Tabela 2: Valores de IC <sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) da atividade dos complexos de prata contra formas promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> após 24, 48 e 72h. P <0,05 .....	49
Tabela 3: Atividade citotóxica em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos com valores de CC <sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) dos complexos de prata após 24, 48 e 72 h de incubação. P<0,05 .....	54
Tabela 4: Valores de IC <sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) da atividade dos complexos de prata contra formas amastigota de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> após 24, 48 e 72h, e valores de índice de seletividade (SI) em macrófagos Peritoneais .....	56
Tabela 5: Características dos géis com complexos metálicos incorporados .....	60

## LISTA DE ABREVIACÕES

a. C. – Antes de Cristo  
Ag – Símbolo químico para prata, vindo do latim *Argentum*  
Ag<sup>+</sup> – Íon de prata  
AmpB – Anfotericina B  
CC50 – Concentração citotóxica a 50%  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
COSAS – Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde  
d. C. – Depois de Cristo  
DMSO – Ddimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
g – Grama  
IC – Concentração inibitória a 50%  
ICMATE – Institute of Condensed Matter Chemistry and Energy  
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
IS – Índice de seletividade  
K<sup>+</sup> – Íon de potássio  
Kg – Kilogramas  
Kr – Representação da configuração eletrônica do elemento químico prata  
LC – Leishmaniose cutânea  
LCD – Leishmaniose cutânea disseminada  
LM – Leishmaniose mucocutânea  
LT – Leishmaniose tegumentar  
LTA – Leishmaniose tegumentar americana  
LV – Leishmaniose visceral  
mL – Mililitros  
mg – Miligramas  
N – Nitrogênio  
NNN – Meio de cultivo  
O – Oxigênio  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PA – Paramomicina  
PBS – Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline  
Pt – Platina  
RNA – Ácido ribonucleico  
RPM – Rotação por minuto  
RPMI – Meio de cultivo  
S – Enxofre  
SFB – Soro fetal bovino  
SFBi – Soro fetal bovino inativado  
TrxR – Enzima tiorredoxina redutase  
WHO – World Health Organization  
µm – micrometro  
µmol/mL – micromol por mililitro

## Sumário

1.0.	INTRODUÇÃO .....	14
2.0.	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1.	Leishmaniose .....	17
2.2.	Agente Etiológico .....	20
2.3.	Vetores .....	22
2.4.	Ciclo de Vida .....	23
2.5.	Epidemiologia .....	24
2.6.	Formas Clínicas .....	25
2.7.	Tratamento.....	27
2.8.	Química Inorgânica Medicinal e Complexos Metálicos.....	29
2.9.	A prata e sua interação em organismos vivos .....	31
2.10.	Uso da prata na medicina .....	34
2.11.	Complexos metálicos a base de prata.....	36
3.0.	OBJETIVOS .....	38
3.1.	Geral .....	38
3.2.	Específicos .....	38
	Local de execução .....	39
4.0.	METODOLOGIA.....	40
4.1.	Compostos Químicos .....	40
4.2.	Obtenção de macrófagos peritoneais .....	41
4.3.	Obtenção de monócitos humanos .....	41
4.4.	Ensaio de citotoxicidade dos complexos metálicos sobre macrófagos peritoneais e monócitos humanos por ensaio colorimétrico.....	42
4.5.	Manutenção e Preparo de massa parasitária.....	43
5.3.	Índice de Seletividade (IS).....	45
6.1.	Preparação do gel .....	45
6.2.	Animais de experimentação .....	46
6.3.	Infecção e tratamento dos animais.....	46
7.0.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
8.0.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
	Estudos <i>in vitro</i> .....	48
9.0.	CONCLUSÃO.....	70
10.0.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	71

## 1.0. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, crônicas, não contagiosas ao homem, desencadeadas por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitidas de animais infectados para humanos pela picada do inseto flebotomíneo. Manifesta - se nas formas Tegumentar (LT), Mucocutânea (LM) e Visceral (LV). A doença apresenta – se em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com o hospedeiro (GOTO e LINDOSO, 2012; ALEMAYEHU e ALEMAYEHU, 2017).

Parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários com ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo de forma alternada em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes responsáveis pela transmissão do parasita entre as espécies de mamífero. Diversas espécies estão envolvidas na etiologia da doença no Brasil. No Estado do Amazonas, são encontradas *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* (KAYE; SCOTT, 2011).

As moléstias apresentam formas clínicas distintas. O aspecto clínico da LT em humanos inclui as formas clínicas: cutânea (LC), cutânea disseminada (LCD) e mucocutânea (LM). As manifestações clínicas da doença são determinadas pelas características do hospedeiro, espécie de *Leishmania* presente e resposta imune do indivíduo infectado (LUQUE-ORTEGA, 2010; MICHEL et al.; 2011).

Os fármacos utilizados para o tratamento da LT pertencem à classe dos antimoniais, antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e o isotionato de pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>). Ambos apresentam toxicidade e casos de falha do tratamento, seja por resistência de determinadas cepas do parasita, quanto por baixa atividade em pacientes imunodeprimidos ou descontinuidade do tratamento devido aos efeitos colaterais. Isso estimula a busca por novas formas de tratamento e novas substâncias com ação anti-*Leishmania*, bem como formas

farmacêuticas menos efeitos colaterais na administração (CROFT e SUNDAR 2006).

A utilização de metais como fármacos apresenta potencial para aumentar o conjunto de drogas disponíveis para tratamento de uma série de enfermidades, dentre elas a leishmaniose. A interação entre íon metálico e ligante possibilita obter compostos com extensa variedade, estados de oxidação e geometrias (BRUIJNINCX e SADLER, 2008; SEGURA et al., 2014).

É visto na literatura relatos da complexação de íon metálicos, estabelecendo a formação do complexos com atividade antibacteriana (VIEIRA et al., 2009), antifúngica (GUO, 1999), antiparasitária (BAIOCCO et al., 2011; ALLAHVERDIYEV et al., 2011; JOB et al., 2014) e anticancerígena (SANTINI et al., 2011). A capacidade do ligante em formar quelato com metal favorece atividade biológica de complexos metálicos (ROCHA, 2011; SEGURA et al., 2014).

Dos metais utilizados como fármaco, a prata chama atenção devido as propriedades médicas e químicas, como atividade antibacteriana, resistência à oxidação e condutividade térmica (LEE, 2007). A prata exibe baixa toxicidade em humanos, quando absorvida, entra no sistema circulatório complexada a proteínas, sendo assim rapidamente eliminada pelo fígado pelos rins (HADRUP e LAM, 2014). O estudo de Greulich (2013) confirmou que uma possível citotoxicidade da prata foi demonstrada apenas em estudos *in vitro*.

Entretanto, a exposição crônica pode levar a deposição de partículas de prata na pele (argiria) e outros órgãos. Devido a isso, a preocupação atual é desenvolver complexos que liberem de forma lenta os íons de prata no organismo (BRANDT et al., 2005).

Com base nos resultados dos complexos metálicos a base de prata realizados anteriormente em dissertação de mestrado de Soldera (2015), contra *L. (L.) amazonensis* Ag<sub>2</sub> apresentou atividade contra forma promastigota (IC<sub>50</sub> 14,53 µM/mL) e amastigotas houve 25%

de macrófagos infectados, contra *L. (V.) guyanensis* contra formas promastigota e amastigota os complexos não apresentaram atividade ( $IC_{50} >60 \mu\text{M/ mL}$ ), o presente estudo busca dar continuidade nos testes e tem como objetivo avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* anti-*Leishmania* de dois complexos metálicos a base de prata, contra as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*, causadoras das formas cutâneas da leishmaniose no Brasil.

## 2.0. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leishmaniose

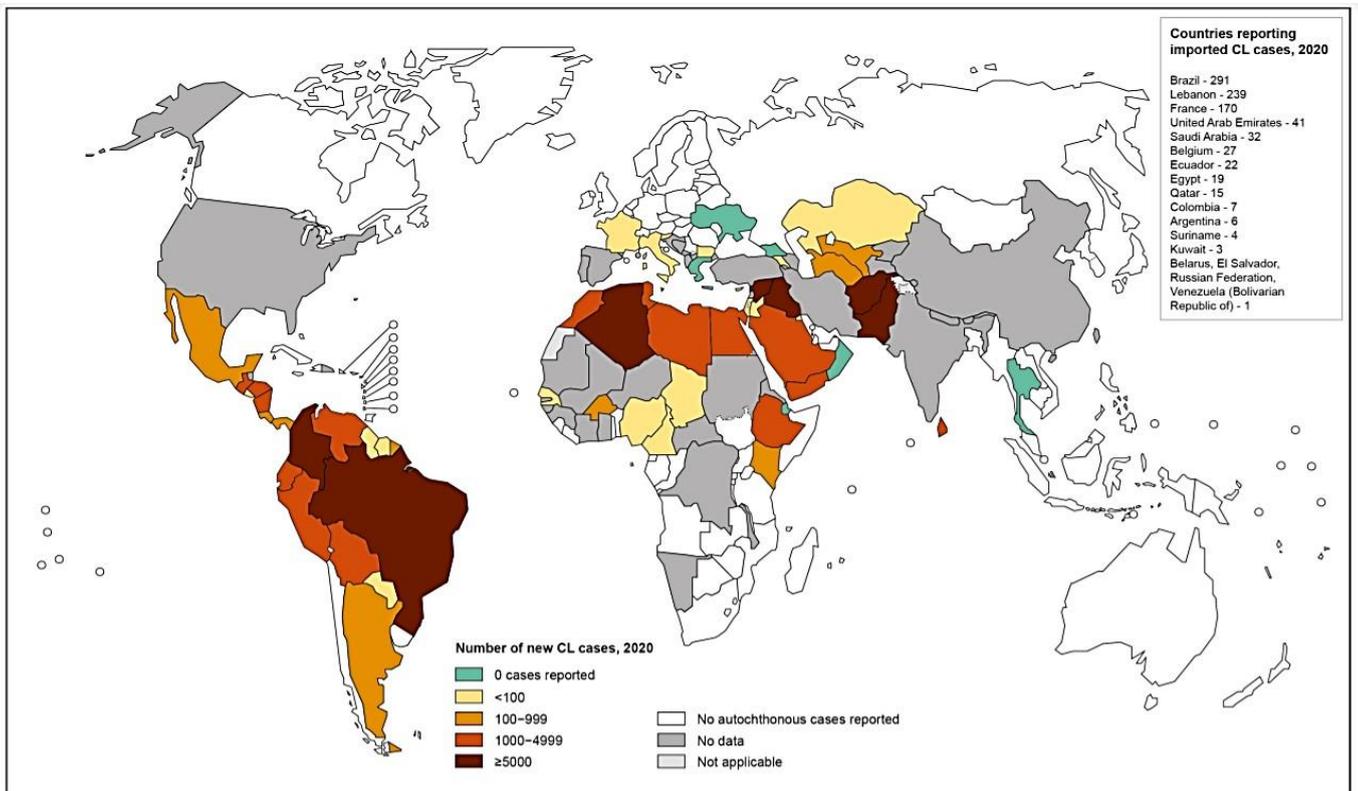
O termo Leishmaniose engloba um complexo de doenças infecto-parasitárias, causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*, que possuem como vetores espécies diversas de insetos, conhecidos como flebotomíneos. A doença pode manifestar - se sob duas formas clínicas, que possuem caráter distinto, leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), com distribuição pelo mundo, apresentando espécies dos parasitas restritas a determinadas localidades (GOTO, 2010).

Os pesquisadores, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, ao fim do século XIX, de forma independente, conseguiram identificar o parasita causador da leishmaniose. Ronald Ross quem atribuiu o nome ao gênero *Leishmania*, Nicolle, em 1908, sugeriu que os cães poderiam contribuir para dispersão dos parasita (OMS, 2010).

No Brasil, Moreira, em 1895, pela primeira vez identificou a existência endêmica do “Botão da Bahia”, mas a confirmação de parasitas da leishmaniose em úlceras cutâneas ou nasobucofaríngeas se deu no ano de 1909, quando Lindenberg identificou o parasita em trabalhadores em áreas de desmatamento em uma construção de ferrovia, no interior do estado de São Paulo. O diagnóstico da forma mucosa da doença foi realizada por Splendore, em 1911, e Gaspar Viana atribuiu ao parasita o nome a espécie *Leishmania braziliensis*. Aragão, em 1922, demonstrou a atuação de flabótomos na transmissão de leishmaniose tegumentar (OMS, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2020), a leishmaniose está entre as protozoonoses mais importantes, e está entre as dez principais doenças negligenciadas, devido aos limitados recursos investidos em seu diagnóstico, tratamento, controle e pelo fato de estar ligada diretamente com a população de baixa renda, sendo a maioria em países em desenvolvimento (Figura 1) [LINDOSO, 2009; ALVAR et al, 2012].

**Figura 1:** Número total de casos no Mundo de Leishmaniose Cutânea em 2020.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



Fonte: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis\\_cl\\_2020.pdf?sfvrsn=716850a8\\_9](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis_cl_2020.pdf?sfvrsn=716850a8_9)  
Acesso em 21/01/2022

A LT manifesta – se nas formas cutâneas, localizada e/ou difusa e cutâneo-mucosa, oral ou nasal. Diferentes formas clínicas da doença podem ser observadas, com base na espécie de parasita envolvido na infecção ou no perfil genético e imunológico do hospedeiro. A doença então pode variar entre a forma benigna, caracterizada pela presença de uma única úlcera cutânea localizada, podendo curar – se de forma espontânea e de doença crônica, latente e com tendência de disseminação (SOUZA, 2010). A LT é conhecida no Novo Mundo como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo, de acordo com as manifestações clínicas, características

Histopatológicas e resposta imunológica do hospedeiro contra o parasita, podendo ser classificada em cutânea localizada (LC), mucocutânea (LM) e cutânea difusa (LCD) [SILVEIRA

et al. 2009; CROFT e OLLIARO, 2011].

São conhecidas diversas espécies do parasita capazes de provocar a doença em humanos, as quais apresentam distribuições geográficas também diversas, e essa diversidade de espécies e formas clínicas estão listadas na tabela 1, ressaltando o fato da importância da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, bem como da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (REITINGER et al., 2007).

**Tabela 1:** Principais espécies do gênero *Leishmania* e *Viannia* que causam doença em humanos e suas formas clínicas\*

Forma Clínica	Distribuição Geográfica	Subgêneros	Espécie
Leishmaniose Tegumentar (LT)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i>
	Novo Mundo		<i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i>
Leishmaniose Tegumentar e Mucocutânea (LT/LM)	Novo Mundo	<i>Viannia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) colombiensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) shawi</i> <i>L. (V.) lindenbergi</i>
Leishmaniose Visceral (LV)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i>
	Novo Mundo		<i>L. (L.) chagasi</i>

\*Adaptada de REITINGER et al. (2007).

## 2.2. Agente Etiológico

A *Leishmania*, parasita causador da leishmaniose, pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*, os quais infectam um hospedeiro vertebrado, animais e humanos. A forma promastigota (Figura 2A), com corpo alongado e flagelo livre, é encontrada no vetor flebotomíneo, reproduzindo-se de forma extracelular, no trato alimentar do inseto. Já a forma amastigota (Figura 2B), de forma ovalada, com o flagelo interiorizado, é encontrada no hospedeiro vertebrado. Ela origina-se a partir da diferenciação das formas promastigotas, no interior de vacúolos parasitóforos, após serem fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (MOUGNEU, 2011).

**Figura 2:** Forma promastigota (A); forma amastigota (B).

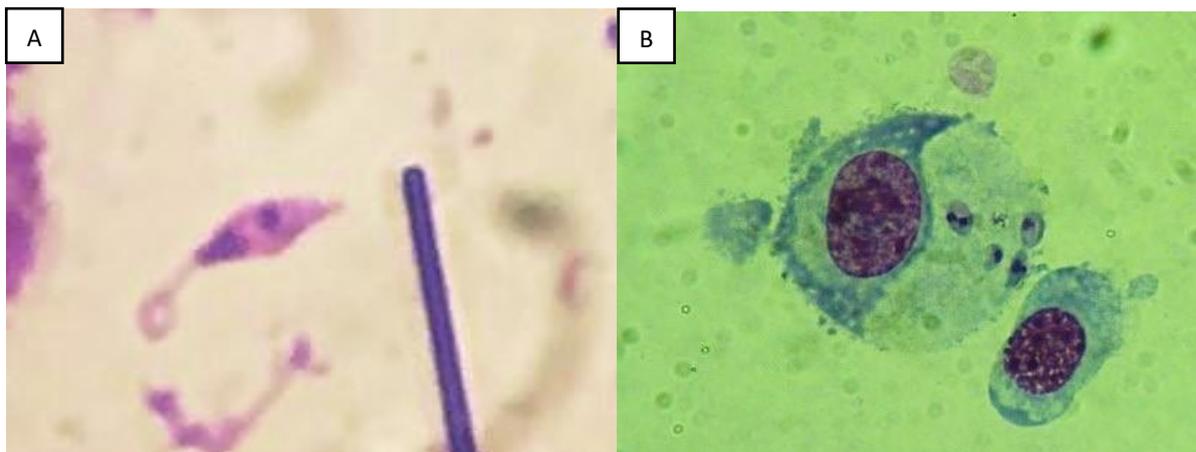


Foto: acervo pessoal

Dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem os mais diversos mecanismos de defesa celular, que seriam responsáveis pela lise do mesmo, tais como fusão fago– endossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

Além disso, assim como outros parasitas de sucesso, as leishmanias conseguem resistir as células hospedeiras, evitando o mecanismo imunológico do hospedeiro em decorrências de alguns fatores de virulência, como a modificação da células parasitada ou hospedeira,

modulação do processo redox do metabolismo, perfil de citocinas e quimiocinas que podem modificar células imunológicas, em especial a parasitada, alterando sua ativação e a movimentação para o local de infecção (GUPTA et al., 2013).

O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros, com base no desenvolvimento do parasita no vetor. O subgênero *Leishmania* cresce apenas na parte anterior do piloro, na junção do intestino médio e o grosso (desenvolvimento suprapilórico). O subgênero *Viannia* cresce em todo o intestino médio e grosso (desenvolvimento peripilórico). Diferentes tipos de parasitas causam vários tipos de leishmaniose, e cada um desses parasitas determina a característica de cada uma das doenças (OMS, 2010).

Entre as espécies de *Leishmania* presente no Brasil, encontramos seis pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, onde as três principais são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, seguidas por *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (SILVEIRA et al., 2009; OMS, 2010). Dentre essas, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* são as espécies de predomínio na região Norte (NEVES, 2008)

A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver a leishmaniose difusa. A forma cutânea tem distribuição nas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). Sua presença é maior no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Relatos indicam que roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* sejam os reservatórios desta espécie. Os vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*. Tais espécies são pouco antropofílicas, o que indica pouca frequência de infecção em humanos (LAINSON, 1997).

A *L. (V.) guyanensis* causa, de forma predominante, lesões ulceradas cutâneas, únicas ou múltiplas, sendo estas, uma consequência de picadas simultâneas de diversos

flebótomos, sendo raro o comprometimento das mucosas por essa espécie, acometendo, principalmente, indivíduo do sexo masculino, em fase reprodutiva. Ao que tudo indica, limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), tendo se estendido pelas Guianas. Esta espécie já foi isolada de mamíferos silvestres, como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*), estando presente na pele e nas vísceras, que algumas evidências indicam que estes animais atuam como reservatórios. O principal vetor é *Lutzomyia umbratilis* distribuída nos países de fronteira ao Brasil e também nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia (LAINSON & SHAW, 1997).

### 2.3. Vetores

Os vetores das leishmanioses são insetos chamados de flebotomíneos, os quais pertencentes à ordem Diptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*. São insetos que não ultrapassam os 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, corpo piloso, com principal característica voo saltitante e asas eretas, mesmo quando em repouso. Sua coloração é parda, recebendo assim o nome vulgar asa dura, cangalha, cangalhinha, mosquito-palha, birigui, ligeirinho, pela-égua, arrupiado, entre outros (PEREIRA, SACRAMENTO, MARQUES, 2011; READY 2013).

As fêmeas estão adaptadas com aparelho bucal para picar a pele de animais vertebrados, sugando assim o sangue, os quais necessitam para maturação dos ovos. Pouco se sabe sobre seus criadouros, podendo ser encontrados em formas imaturas, em fendas de pedras, cavernas, raízes do solo e serrapilheira, em ambientes úmidos e nunca em lugares molhados (GUERRA et al., 2007).

As espécies responsáveis pela transmissão da LV no Brasil são *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* e as principais responsáveis pela LT são as *Lu. flaviscutellata*, *Lu. olmeca nociva* (vetor

da *L. (L.) amazonensis*, *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. intermedia*, *Lu. carrerai* (vetores da *L. (V.) braziliensis*), *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (vetores da *L. (V.) guyanensis*) (BASANO e CAMARGO, 2004). Ready (2013) escreve que, de aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos, por volta de 70 são responsáveis e atuam na transmissão da leishmaniose.

#### **2.4. Ciclo de Vida**

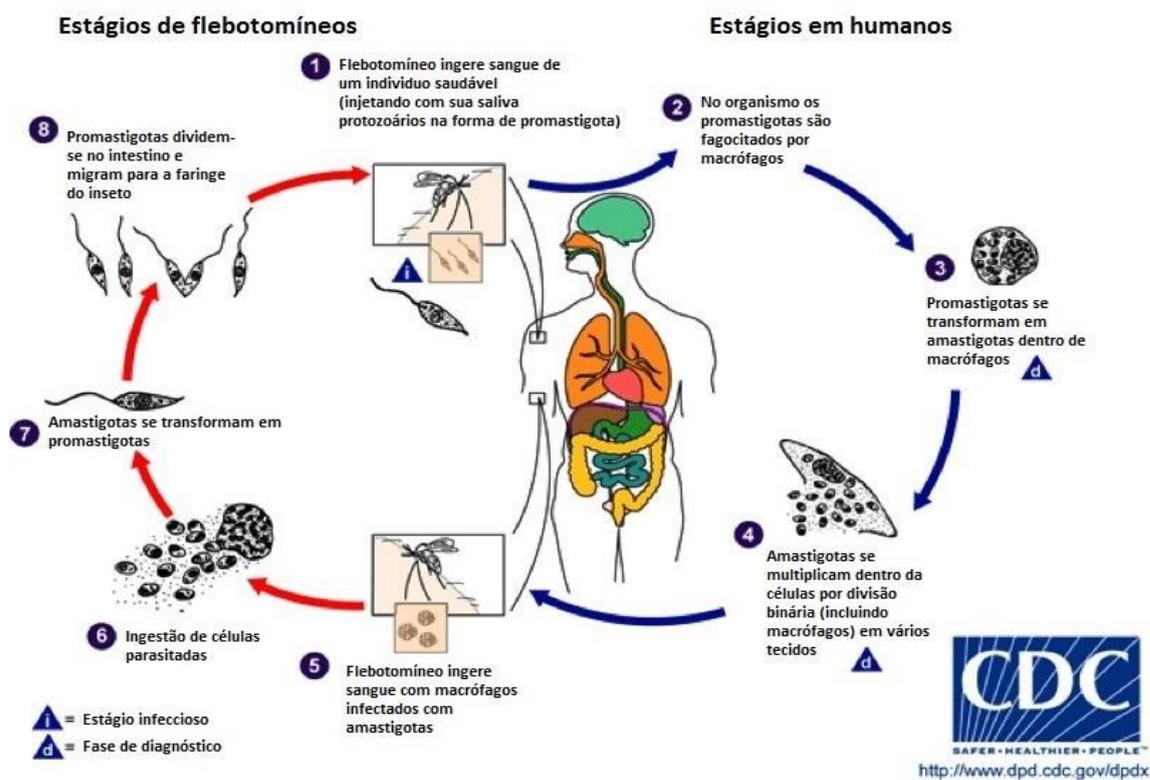
O ciclo de vida das leishmanias possui uma fase extracelular, onde o parasita está dentro do trato digestivo do invertebrado vetor, e uma intracelular, dentro de macrófagos de hospedeiros mamíferos. As formas infectantes que são transmitidas para o hospedeiro vertebrado são as promastigotas (SILVEIRA et al., 2009).

O ciclo, no hospedeiro vertebrado, tem seu início durante o repasto sanguíneo das fêmeas infectadas de flebotomíneos, que inoculam formas promastigotas no hospedeiro vertebrado junto com saliva. As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes ou neutrófilos recrutados pela picada do inseto, a qual irá modular a resposta imune local. Dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, as formas promastigotas vão se diferenciar em formas amastigotas (formas mais arredondadas, sem flagelo livre), proliferando – se e estabilizando a infecção, e assim, um inseto vetor saudável pode realizar o repasto sanguíneo e infectar – se com *Leishmania*, reiniciando o ciclo biológico [Figura 3] (RIBEIRO-GOMES, 2012; JESUS, 2015).

Roger e Bates (2007), descrevem que o parasita manipula o momento da ingestão de sangue pela fêmea do vetor, para que o maior número de parasitas na fase metacíclica, de maior infectividade, estejam em uma espécie de gel, chamando de gel secretor de promastigota. Esse gel bloqueia levemente a ingestão de sangue, levando a fêmea a regurgitação e inserção do parasita no hospedeiro.

Um mecanismo de virulência tem sido proposto por englobar dois grupos diferentes de moléculas do parasita. Um deles é composto na superfície celular e em substâncias secretadas, formado por determinantes invasivos, que protegem o parasita e célula do hospedeiro, impedindo que ela sofra lise prematura, ajudando as amastigotas a manterem a infecção através do crescimento baixo em vacúolos dos macrófagos do hospedeiro. Os antígenos intracelulares são expostos ao sistema imune do hospedeiro e os parasitas passam por citólise durante a infecção natural (CHANG et al., 2003).

**Figura 3:** Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.



Fonte: <http://saude.culturamix.com/doencas/doencas-parasitarias-prevencao-e-tratamento> Acesso 04/06/2018.

## 2.5. Epidemiologia

A leishmaniose é endêmica em regiões de clima tropical e subtropical, totalizando 98 países e três territórios nos cinco continentes, representando um problema de saúde pública

em vários países, especialmente os em processo de desenvolvimento (ALVAR et al., 2012; WHO 2016).

De acordo com Alvar, no ano de 2012, foram estimados de 7.000 – 1.200.00 casos de LTA por ano no mundo, com cerca de um terço dos casos decorrentes em cada uma das três regiões, as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia. Atualmente, estima – se que a Leishmaniose atinja doze milhões de pessoas, em 98 países, estando o Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão os mais afetados. Na América latina, o Brasil detem 90% dos casos de leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral. A incidência no ano de 2020 no Brasil, foi de 16.056 casos (SILVA, et al. 2015; WHO, 2021).

Mudanças ambientais diversas causadas pelo homem, urbanização, desmatamento e crescimento desordenado de cidades, contribuem para expansão das ocorrências de LTA, caracterizada pela transmissão da doença, antes restrita a áreas rurais e agora também presente nas zonas urbanas. Contribuem para a disseminação da doença, também, a constante migração de indivíduos, sendo que a forma tegumentar está presente entre as 10 doenças de pele que mais acometem turistas que retornam de países tropicais (PAVLI, 2010).

Os dez países com as contagens de casos mais elevadas estimados, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos, respondem por 70 a 75% da incidência global. No Brasil, a LTA tem ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões do país (ALVAR et al, 2012).

## **2.6. Formas Clínicas**

Na LT, estudos demonstram que dias ou semanas antes do aparecimento da lesão cutânea, ocorre o aumento de gânglios linfáticos, próximo ao local de inoculação do parasita regredindo em algumas semanas. Em pacientes com úlceras cutâneas com mais de dois meses de duração, a linfadenopatia pode ser bem observada (ALMEIDA e SANTOS, 2011).

Além da forma cutânea e da forma mucosa, outras duas formas clínicas de LT são bastante conhecidas: a cutânea difusa e a cutânea disseminada, consistindo, em ambas, múltiplas lesões, possuindo diferenças clínicas, histopatológicas e imunológicas (NEVES, 2008).

A leishmaniose cutânea difusa apresenta – se na forma de nódulos, não existindo resposta imune celular contra antígenos do parasita. A leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por lesões acneiformes que podem se ulcerar e, histopatologicamente, há infiltrado eosinófilo ou linfoplasmocitário, com os parasitas podendo ou não ser detectados na lesão. A resposta imune é variável, enquanto na cutânea difusa o comprometimento da mucosa nasal não é observado, na forma disseminada esse envolvimento é muito frequente (ALMEIDA e SANTOS, 2011) [Figura 4]

**Figura 4:** Formas clínicas da leishmaniose tegumentar. A: leishmaniose cutânea; B. Leishmaniose cutânea-mucosa; C: leishmaniose difusa; D: leishmaniose disseminada



Fonte: Brasil, 2017

Acredita-se que a ocorrência de leishmaniose clinicamente manifesta esteja na dependência de fatores inerentes ao parasita, da resistência natural do hospedeiro e da resposta imunológica. No homem, a propagação da doença, desde a lesão cutânea até o nariz, pode ocorrer por via linfática, hematogênica e raramente pelo contato direto da mucosa com a lesão cutânea (NEVES, 2008).

O corpo do hospedeiro elabora uma tentativa de eliminar a ação da *Leishmania*, ativando de forma intensa os mecanismos de defesa, o que pode resultar em um grande processo

inflamatório, com grande dano ao tecido lesionado. Na infecção por *Leishmania* tem – se uma ação imunológica dentro do corpo do hospedeiro, pois a resposta imune que auxilia na redução da infecção, pode piorar o estado e curso clínico da doença (OLIVEIRA et al.; 2005; SANTANA et al.; 2017)

## 2.7. Tratamento

Atualmente, o tratamento utilizado para as Leishmanioses são baseados no processo de eliminação de formas amastigotas interiorizadas em macrófagos, local que dificulta a atividade dos fármacos de tratamento para essa enfermidade (ESPURI et al., 2019).

Os antimoniais pentavalente têm sido adotados há muito tempo para o tratamento de doenças parasitárias. Os compostos de antimoniais pentavalente são as drogas de primeira escolha da Organização Mundial da Saúde (OMS) para tratar a LT. Nos países de língua francesa, espanhola e no Brasil, é utilizado a N-metilglucamina, nome comercial Glucantime<sup>®</sup>, e nos países que tem como língua o inglês, o estibogluconato de sódio, nome comercial Pentostam<sup>®</sup>, com a dose de 10 – 20mg/Kg/dia, por via parenteral, durante 20 dias (FREITAS – JUNIOR et al., 2012).

O tratamento da LT pode ser local ou de forma sistêmica, dependendo de como a lesão está evoluindo, de qual espécie de *Leishmania* está envolvida, se ela pode se disseminar e quais implicações estéticas e funcionais ela poderá causar. As recomendações da OMS para o tratamento da LT usando antimoniais são as vias intralésional e intramuscular, dependendo da espécie e aspecto clínico (BRASIL, 2017).

O mecanismo de ação o qual os antimoniais atuam ainda não foi completamente elucidado. Alguns estudos acreditam que atuam como uma espécie de pró – droga, utilizando tióis da superfície do parasita e da célula hospedeira, reduzindo – se, assim, a forma trivalente, e agindo sobre as formas amastigotas dentro do macrófago (DA LUZ et al., 2015).

Um tratamento diferenciado é adotado quando não se obtém resposta satisfatória ao tratamento com o antimonial ou quando o paciente não pode fazer uso do mesmo. Dentre eles, o Isotionato de pentamidina, nome comercial Pentamidina<sup>®</sup>, Anfotericina B<sup>®</sup>, Milteforan<sup>®</sup>, Paromomicina<sup>®</sup>, vem sendo reintroduzidos, com novas formulações ou mudanças na dosagem (DA LUZ et al., 2015).

O isotionato de pentamidina é administrado por via parenteral e possui alta toxicidade, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas, dificultando seu uso. Este é usado na América do Sul para tratar a LT, em especial quando está é causada por *L. (V.) guyanensis*, pois o parasita é pouco sensível aos antimoniais (CHAKRAVARTY e SUDAR, 2010).

A anfotericina B tem ação leishmanicida reconhecida, sendo apresentada em duas formas, AmpB simples e AmpB lipossomal, sendo a última menos tóxica, e usada, principalmente, no tratamento da lesão mucosa e é indicada como primeira opção no tratamento de LT em gestantes ou com coinfeção *Leishmania*/HIV. Porém, apesar dos conhecidos efeitos terapêuticos da anfotericina B, a maioria dos pacientes tem algum efeito adverso, como febre, náuseas, vômitos, cefaléia, hipotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações. Atualmente, a anfotericina B possui taxa de 97% de cura com nenhum relato de recidiva. No entanto, tem se observado uma diminuição na sensibilidade e diversas recaídas em casos isolados (PURKAIT et al., 2012).

A Miltefosina foi originalmente desenvolvida como agente antineoplásico. Atua diretamente sobre as formas promastigotas de *Leishmania*, de forma tóxica. Possui como efeito colateral vômitos e náuseas. A Paromomicina (PA) possui ação anti-*leishmania* quando usada no tratamento da leishmaniose visceral (FERNÁNDEZ et al., 2014).

Mesmo desempenhando bons resultados no tratamento da leishmaniose, eles apresentam limites na eficácia contra o parasita, e algumas desvantagens, como: administração parenteral diária (exceto miltefosina, que é via oral), toxicidade, longo tempo de tratamento,

necessidade de hospitalização, acompanhamento diário e efeitos colaterais, como febre, tontura, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, pirose, diarreia, dor abdominal, pancreatite, prurido, fraqueza, neuropatia periférica, cefaleia, palpitação, insônia, nervosismo, calafrio, edema, anemia, e erupções cutâneas (DA LUZ et al, 2015).

Além dos efeitos colaterais, tem sido relatados resistência por parte dos parasitas a esses fármacos, desfavorecendo seu uso, devido a sua grande interação com a resposta imune do hospedeiro, e a maioria dos pacientes tratados apresentam alterações das enzimas pancreáticas e também dores abdominais (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2010; DA LUZ et al., 2015)

## **2.8. Química Inorgânica Medicinal e Complexos Metálicos**

O uso da Química Inorgânica Medicinal fundamenta – se na administração, acidental ou intencional, de íons metálicos em um sistema biológico. A administração acidental tem como finalidade novas formas de quelar o metal, com a finalidade de retirá – lo do sistema biológico e, assim, evitar o excesso de metal e possíveis envenenamentos. A administração intencional tem como objetivo, fins terapêuticos ou de diagnóstico (SEGURA et al., 2014).

Um complexo é obtido quando íons metálicos, receptores de elétrons, combinam – se a grupos doadores de elétrons, e o composto resultante é chamado de complexo ou composto de coordenação. Esse complexo é o produto final da reação entre uma base de Lewis, que irá possuir elétrons disponível para serem doados a um ácido de Lewis, e esse par de elétrons, no produto final, será compartilhado por ambos, em uma ligação covalente. Sendo assim, esses complexos consistem em um único átomo ou íon central, rodeado por outros átomos, íons ou moléculas, que possuem a propriedade de doação ou compartilhamento de elétrons, chamados de ligantes (ESPURI et al., 2019).

O número de ligantes é determinado por um número de coordenação, e nos complexos, ligam – se ao átomo metálico central por apenas uma única ligação, porém, alguns

ligantes podem ser ligados ao átomo central metálico por mais de um ponto de ligação. Complexos desse tipo são chamados de quelatos (ESPURI et al., 2019).

Os complexos são formados por quase todos os metais encontrados na tabela periódica, e os átomos doadores que se combinam com os íons metálicos estão restritos aos elementos não metálicos (N, O, S, etc.) [SEGURA et al., 2014].

O uso de complexos metálicos na medicina está se difundido no mundo todo, além de serem usados para diagnosticar diversas doenças. Esses complexos são bastante diversificados, e conhecer e entender como funciona o mecanismo de ação farmacológica deles é fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos, que podem vir a ser mais eficientes e seguros para o organismo humano (CHEN et al., 2009).

Desde a antiguidade, metais e derivados dos mesmos são utilizados com finalidades terapêuticas, e os experimentos com eles foram, provavelmente, realizados com base no conhecimento das propriedades tóxicas, e por conseguirem suprir determinados processos biológicos (CHEN et al., 2009).

Em 1965, ocorre um marco na química inorgânica medicinal, quando Barnett Rosenberg descobriu as propriedades antitumorais do  $\text{cis Pt (NH}_3)_2 \text{Cl}_2$ , um complexo metálico a base de cisplatina. E com essa descoberta, ocorreu um grande impulso nas buscas por novos compostos metálicos com propriedades farmacológicas diferentes (SEGURA et al., 2014).

Os compostos que possuem ouro tem recebido grande atenção por terem a capacidade de interromper o crescimento de células tumorais, fato que ocorre, possivelmente, pela inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), essencial ao mecanismo de proliferação de células cancerígenas. Complexos contendo paládio, por possuírem similaridades estrutural com complexos de platina, também podem ser agentes tumorais com elevado potencial, por terem, em certos casos, atividade *in vitro* semelhantes ou superiores a cisplatina (SEGURA et al., 2014).

## 2.9. A prata e sua interação em organismos vivos

A prata foi um dos três primeiros metais a serem descobertos pelo homem, junto com o ouro e o cobre. É um metal branco, brilhante, dúctil e maleável, que perde o brilho quando exposto ao ozônio (O<sub>3</sub>), bom condutor de eletricidade e um elemento estável quando exposto ao ar e à água, podendo ser obtido através de extração direta de minério. O elemento cuja representação são as letras Ag, número 47 da tabela periódica é um metal de transição, pertencente ao grupo 11 (MOYER et al., 1965). Possui configuração eletrônica [Kr] 4d<sup>10</sup>5s<sup>1</sup>, peso atômico de 107,86 g mol<sup>-1</sup> (ATKINS; JONES, 2005; SEGURA et al.; 2014).

Médice et al. (2019) afirma que a prata, assim como os demais metais, são insolúveis em água. Quando em sua forma metálica, assim como seus compostos inorgânicos podem produzir íons Ag<sup>+</sup>, e liberar oxidantes e produtos biologicamente ativos na presença de água, condição essa encontrada em organismos vivos, em fluidos corporais e demais secreções, porém, essa solubilidade vai variar em relação a natureza do ânion.

Assim como outros metais encontrados, não apresenta nenhuma função biológica, sendo considerado especialmente tóxico para certos tipos de organismos inferiores, como certos tipos de bactérias e cianófitas. O metal é encontrado em diversos alimentos, como certos peixes, leite e carnes, com ingestão diária do metal para humanos entre 20 a 80 µg, de acordo com a dieta do indivíduo. Entretanto, apenas 10% do que foi ingerido do metal é absorvido, e o restante excretado através do intestino, por descamação de células do sistema gastrointestinal contendo o metal em sua constituição (LAULICHT et al., 2015).

Tal determinação de absorção foi determinado por pioneiros no estudo de administração de prata em organismos vivos, Furchner et al. (1968) que administraram em diferentes mamíferos isótopos de prata de forma oral, intravenosa ou intraperitoneal, obtendo a eliminação de 90% do metal nas fezes, o que indica que aproximadamente 10% da dose foi absorvida pelo organismo.

O tipo de organismo também influencia na absorção do metal. No estudo citado anteriormente, foi notado que animais de pequeno porte, como macacos, ratos e camundongos apresentaram retenção de menos de 1% da dose inicial após uma semana, porém, em cães o valor era maior em comparação a eles, entretanto, inferior a 10% da dose inicial (FURCHNER et al., 1968).

Órgãos do complexo reticulo endoteliais apresentam – se como responsáveis por maior parte da absorção do metal, visto que estudo citado, após aplicação de forma intravenosas, o metal foi encontrado no baço, fígado, medula óssea, pulmões, músculos e tecidos da pele (FURCHNER et al., 1968). Browning (1961) evidencia que o metal, na sua forma de sal, pode ser absorvido pelo sistema gastrointestinal, pulmões, epitélio conjuntivo, dérmico e mucosas nasais.

Íons de prata apresentam forte ligação e afinidade, no organismo, por proteínas especialmente albuminas, metaloproteínas e macroglobulinas, e  $Ag^+$  também apresenta afinidade para glutathione reduzida. Devido a essa afinidade, a prata associada a proteínas formando complexos na região gastrointestinal, na corrente sanguínea e até mesmo dentro das células (MÉDICE et al.; 2019).

Em relação a toxicidade, um metal tem sua atividade tóxica avaliada em relação a biodisponibilidade, solubilidade, estado de oxidação, capacidade de complexação em relação ao seu alvo biológico (proteínas e microrganismos, por exemplo) e excreção. Dose letais de prata não foram avaliadas para humanos até o momento, apenas para ratos e cães (HADRUP e LAM, 2014).

Não se sabe ao certo qual dose do metal tornaria – se letal para humanos, principalmente do nitrato de prata, substância de maior uso a base de prata, mas a literatura cita os valores entre 28mg/ Kg a 10g/ Kg. O efeito de forma sistêmica de dose letal de prata incluem hemorragia, gastroenterite e choque. Não se sabe ainda como o metal atuaria nesses casos, mas ao que parece

os íons de prata causam um processo de estímulo seguido de depressão no tronco cerebral, seguido de aumento da pressão arterial em decorrência de uma estimulação vasomotora, com desenvolvimento em seguida de bradicardia e, então, morte por problemas respiratórios (MÉDICE et al.; 2019)

Humphreys e Routledge (1998) relatam que íons de prata podem estar relacionados a menor capacidade proliferativa, perda de identidade celular e modificação a nível degenerativo em núcleos e organelas citoplasmáticas.

Os mesmos autores afirmam que após acúmulo nos tecidos do organismo, especialmente na pele, os íons de prata podem ser reduzidos pela luz solar, o que induz processos e reduções de precipitados como sulfetos de coloração escura, com caráter insolúvel, o que acaba por manchar a pele em diferentes tons de cinza-azulado, ou acabam por desencadear a produção excessiva de melanina, aumentando a tonalidade escura.

Tal processo de escurecimento e descoloração é conhecido como argíria ou argiriose, que acomete indivíduos expostos a longos períodos a prata, através de inalação ou ingestão. Tal condição não apresenta riscos à saúde do indivíduo, apenas alteração na estética do mesmo, como a coloração da pele. Tais modificações são permanentes, portanto, uma vez descolorida a pigmentação da pele, não pode ser removida, por nenhum tipo de terapia, tais como uso de laser ou dermoabrasão (MÉDICE et al., 2019).

A utilização da prata, principalmente na forma de complexos tem atraído bastante a atenção, em especial por suas propriedades antimicrobianas e quimioterapêuticas, sendo o mecanismo o qual esse metal atua sobre os mais diversos microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, assim como sua ação em células cancerígenas são bem complexos, começando a ser elucidado nos últimos anos. Tais mecanismos dependem do tipo de composto de prata, sais ou íons, e do tipo de alvo celular, célula mutada ou de microrganismos (MÉDICE et al., 2016, EBRAHIMINEZHAD et al., 2016).

Porém, segundo Médice et al. (2016), Ebrahiminezhad et al. (2016) e Saturnino et al. (2016), a ação citotóxica dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) tem com base danos causados as células, seja de microrganismos ou cancerígenas como:

- a) Comprometimento de trocas iônicas, o que leva a inibição da absorção e troca de moléculas de fosfato, o que leva ao acúmulo desse ânion, favorece a ação de íons  $\text{K}^+$ , eliminando a força dos prótons através da membrana, levando a morte celular;
- b) Ligam – se com DNA e RNA, de forma a eliminar processos de replicação da célula;
- c) Os íons de prata podem interagir com peptídeos e proteínas, formando complexos com os grupos doadores de elétrons, principalmente aqueles de grupamentos tio e fosfato. Essas ligações podem modificar estruturalmente proteínas e enzimas, em especial em casos de oxidação enzimática por fumarato, glicerol, glicose, succinato e tioredoxina redutase, ligando – se de forma efetiva a glutathione redutase;
- d) Interrupção da homeostase mitocondrial, acarretando desequilíbrio de membrana e despolarização.

## **2.10. Uso da prata na medicina**

O uso da prata data de muito tempo atrás. De acordo com relatos, Alexandre, o Grande, (356-323 a. C.), assim como os venezianos usavam recipientes feitos de prata para manter vinho, água e vinagre salubres. Os pioneiros no durante a conquista do Oeste, depositavam moedas de prata dentro de garrafas com o mesmo fim (PAIVA et al., 2013).

Relatos de seu uso medicinal tem uma história longa, na Macedônia, eram usadas placas de prata sobre feridas para ajudar na cicatrização; na Grécia antiga, Hipócrates (460 – 370 a. C.) ensinava a seus discípulos sobre o uso da “flor de prata”, que consistia em um pó extrafino de prata, que curava feridas ulceradas; na época dos alquimistas, como Plínio (78 d. C.), Gerber (702 – 765 d. C.), Paracelso (1493 – 1541), utilizavam a prata para o tratamento de

doentes mentais e epiléticos, pois acreditavam que a prata corresponderia a lua (macrocosmo) e a cabeça (microcosmo) e o uso da prata traria de volta a sanidades dos doentes mentais e o fim das crises epiléticas; na Idade Média, a prata era usada no tratamento de palpitações; já no século XVIII, o nitrato de prata tornou – se a melhor opção para tratar de feridas, úlceras e doenças de pele em geral, tendo seu primeiro relato com atividade antimicrobiana em 1869, pelo cientista Revelim; em 1881, o médico Carl Crede (1819 – 1882) foi o primeiro a recomendar o tratamento com solução de 1% de nitrato de prata em olhos de recém – nascidos para evitar a cegueira, prática utilizada até os dias de hoje (PAIVA et al, 2013).

Sua propriedade antimicrobiana e de seus compostos é a base principal de sua aplicação medicinal, desde o século XIX. A partir daí a prata teve diversas utilizações, e seu enorme potencial para o tratamento de lesões foi sendo descoberto. Moyer et al. (1965) foram, provavelmente, os primeiros a abordarem o uso tópico dela em feridas, desenvolvendo um tratamento eficaz contra queimaduras infectadas utilizando-se de um creme a base de nitrato de prata a 0,5%, sendo eficaz, também, contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus hemolyticus* sem causar resistência das cepas por conta da prata. Atualmente ela está presente em uma ampla gama de coberturas e pode se apresentar em duas formas:

- 1) Compostos/complexos: quando associada a um sal e produz a prata iônica ( $Ag^+$ ), quando está em contato com fluidos de feridas ou soluções;
- 2) Elementar: quando está em forma metálica ( $Ag$ ), também descrita como prata coloidal ou nanopartículas de prata.

Seu íon carregado positivamente ( $Ag^+$ ) é ativo contra uma grande variedade de patógenos bacterianos (RUSSEL, 1994), fungos (WRIGHT et al., 1999) e vírus (MONTES et al., 1986) e esse poder antimicrobiano tem sido relacionado aos seus variados mecanismos de ação, como interferindo no metabolismo bacteriano, levando ao rompimento da parede da célula

bacteriana e ligando – se ao seu DNA, inibindo assim a replicação e a possibilidade de desenvolver resistência (SEGURA et al., 2014. ).

Os complexos de prata são bastante interessantes, já que sua atividade antimicrobiana e outras propriedades possibilitam sua manipulação, variando o número e tipo de ligantes que podem ser coordenados ao seu íon, e, quando usados ligantes ativos biologicamente, podem aumentar a eficiência de um agente terapêutico (SEGURA et al., 2014).

Por possuir uma coordenação rica, pode – se encontrar na literatura compostos com diversos tipos de coordenação usando prata (ATKINS, 2010). Escolher a forma e o ligante adequados para uso na coordenação com o íon da prata torna a diversidade do complexo maior, ajudando na estabilização da molécula (BARREIRO et al., 2014).

## **2.11. Complexos metálicos a base de prata**

Composto e complexos contendo prata e o próprio metal são conhecidos dentro da ação terapêutica por suas excelentes atividades biológicas, como antibacterianos, antimicóticos, antiparasitário, anticâncer e antimalárico (MÉDICE et al., 2016).

A efetividade de complexos de prata, principalmente contra bactérias e células cancerígenas dependem de fatores, como lipofilicidade atividade redox, solubilidade, estabilidade e taxa de liberação dos íons de prata no organismo (MÉDICE et al., 2016).

Coyle (2004) e Segura et al. (2014) apresentaram em suas pesquisas que complexos metálicos de prata exibem a capacidade de redução na quantidade de ergosterol na membrana celular, seguido de um aumento na permeabilidade da membrana, sendo um bom mecanismo de facilitação de outros fármacos ou compostos.

Tais condições precisam ser controladas por características, propriedades estéricas e eletrônicas dos ligantes. Também deve – se saber que o complexo pode perder parte ou toda a

atividade quando levado para condições *in vivo*, devido a formação de AgCl insolúvel, ligações dos ligantes com enzimas celulares e complexação com proteínas (MÉDICE et al., 2019).

Estudos realizados com *L. tropica* demonstraram que, quando expostas a nanopartículas de prata, os valores de proliferação e atividade metabólica desses parasitas diminuiu (RAHI et al., 2013; ALLAHVERDIYEV et al., 2011). O estudo de Job et al. (2014) com *L. (V.) braziliensis*, comprovou que, o uso de borracha natural com membranas de nanopartículas metálicas de prata, quando em meio parasitado, são capazes de separar células, eliminando os parasitas que não terminaram a metaciclologênese e são altamente infecciosos para o hospedeiro. Estudos de Navarro et al. (2006), apresentaram alta atividade de complexos de prata do tipo  $[Ag(L)_2]NO_3^-$  contra *L. (L.) mexicana*, através da interação do complexos com o DNA parasitário.

### 3.0. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

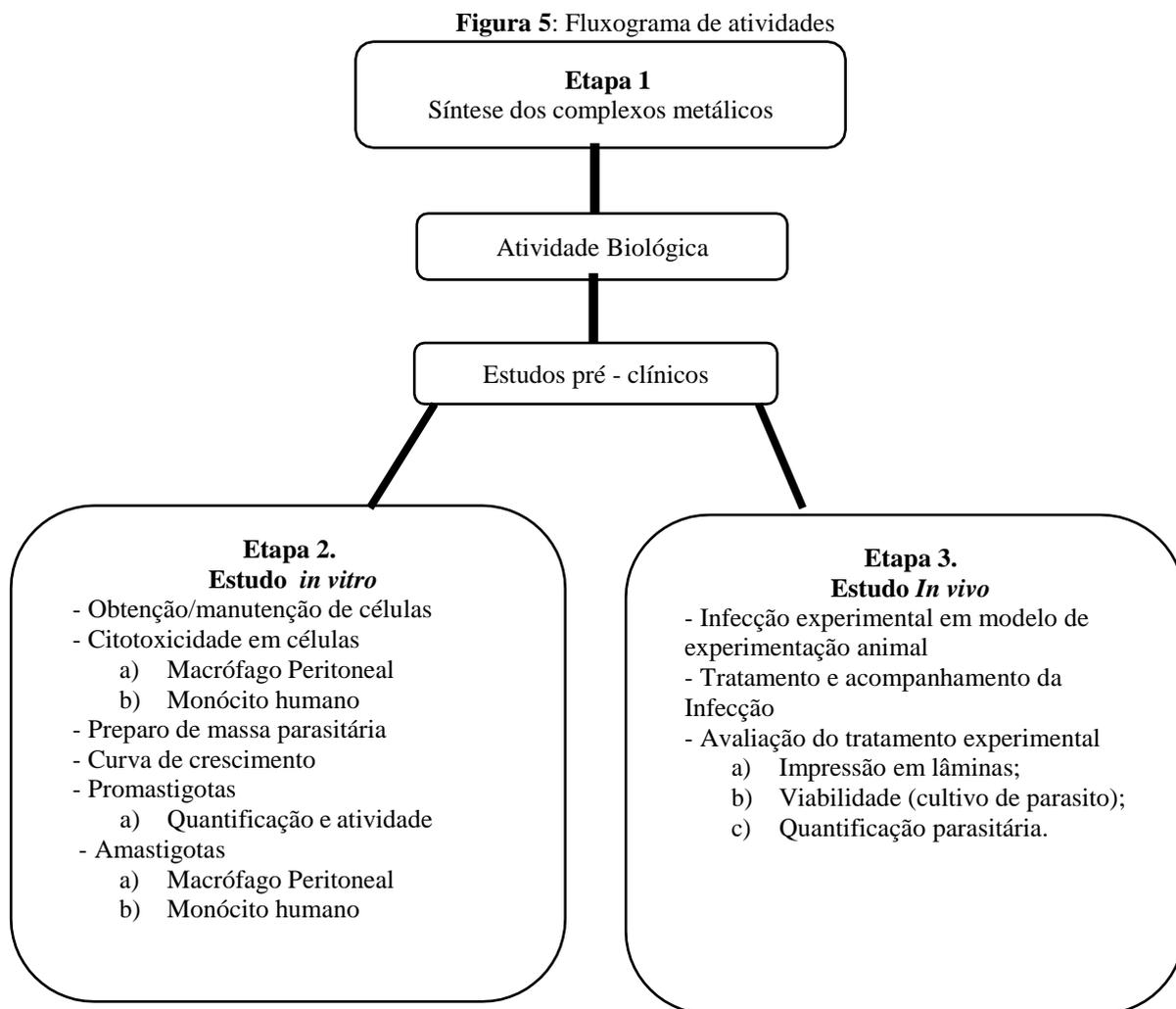
Avaliar a atividade biológica anti-*Leishmania* de complexos metálicos a base de prata em estudos pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, contra espécies causadoras da forma cutânea da Leishmaniose.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos complexos metálicos em macrófagos peritoneais murinos e em monócitos humanos;
- Investigar a atividade anti-*Leishmania* dos complexos metálicos contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*;
- Estudar o efeito dos complexos metálicos contra formas amastigotas de *Leishmania* spp. interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos e em monócitos humanos;
- Determinar a EC<sub>50</sub> (concentração efetiva à 50%) dos complexos metálicos quanto ao potencial anti-*Leishmania*;
- Avaliar o tratamento *in vivo* utilizando modelos animais de experimentação (hamster dourado/*Mesocricetus auratus*) com os complexos metálicos.

## Local de execução

O projeto foi executado no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, na Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS), no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob a orientação da Dra. Antonia Maria Ramos Franco e da Dra. Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski e Dra Marina Porchia, em parceria com Institute of Condensed Matter Chemistry and Energy, ICMATE, Pádua, Itália. A Figura 5 apresenta as etapas realizadas na tese.

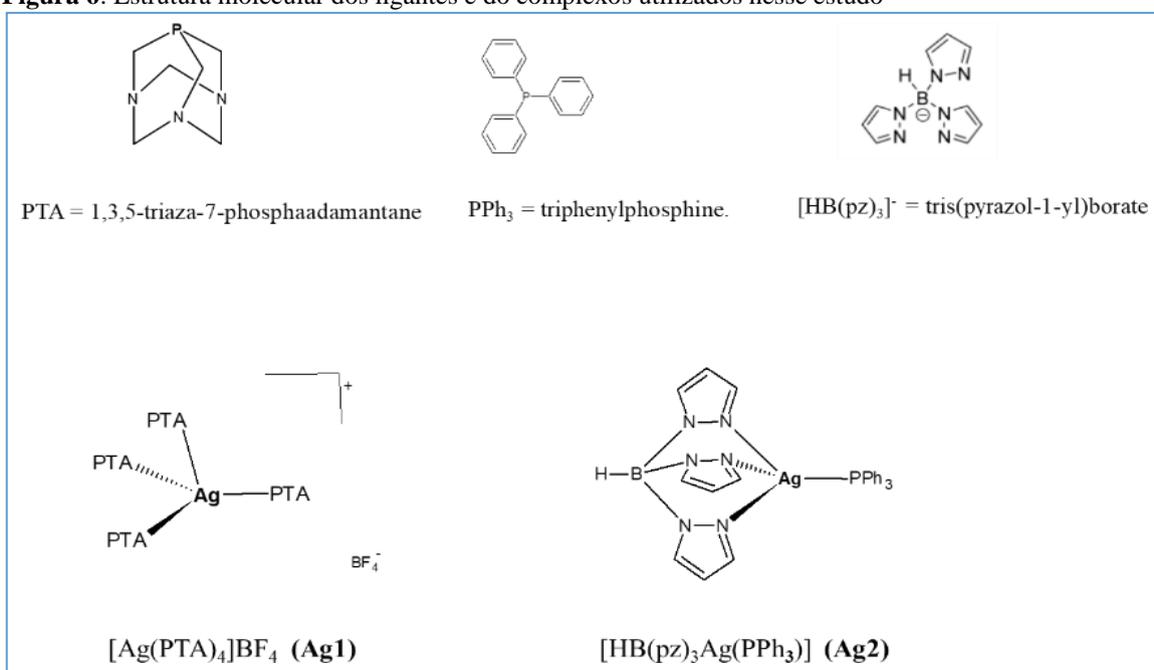


## 4.0. METODOLOGIA

### 4.1. Compostos Químicos

No estudo foram realizados testes pré-clínicos com dois complexos solúveis de prata e seus respectivos ligantes:  $[Ag(PTA)_4]BF_4$ , denominado de Ag1 e  $[Ag(HBPz_3)(PPh_3)]$ , denominado de Ag2 (Figura 6). A síntese química dos compostos foi realizada pela equipe de Marina Porchia e Francesco Tisato, ICMATE, CNR, Pádua, Itália, sob consórcio do Projeto Vaikutus (FP7-PEOPLE-IRES-2011-295262). os quais foram preparados de acordo com o relatado em literatura por Santini et al. (2011) e Tapanelli et al. (2017).

**Figura 6:** Estrutura molecular dos ligantes e do complexos utilizados nesse estudo



Fonte: Santini et al. (2011)

Os complexos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO – Synth<sup>®</sup>), concentração de 1% e em meio RPMI e meio Schneider incompleto, sem adição de SFBi (Soro Fetal Bovino inativado), filtrados em membrana Milipore<sup>®</sup> 0,22 μm em ambiente estéril. Os complexos foram avaliados nas concentrações de 160 μmol/mL, 80 μmol/mL, 40 μmol/mL e 20 μmol/mL. A atividade dos complexos e seus ligantes foram estudados em comparação com Glucantime<sup>®</sup>, nas concentrações de 160 a 20 μmol/mL de antimônio.

#### **4.2.Obtenção de macrófagos peritoneais**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos oriundos do Biotério Central do INPA, sob o comitê de ética CEUA-INPA 060/2018, utilizando o protocolo de Sasada (1983) com modificações. Os camundongos foram anestesiados e posteriormente eutanasiados, realizada assepsia dos animais com álcool 70%, posicionados em suporte, com membros fixos e a porção ventral voltada para cima, onde foi realizada uma incisão no ventre do animal, para separação entre peritônio e pele.

Em seguida foi introduzido com auxílio de uma seringa, 5 mL de meio RPMI incompleto, sem adição de SFBi, no peritônio do animal, sendo então realizada uma massagem no abdômen para ativação dos macrófagos. Com isso, o líquido foi aspirado com uma seringa e mantido em gelo até o momento da centrifugação.

As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio RPMI completo, com adição de 10% de SFBi. Foram quantificadas usando câmara de Neubauer, concentração celular (células/mL) estimada.

#### **4.3.Obtenção de monócitos humanos**

Os monócitos humanos foram obtidos sob o comitê de ética CAAE: 29406319.2.0000.5020. O sangue foi coletado de um voluntário sadio com auxílio de uma seringa de 10 mL. Em um Falcon de 50ml de volume, o sangue foi diluído, cuidadosamente em PBS 1X, utilizando o dobro do volume do sangue. Utilizando outro tubo Falcon, foi adicionado 10 mL de Ficoll-

Histopaque (SIGMA – ALDRICH®), e o adicionado o sangue diluído pela lateral do tubo com cuidado, evitando ao máximo a mistura do sangue diluído com o Ficoll. Em seguida os tubos Falcon foram centrifugados, em temperatura ambiente, durante 30 minutos, com a velocidade de 2000 RPM, com *break* na posição desligado. Após a centrifugação, com uma pipeta Pasteur, foi coletada a camada contendo as células mononucleares/ linfócitos, situados na interface plasma-Ficoll (CORKUM et al., 2013).

As células foram transferidas para um tubo Falcon, onde foi adicionado PBS 1X com volume três vezes maior que o da camada retirada, sendo novamente centrifugados por três minutos, na velocidade de 12.000 RPM. Essa etapa foi repetida por três vezes, para a remoção dos contaminantes do Ficoll (SIGMA – ALDRICH®) e de proteínas plasmáticas. Após as etapas, o sedimento contendo os monócitos foi ressuspensão em 1,0 mL de meio de cultivo RPMI completo (10% SFBi). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração celular (células/mL) [CORKUM et al., 2013]

#### **4.4. Ensaio de citotoxicidade dos complexos metálicos sobre macrófagos peritoneais e monócitos humanos por ensaio colorimétrico.**

O ensaio colorimétrico usando o Alamar Blue® é um método que também pode ser aplicado para testar a viabilidade celular. Em placa de 96 poços, foi adicionado meio Schneider completo e o volume de células ajustado para  $2 \times 10^5$  macrófagos/ monócitos por poço. As células foram incubadas na presença dos dois complexos de prata, em quatro concentrações diferentes ( $160 \mu\text{mol/m} - 20 \mu\text{M/mL}$ ). Como controle negativo do experimento, as células foram incubadas na presença apenas de meio Schneider completo, como controle positivo, o medicamento Glucantime®, nas mesmas concentrações dos complexos metálicos.

As culturas permaneceram expostas aos compostos durante 24 e 48 horas, incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após os períodos de incubação foi adicionado 10µL de Alamar Blue® em cada poço, e as placas foram incubadas por 5 horas em estufa a 25° C, em seguida submetidas à leitura em espectrofotômetro.

#### **4.5. Manutenção e Preparo de massa parasitária**

Foram utilizadas para os estudos de avaliação *in vitro* as espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Os parasitas foram cultivados em meio bifásico NNN (McNeal, Novy e Nicolle) por sete dias em incubadora a 25°C e, em seguida, transferidos para meio líquido, com cinco mL meio RPMI completo. Foi acrescido meio líquido a cada dois dias, com o dobro da quantidade de RPMI completo, durante o período de sete dias para expansão dos parasitas.

#### **5.0. Ensaio *in vitro***

##### **5.1. Ensaio com formas promastigota de *Leishmania* spp.**

A atividade anti-*leishmania* dos compostos foi avaliada por inibição de crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Antes de cada experimento, foi observada motilidade flagelar e morfologia dos parasitas. Na realização do bioensaio, as formas promastigotas foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos, lavadas em solução salina estéril, diluídas e contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para obtenção da concentração parasitária de 2x10<sup>4</sup> células/mL.

As amostras dos dois complexos foram testadas nas concentrações de 160 a 20µm/m, como controle negativo foi constituído de meio RPMI completo e parasitas, dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1% a 0.125%. Para o controle positivo foi usado Glucantime® nas mesmas concentrações utilizadas com os complexos metálicos. A atividade das amostras

foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas após incubação na presença das mesmas nos períodos de 24 e 48 horas, na temperatura de 25° C em estufa.

Para avaliar a viabilidade celular foi empregado o método de contagem direta nos períodos de 24, 48 e 72 horas de células vivas em câmara de Neubauer em microscópio óptico, aumento de 400 vezes, e o método colorimétrico utilizando Alamar Blue<sup>®</sup>, seguindo o mesmo protocolo relatado no item 4.4 (PEREIRA et al., 2010).

## **5.2. Ensaio com formas amastigotas de *Leishmania* spp.**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos e quantificado como descrito nos itens 4.2. e 4.3. O ensaio foi realizado por método de contagem direta e por método colorimétrico utilizando Alamar Blue<sup>®</sup>, como descrito no item 4.7.1.

Para o método de contagem direta, as células foram incubadas em placas de 24 poços com lamínulas no seu interior, com meio RPMI completo, expostas a formas promastigotas de *Leishmania* spp, na concentração de 10<sup>5</sup> promastigotas/ mL, macrófagos por no máximo duas horas, monócitos por no máximo de 30 minutos. Em seguida, o conteúdo foi removido e adicionado RPMI incompleto para a remoção das formas promastigotas não interiorizadas.

Para o método colorimétrico, as células foram incubadas em placas de 96 poços, contendo meio Schneider completo, expostas a formas promastigotas de *Leishmania* spp, na concentração de 10<sup>5</sup> promastigotas/ mL, os macrófagos por no máximo duas horas, os monócitos por no máximo de 30 minutos.

As culturas permaneceram expostas aos compostos durante 24, 48 e 72h horas, incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após os períodos de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e adicionado meio RPMI incompleto para remoção de vestígios dos

complexos. Em seguida, foram corados pelo Kit Panótico (Laborclin<sup>®</sup>) as lamínulas fixadas em lâminas e contados em microscopia óptica, contando 100 macrófagos/ monócitos ao acaso.

### **5.3. Índice de Seletividade (IS)**

O Índice de Seletividade (IS) compõe a relação entre a atividade citotóxica a células do composto testado e sua atividade anti-*Leishmania*. O IS é calculado partindo da razão entre a citotoxicidade para macrófagos e monócitos (CC<sub>50</sub>) e a ação contra formas amastigotas em cada um desses tipos celulares (IC<sub>50</sub>) [PEREIRA, 2010].

## **6.0. Experimentos *in vivo***

### **6.1. Preparação do gel**

O gel a base de Carbopol foi preparado seguindo o protocolo descrito em literatura por Ferreira (2006). Inicialmente foi realizada uma mistura de Nipagin com água destilada até sua total solubilização, então foi adicionado o Carbopol a diluição, em seguida a essa mistura foi adicionado o complexo metálico, incorporados separados em cada gel, e, a fim de obter a consistência de gel, foi adicionado aos poucos Trietonolamina, até a obtenção de gel espesso.

Esta fórmula foi escolhida por apresentar melhor consistência e homogeneidade para avaliar o potencial anti – *Leishmania* de complexos metálicos a base de prata. Os complexos metálicos foram incorporados na concentração de 3 mg/L, valor definido para fins comparativos ao controle positivo do estudo, composto pela droga Glucantime<sup>®</sup>, foi administrada na mesma concentração, via intramuscular (IM). Após a preparação, foram mantidos em recipientes de plástico com tampa rosqueável, longe de luminosidade, à temperatura ambiente (20 a 25 °C).

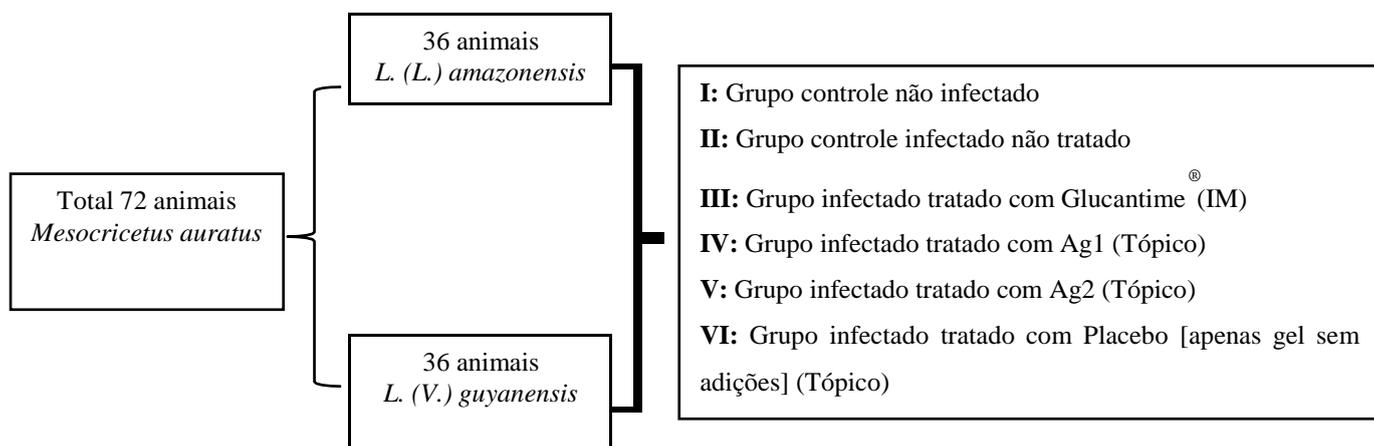
## 6.2. Animais de experimentação

Para o ensaio foram utilizados 36 animais de experimentação do tipo hamster dourados (*Mesocricetus auratus*), por ser o modelo experimental mais indicado em testes *in vivo* (CROFT e SUNDAR, 2006), machos, adultos, com idade de cerca de 12 semanas, pesando em torno de 150 mg sendo livres de patógenos provenientes do Biotério Central do INPA (CEUA 060/2018). Os animais foram mantidos alojados em gaiolas de aço inoxidável em salas climatizadas, as quais contavam com disposição de luz, temperatura (22-25°C) e umidade (50-60%) de forma controlada, em condições de alimentação *ad libitum* e livre acesso a água.

## 6.3. Infecção e tratamento dos animais

Para o experimento foi utilizado o protocolo de Rocha (2012), modificado. Os animais foram separados grupos, cinco contavam com animais infectados na região do focinho, com 100µL de solução contendo 10<sup>6</sup> promastigota/mL de *Leishmania* spp. O delineamento experimental está representado na Figura 7.

**Figura 7:** Esquema de delineamento experimental



Fonte: Elaborado pela autora

O procedimento foi repetido nos dois ensaios, com espécies diferentes do parasita. O tratamento foi iniciado após o aparecimento da lesão, nos animais infectados com *L. (L.)*

*amazonensis*, após 28 dias de infecção, *L. (V.) guyanensis*, após 30 dias de infecção. Os géis foram aplicados sobre a lesão uma vez ao dia por 30 dias ininterruptos. A avaliação do curso da infecção foi feita com paquímetro (Zaas<sup>®</sup> Precision), determinando o volume da lesão, uma vez por semana, realizada fotodocumentação das lesões, para análise morfológica da evolução da infecção. Após 30 dias de tratamento, animais foram eutanasiados utilizando cloridrato de ketamina (Dopalen<sup>®</sup>) associado a cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>), de acordo com CEUA.

#### **6.4. Análises *in vivo***

Após eutanásia, amostras das lesões foram tricotomizadas, onde uma amostra do tecido da região da lesão de cada animal foi seccionada e realizado *imprinting* sobre uma lâmina de vidro, foram coradas usando o kit Panótico (Laborclin<sup>®</sup>). As lâminas foram avaliadas sobre microscopia óptica, contando 30 campos, quantificando células infectadas, não infectadas e quantidade de formas amastigotas interiorizadas.

Para análise da viabilidade parasitária, um fragmento da lesão e fígado de cada animal foi cultivado em meio NNN, incubados em estufa, 25 °C, por sete dias. Após esse período, uma alíquota foi analisada sobre microscopia óptica, avaliando a viabilidade parasitária.

#### **7.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os ensaios foram realizados em triplicatas, seus resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Utilizamos análise de variância Two-Way (ANOVA) para avaliar significância estatística entre os grupos, seguido pelo teste de Tukey para comparar as médias dos grupos, como 95% de confiança. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 6.0 para Windows), utilizando regressão linear para cálculo de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória).

## 8.0.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudos *in vitro*

Os bioensaios *in vitro* correspondem a etapa inicial dos estudos com complexos metálicos. A Tabela 3 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> dos complexos metálicos contra formas promastigotas de *Leishmania* spp. nos três horários testados.

Quando testados contra formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, os complexos apresentaram melhor resultados no período de 24h IC<sub>50</sub> > 10 µM, resultado o qual se repetiu no período de 48h, apenas com o complexo Ag2, em comparação com o controle positivo, Glucantime<sup>®</sup>, indicando uma possível atividade anti-*Leishmania* desse complexo para essa espécie e forma evolutiva do parasita (Tabela 2).

Já contra a espécie *L. (V.) guyanensis*, os complexos não apresentaram valores de IC<sub>50</sub> que indiquem um potencial anti-*Leishmania*, sendo assim, os complexos não apresentam atividade para essa forma evolutiva e espécie do parasita (Tabela 2). Tal inatividade pode ocorrer devido a natureza do ligante dos complexos testados, visto que diferentes ligantes apresentam a capacidade de induzir os complexos a atingir alvos biológicos de acordo com a interação existente no complexos (MÉDICE et al., 2019).

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) da atividade dos complexos de prata contra formas promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* após 24, 48 e 72h. P <0,05.

Valores de IC <sub>50</sub> (μmol/mL ± Desvio Padrão) / Tempo de incubação			
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (IM5584)			
Compostos	24	48	72
Ag1	<10**	69,18 ± 3,03	104,50 ± 1,47
Ag2	<10**	<10**	54,33 ± 0,76
Glucantime®	292,14 ± 2,40*	343,10 ± 2,37*	435,60 ± 3,03*
Valores de IC <sub>50</sub> (μmol/mL ± Desvio Padrão) / Tempo de incubação			
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (M4147)			
Compostos	24	48	72
Ag1	75,14 ± 0,53	130,30 ± 2,94	228,90 ± 1,26
Ag2	108,51 ± 0,54	120,81 ± 2,04	150,30 ± 2,75
Glucantime®	286,60 ± 1,28	376,51 ± 2,74	453,70 ± 3,18

IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória a 50% (μmol/mL ± Desvio Padrão)

P < 0,05 Diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey

\* valores marcados com asterisco significa que o composto é estatisticamente diferente do outros

\*\* valores marcados com dois asteriscos significa que o composto é estatisticamente semelhante ao outro.

A atividade de um medicamento à base de metal depende não apenas da natureza do metal, mas das propriedades físico-químicas dos ligantes que, por sua vez, determinam o impedimento estérico, lipofilicidade e carga total dos complexos resultantes e, em muitos casos, também são capazes de interagir com diferentes alvos biológicos, como o DNA no caso de diimina intercalada. Por este motivo, é difícil comparar os dados obtidos com diferentes classes de complexos, pois sua atividade pode ser direcionada para diferentes alvos biológicos, determinando diferentes mecanismos de ação (ESPURI et al., 2019).

A literatura relata relatados apenas alguns exemplos de complexos de prata testados contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Segura et al. (2014) testou compostos de prata ternários com ligantes N, N-diimina e tioureia, obtendo valores de IC<sub>50</sub> a 72h na faixa de 5,68-9,87 μM. Mais recentemente, uma série de compostos de prata contendo imidazolidina - 2 - tiona (imzt) e fenantrolina foram relatados e os mais potentes contra as formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* foram as espécies diméricas [Ag<sub>2</sub> (imzt)<sub>6</sub>] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 4,67 e 1,88 μM, respectivamente) comparável ao medicamento de referência anfotericina B.

Porém, a atividades demonstrada por complexos de prata e o mecanismo de ação ainda não foi elucidado (ESPURI et al., 2019).

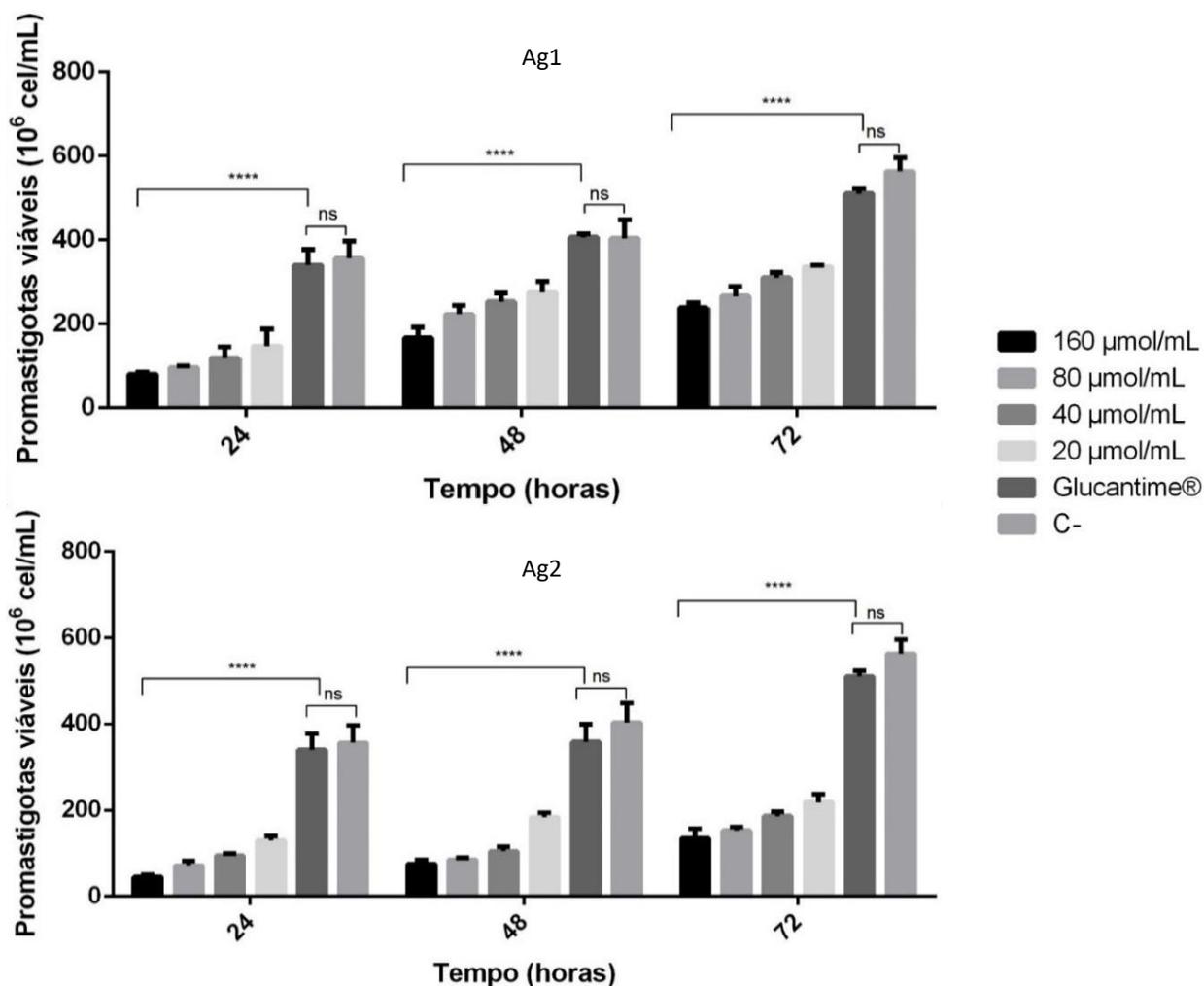
Tais resultados que encontramos para *L. (V.) guyanensis* podem estar diretamente ligados ao ligante que forma os complexos. Esteban – Parra et al. (2019) testaram dois complexos metálicos a base de prata, contendo 5,7-dimetil[1,2,4] triazolo [1,5-a] pirimidia (dmtp) como ligantes e perclorado e tetrafluoroborato no modo de contra-íon, *L. (V.) braziliensis*, onde os complexos apresentaram inibição do crescimento de formas promastigotas superior a 50%.

Os autores, Esteban – Parra et al. (2019), concluíram que o ligante teve ação direta na inibição do crescimento dos parasitas, apresentando atividade biológica não somente em complexos de prata, mas também em complexos contendo outros cátions metálicos, como níquel. Um dos complexos testado por esses autores,  $[Ag_2(dmtp)_2] (BF_4)_6 (H_2O)_2$  apresenta um ligante semelhante ao nosso complexo Ag1,  $BF_4$ , corroborando com hipótese da constituição e natureza do ligante estar ligado a atividade do complexo.

A Figura 8 apresenta os dados das concentrações dos complexos Ag1 e Ag2 nos períodos estudados, contra formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. Nos tempos de 24, 48 e 72h existe diferença estatística das concentrações dos complexos em relação ao controle positivo. O complexo Ag1 apresentou menor número de parasita viáveis nas concentrações de 160  $\mu\text{mol/mL}$  e 80  $\mu\text{mol/mL}$ , no tempo de 24h.

O complexo Ag2 apresenta resultados melhores que Ag1, com menor número de parasitas viáveis em todas as concentrações nos tempos estudados, porém, nas concentrações de 160  $\mu\text{mol/mL}$  e 80  $\mu\text{mol/mL}$  tem – se as menores quantidade de parasitas viáveis, indicando uma possível ação anti - *Leishmania* contra essa espécie e forma evolutiva de *Leishmania* (Figura 8).

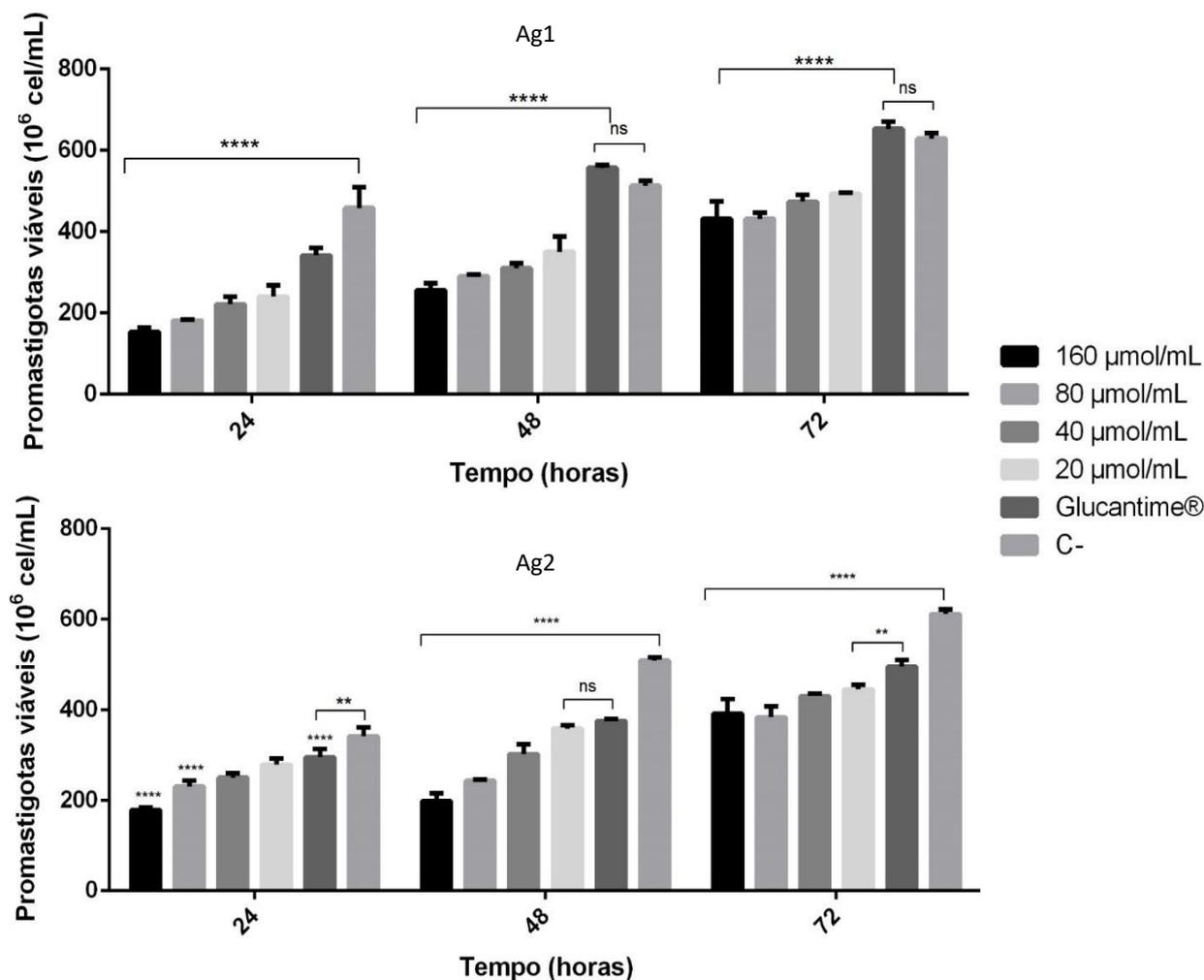
**Figura 8.** Atividade dos complexos Ag1 e Ag2 contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h.



Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

A Figura 9 apresenta os dados das concentrações dos complexos Ag1 e Ag2 nos períodos estudados, contra formas promastigota de *L. (V.) guyanensis*. O complexo Ag1 apresentou menor quantidade de parasitas viáveis na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$ , no tempo de 24h, seguido do crescimento exponencial dos mesmos nos demais tempos estudados, porém, todos menores que a quantidade de parasitas no controle positivo. O complexo Ag2 apresentou menor quantidade de parasitas viáveis na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$  no tempo de 24 e 48h em relação ao controle positivo, em relação ao controle positivo.

**Figura 9.** Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h.



Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

A atividade citotóxica dos complexos foi testada em comparação ao controle positivo, como visto na Tabela 3. Quando avaliados em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos, o complexo Ag1 mostrou – se tóxico. Greulich et al. (2013) e Mijndonckx et al. (2013) já haviam relatado a atividade citotóxica de complexos metálicos, entre eles aqueles a base de prata em estudos *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais murinos e células humanas, onde se observa a atividade citotóxica de íons de prata em concentrações acima de 1,5 ppm para macrófagos e concentrações acima de 30 ppm para monócitos humanos.

O complexo Ag1, de acordo com os mesmos autores, foi o primeiro complexos de prata e fosfina que possuem uma atuação como inibidor de TrxR. Antes dos complexos Ag1, Hickey et al (2008) relataram um complexo de prata, porém contendo difosfina atuando em mitocôndria de leveduras.

Já o complexo Ag2 não apresentou atividade citotóxica em ambos os tipos celulares em nenhum dos períodos estudados, com valores de CC<sub>50</sub> superiores ao fármaco Glucantime<sup>®</sup>. Nossos resultados concordam com os achados por Espuri et al. (2019), o qual testaram complexos metálicos a base de prata com ligantes de fenantrolina, em macrófagos peritoneais murinos e obtiveram valores de CC<sub>50</sub> 91,80 µg/mL, em relação a droga de referência Anfotericina B<sup>®</sup>, CC<sub>50</sub> 25,00 µg/mL.

A ação citotóxica desse complexo pode estar relacionada com o ligante. Santini et al. (2011), que sintetizaram os complexos utilizados nesse trabalho, relatam que o metal pode de fato atuar de forma distinta na interação com o substrato biológico, seja qual for ele. O complexo Ag1, que contém ligantes a base de fosfina, quando testado em células tumorais *in vitro*, teve capacidade de redução de inibir a proteína tiorredoxina redutase (TrxR) em até 50% a nível nanomolar, sendo essa atuação a responsável por sua citotoxicidade em células tumorais.

A capacidade de inibir seletivamente o TrxR em células de mamíferos na faixa de nanomolar de baixo valor foi recentemente confirmada para uma série de complexos a base de prata. Ag2 era um inibidor muito forte tanto da enzima purificada quanto dos extratos celulares e exercia uma notável atividade citotóxica em direção a um grande painel de linhas celulares cancerosas (DAMMAK et al., 2020).

Curiosamente, Ag2 juntamente com a inibição de TrxR e a superprodução de ROS levam a morte celular por apoptose, e também mostraram habilidade em danificar o DNA. Esse mecanismo duplo tem sido relacionado à presença do ligante HB(pz)<sub>3</sub> que é capaz de interagir com o DNA (DAMMAK et al., 2020).

Esses resultados confirmam o papel fundamental da natureza dos ligantes e de suas combinações que podem influenciar a atividade citotóxica dos complexos, indicando não apenas o equilíbrio hidrofílico-lipofílico dos complexos de Ag (I), mas também seu mecanismo de ação (DAMMAK et al., 2020).

**Tabela 3.** Atividade citotóxica em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos com valores de CC<sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) dos complexos de prata após 24, 48 e 72 h de incubação. P<0,05.

Valores de CC <sub>50</sub> (μmol/mL ± Desvio Padrão)/Tempo de incubação			
Macrófago peritoneal			
Compostos	24	48	72
Ag1	52,66 ± 1,87*	95,49 ± 1,13*	92,62 ± 2,63*
Ag2	200,88 ± 0,20**	206,38 ± 1,14**	209,44 ± 2,00**
Glucantime®	178,99 ± 0,23	205,21 ± 1,25**	211,61 ± 2,48**
Valores de CC <sub>50</sub> (μmol/mL ± Desvio Padrão) / Tempo de incubação			
Monócito humano			
Compostos	24	48	72
Ag1	98,02 ± 0,99	94,30 ± 2,90*	69,37 ± 1,28
Ag2	175,19 ± 1,78	391,63 ± 2,47**	436,80 ± 2,75**
Glucantime®	149,36 ± 1,52	254,90 ± 2,74**	398,40 ± 1,18**

CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica a 50% (μmol/mL ± Desvio Padrão)

P < 0,05: Diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey

\* valores marcados com asterisco significa que o composto é estatisticamente diferente dos outros

\*\* valores marcados com dois asteriscos significa que o composto é estatisticamente semelhante ao outro.

A atividade contra formas amastigota dos complexos metálicos a base de prata foi testada em comparação com Glucantime®. Os resultados com macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*, o complexo Ag1 mostrou menor quantidade de células infectadas nos tempos de 24, 48 e 72h quando comparados com complexo Ag2 e Glucantime®. Já os resultados com monócitos humanos infectados, Ag1 mostrou menor quantidade de células infectadas no tempo de 24h, em comparação com Glucantime® (Tabela 4)

Nossos resultados apresentam – se melhores que os encontrados por Espuri et al. (2019), que avaliou a atividade de complexos metálicos a base de prata complexados a ligantes do tipo fenantrolina contra formas amastigota de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos, obtendo resultados de IC<sub>50</sub> de 2,31 μg/mL e 1,30 μg/mL, em relação ao

fármaco Anfotericina B<sup>®</sup>, IC<sub>50</sub> 1,20 µg/mL, também utilizado no tratamento da Leishmaniose cutânea.

Os resultados com macrófagos infectados por formas amastigotas *L. (V.) guyanensis*, o complexo Ag2 apresentou menor quantidade de células infectadas no tempo de 48h, em relação ao complexo Ag1 e o controle positivo. Já os resultados com monócitos humanos infectados, todos os complexos apresentam valores elevados de células infectadas (Tabela 4).

Na literatura não foi encontrado resultados de complexos metálicos a base de prata contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*, porém, Nascimento et al. (2019) utilizou complexos a base de rutênio contra *L. (V.) braziliensis* e obteve uma diminuição significativa no número de células infectadas, na concentração de 50µmol e 100µmol.

Além do IC<sub>50</sub>, também foi calculado o índice de seletividade (IS), com o objetivo de avaliar e medir a seletividade dos complexos metálicos em relação as células hospedeiras, macrófagos e monócitos, e as formas amastigotas do parasita. Os valores do IS maiores ou iguais a 10 foram considerados satisfatórios (CHAVES et al., 2016). Em nosso estudo, os resultados de IS mostraram eficiência com macrófagos peritoneais somente quando submetido ao complexo Ag2 (Tabela 4).

Tabela 4 . Valores de IC<sub>50</sub> (μmol ± Desvio Padrão) da atividade dos complexos de prata contra formas amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* após 24, 48 e 72h, e valores de índice de seletividade (SI) em macrófagos Peritoneais.

Complexo	Período (h)	Amastigota IC <sub>50</sub>		Amastigota IC <sub>50</sub>		Índice de seletividade	
		(μM (10 <sup>-6</sup> M) ± Desvio Padrão)		( μM (10 <sup>-6</sup> M) ± Desvio Padrão)		Macrófagos	
		Macrófago		Monócitos			
		<i>L. (L.)</i>	<i>L. (V.)</i>	<i>L. (L.)</i>	<i>L. (V.)</i>	<i>L. (L.)</i>	<i>L. (V.)</i>
		<i>amazonensis</i>	<i>guyanensis</i>	<i>amazonensis</i>	<i>Guyanensis</i>	<i>amazonensis</i>	<i>guyanensis</i>
Ag1	24	6.09 ± 0.47	90.51 ± 0.70	23.28 ± 1.04	109.20 ± 0.63		
	48	14.91 ± 0.41	105.12 ± 0.42	69.04 ± 0.34	186.60 ± 0.57	3.89	3.64
	72	23.80 ± 1.51	116.25 ± 1.58	150.70 ± 0.91	270.30 ± 0.25		
Ag2	24	90.45 ± 1.33	65.44 ± 0.50	91.30 ± 0.9	237.10 ± 0.94		
	48	103.70 ± 1.59	30.50 ± 0.70	129.87 ± 0.23	235.70 ± 1.03	10.28	6.70
	72	112.87 ± 1.18	103.28 ± 1.17	230.10 ± 2.01	200.90 ± 0.90		
Glucantime®	24	57.08 ± 0.77	48.19 ± 0.77	294.60 ± 0.38	374.70 ± 0.64		
	48	279.20 ± 1.95	70.19 ± 1.62	317.20 ± 1.75	372.60 ± 1.75	-	-
	72	318.67 ± 1.48	101.06 ± 1.02	391.00 ± 1.38	427.80 ± 1.32		

IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória a 50% (μM (10<sup>-6</sup> M) ± Desvio Padrão)

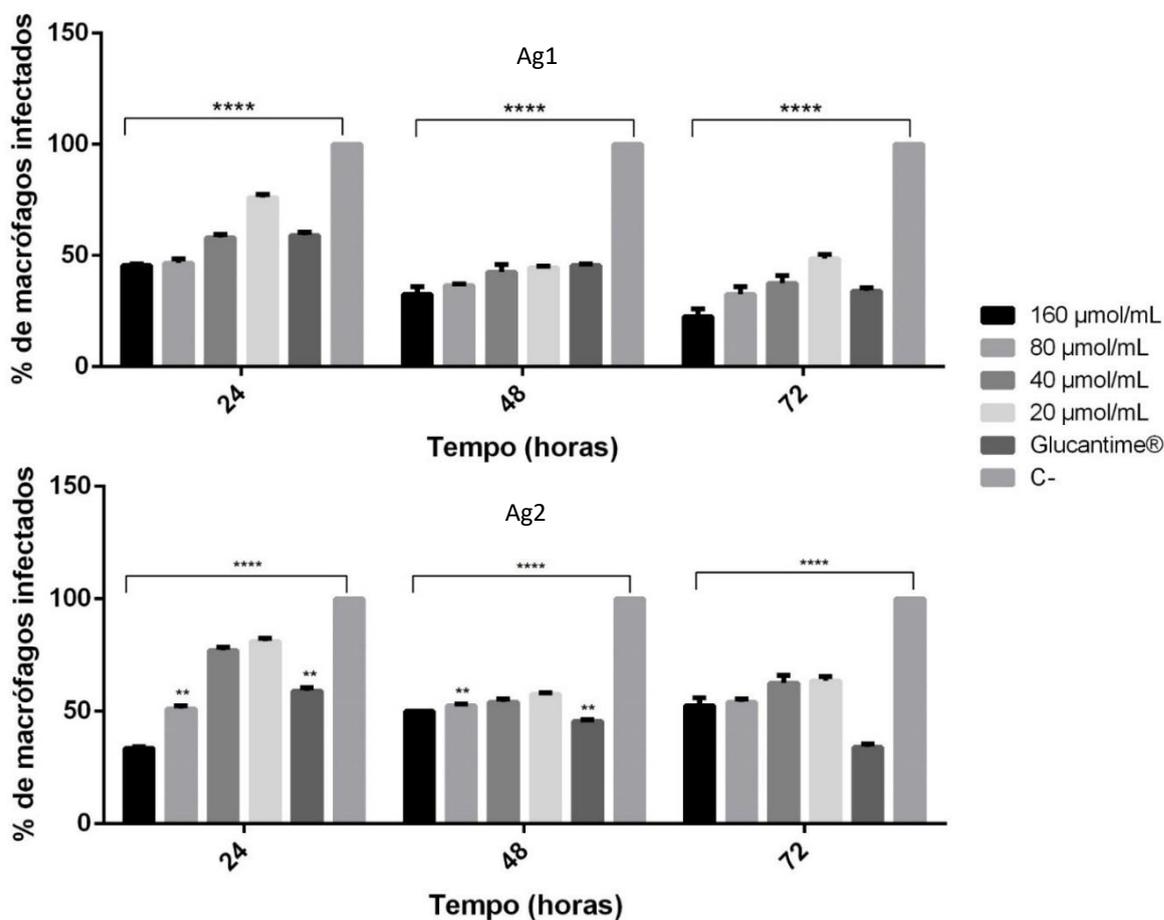
SI: Índice de seletividade

P <0,05: Diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey

A Figura 10 apresenta dados da atividade dos complexos contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos. Todas as concentrações do complexo Ag1 apresentam diferenças estatísticas em comparação com o controle positivo e negativo, com diminuição decrescente na quantidade de macrófagos infectados, com menor quantidade na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$  no período de 72h, concentração a qual apresentou valores de infecção inferior ao fármaco padrão nos tempos de 24, 48 e 72h.

O complexo Ag2 apresentou menor quantidade de macrófagos infectados também na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$ , em relação ao fármaco padrão, porém apenas no tempo de 24h, seguido de crescimento nos demais tempos estudados, apresentando quantidade de células infectadas superiores ao controle positivo (Figura 10).

**Figura 10.** Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h

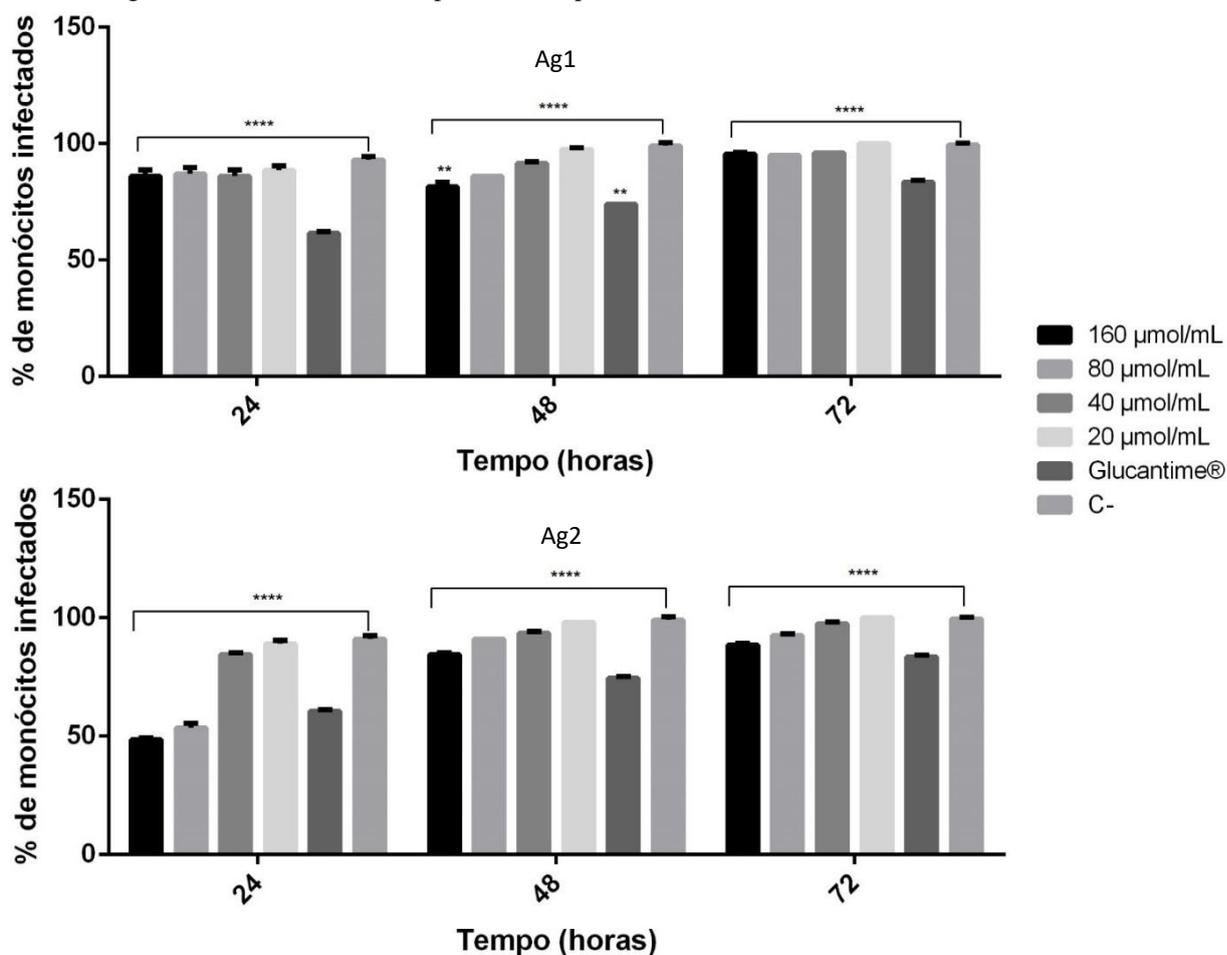


Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

Já a Figura 11 apresenta a atividade dos complexos metálicos contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em monócitos humanos. O complexo Ag1, em todas as concentrações, apresentou quantidade muito superiores de monócitos infectados quando comparadas com controle positivo, com pequeno decréscimo na quantidade no tempo de 48h, na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$ .

O complexo Ag2 apresentou menor quantidade de monócitos infectados no período de 24h, nas concentrações de 160  $\mu\text{mol/mL}$  e 80  $\mu\text{mol/mL}$  em relação ao controle positivo. Nos demais tempos estudados houve aumentos de células infectadas, com valores de monócitos infectados superiores ao controle positivo (Figura 11).

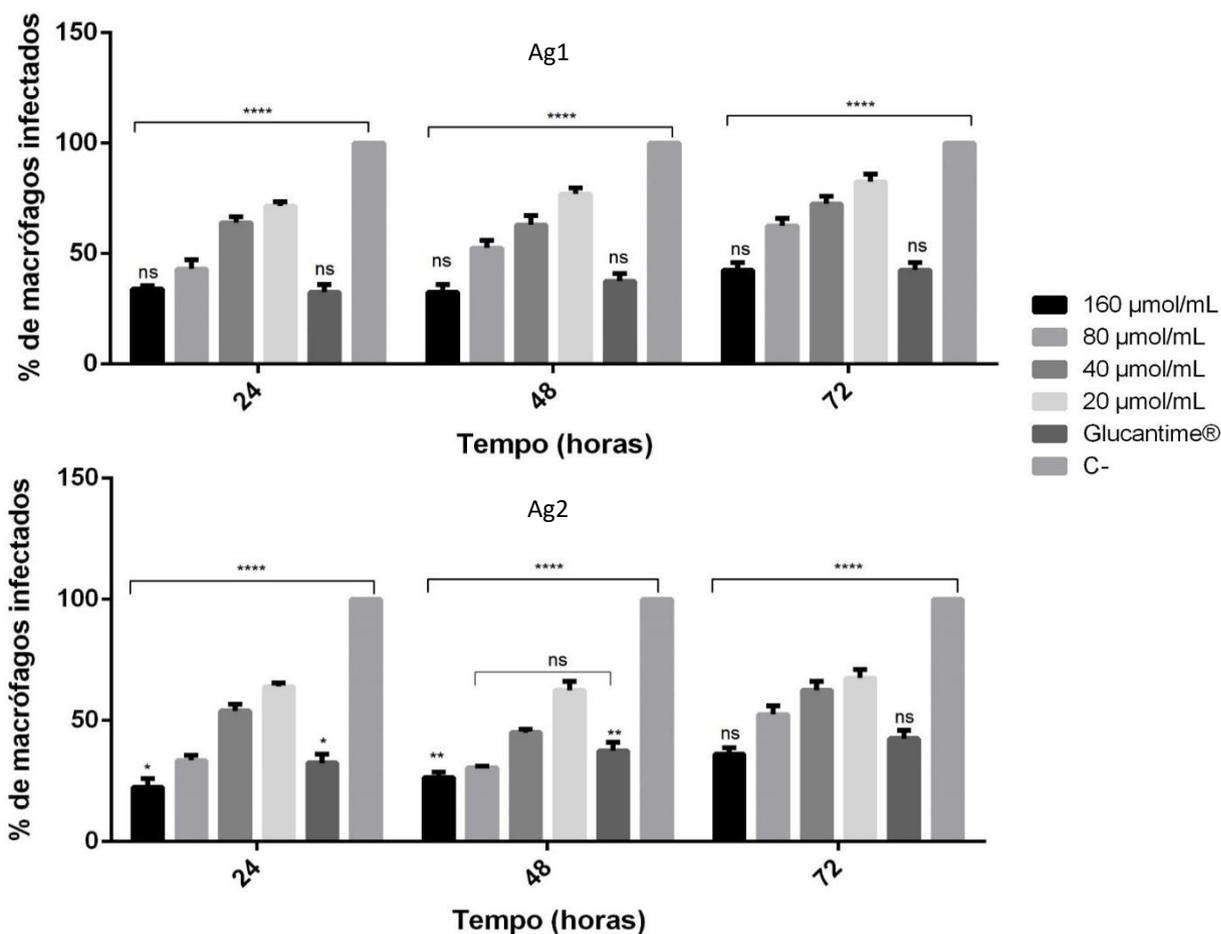
**Figura 11.** Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em monócitos humanos em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h



Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

A Figura 12 apresenta atividade dos complexos contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*, onde ambos complexos apresentam menos células infectadas na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$ .

**Figura 12.** Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis* interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h

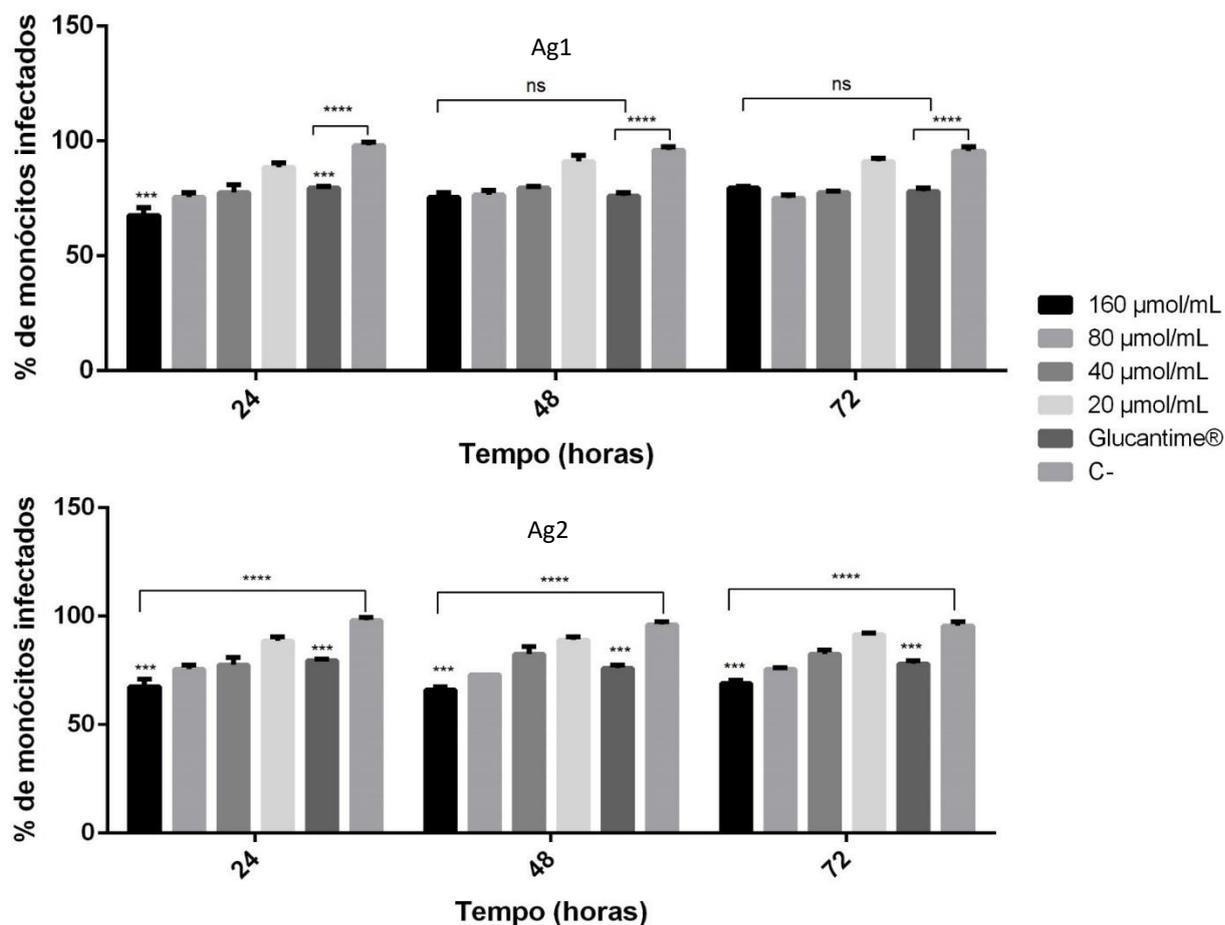


Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

A Figura 13 apresenta dados da atividade dos complexos contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis* interiorizadas em monócitos humanos. O complexo Ag1, na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$  apresentou menor quantidade de monócitos infectados, em relação ao fármaco padrão no período de 24h, com diferenças estatísticas entre eles.

O complexo Ag2 apresentou menor quantidade de monócitos infectados na concentração de 160  $\mu\text{mol/mL}$  relação ao controle positivo em todos os tempos estudados, com diferenças estatísticas entre os mesmos e o controle negativo (Figura 13).

**Figura 13.** Atividade do complexo Ag1 e Ag2 contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em monócitos humanos em quatro concentrações (160 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) em comparação ao fármaco Glucantime® e controle negativo, meio de cultura com parasita, nos períodos de 24, 48 e 72h



Nota: Dados marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente diferentes ao Glucantime®. Dados marcados com NS significa que não existe diferença estatística entre os compostos.  $P < 0,05$ .

### Preparação dos géis

Os géis foram preparados de acordo com o protocolo de gel base de carbopol. Com os géis prontos (Figura 14), foi feita a quantificação de rendimento, com a pesagem dos géis em balança analítica, aferição do volume, com auxílio de uma seringa e densidade do géis, este sendo o quociente entre massa/volume. Os resultados estão listados na tabela 5, pode – se perceber que os complexos apresentam valores aproximados em todos os critérios analisados.

**Figura 14:** Géis incorporados com complexos metálico. A: gel com incorporação de Ag1; B: gel com incorporação de Ag2; C: gel sem adição de nenhum complexo (placebo).



**Tabela 5:** características dos géis com complexos metálicos incorporados

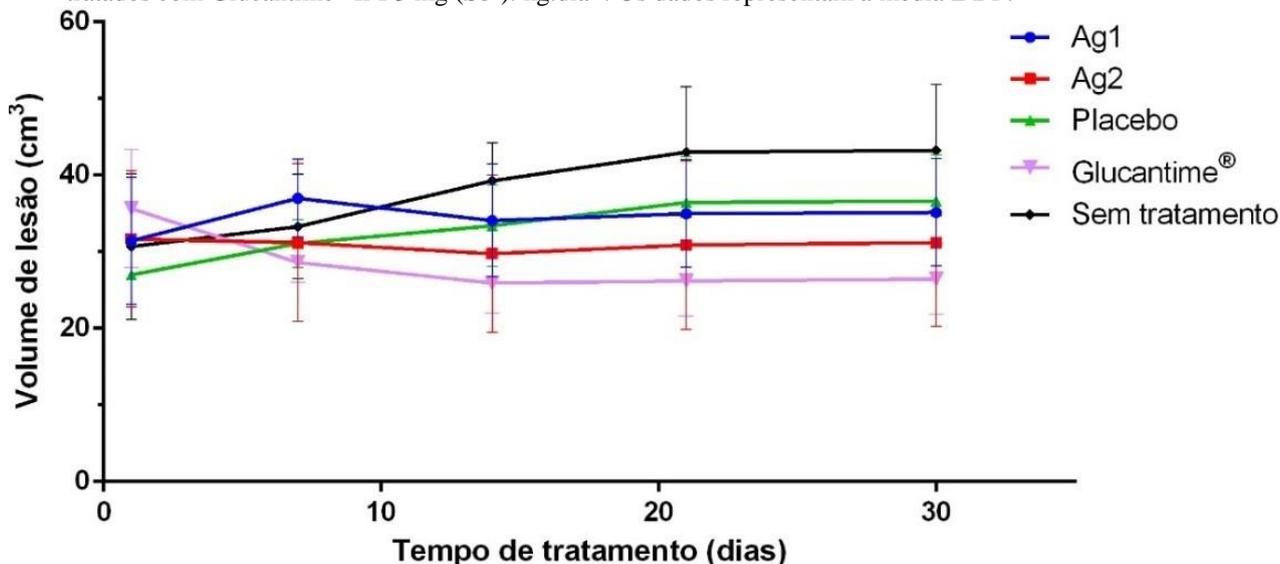
	<b>Rendimento</b>	<b>Volume</b>	<b>Densidade</b>
<b>Ag1</b>	43,88 g	41 mL	1,07
<b>Ag2</b>	36,02 g	35 mL	1,02

### **Ensaio *in vivo***

A análise do efeito anti-*Leishmania* dos géis frente lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* em animais de experimentação se deu por aferição do volume total da lesão e quantificação de células infectadas e amastigotas interiorizadas no tecido da lesão.

Quando utilizados no tratamento de lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*, os géis contendo os complexos metálicos apresentaram redução do volume da lesão menor que visto no Glucantime<sup>®</sup>, porém, apresentam redução significativa em comparação com controle negativo. Ao analisarmos a Figura 15, pode ser observado uma tendência a redução do volume das lesões após o 14<sup>o</sup> dia de tratamento, seguida de notável estabilidade dessa redução até o fim do tratamento. O gel contendo Ag2 mostra maior redução entre os dois complexos, com diferença estatística em relação ao grupo sem tratamento ( $P < 0,001$ ).

**Figura 15:** Efeito do tratamento tópico na lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (L.) amazonensis*, com géis contendo complexos metálicos incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados, animais tratados com Glucantime® IM 3 mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>-1</sup>. Os dados representam a média ± DP.



O aspecto morfológico e a evolução do volume das lesões são causada por *L. (L.) amazonensis* é apresentada na Figura 16. O grupo composto por animais sem infecção apresentam a região do focinho sem alterações morfológicas.

No grupo infectado sem tratamento é possível observar a evolução da lesão típica causada por essa espécie, com presença de um grande edema inicial, seguido para um processo ulcerativo da região da lesão, levando por fim, a destruição dos tecidos da área da lesão e regiões adjacentes. O aspecto das lesões após a tricotomia apresentou endurecimento em todos os animais do grupo.

Animais infectados e tratados com Glucantime® apresentaram discreta redução do edema formado, porém, sem regressão da lesão. Notou – se que as lesões apresentavam aspecto tecidual endurecido no local com edema.

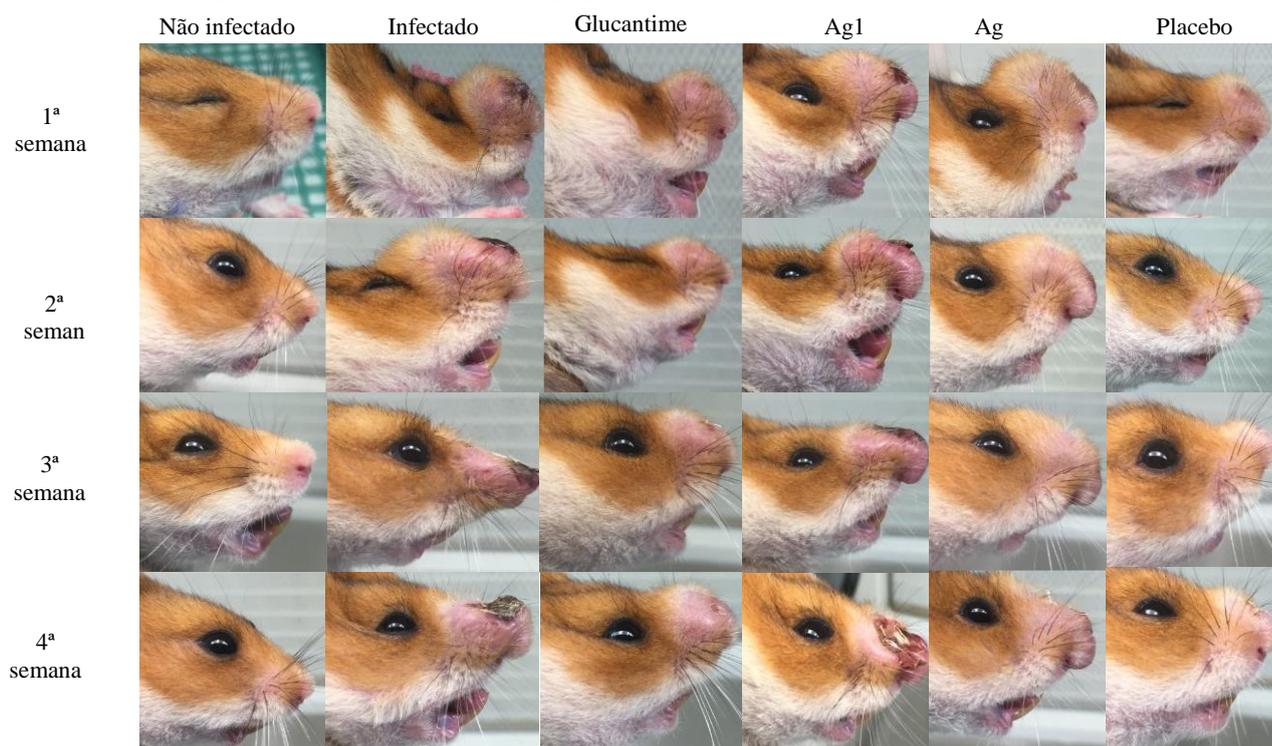
O grupo tratado com Ag1 apresentou piora no estado clínico da lesão, iniciada com edema característico da lesão por *L. (L.) amazonensis*, evoluindo com grave ulceração e destruição da região nasal do animal, aspecto semelhante ao apresentado pelo grupo infectado

e não tratado. As lesões apresentaram purulência, indicando um processo infeccioso secundário por tipos bacterianos.

O grupo tratado com Ag2 apresentou redução do edema, sem evolução da lesão a processos ulcerativos, entretanto, os animais apresentam lesões maiores que o grupo tratado com Glucantime®. As lesões, assim como no grupo tratado com Ag1, apresentaram purulência, assim como o tecido da lesão e endurecidos.

No grupo Placebo foi observada a evolução da lesão em todos os animais, com formação de edema e de forma posterior, processo ulcerativo com início de destruição da região afetada.

**Figura 16:** Evolução do tratamento tópico de lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (L.) amazonensis*, usando géis contendo complexos metálicos incorporados (0,3 mg/dia), gel sem adição de complexos (placebo), tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup> em relação aos grupos infectado e não infectado e não infectado.

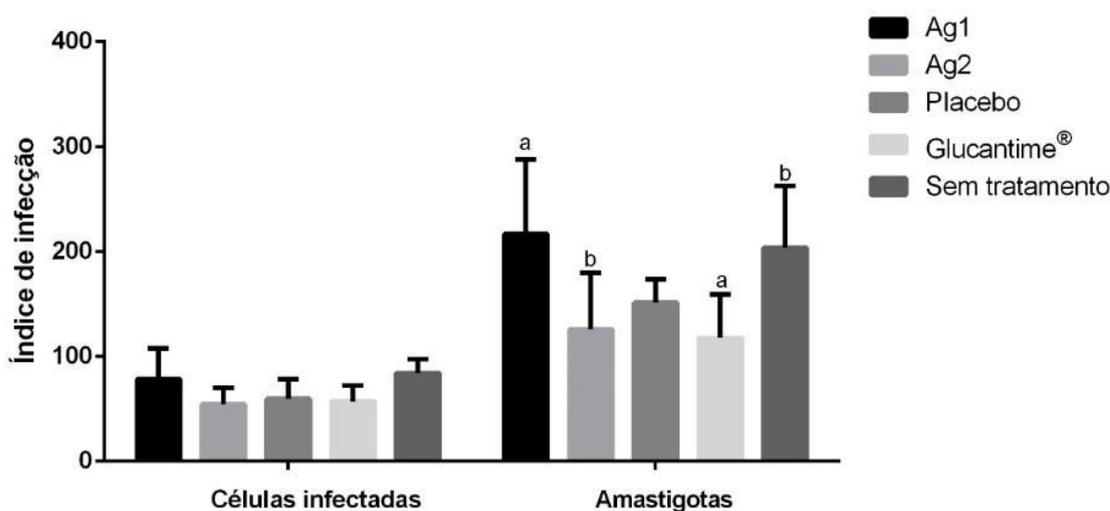


IM: intramuscular

A quantificação de células infectadas em *imprintings* de lesões, Figura 17, mostra que os géis contendo os complexos não apresentaram diferença estatística para o Glucantime®. O grupo tratado com Ag1 apresentou maior quantidade de amastigotas interiorizadas, com

diferença estatística em relação ao Glucantime<sup>®</sup>, resultado inverso é encontrado no grupo tratado com gel contendo Ag2, que apresentou diferença estatística ao grupo de animais sem tratamento. Tais resultados indicam que o gel contendo complexo Ag2 pode apresentar potencial de redução da carga parasitária intracelular em formulações tópicas, a 3mg/mL, porém por maior período de tratamento que estudado.

**Figura 17:** Índice de infecção e amastigotas quantificados em lesão em *Mesocricetus auratus* infectados por *L. (L.) amazonensis*.



Dados representam a média  $\pm$  DP.

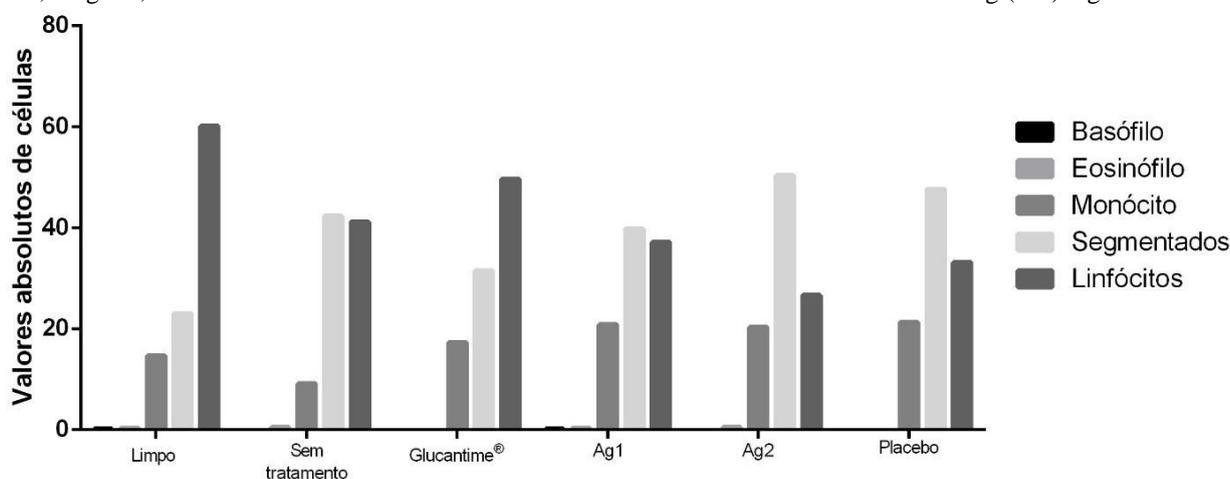
Letras indicam diferenças estatísticas segundo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

O diagnóstico parasitológico confirmou a infecção dos animais submetidos inoculação de *L. (L.) amazonensis*, com presença de parasitas viáveis em todos os fragmentos de lesão e fígado cultivados em meio NNN.

Também foram analisados esfregaços sanguíneos de cada animal dos grupos, e quantificadas as células do sistema imunitário. No grupo limpo, obteve-se maior número de células do tipo linfócitos, seguido de segmentados e monócitos, e pouca quantidade. O grupo infectado e não tratado apresentou quantidade de células segmentados e linfócitos iguais, seguido por monócitos e eosinófilos, sem presença de basófilos. O grupo tratado com Glucantime<sup>®</sup> apresentou maior quantidade de linfócitos, seguidos por segmentados e monócitos, valores muito semelhantes aos encontrados em animais limpos (Figura 18).

Quando tratados com Ag1, os animais apresentaram quantidade de células de linfócitos e segmentados semelhantes, seguido dos monócitos, resultado semelhante ao encontrado em animais infectados e não tratados. Animais tratados com Ag2 e Placebo apresentaram valores de linfócitos, segmentados e monócitos iguais, sem diferença aparente entre esses dois tratamentos (Figura 18).

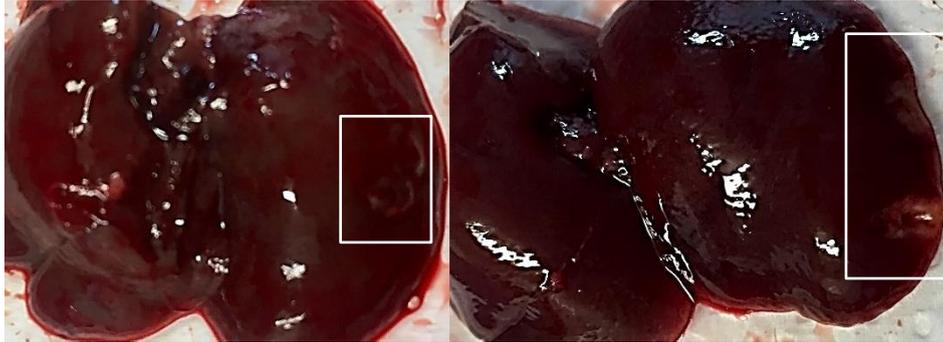
**Figura 18:** Valores absolutos de células do sistema imunitário encontradas em esfregaço sanguíneo de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com géis contendo complexos metálicos, Ag1 e Ag2, incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup>.



Sobre os demais órgãos e aspectos morfológicos dos mesmos, o grupo infectado não tratado e grupo Placebo apresentaram petéquias por toda a extensão do fígado, assim como animais tratados com Glucantime®, porém, sabe-se da atividade tóxica desse fármaco no órgão, já que o mesmo tem sem processo de metabolização de forma hepática, o que pode explicar o aparecimento de tais marcas.

Com relação ao tratamento com complexos metálicos, o grupo tratado com Ag1 além de presença de petéquias no fígado, com presença de machas esbranquiçadas de borda irregular em regiões do lobo esquerdo e/ou direito do órgão, apresentaram também quadro semelhante a hidremia assim como coloração sanguínea escura, do tipo amarronzada. O grupo tratado com Ag2 apresentou os mesmos aspectos, porém, alguns animais apresentaram os rins com coloração esbranquiçada (Figura 19).

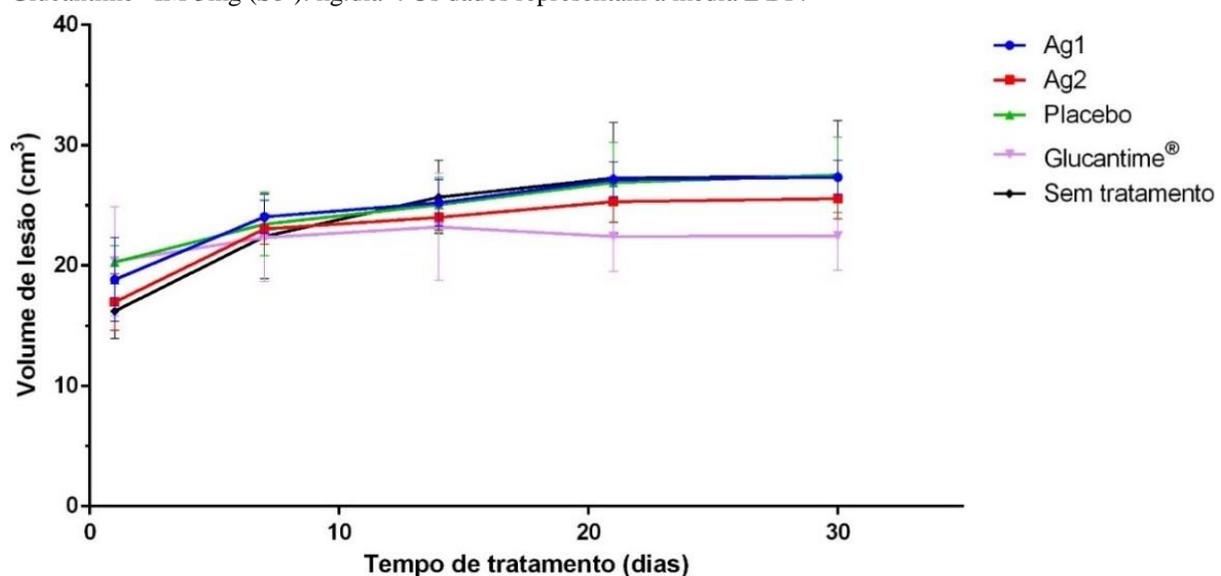
**Figura 19:** Aspecto de órgão, fígado, de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* tratados com Ag1 (A) e Ag2 (B). No detalhe é possível visualizar áreas esbranquiçadas nos lobos dos órgãos.



Fonte: obra da autora

A Figura 20 apresenta resultados de testes em lesões causadas por *L. (V.) guyanensis*. O tratamento com géis contendo os complexos metálicos não apresentou atividade redutiva do volume das lesões, em comparação ao Glucantime<sup>®</sup>, tendo o grupo tratado com Ag1 sem diferença estatística ao grupo de animais sem tratamento ( $P < 0,001$ ). Tais resultados indicam que os complexos não apresentam capacidade de redução da lesão contra a espécie, na concentração e período de tratamento estudado.

**Figura 20:** Efeito do tratamento tópico na lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (V.) guyanensis*, com géis contendo complexos metálicos incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime<sup>®</sup> IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>-1</sup>. Os dados representam a média  $\pm$  DP.



A apresentação clínica, morfológica e a evolução do volume das lesões causadas por *L. (V.) guyanensis* é vista na Figura 21, que se apresentam diferentes das causadas por *L. (L.) amazonensis*. São lesões pequenas, com edema sem grandes dimensões, não evoluindo para processo ulcerativo e destruição da lesão de forma rápida, como no grupo sem tratamento e Placebo, o qual nos 30 dias de acompanhamento apresentou crescimento da lesão de forma característica da espécie.

Lesões de animais do grupo tratado com Gluncatime® apresentou moderada redução no volume da lesão durante o tratamento, entretanto, foi constatado processo ulcerativos em três dos seis animais do grupo. Os grupos tratados com complexos metálicos apresentam evolução da lesão, o grupo tratado com Ag1 foi observado aumento do edema na região lesionada. O grupo tratado com Ag2 além do aparecimento do edema, leve ulceração com presença de regiões purulentas próximo ao fim do tratamento.

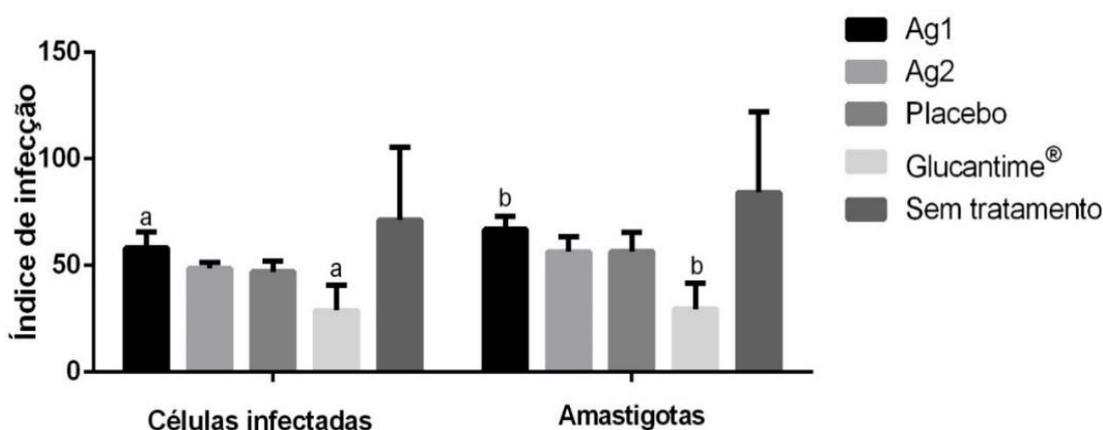
**Figura 21:** Evolução do tratamento tópico de lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (V.) guyanensis*, usando géis contendo metálicos incorporados (0,3 mg/dia), gel sem adição de complexos (placebo), tratados com Gluncatime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>-1</sup> em relação aos grupos infectado e não tratado e não infectado.



IM: intramuscular

Em relação à quantidade de células infectadas, como mostra a Figura 22, não houve redução na carga parasitária pelos complexos. Em comparação ao grupo tratado com Glucantime<sup>®</sup>, o grupo tratado com Ag1 apresentou diferença estatística em relação a quantidade de células infectadas e amastigotas interiorizados, Ag2 tem menos células infectadas e amastigotas interiorizados, porém, sem diferenças em relação aos controles.

**Figura 22:** Índice de infecção e amastigotas quantificados em lesão em *Mesocricetus auratus* infectados por *L. (V.) guyanensis*, tratados com géis contendo complexos metálicos, animais infectados sem tratamento e animais tratados com Glucantime<sup>®</sup> IM 3mg (Sb<sup>5</sup>).kg.dia<sup>-1</sup>.



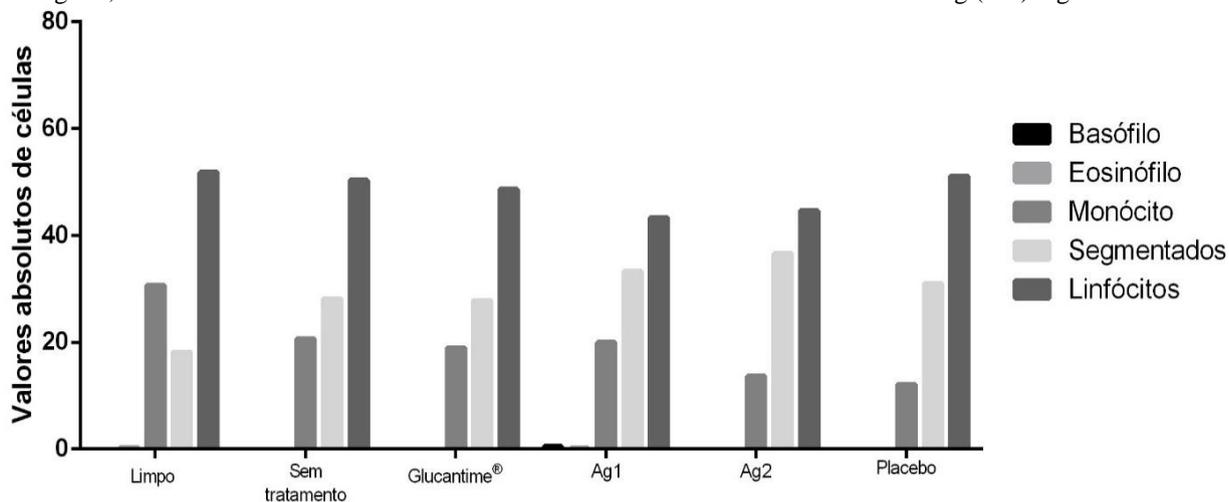
Dados representam a média ± DP.

Letras indicam diferenças estatísticas segundo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

O diagnóstico parasitológico confirmou a infecção dos animais submetidos inoculação de *L. (V.) amazonensis*, com presença de parasitas viáveis em fragmentos de lesão cultivados em meio NNN.

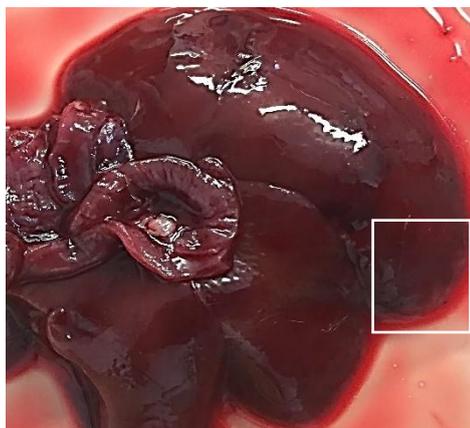
O esfregaço sanguíneo mostrou que no grupo limpo, obteve – se maior número de células do tipo linfócitos, seguido de monócitos e segmentados. O grupo infectado e não tratado, tratado com Glucantime<sup>®</sup> e tratado com Ag1 apresentaram valores semelhantes na quantidade linfócitos, seguido de células segmentados monócitos. Animais tratados com Ag2 e Placebo apresentaram valores de linfócitos, segmentados e monócitos iguais, sem diferença aparente entre esses dois tratamentos (Figura 23).

**Figura 23:** Valores absolutos de células do sistema imunitário encontradas em esfregaço sanguíneo de animais infectados com *L. (V.) guyanensis* tratados com géis contendo complexos metálicos, Ag1 e Ag2, incorporados, 0,3 mg/dia, animais infectados e não tratados e animais tratados com Glucantime® IM 3mg (Sb<sup>5</sup>). kg.dia<sup>1</sup>.



Os grupos infectados com *L. (V.) guyanensis* não apresentaram elevadas alterações morfológicas dos órgãos, em comparação a animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. O grupo tratado com Glucantime apresentou leve presença de petéquias em alguns pontos do fígado, e o grupo tratado com Ag2 apresentou áreas com petéquias em grande extensão dos lobos do fígado (Figura 24).

**Figura 24:** Aspecto de órgão, fígado, de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* tratados com Ag1 (A) e Ag2 (B). No detalhe é possível visualizar áreas esbranquiçadas nos lobos dos órgãos.



São escassos os relatos na literatura acerca do uso de complexos metálicos em experimentação *in vivo*, com as espécies em estudo. Os relatos de Nascimento et al. (2019)

avaliou a ação leishmanicida do complexo nitrosil de rutênio *cis* - [Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* na concentração de 300 µg/kg/dia, o qual o complexo reduziu significativamente o tamanho da lesão em 51% (p <0,05), com eliminação de 99,9% dos parasitas encontrados nos linfonodos (p <0,001).

O estudo de Espuri et al. (2019) avaliou a ação de complexo metálico base de prata, [Ag<sub>2</sub>(imzt)<sub>6</sub>] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em hamster infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, quantificando amastigotas vivo no tecidos do fígado e baço, os resultados mostraram que o complexo reduziu o número de amastigotas nesses órgãos, em comparação com o grupo não tratado.

## 9.0. CONCLUSÃO

Os bioensaios contra *L. (L.) amazonensis*, em formas promastigotas, Ag2 apresentou melhor atividade anti – *Leishmania*, já amastigotas Ag1 apresentou maior atividade.

Contra *L. (V.) guyanensis*, os complexos não apresentaram atividade anti-*Leishmania*, em amastigotas interiorizadas em macrófagos Ag2 apresentou menor quantidade de células infectadas. Tais resultados são inovadores, caracterizam o estudo como pioneiro, visto que não se tem em literatura relatos da utilização de complexos a base de prata contra as formas evolutivas de *L. (V.) guyanensis*.

Sobre citotoxicidade, Ag1 mostrou – se tóxico para os tipos celulares testados, levando a hipótese de que sua atividade frente ao parasita deve – se a essa atividade tóxica, Ag2 não apresentou atividade tóxica. O índice de seletividade mostrou resultado mais tolerável por Ag1, para *L. (L.) amazonensis*, apenas em relação a macrófagos peritoneais.

O tratamento *in vivo* frente a lesões de *L. (L.) amazonensis*, os complexos reduziram o volume da lesão a partir do 14º dia de tratamento, porém menos que Glucantime®, com Ag2 apresentando elevado número de amastigotas interiorizadas. Ambos complexos provocaram alterações morfológicas de rins e fígado, mesmo em concentrações consideradas baixas.

Já animais infectados com *L. (V.) guyanensis* apresentaram evolução do quadro clínico da lesão, com aumento do edema e aparecimento de processo ulcerativo, conseqüentemente, apresentando elevado número de amastigotas interiorizadas, sem danos ao fígado e rins dos animais.

Sendo assim, podemos concluir que o complexo Ag2, *in vitro*, apresenta atividade anti-*Leishmania*. Em estudo *in vivo*, é necessário estudo de novo métodos de administração do complexo, a fim de se ter uma maior absorção do complexo, e menos danos a órgãos internos.

## 10.0. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALEMAYEHU, B., ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. *Heal. Sci. J.* 11. 2017.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine.* v.6, p. 2705-14. doi: 10.2147/IJN.S23883. Epub 2011.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anuais Brasileiro de Dermatologia.* v. 86, n.3, p. 497-506. 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis: Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* v. 7, n.5, p. 35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. Epub May 31, 2012.

ATKINS, P. *Inorganic chemistry.* 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2010

ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios da química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.* 3 ed. São Paulo: Bookman, 2005.

BAIOCCO, P. et al. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *ACS Med. Chem. Lett.* v. 2, p. 230–233.

BARREIRO, E. et al. Heteronuclear gold (i)-silver(i) sulfanylcarboxylates: synthesis, structure and citotoxic activity against câncer cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 131, p. 68-75, 2014.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira Epidemiologia*. v. 7, n.3, 2004.

BRANDT, D.; PARK, B.; HOANG, M.; JACOB, H. T.; Argiria secondary to ingestion of homemade silver solution. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, p. S105 – S107, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília; 2017.

BROWNING, E. Toxicity of Industrial Metals; Butterworth & Co.:London, 1961.

BRUIJNINCX, P. C. A. SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticâncer activity. *Current Opinion in Chemincal Biology*. v. 12, n. 2, p. 197-206.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug Resistance in Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2(2): 167–176. 2010.

CHANG, K.P.; REED, S. G.; SOONG, L. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasites multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*. v.85, n.3, p. 375-90.; 2003.

CHAVES, J. D. S. et al. Novel gold (I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2017; (127), 727-739p. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.052

CHEN, D. et al. C, V.; FREZZA, M.;DUO, Q. P. *Curr. Pharm. Dees.* 15, 777. 2009.

CORKUM, C.P. et al. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CTP) and standard density gradient. *BMC Immunol* 2015; (16): 48. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0113-0>

COYLE B., KINSELLA P., McCANN M., DEVEREUX M., O'CONNOR R., CLYNES M., KAVANAGH K., *Toxicol. In Vitro*, v. 18, p. 63, 2004.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA LUZ, J. S. B. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum* chagasi Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1–7, 2015.

DAMMAK, K; et al. Antiproliferative Homoleptic and Heteroleptic Phosphino Silver(I) Complexes: effect of Ligand Combination on their Biological Mechanism of Action. *Molecules*, 2020; (25): 5484. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25225484>

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. *J. Adv. Med. Sci. Appl. Technol.* v. 2, . 122– 128. 2016.

ESPURI, P. F. et al. Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* v.24, p. 419–432, 2019.

ESTEBAN-PARRA, G. M. et al. High antiparasitic activity of silver complexes of 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5  $\alpha$ ]pyrimidine. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 201. 2019.

FERNÁNDEZ, O. L. et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. e2871, 2014

FERREIRA, A. O. Formas farmacêuticas semi-sólidas. São Paulo:ANFARMAG. 2006 2-3

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* v.2, p.11–19. 2012.

FURCHNER, J. E.; RICHMOND, C. R.; DRAKE, G. A. Comparative metabolism of radionuclides in mammals-IV. Retention of silver-110m in the mouse, rat, monkey, and dog. *Health Phys.* v.15, p. 505-514. 1968

GOTO, H. et al. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.*v, 8, n. 4, p. 419 – 433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cell occur in the same concentration range. *RSC Advances*, v. 2, p. 6981-6987, 2012.

GREULICH, C. et al. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cell occur in the same concentration range. *RSC Advances*, v. 2, p. 6981-6987, 2012.

GUERRA, J. A. O. et. al. Leishmaniose tegumentar em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n.9, p. 2215-2223, set, 2007.

GUO, Z.; SADLER, P. J. Metals in medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, p. 1512-1531, 1999.

GUPTA, G., OGHUMU, S., Satoskar, A.R., 2013. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv. Appl. Microbiol.* v.82, p. 155. 2013.

HADRUP, N.; LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 68, p. 1-7, 2014.

HICKEY, J. L. et al. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J Am Chem Soc.* 130 (38):12570-1. 2008.

HUMPHREYS, S. D.; ROUTLEDGE, P. A. The toxicology of silver nitrate. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 1998, v.17, p.115-143.

JESUS, J. A. D. E. Universidade Federal de São Paulo. 2015.

JOB, A. E. et al. Nanoparticle Technology: Na alternative approach for Leishmaniasis Treatment. Department of Physycs, Chemistry and Biology, Uni. Estadual Paulista, São Paulo, Brazil, 2014.

KAYE; SCOTT. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011.

LAINSON, R. Leishmania e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*; .11 (1): 29-40. 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, v.273, p. 595-600. 1997.

LAULICHT, F. et al. Tungsten-induced carcinogenesis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 288, p. 33-39. 2015.

LEE, H. Fabrication of silver nanoparticles via self-regulated reduction by 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium tetrafluoro-borate. *Kor. J. Chem. Eng.* 24:856-859. 2007.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. The antitumoral depsipeptide IB-01212 kills *Leishmania* through an apoptosis-like process involving intracellular targets. *Molecular Pharmaceutics*. v.5, p.1608–1617, 2010.

MÉDICE, S. et al. Medical uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.62, p. 5923-5943. 2019.

MICHEL G., et al. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop.* v. 119, p. 69–75. 2011.

MIJNENDONCKX, K.; et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, v. 26, p. 609-621, 2013.

MONTES, L. F.; MUCHINIK, C. L.; JR, F. Response of varicella zoster virus and herpes zoster to silver sulfadiazine. *Cutis*. v. 38. N. 6, p. 363-365. 1986.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell Biology and Immunology of Leishmania. Immunological Reviews, v. 240, p. 286–296, 2011.

MOYER, C. A.; BRETANO, L.; GRAVENS, D. L.; MARGRAF, H. W.; MORFANO, W. W. Arch. Surg. 90, 812. 1965.

NASCIMENTO, N. B. F. et al. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Acta Tropica. v.192, p. 61–65, 2019.

NAVARRO, M. et al. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 8, p. 401–408, 2003

NEVES, B. J. N. Concentração de antimônio em plasma e pele de pacientes com leishmaniose cutânea – relação com efeitos colaterais após o tratamento com antimoniato de N-Metil Glucamina. 2008. 99p. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

OLIVEIRA, M. C. et al. Óbito em caso de Leishmaniose cutâneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. Rev Soc Med Trop, n. 38, p. 258-260, 2005.

OMS. Leishmaniasis: background information. Geneva: WHO, 2010. Leishmaniasis, Magnitude of the problem. Disponível em: Acesso em 4 de junho de 2018-07-04

OMS. Leishmaniasis: background information. Geneva: WHO, 2020. Leishmaniasis, Magnitude of the problem. Disponível em: Acesso em 10 de maio de 2018

PAIVA, I. L. et al. Silver(I) complexes with symmetrical Schiff bases: synthesis, structural characterization, DFT studies and antimycobacterial assays. *Polyhedron*, v. 62, p. 104-109, 2013.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, 2010

PEREIRA, G. R. et al. *Tetrahedron Letters*, v. 51, p. 1022-1025, 2010

PEREIRA, I. O., SACRAMENTO, V. S; MARQUES, M. J. Leishmanioses: "Estado da arte" *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 9, n. 1, p. 220-238, jan./jul. 2011.

PURKAIT B, et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, p. 1031-41, 2012.

RAHI, A. A.; ALI, M. A.; AL-CHARRAKH, A. H. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania tropica*. *African Journal of Biotechnology*. v. 12, n48, pp. 6718-6722, 2013.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Review of entomology*. v. 58:1, p. 227-250, 2013.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, n. 7, 581-596. 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-Leishmania Response. *PLoS Pathogens*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 04 May 2012 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00059>

ROCHA, V. P. C.; Avaliação da atividade antileishmania de fármacos antimaláricos *in vitro* e em modelo murino de leishmaniose tegumentar. 2012. 75 p. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. FIOCRUZ. 2012

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Leishmania manipulation of sand fly feeding behaviour results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*. v.3, n. 6, p. 227-250, 2007.

SANTOS, A. L. S. Protease expression by Microorganisms and its Relevance to Crucial Physiological/Pathological Events. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 2, n. 3, p. 48- 58, 2011.

SOLDERA, P. F. Avaliação *in vitro* da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos a base de prata. 2015. 80P. Dissertação de mestrado. Programa de Pós graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas.

RUSSEL, A. D. et al. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*. v. 31, p. 351-370. 1994.

SANTANA, F. R. et al. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage – *Leishmania (L.) amazonensis* interaction *in vitro*. *Cytokine*. v. 92, p. 33-47. 2017.

SANTINI, C. et al. In vitro antitumour activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v.105, fevereiro de 2011, p. 232-240. 2011.

SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. JR. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SATURNINO, C. et al. N heterocyclic carbene complexes of silver and gold as novel tools against 2213- breast cancer progression. *Future Med. Chem.* 8, 2229. 2016.

SEGURA, D. F. et al Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N,Nchelating ligands and thiourea: X-ray structure of  $[\{Ag(bpy)(\mu-tu)\}_2](NO_3)_2$  (bpy = 2,2'-bipyridine; tu = thiourea). *Polyhedron*. v.79, n. 5, p. 197-206, 2014.

SILVA, J. M. et al. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. *Experimental Parasitology*. v. 159, p. 143-150.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 423 – 431, 2009.

SOUZA, G. F. et al. Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxid*, v. 15, n. 3, p. 209-216. 2010.

TAPANELLI, S. et al. Novel metalloantimalarials: Transmission blocking effects of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) phosphane complexes on the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 166, p. 1-4. 2017.

VIEIRA, L.M.M. et al. Platinum (II) complexes with fluoroquinolones: Synthesis and characterization of unusual metal-piperazine chelates. *Inorganic Chimica Acta*, v.369, p. 2060-2064, 2009.

WHO informal consultative meeting for the control of cutaneous leishmaniasis in the middle east and maghreb, 2007. Geneva. Cutaneous leishmaniasis: why you neglecting me? Geneva: World Health Organization, 2021..

WRIGHT, S. F. et al. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *American Journal of Infection Control*. v. 27, p. 344-350. 1999.





MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
**PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS**  
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudos da dinâmica da Leishmaniose Tegumentar e Doença de Chagas na Região Amazônica em seus aspectos parasitológicos, epidemiológicos e imunológicos**", registrada com o nº **023/2020 - 01280.000455/2020-41**, sob a responsabilidade de **Maricleide de Farias Naiff** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de **07/05/2020**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 04/05/2020 a Final: 30/09/2024
Espécie/linhagem/raça:	Hamsters e camundongos (Balb C)
Número de animais:	400 Camundongos isogênicos Balb C e 800 Hamsters Golden (1200)
Peso/Idade:	Camundongo isogênico Adulto 25g / Hamster Adulto 65g
Sexo:	Machos / Fêmeas
Origem:	Biotério Central do INPA
Inoculação:	Inoculação de parasitas (Leishmania e Trypanosoma)

Data de liberação do Parecer: **11.05.2020 - Raimunda Liege Souza de Abreu** - Presidente CEUA-INPA - PO 011/2020



Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 11/05/2020, às 15:50 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **5475441** e o código CRC **3E041B70**.



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO  
DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos pre-clínicos de complexos a base de prata contra *Leishmania* ssp (*Kinetoplastidas trypanosomatidae*", registrada com o nº 060/2018, SEI 01280.001865/2018-65, sob a responsabilidade de PAULINE DE FARIAS SOLDERA - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 26/02/2020.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 01/01/2019 a Final: 01/07/2020
Espécie/linhagem/raça:	<i>Mus musculus</i> - Balb - C e <i>Mesocricetus auratus</i>
Número de animais:	<i>Mus musculus</i> - Balb - C - 120 e <i>Mesocricetus auratus</i> - 120
Peso/Idade:	<i>Mus musculus</i> - Balb - C - >15g / >12sem e <i>Mesocricetus auratus</i> >15g / >12sem
Sexo:	M
Origem:	Biotério Central do INPA
Jejum:	não se aplica
Inoculação:	L. L. anazibebsus e L. (V.) guyanensis / Complexos Metálicos a base de Prata ( Ag1 e Ag 2), Antimoniato de meglumina - Glucatime

Data de liberação do Parecer: 27.02.2020

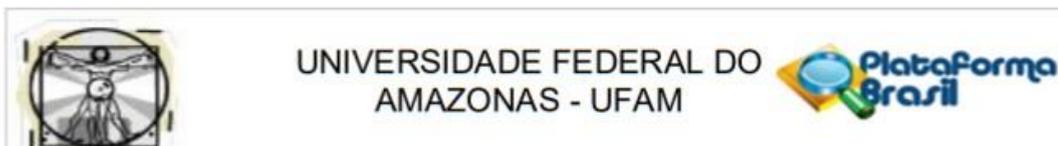
Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 011/2020



Documento assinado eletronicamente por Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia, em 23/03/2020, às 12:15 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador 5305166 e o código CRC 7D4CFD94.



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo Experimental in vitro com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes portadores de Leishmaniose cutânea antes e após tratamentos alternativos

**Pesquisador:** Erika Oliveira da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 29406319.2.0000.5020

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.974.245

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental in vitro. O projeto será dividido em duas etapas. Primeiro, será realizada atividade em campo, através do deslocamento da equipe de pesquisadores e técnicos até o município de Rio Preto da Eva (AM) para atendimento à população infectada em uma Unidade Básica de Saúde Dr Hamilton Cidade. Neste momento, será realizada a coleta de material biológico (sangue, escarificação e biópsia da lesão). Para cada paciente, será aplicado um questionário epidemiológico e a realização de exame clínico dos pacientes que aceitarem participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Posteriormente, todo material será levado ao Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório de Histologia Funcional da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) para o armazenamento e processamento das amostras. Serão realizados os testes de diagnóstico parasitológico em meio de cultivo e infecção de hamsters para acompanhar o crescimento dos parasitos. Além disso, serão realizados testes bioquímicos para identificação da espécie de Leishmania e testes imunológicos para avaliar a resposta imune frente às diferentes formas clínicas da infecção. Com recursos próprios do grupo de pesquisa, serão realizados os ensaios imunológicos. Serão incluídos 20 indivíduos sem tratamento prévio, 20 pacientes após tratamento com Glucantime® (Controle positivo) e 20 indivíduos sadios (controle negativo), totalizando n= 60

**Endereço:** Rua Teresina, 495

**Bairro:** Adrianópolis

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3305-1181

**CEP:** 69.057-070

**E-mail:** cep.ufam@gmail.com