

ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ

**ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA AS LEISHMANIOSES CUTÂNEA
E VISCERAL: DA DESCOBERTA AO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

**Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.**

Supervisora: Profa. Dra. Marcia A. S. Graminha

Convênio FINEP 01.23.0034.00 - Ref. Finep nº 0419-22

Araraquara, SP

2025

Estudo e identificação de compostos ativos contra as leishmanioses cutânea e visceral: da descoberta ao estudo pré-clínico

RESUMO

As leishmanioses, causadas por mais de 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*, são reconhecidas como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A escassez de opções terapêuticas eficazes, juntamente com a variedade de efeitos colaterais e o surgimento de cepas resistentes, destaca a necessidade urgente de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas moléculas com alvos moleculares específicos, para melhorar o tratamento dessas e outras doenças negligenciadas. Nesse cenário, o grupo de pesquisa *InovaLeish* tem se dedicado a descobrir compostos com atividade leishmanicida, empregando estratégias como o planejamento racional de fármacos baseados no alvo, triagens fenotípicas e reposicionamento de medicamentos. Nos últimos anos, o grupo identificou diversas moléculas furoxânicas e guanidínicas com promissor potencial leishmanicida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O foco dessas pesquisas tem sido o desenho de inibidores específicos para a enzima cisteíno protease B (LmCPB2.8ΔCTE - CPB) de *Leishmania* que é essencial para a sobrevivência e virulência do parasita. A partir dessas descobertas, novos derivados desses compostos foram sintetizados com o objetivo de melhorar o processo de inibição enzimática e por tanto aumentar a seletividade da molécula. Este relatório apresenta os resultados obtidos desses novos compostos, incluindo nitroimidazooxazóis, hidrazonas e guanidinas conjugadas com peptídeos antimicrobianos, que foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a atividade da CPB, assim como sua atividade leishmanicida, citotóxica e sua seletividade. Entre os compostos testados, os bioconjugados peptídicos, especialmente o peptídeo dimérico, demonstrou uma inibição significativa da enzima. Além disso, esses compostos mostraram-se relativamente seguros para macrófagos peritoneais de camundongos e revelaram potencial atividade anti-parasitária contra as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania in vitro*, que são clinicamente relevantes. Com base nesses resultados promissores, e considerando as contribuições dos demais integrantes do grupo *InovaLeish*, foram realizados ensaios *in vivo* em modelo animal Balb/c infectado com *L. infantum*, utilizando a molécula denominada PEP01 para tratamento por via oral, administrada uma vez ao dia durante cinco dias consecutivos, na dose de 0,77 mg/kg/dia. Como resultado, observou-se uma redução da carga parasitária de aproximadamente 40% no fígado e 50% no baço, demonstrando o potencial dessa molécula e indicando a viabilidade de realizar modificações estruturais e planejamento racional visando aprimorar sua atividade leishmanicida.

1. INTRODUÇÃO

Infecções provocadas por organismos da família Trypanosomatidae, pertencentes à ordem Kinetoplastida, afetam milhões de pessoas globalmente, particularmente em comunidades empobrecidas e marginalizadas da América Latina, África e Ásia. Essas regiões frequentemente são ignoradas tanto pela indústria farmacêutica quanto pelos governos (Sülsen et al., 2008). Entre as 17 doenças consideradas negligenciadas (DNs) pela Organização

Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses se destacam por serem extremamente carentes de novos tratamentos há décadas e estão amplamente distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, como América, Europa, África e Ásia. Estas doenças são causadas por pelo menos 20 espécies distintas de *Leishmania* e são transmitidas por mais de 90 espécies de insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. De acordo com a OMS, há uma estimativa de 1,3 milhões de novos casos de leishmanioses e entre 20.000 a 30.000 mortes anualmente (WERNECK, 2010; WORD..., 2017a). As manifestações clínicas e a gravidade da doença variam conforme a espécie do parasita, a genética e o estado imunológico do indivíduo, como é o caso de pacientes com sistema imunológico comprometido pelo HIV (Cunningham, 2002; Rogers et al., 2002). As formas clínicas principais incluem a leishmaniose visceral (LV), que pode ser fatal sem tratamento, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose muco-cutânea (LMC). Os países da América Latina, incluindo o Brasil, são os que concentram a maior parte dos casos de LC e LMC (Alvar et al., 2012).

Os parasitas *Leishmania* apresentam duas formas principais: promastigotas (a forma flagelada encontrada em flebotomíneos e em cultivo) e amastigotas intracelulares (a forma não flagelada, que se multiplica dentro dos fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro mamífero) (Herwaldt, 1999). Os cães são um dos principais reservatórios do parasita, o que aumenta o risco de transmissão para os humanos (Burza et al., 2018).

Durante décadas, os antimoniais pentavalentes foram a primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, mas apresentam alta toxicidade. Como alternativas, a anfotericina B (AmpB) desoxicolato e a miltefosina são usadas como tratamento sistêmico. A administração dos antimoniais pentavalentes enfrenta desafios, como a necessidade de internação devido à administração parenteral e uma taxa de nefrotoxicidade que pode exceder 50%. A formulação lipídica da AmpB é uma opção terapêutica, embora seu custo elevado seja uma limitação significativa (Melo & Fortaleza, 2013). Atualmente, a paromomicina 10% em gel é usada para tratar a LC e está avançando para o tratamento da LV (Santos et al., 2008). Dado o caráter altamente tóxico e a eficácia variável dos tratamentos disponíveis (Burza et al., 2018), é urgente a busca por novos medicamentos com alvos específicos.

A descoberta de novas moléculas bioativas, por meio de triagens fenotípicas ou baseadas em alvos, e a compreensão dos mecanismos de ação são cruciais para aprimorar compostos protótipos e aumentar as chances de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos (Katsuno et al., 2015). O grupo interdisciplinar *InovaLeish* tem se dedicado intensamente à identificação de compostos antileishmaniais usando várias abordagens, como o planejamento racional de fármacos baseado em alvos, reposicionamento de fármacos, modificação molecular e exploração de novos princípios ativos encontrados na natureza. Entre os protótipos com eficácia comprovada em modelos animais para LV e LC, destacam-se o furoxano 14e, que reduz a carga parasitária em hamsters infectados com *L. infantum* (~50% no fígado e baço) após administração intraperitoneal. A atividade leishmanicida do 14e está ligada à inibição da cisteína protease B (CPB) e à liberação de óxido nítrico. Melhorias na estrutura do 14e resultaram no composto 4f, que se mostrou eficaz no tratamento oral da LV, reduzindo a carga parasitária em ~90% em camundongos infectados com *L. infantum* após um breve tratamento de cinco dias. Estudos indicam que o 4f inibe a CPB e induz estresse oxidativo no parasita,

levando à sua morte. Outros protótipos promissores da classe das guanidinas também foram eficazes na redução da carga parasitária (~80%) em camundongos infectados com *L. amazonensis*, e também inibiram a CPB do parasita (do Espírito Santo et al., 2019; Moreira et al., 2022).

Baseado nesses resultados, o *InovaLeish* pretende identificar novos derivados dessas moléculas que atendam aos seguintes critérios para tratamento oral das leishmanioses em modelos animais:

- A química sintética deve permitir a expansão em série, facilitando a rápida avaliação de novos compostos.
- O lead deve ter propriedades físico-químicas adequadas, incluindo (1) solubilidade em PBS >10µM para evitar problemas na formulação; (2) lipofilicidade adequada e (3) valores de LogP <5, com valores ideais abaixo de 3.
- O lead precisa ter uma potência *in vitro* aceitável, com atividade anti-amastigota igual ou menor que 10µM.
- O lead deve ser pelo menos 100 vezes mais seletivo para o parasita em comparação com as células de mamíferos.
- O lead deve ter perfis farmacocinéticos e metabólicos gerenciáveis, incluindo estabilidade microsomal e de hepatócitos, boa permeabilidade da membrana e sem inibição do citocromo P450.
- O lead deve ser eficaz por via oral em modelos de doença, com boa biodisponibilidade oral em roedores (F>25%).
- O lead precisa passar por uma avaliação inicial de segurança com base no alvo (ortólogo), com estudos *in silico* e *in vitro* para garantir baixa toxicidade.
- A avaliação de segurança deve incluir ortólogos humanos e parálogos conhecidos da enzima ou receptor alvo, com testes conforme o tamanho da família genética e os riscos de segurança.
- O lead não deve conter grupos reativos indesejáveis ou características químicas associadas à formação de produtos tóxicos.
- O lead não deve causar toxicidade aguda em estudos de eficácia *in vivo*. Para modelos murinos infectados com *Leishmania infantum*, o tratamento com o candidato deve resultar em uma redução superior a 70% da carga parasitária no fígado após pelo menos 5 doses de 50mg/kg administradas oralmente uma ou duas vezes por dia.

Além disso, informações adicionais obtidas em estudos *in vivo* são importantes para entender melhor a resposta imune ao tratamento. No entanto, essas informações ainda são fragmentadas, e modelos laboratoriais, como ratos, podem não ser ideais, já que a dicotomia Th1/Th2 não

parece estar presente nos hospedeiros reais da LV (Olías-Molero et al., 2021). Análises futuras serão essenciais para obter uma compreensão mais completa.

Neste relatório, destaca-se a obtenção do peptídeo protótipo PEP01, que apresenta características promissoras para o desenvolvimento de novas moléculas planejadas a partir de sua estrutura inicial, com potencial leishmanicida e possibilidade de uso por via oral no tratamento das leishmanioses. Em ensaios *in vitro*, o PEP01 mostrou-se seletivo para o parasita e não tóxico para células de mamíferos. Já nos ensaios *in vivo*, utilizando o modelo animal Balb/c infectado com *L. infantum*, o composto promoveu redução significativa da carga parasitária, sem evidências aparentes de toxicidade hepática ou renal, reforçando seu potencial como intermediário para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos.

2. OBJETIVO

O presente trabalho visou avaliar a atividade anti-leishmanial de uma série de derivados de N-acil-hidrazonas, nitroimidazooxazóis e peptideomiméticos contendo os núcleos nitroimidazooxazol e nitroimidazoxazina, e seu possível potencial como inibidores da enzima cisteíno protease (CPB) de *Leishmania* para a identificação de moléculas com potencial eficácia oral *in vivo* frente a modelo animal infectado com *Leishmania* spp.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongo Swiss (CC₅₀) de uma série de derivados de nitroimidazooxazóis, hidrazonas, bioconjugados peptídicos;
- *Screening in vitro* de derivados de nitroimidazooxazóis, hidrazonas e bioconjugados peptídicos frente a formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. infantum* (IC₅₀);
- Determinação do índice de seletividade (IS= CC₅₀/IC₅₀) (Bollini et al., 2009) das moléculas;
- Análise da inibição da CPB de *Leishmania* na presença de derivados de nitroimidazooxazóis, hidrazonas e bioconjugados peptídicos.
- Avaliação *in vivo* em modelo animal Balb/c infectado com *L. infantum* da molécula mais promissora identificada nos ensaios *in vitro* com tratamento por via oral
- Determinação da Carga Parasitaria dos animais após o tratamento oral
- Avaliação dos níveis dos marcadores bioquímicos de função hepática e renal dos animais tratados com a molécula mais promissora após tratamento oral
- Determinação da dose letal utilizando modelo alternativo *Galleria mellonella*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Formas promastigotas da cepa MPRO/BR/1972/M1841-LV-79 de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (Fernandes & Castellani, 1966) pH 7,2; e as formas promastigotas da cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 de *L. infantum* foram cultivadas em meio 199. Os meios de cultura foram suplementados com 25 mg/L de Haemin (ICN); 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab); estreptomicina/penicilina (100 mg/mL; 100 µM/mL) e as culturas de parasitas foram mantidas em estufa a 26°C, até a fase logarítmica tardia de crescimento (1×10^7 parasitos/mL), para a realização dos bioensaios de atividade anti-amastigota (Clementino et al., 2018; Velásquez et al., 2016, 2017).

3.2 Moléculas

A síntese dos compostos, realizada pelo grupo *Lapdesf* da FCFAr associado ao grupo *InovaLeish* realizou a síntese dos derivados, a qual foi dividida em três séries estruturais, considerando a diferença química entre as moléculas. A primeira série (Série A) consistiu na síntese dos derivados nitroimidazooxazóis. A segunda série (Série B), consistiu na síntese dos derivados hidrazonas, sendo estes para inibição da forma amastigota dos parasitas *L. infantum* e *L. amazonensis*. A terceira série (Série C), consiste da síntese dos derivados peptideomiméticos contendo os núcleos nitroimidazooxazol e nitroimidazoxazina em etapa de obtenção dos intermediários.

3.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo

Para a obtenção de macrófagos peritoneais foi injetada uma solução de tioglicolato de sódio a 3%, via intraperitoneal, em camundongos *Swiss* de acordo com a metodologia previamente estabelecida (Velásquez et al., 2017). Seguidamente, 5×10^5 células/mL foram semeadas em placas para a aderência das células em estufa a 37°C com 5% CO₂-ar em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e estreptomicina/penicilina (100 mg/mL; 100 µM/mL), contendo concentrações decrescentes dos diferentes compostos (500 – 5 µM), a um volume final de 100 µL por poço, por 24 h. Logo após o período de incubação a viabilidade celular foi mensurada por meio do ensaio colorimétrico do MTT de acordo com (Velásquez et al., 2016) com algumas modificações (Clementino et al., 2021). A partir dos dados de absorbância medida, que é diretamente proporcional ao percentual de macrófagos vivos, o valor da atividade citotóxica das moléculas na qual o 50% das células se vê afetada pelo tratamento (CC₅₀) foi determinado. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.4 Avaliação da atividade anti-amastigota

A avaliação da atividade antileishmanial das moléculas frente às formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *L. amazonensis* foram realizadas de acordo com a metodologia previamente estabelecida por (Clementino et al., 2021; Velásquez et al., 2016). Em resumo, macrófagos peritoneais de camundongo em meio RPMI 1640 foram semeados a uma densidade de 5×10^5 células/mL (500 µL de volume final) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13mm. Após 6 h de incubação a 37°C e 5% CO₂-ar para a aderência dos macrófagos, as formas promastigotas de *L. infantum* ou *L. amazonensis* na fase estacionária de

crescimento (6-7 dia) foram adicionadas aos poços numa proporção de 1:10 ou 1:5 (macrófagos: promastigotas), respectivamente. Após, 18h de infecção foi realizada uma lavagem com PBS 1X para retirada dos parasitos não internalizados e adicionado meio fresco contendo concentrações decrescentes dos compostos (30 – 0.94 μ M). As placas foram incubadas por 24h a 37°C e 5% CO₂-ar. Como controles foram usados macrófagos não infectados e macrófagos infectados sem tratamento. A Miltefosina foi utilizada como controle positivo. Após a incubação com os compostos, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A concentração na qual inibe-se o crescimento de 50% das amastigotas intracelulares (IC₅₀) foi obtida pela contagem do número de amastigotas intracelulares presentes em 100 macrófagos em duplicata de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Adicionalmente, foi determinado o valor do índice de infecção que é calculado pela multiplicação da porcentagem de células infectadas e a média do número de amastigotas por macrófago infectado. Assim como também foi determinado o valor do índice de seletividade ($IS = CC_{50\text{-macrofagos}}/IC_{50\text{-Leishmania}}$).

3.5 Ensaio enzimático - CPB

O ensaio de avaliação da inibição da atividade enzimática da CPB pelas moléculas foi realizado de acordo com metodologia previamente estabelecida com algumas modificações (Clementino et al., 2021; Moreira et al., 2022). Em resumo, a uma solução contendo 100 mM de buffer de acetato pH 5,5, 200 mM NaCl, 0,01% v/v Triton X-100 e 2 mM DTT foram adicionados 7 nM CPB a 37 °C em placas pretas de 96 poços. A seguir a enzima foi incubada por 2 min com os inibidores selecionados antes da adição do substrato 4 μ M Z-FR-AMC. A reação foi monitorada por 5 min através da emissão de fluorescência a 460nm (excitação 380 nm) a qual é proporcional a hidrólises do substrato. Todos os compostos foram avaliados a 20 μ M, e os compostos capazes de inibir a enzima a 20 μ M (inibição < 20 μ M) foram selecionados e testados novamente a 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,62 μ M e 0,3 μ M para determinar os valores de EC₅₀ (Concentração inibitória efetiva ao 50% frente a enzima). Cada experimento foi realizado em duplicata. Como controle foi realizado o mesmo procedimento na ausência de inibidor. Os resultados foram expressos como média e SD de dois experimentos independentes.

3.6. Ensaio de estabilidade em soro ativo e pH 2

Para avaliar a estabilidade do composto 1 (denominado PEP01), foi realizado um ensaio de degradação em soro sanguíneo humano e em solução com pH 2. O soro humano foi utilizado para simular potenciais interações entre o composto e os componentes sanguíneos. Como o ensaio in vivo (descrito posteriormente) envolveu administração oral por gavagem, foi necessário avaliar a degradação do composto em condições gástricas. O ensaio foi adaptado da metodologia descrita por Santos-Filho (2017), com modificações. Resumidamente, foram preparadas soluções estoque da molécula (1 mg/mL em PBS, pH 7,4) e uma solução de soro a 25% (v/v) diluída em PBS. Volumes iguais (100 μ L) de cada solução foram misturados e incubados a 37 °C. Os tempos de amostragem para análise de degradação foram definidos em 0 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h.

Em cada ponto de tempo, 100 μ L de etanol a 96% foram adicionados para interromper a reação, seguido de centrifugação a 1000 g por 2 min. O sobrenadante resultante foi analisado por HPLC

analítico em modo analítico, com coluna C18 (25 cm × 10 mm) e eluição utilizando um gradiente de 5 a 95% de solvente B (acetonitrila com 0,036% de TFA) e solvente A (água com 0,045% de TFA) ao longo de 30 min, com vazão de eluente de 1 mL min⁻¹. O sobrenadante restante foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado para análise futura de produtos de degradação por espectrometria de massas na configuração ESI-IT-MS (LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific), com um analisador de armadilha de íons em modo de eletrospray positivo (M+H)⁺ e uma faixa de 200–2000 g mol⁻¹. Os resultados foram expressos com base no perfil de degradação da molécula ao longo do tempo.

3.7. Avaliação da toxicidade em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

O ensaio de dose letal em *Galleria mellonella* foi realizado conforme descrito por (Silva et al 2024), com pequenas modificações. Larvas de coloração clara sem melanização, medindo 2–3 cm de comprimento e pesando entre 180–300 mg, foram selecionadas e incubadas a 37 °C sem alimento por 24 h antes do experimento. As larvas foram divididas aleatoriamente em seis grupos de dez indivíduos cada e injetadas na proleg direita usando uma seringa de insulina com 10 µL das respectivas soluções: PBS (G1), PBS com 6% DMSO (G2) e PEP-01 (17,1 µg) em 6% DMSO (G3). Após o tratamento, as larvas foram mantidas a 37 °C em placas de Petri e monitoradas diariamente por cinco dias. O estado de saúde foi avaliado com base no Sistema de Pontuação do Índice de Saúde (1-10), que considera a mobilidade larval, a formação do casulo, a melanização e a sobrevivência, conforme descrito por Loh (2013). Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism em pelo menos três experimentos independentes.

3.8. Avaliação da eficácia e segurança *in vivo* do composto 1 em modelo murino de leishmaniose visceral

A eficácia antileishmanial *in vivo* do composto 1 foi avaliada usando como modelo murino camundongos BALB/c machos (6 semanas de idade, 27 ± 1,1 g; CEMIB-UNICAMP) infectados via intraperitoneal com 100 µL (1 × 10⁸) de promastigotas de *Leishmania infantum* em fase estacionária. Após 15 dias de progressão da infecção, os animais foram tratados com PEP-01 por gavagem oral, uma vez ao dia por cinco dias consecutivos, na dose de 0,77 mg/kg/dia. A dosagem foi extrapolada com base na IC₅₀ do composto e na relação volume sanguíneo/peso corporal murino (Clementino et al., 2021). O medicamento de referência miltefosina (Cayman Chemical®) foi administrado sob o mesmo esquema na dose de 7,7 mg/kg/dia (Clementino et al., 2021). Os controles negativos incluíram camundongos infectados, não tratados e camundongos infectados tratados com PBS (veículo). As soluções de trabalho foram preparadas recentemente em PBS antes da administração. Os animais tratados com miltefosina serviram como grupo de controle positivo. Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados, e tecidos do fígado e do baço foram coletados para quantificação da carga parasitária. Além disso, sangue cardíaco também foi coletado após a eutanásia para avaliar a toxicidade sistêmica. Marcadores bioquímicos da função hepática e renal — AST, ALT, ALP, creatinina, ureia e bilirrubina total — foram analisados. Impressões

dos tecidos coletados foram preparadas em lâminas de vidro, coradas com Giemsa e analisadas em microscopia de luz. A carga parasitária foi expressa em Unidades *Leishman*-Donovan (LDU), calculadas como o número de amastigotas por 1.000 núcleos de células hospedeiras por grama de tecido, seguindo o método descrito por Stauber (1958), Sousa-Batista (2018) e Kwofie (2019). Os resultados da carga parasitária foram expressos como média $\pm$ EPM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividades biológicas de derivados de dipeptidil nitrila: citotoxicidade, inibição enzimática da CPB e atividade anti-amastigota contra *L. infantum* e *L. amazonensis*.

A citotoxicidade de uma série de 9 derivados de dipeptidil nitrila, Figura 1, foi avaliada contra macrófagos peritoneais murinos (CC_{50}), conforme reportado na Tabela 1. Os resultados apresentados indicam que estes derivados não são citotóxicos na concentração máxima testada (300 μ M) nas células murinas em comparação com o fármaco de referência utilizado para o tratamento das leishmanioses, a miltefosina ($88,2 \pm 5,3 \mu$ M).

O efeito dos derivados de dipeptidil nitrila na atividade da cisteína protease recombinante LmCPB2.8 Δ CTE, avaliado pelo ensaio de inibição enzimática dose-resposta, demonstrou atividade inibitória frente a enzima CPB de *Leishmania*. Destacam-se os compostos 1 e 6 que apresentaram as maiores porcentagens de inibição (≈ 84 e 93%, respectivamente) na concentração máxima testada (20 μ M).

A atividade anti-amastigota dos derivados testados frente a *L. infantum* e *L. amazonensis* é apresentada na Tabela 1. Os resultados demonstram que os compostos 1-3, 6 e 7 apresentam atividade antileishmanial contra as formas amastigotas intracelulares — o estágio clinicamente mais relevante do parasita — de *L. amazonensis*, enquanto os compostos 1, 4 e 8 apresentam atividade contra *L. infantum*. Contudo, só o composto 1 ($EC_{50} = 4,6 \pm 1,6$ e $3,9 \pm 0,5$ para *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente) cumpre o critério da DNDi que indica que um composto é considerado um lead se seu valor de EC_{50} é menor que 10 μ M.

Por outro lado, os compostos 4 e 8 (Figura 1), que apresentaram uma atividade relevante frente a *L. infantum* ($EC_{50} = 14,7 \pm 3,2$ e $18,8 \pm 4,0 \mu$ M, respectivamente), contêm um grupo fluorofenil em suas estruturas, o que sugere que essa modificação favoreceu sua atividade leishmanicida em comparação ao observado frente a *L. amazonensis* ($EC_{50} > 30 \mu$ M). Não obstante, a troca do anel aromático e a adição de diferentes substituintes na posição -Para deste anel não incrementaram sua atividade leishmanicida quando comparado ao composto 1, que mostrou ser o mais potente e mais seletivo frente a ambas as espécies de *Leishmania* (SI ≈ 65 para *L. amazonensis* e SI ≈ 77 para *L. infantum*), com uma alta inibição enzimática (*L. amazonensis* - EC_{50} : 4,6 μ M; *L. infantum* - EC_{50} : 3,9 μ M), demonstrando a eficácia do desenho de fármacos baseados no alvo devido à forte correlação entre a inibição da CPB e a atividade antiamastigota. Destaca-se ainda, que o composto 1 demonstrou aproximadamente o dobro da potência do medicamento de referência miltefosina contra *L. infantum*, conforme indicado por um valor de EC_{50} duas vezes menor ($3,9 \pm 0,5 \mu$ M vs. $7,8 \pm 0,1 \mu$ M) e um índice de seletividade cerca de sete vezes maior (SI ≈ 77 vs. SI ≈ 11). Isto posto, sugere que a eficácia e seletividade

aprimoradas em relação ao medicamento de referência são um indicativo do potencial desta molécula para estudos *in vivo* e possíveis modificações estruturais para aprimorar sua atividade.

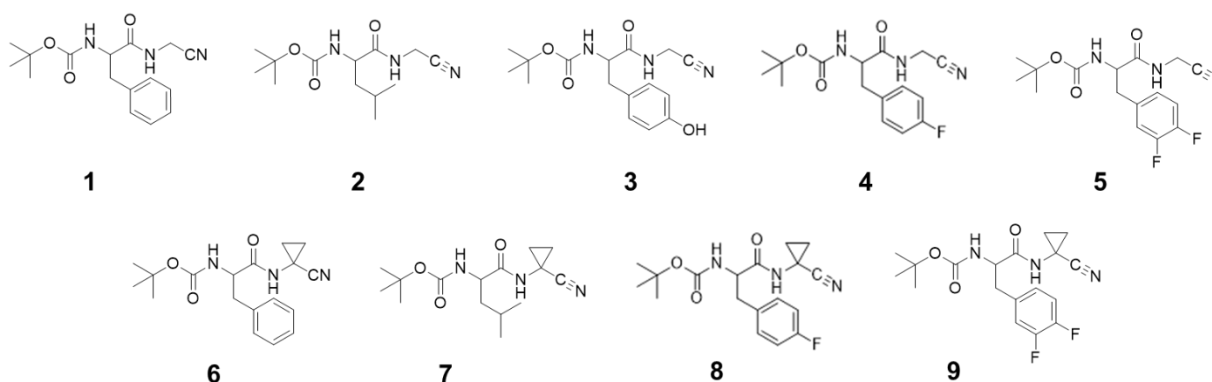
Tabela 1. Citotoxicidade em células de mamíferos (CC₅₀), inibição da enzima CPB (IC₅₀) de *Leishmania* e atividades antileishmanial (IC₅₀-AMA) dos derivados de dipeptidil nitrila. Os dados são expressos como médias ± desvios-padrão (DP) de três experimentos independentes (P < 0,05). La: *Leishmania amazonensis*; Li: *Leishmania infantum*. Índice de Seletividade (IS=CC₅₀/EC₅₀-AMA) destacado em negrito. NA = nenhuma atividade inibitória observada na concentração máxima testada 20 µM.

Compostos	% inibi. CPB (20 µM)	IC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ -ama (IS)	
				La	Li
1	83,9 ± 2,2	4,3 ± 0,2	> 300	4,6 ± 1,6 (~ 65)	3,9 ± 0,5 (~ 77)
2	56,7 ± 3,8	> 20	> 300	14,6 ± 0,3 (~ 21)	> 30 (~ 10)
3	35,1 ± 3,2	> 20	> 300	21,6 ± 1,0 (~ 14)	> 30 (~ 10)
4	41,5 ± 7,6	> 20	> 300	> 30 (~ 10)	14,7 ± 3,2 (~ 20)
5	36,8 ± 6,7	> 20	> 300	> 30 (~ 10)	> 30 (~ 10)
6	93,2 ± 0,9	0,8 ± 0,1	> 300	23,0 ± 1,7 (~ 13)	> 30 (~ 10)
7	39,1 ± 4,9	> 20	> 300	12,3 ± 1,7 (~ 24)	> 30 (~ 10)
8	48,3 ± 0,7	> 20	> 300	> 30 (~ 10)	18,8 ± 4 (~ 16)
9	31,7 ± 4,6	> 20	> 300	> 30 (~ 10)	> 30 (~ 10)
Miltefosina*	NA	NA	88,2 ± 5,3	5,4 ± 0,3 (~ 16)	7,8 ± 0,1 (~ 11)
E64**	99,4 ± 5,0	< 0,3	NA	NA	NA

*A miltefosina foi usada como controle para *L. amazonensis* (La) e *L. infantum* (Li);

**E64 foi usado como inibidor de controle para CPB.

Figura 1. Estruturas químicas dos derivados de dipeptidil nitrila com atividade anti-leishmanial.



4.2. Avaliação da toxicidade em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

Larvas de *G. mellonella*, usadas como modelo alternativo ao uso de animais, permitem a avaliação pré-clínica de moléculas para garantir que os candidatos a leads não apresentem toxicidade frente a organismos mais complexos aos utilizados inicialmente nos *screening in vitro* com células de mamífero. Neste estudo, *G. mellonella* foi utilizada para avaliar a dose letal do composto 1 (95 mg/Kg/dia). Para isso, foi atribuída uma pontuação do estado de saúde das larvas de acordo com o Sistema de Pontuação do Índice de Saúde (1 a 10), que analisa quatro principais características observadas: mobilidade larval, formação de casulos, melanização e sobrevivência. Após os testes, observou-se que os animais inoculados com composto 1 (DMSO 6%) mantiveram os aspectos de mobilidade, formação de casulos, melanização e sobrevivência, sem causar mortes, conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3. Estes dados sugerem que o composto 1 não é tóxico na dose letal testada.

Figura 2. Estado de saúde das larvas de *Galleria mellonella* após 5 dias de tratamento com o composto 1 (PEP01). Os dados expressos neste gráfico foram analisados utilizando o software Graph Prism em triplicata independente.

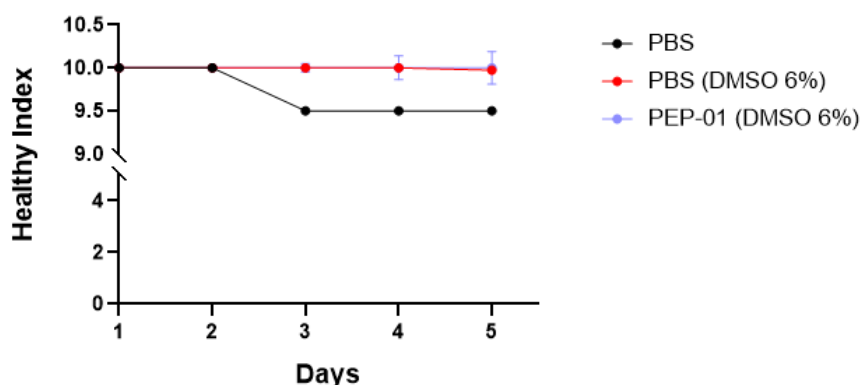
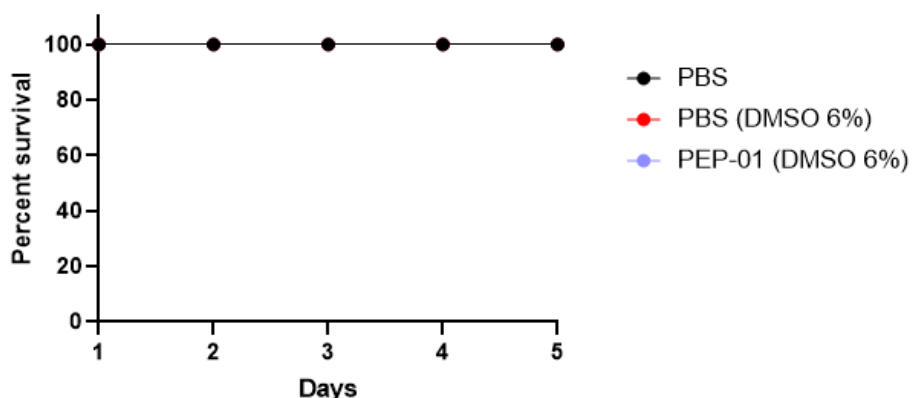


Figura 3. Porcentagem de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* durante os 5 dias de tratamento com o composto 1 (PEP01). Os dados expressos neste gráfico foram analisados utilizando o software Graph Prism em triplicata independente.



4.3. Avaliação da eficácia e segurança *in vivo* em modelo experimental de leishmaniose visceral em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* tratados com composto 1.

A avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do composto 1 foi realizada considerando os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, como atividade inibitória da CPB, baixa citotoxicidade, alta potência contra amastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, bem como os bons resultados obtidos em estudos adicionais, ADME *in silico* (Anexo I), no qual o composto resultou ser drogável, hidrossolúvel, moderadamente lipofílico e atender aos parâmetros farmacocinéticos, o que o faz um bom candidato para ser utilizado por via oral; adicional aos resultados obtidos no ensaio de dose letal *in vivo* em *Galleria mellonella*. Camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, espécie causadora da leishmaniose visceral, 20 dias após a infecção, foram tratados oralmente por 7 dias, uma vez ao dia, com o composto 1. Após esse período, os animais foram eutanasiados, baço e fígado coletados, e a carga parasitária desses órgãos foi determinada por diluição limitante e índice LDU. Adicionalmente, análises dos biomarcadores hepáticos e renais foram realizados utilizando o soro coletado do sangue dos animais ao final do estudo para verificar danos ao fígado e aos rins dos animais. Após o tratamento, verificou-se que o Composto 1 apresentou redução da carga parasitária de aproximadamente 41% no fígado dos animais, utilizando o método de diluição limitante (Figura 4), quando comparado ao grupo de animais infectados não tratados, corroborando os resultados obtidos utilizando a metodologia do índice LDU, que apresentou uma redução de 44% (Figura 6). No baço dos animais, por sua vez, os resultados indicaram que a carga parasitária foi reduzida em 47% quando avaliado utilizando o método de diluição limitante (Figura 5) e 55% para o índice LDU (Figura 7). Adicionalmente, não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao fármaco de referência. Contudo, os animais tratados com miltefosina apresentaram uma redução da carga parasitaria de 32% e 51% utilizando o método de diluição limitante (Figuras 4 e 5), e redução de 65% e 52% utilizando o índice LDU (Figuras 6 e 7), no fígado e no baço, respectivamente,

Figura 4. Quantificação da carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* pelo método de diluição limitante. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) dos animais infectados tratados por 7 dias em diferentes grupos, a saber: infectados, não tratados, Miltefosina (7,7 mg/kg/dia), Composto 1 (0,77 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais infectados, não tratados, e aqueles tratados com Miltefosina e Composto 1 ($p < 0,05$).

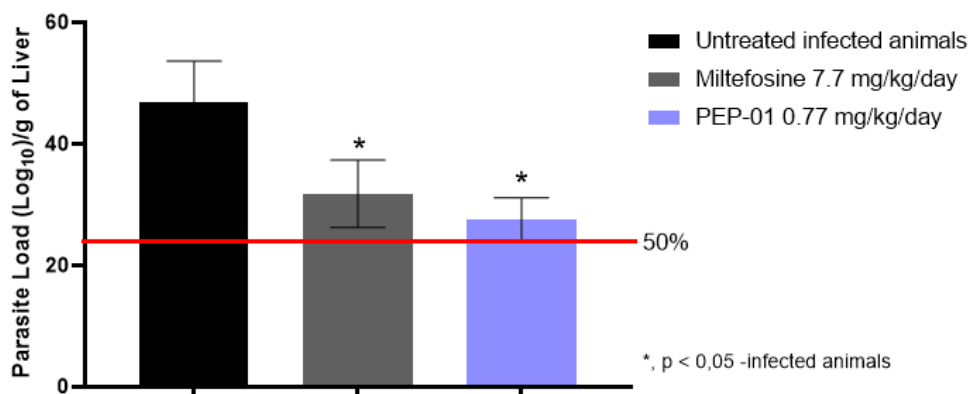


Figura 5. Quantificação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* pelo método de diluição limitante. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos animais infectados tratados por 7 dias em diferentes grupos, a saber: infectados, não tratados, Miltefosina (7,7 mg/kg/dia), Composto 1 (0,77 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais infectados, não tratados, e aqueles tratados com Miltefosina e Composto 1 ($p < 0,05$).

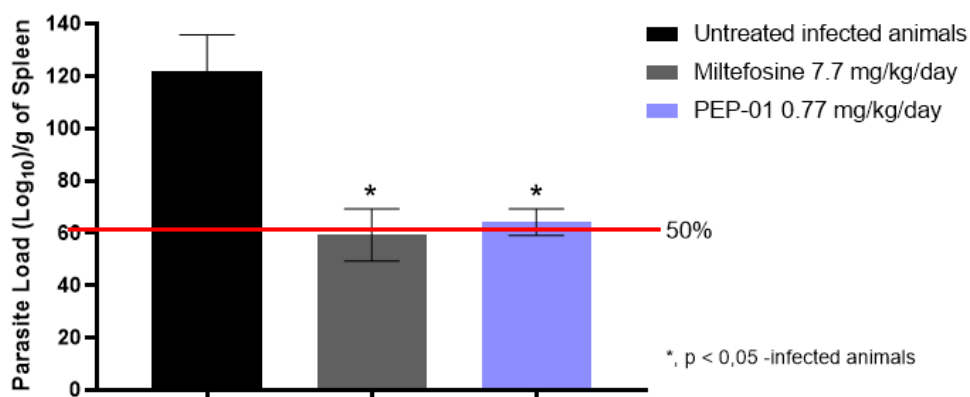


Figura 6. Quantificação da carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* utilizando o índice LDU. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) dos animais infectados tratados por 7 dias em diferentes grupos, a saber: infectados, não tratados, Miltefosina (7,7 mg/kg/dia), Composto 1 (0,77 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais infectados, não tratados, e aqueles tratados com Miltefosina e Composto 1 ($p < 0,05$).

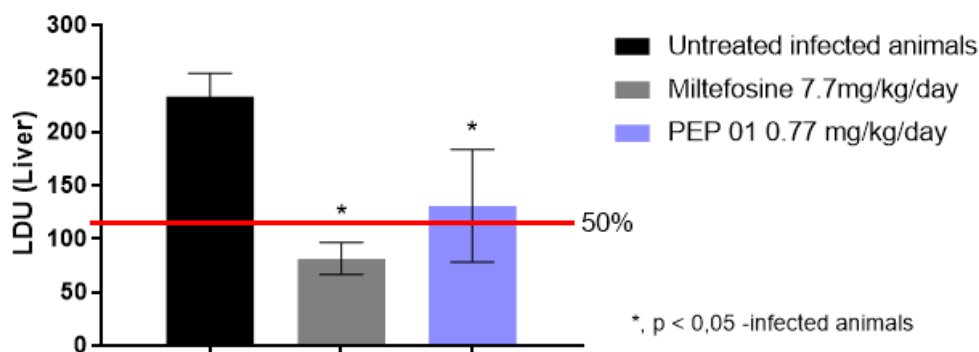
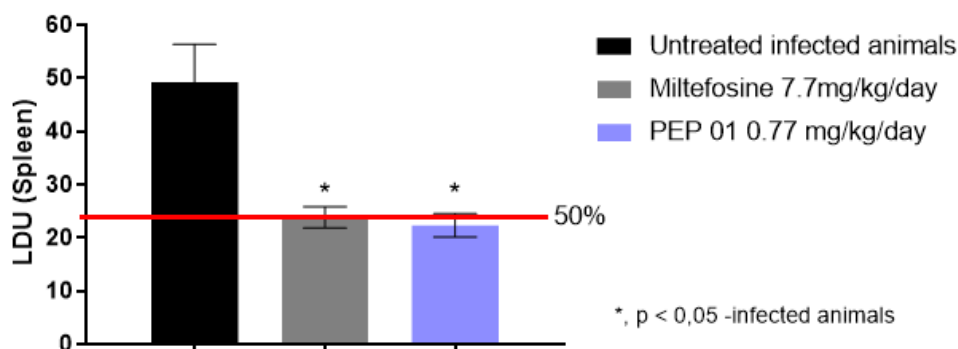


Figura 7. Quantificação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* utilizando o índice LDU. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) dos animais infectados tratados por 7 dias em diferentes grupos, a saber: infectados, não tratados, Miltefosina (7,7 mg/kg/dia), Composto 1 (0,77 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais infectados, não tratados, e aqueles tratados com Miltefosina e Composto 1 ($p < 0,05$).

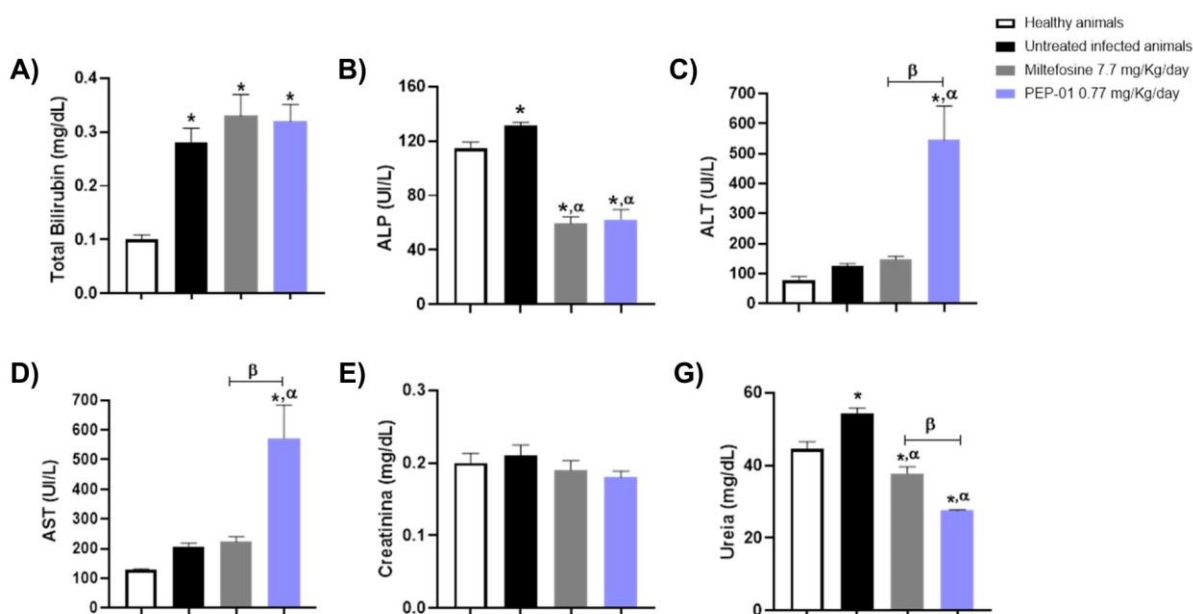


As análises dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais indicaram que os animais infectados e não tratados apresentaram aumento nos níveis de bilirrubina total (Figura 8A), acompanhado de elevação da fosfatase alcalina -ALP- (Figura 8B). Por outro lado, nos animais infectados e tratados com o composto 1, observou-se aumento da bilirrubina total, porém com redução nos níveis de ALP. Esse padrão sugere que o distúrbio está mais relacionado a uma lesão hepatocelular do que a um processo colestático. Como a ALP tende a se elevar em casos de obstrução biliar ou colestase, a sua redução ou manutenção em níveis normais indica ausência de obstrução significativa dos canais biliares. Assim, os resultados apontam para uma possível disfunção hepática associada ao comprometimento metabólico esperado em decorrência da infecção (Figura 8).

Para os níveis de ALT e AST, o grupo tratado com o Composto 1 apresentou um aumento destes dois biomarcadores em comparação aos níveis obtidos para os animais saudáveis e infectados com *L. infantum*. A literatura sugere que níveis aumentados desses biomarcadores podem indicar lesão hepática e, portanto, o composto 1 pode induzir hepatotoxicidade (Figura 8C e 8D).

Em relação aos marcadores bioquímicos relacionados com a função renal (Creatinina e Ureia, Figura 8E e 8F), os grupos infectados e tratados com o composto 1 apresentaram níveis normais de creatinina e uma diminuição significativa dos níveis de ureia. Este último achado sugere que a diminuição dos níveis de ureia pode estar associada a uma causa pré-renal, que pode induzir uma alteração metabólica leve, com ausência de disfunção renal (Figura 8F).

Figura 8. Níveis plasmáticos de biomarcadores de função hepática e renal em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. infantum* após 5 dias de tratamento como Composto 1 e a miltefosina. (A) Bilirrubina total, (B) ALP, (C) ALT, (D) AST, (E) Creatinina, (F) Ureia. Os dados são expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com animais não infectados (animais saudáveis); α : diferença estatisticamente significativa com animais infectados e não tratados; β : diferença estatística entre os grupos tratados com o fármaco de referência. ($p < 0,05$).



5. CONCLUSÕES

O composto 1 é capaz de inibir ~85% da atividade enzimática da enzima CPB de *Leishmania* e cumpre com as recomendações do DNDi associadas a atividade *in vitro* de moléculas candidatas para estudos *in vivo* ($IC_{50} < 10 \mu M$; $SI > 10$).

Animais tratados via oral, por 5 dias, com o composto 1 apresentaram uma diminuição da carga parasitária de 40% a 50% nos órgãos afetados com uma dose 10 vezes menor (0,77 mg/Kg/day) a utilizada com o fármaco convencional para o tratamento (Miltefosina). Contudo este composto pode afetar a função hepática sem induzir um comprometimento da função renal, o que sugere seu alto potencial como protótipo para o desenho racional de fármacos baseados no alvo.

6. REFERÊNCIAS

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Bollini, M., Casal, J. J., Alvarez, D. E., Boiani, L., González, M., Cerecetto, H., & Bruno, A. M. (2009). New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(4), 1437–1444. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.011>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Clementino, L. da C., Fernandes, G. F. S., Prokopczyk, I. M., Laurindo, W. C., Toyama, D., Motta, B. P., Baviera, A. M., Henrique-Silva, F., dos Santos, J. L., & Graminha, M. A. S. (2021). Design, synthesis and biological evaluation of N-oxide derivatives with potent in vivo antileishmanial activity. *PLoS ONE*, 16(11), e0259008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008>
- Clementino, L. da C., Velásquez, A. M. A., Passalacqua, T. G., de Almeida, L., Graminha, M. A. S., Martins, G. Z., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M. do C., & Moreira, R. R. D. (2018). In vitro activities of glycoalkaloids from the Solanum lycocarpum against Leishmania infantum. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(6), 673–677. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.07.008>
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2), 132–141. <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>
- de Almeida, L. (2017). *Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano : atividade biológica in vitro e in vivo e potenciais mecanismos de ação*.
- de Almeida, L., Passalacqua, T. G., Dutra, L. A., da Fonseca, J. N. V., Nascimento, R. F. Q., Imamura, K. B., de Andrade, C. R., dos Santos, J. L., & Graminha, M. A. S. (2017). In vivo antileishmanial activity and histopathological evaluation in Leishmania infantum infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.096>
- do Espírito Santo, R. D., Velásquez, Á. M. A., Passianoto, L. V. G., Sepulveda, A. A. L., da Costa Clementino, L., Assis, R. P., Baviera, A. M., Kalaba, P., dos Santos, F. N., Éberlin, M. N., da Silva, G. V. J., Zehl, M., Lubec, G., Graminha, M. A. S., & González, E. R. P. (2019). N, N', N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 171, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.032>
- Dutra, L. A., De Almeida, L., Passalacqua, T. G., Reis, J. S., Torres, F. A. E., Martinez, I., Peccinini, R. G., Chin, C. M., Chegaev, K., Guglielmo, S., Fruttero, R., Graminha, M. A. S., & Dos Santos, J. L. (2014). Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4837–4847. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-14>
- Fernandes, J. F., & Castellani, O. (1966). Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. *Experimental Parasitology*, 18(2), 195–202. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(66\)90016-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(66)90016-6)
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185), 1191–1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)

- Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., van Huijsduijnen, R. H., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C. E., Schmatz, D., Warner, P., & Slingsby, B. T. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11), 751–758. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>
- Melo, E. C. de, & Fortaleza, C. M. C. B. (2013). Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public Health perspective. *Journal of Tropical Medicine*, 2013, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/319234>
- Moreira, V. P., da Silva Mela, M. F., Anjos, L. R. Dos, Saraiva, L. F., Arenas Velásquez, A. M., Kalaba, P., Fabisiková, A., Clementino, L. da C., Aufy, M., Studenik, C., Gajic, N., Prado-Roller, A., Magalhães, A., Zehl, M., Figueiredo, I. D., Baviera, A. M., Cilli, E. M., Graminha, M. A. S., Lubec, G., & Gonzalez, E. R. P. (2022). Novel Selective and Low-Toxic Inhibitor of LmCPB2.8 Δ CTE (CPB) One Important Cysteine Protease for Leishmania Virulence. *Biomolecules*, 12(1903), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom12121903>
- Olías-Molero, A. I., de la Fuente, C., Cuquerella, M., Torrado, J. J., & Alunda, J. M. (2021). Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model? *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122500>
- Passalacqua, T. G., Torres, F. A. E., Nogueira, C. T., de Almeida, L., Del Cistia, M. L., dos Santos, M. B., Regasini, L. O., Graminha, M. A. S., Marchetto, R., & Zottis, A. (2015). The 2',4'-dihydroxychalcone could be explored to develop new inhibitors against the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from Leishmania species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3564–3568. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.085>
- Rogers, K. A., DeKrey, G. K., Mbow, M. L., Gillespie, R. D., Brodskyn, C. I., & Titus, R. G. (2002). Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11101.x>
- Santos, A. M. dos, Noronha, E. F., Ferreira, L. A. M., Carranza-Tamayo, C. O., Cupolillo, E., & Romero, G. A. S. (2008). Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5), 444–448. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500002>
- Sülsen, V. P., Frank, F. M., Cazorla, S. I., Anesini, C. A., Malchiodi, E. L., Freixa, B., Vila, R., Muschietti, L. V., & Martino, V. S. (2008). Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2415–2419. <https://doi.org/10.1128/AAC.01630-07>
- Velásquez, A. M. A. (2017). *Do screening ao mecanismo de ação , uma contribuição para a descoberta de ciclopalladados bioativos : a atividade leishmanicida de CP2 e seu efeito inibitório frente à DNA topoisomerase IB de Leishmania Do screening ao mecanismo de ação , uma contribuição* [Tese Doutorado]. Universidade Estadual Paulista.
- Velásquez, A. M. A., Bartlett, P. J., Linares, I. A. P., Passalacqua, T. G., Teodoro, D. D. L., Imamura, K. B., Virgilio, S., Tosi, L. R. O., Leite, A. de L., Buzalaf, M. A. R., Velasques, J. M., Netto, A. V. G., Thomas, A. P., & Graminha, M. A. S. (2022). New Insights into the Mechanism of Action of the Cyclopalladated Complex (CP2) in Leishmania: Calcium Dysregulation, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(1), e0076721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00767-21>
- Velásquez, A. M. A., De Souza, R. A., Passalacqua, T. G., Ribeiro, A. R., Scontrì, M., Chin, C. M., De Almeida, L., Cistia, M. L. D., Rosa, J. A. D., Mauro, A. E., & Graminha, M. A. S. (2016).

Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against leishmania amazonensis and trypanosoma cruzi. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6). <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150360>

Velásquez, A. M. A., Ribeiro, W. C., Venn, V., Castelli, S., de Camargo, M. santoro, de Assis, R. P., de Souza, R. A., Ribeiro, A. R., Passalacqua, T. G., da Rosa, J. A., Baviera, A. M., Mauro, A. E., Desideri, A., Almeida-Amaral, E. E., & Graminha, M. A. S. (2017). Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with Leishmania amazonensis and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e0068817. <https://doi.org/10.1128/AAC.00688-17>

ANEXO I

Resultados do Analise *in silico* ADME do Composto 1 (www.swissadme.ch)

