

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

MICHELE FERREIRA DA SILVA MELA

**Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno
proteases: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* para o
desenvolvimento racional de fármacos.**

ARARAQUARA

2022

MICHELE FERREIRA DA SILVA MELA

**Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno
proteases: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* para o
desenvolvimento racional de fármacos.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Márcia A. S. Graminha

Araraquara

2022

M517I

Mela, Michele Ferreira da Silva

Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno proteases :
atividade biológica in vitro e in vivo para o desenvolvimento racional de
fármacos / Michele Ferreira da Silva Mela. -- Araraquara, 2022
50 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha

Coorientador: Eduardo Rene Perez Gonzalez

1. Leishmania. 2. Antiparasitários. 3. Inibidores de proteases. 4.
Guanidina. 5. Fármacos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno proteases: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* para o desenvolvimento racional de fármacos."

AUTORA: MICHELE FERREIRA DA SILVA MELA

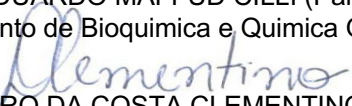
ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORIENTADOR: EDUARDO RENÉ PÉREZ GONZÁLEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Dr. LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biologia - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 04 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES

Nome: Michele Ferreira da Silva Mela

Filiação: Denisia dos Santos Ferreira Silva e Adrovando Batista da Silva

Nascimento: 13/03/1998 - Ibitinga - SP

Endereço Profissional:

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip), Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP. Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campus Ville, S/N, Araraquara SP.

CEP: 14800-903

email: michele.mela@unesp.br

Formação Acadêmica:

2016 - 2019

Graduação: Bacharel em Fisioterapia.

Instituição: Universidade Paulista, Campus de Araraquara - SP.

2020 - 2022

Mestrado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Dissertação: Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno proteases: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* para o desenvolvimento racional de fármacos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Graminha. Bolsa: CAPES.

Produção bibliográfica:

Submetidos:

VITOR PARTITE MOREIRA; **MICHELE FERREIRA MELA**; LUANA RIBEIRO DOS ANJOS; ANGELA M. ARENAS VELASQUEZ; PREDRAG KALABA; ANNA FABISIKOVÁ; LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO; MOHAMMEED AUFY; CHRISTIAN STUDENIK; NATALIE GAJIC; ALEXANDER PRADO-ROLLER; ALVICLER MAGALHAES; MARTIN ZEHL; INGRID DELBONE FIGUEIREDO; AMANDA BAVIERA; EDUARDO MAFFUD CILLI; MARCIA APARECIDA GRAMINHA; GERT LUBEC; EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ. Leishmanicidal activity of synthetic guanidine LQOF-G6 in infected Balb/c mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Parasite and Host*, 2022.

Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração:

- a) Participação no curso de Fundamentos de qPCR para análise de expressão gênica e quantificação de carga viral, ministrado pela Me. Mariana Marchi Santoni - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).
- b) Participação no curso *online* Fundamentos de cromatografia líquida para a indústria farmacêutica, ministrado pelo Me. Miller Pulito – Cromatografando. Abril de 2021. Carga horária: 8h30.
- c) Participação no curso de Comunicação e Escrita Científica, ministrado pelo Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior por transmissão *online* pela American Chemical Society. Outubro de 2021. Carga horária: 4h30.
- d) Conclusão do Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório, oferecido pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP. Período de 29/09/2021 a 16/11/2021. Carga horária: 60h.
- e) Participação no Webnários da ABC – ED.34 sobre Vacina para o Brasil. – Academia Brasileira de Ciências (ABC). Abril de 2021. Carga horária de 2h.

- f) Participação no mini curso A entomologia Forense e os Casos Periciais, durante o evento Four Biotec – Quatro dias pela Biotecnologia. – Universidade Federal de São Carlos. Outubro de 2021. Carga horária: 2h30.
- g) Participação no mini curso Desenvolvimento de uma *Cell Factory*, durante o evento Four Biotec – Quatro dias pela Biotecnologia. – Universidade Federal de São Carlos. Outubro de 2021. Carga horária: 2h30.
- h) Participação no evento científico *online* XI Four Biotec – Quatro dias pela Biotecnologia. – Universidade Federal de São Carlos. 09 a 12 de outubro de 2021. Carga horária: 17h.
- i) Participação em palestra Desafios da docência universitária no contexto atual. – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Setembro de 2021. Carga horária de 2 horas.
- j) Participação em palestra Metodologias ativas: Os desafios da implementação da aprendizagem baseada em problemas. – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Outubro de 2021. Carga horária de 2 horas.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família, meus pais Denisia e Adrovando, pois com eles aprendi a ter determinação e muita garra para conquistar meus sonhos. Às minhas irmãs Ariely e Carolina que sempre foram minha inspiração. Ao meu esposo e meu cachorrinho Lud que são meu porto seguro, minha fonte de apoio e carinho;

Dedico-lhes essa dissertação como tentativa de expressar todo meu amor e minha gratidão por estarem presentes em todos os momentos da minha vida e por apoiarem minhas decisões. Amo vocês!

“São as pequenas coisas que revelam os capítulos do coração. São as pequenas atenções, os numerosos incidentes pequeninos e as simples cortesias da vida, que formam a soma da felicidade da existência.”

Ellen G. White

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isso fica sendo a minha última e mais elevada descoberta..”

Isaac Newton

Agradecimentos

Ao meu Deus, o meu criador, a quem sou grata por tudo o que sou e me tornei. Sou eternamente grata à Ele por me conduzir até aqui e por me acompanhar em todos os momentos durante esse ciclo;

À minha família, Denisia e Adrovando, minhas irmãs Ariely e Carolina, meus avós Ana, Olavo, Maria Elva (Puri), Carlos e ao meu esposo Marcel por estarem sempre por perto e me incentivarem nessa jornada. Amo vocês;

À Professora Dra Márcia Graminha por ter me dado a oportunidade de vivenciar algo que parecia muito distante da minha realidade, por ver em mim algo que eu ainda não via e ter insistido em me ensinar a tão valorosa tarefa de ser pesquisador, tenho uma imensa admiração pelo seu trabalho e por quem você é.

Ao meu co-orientador Professor Dr Eduardo Rene Perez Gonzalez e sua equipe pela síntese e fornecimento dos compostos utilizados neste estudo, por toda solicitude e parceria que tivemos até aqui.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP, Angela, Wilquer, Natália, Juliane, Eduarda, Maricely, Gabriel e todos os demais que conheci no dia a dia de pesquisa, por transformar o nosso convívio em dias leves. Aprendi com vocês que ser pesquisador é ser colaborador, é ensinar e aprender todos os dias, obrigada por todo apoio de vocês. Em especial gostaria de agradecer também, ao meu amigo e colega de laboratório Leandro, por ter me ensinado tanto, por ter me mostrado o caminho da pesquisa e não me negar auxílio em tudo o que precisei.

Aos funcionários da FCFAr-UNESP Araraquara, em especial à Cris, Viviane, às meninas da faxina, Celso e sua equipe de trabalho por todo auxílio durante esses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, também à todos os funcionários dessa instituição e à equipe da STPG;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001 (processo 88887.485306/2020-00) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e para execução deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* e acometem milhares de pessoas no mundo anualmente. Até o momento, há poucos fármacos disponíveis para o tratamento destas doenças, além de apresentarem elevada toxicidade, efeitos colaterais graves e baixa eficácia, o que torna urgente a busca por novas opções terapêuticas. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo identificar compostos guanidínicos com atividade leishmanicida e potencial atividade inibitória da enzima cisteíno protease rCPB2.8, importante fator de virulência do parasita *Leishmania*. As moléculas foram avaliadas frente a *Leishmania infantum* e/ou *Leishmania amazonensis*, com destaque para os compostos **G1**, **G2**, **G3**, **G7** e **G30**, os quais apresentaram potência frente à promastigotas de *L. infantum*, com destaque para **G1**, **G6** e **G7**, as quais também mostraram-se promissoras frente a amastigotas intracelulares ($IC_{50AMA} < 10 \mu M$), além de serem pouco citotóxicas quando avaliadas em macrófagos murinos, indicando índice de seletividade > 10 . Em busca de potenciais alvos moleculares para entendimento do mecanismo de ação, estes derivados guanidínicos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição da enzima recombinante rCPB2.8, uma protease importante para sobrevivência e virulência de *Leishmania* spp, sugerindo que **G6** tenha esta protease como potencial alvo de ação, ($IC_{50CPB} = 6 \mu M$), com análise do gráfico duplo-recíproco Lineweaver e Burk, indicando que esta molécula diminui a afinidade da enzima pelo substrato. Ensaios *in vivo* em modelo experimental Balb/c infectado com *L. amazonensis*, seguindo um protocolo de tratamento de administração intraperitoneal de 2 mg/Kg/dia, durante 15 dias, mostram que **G6** e **G7** levaram a diminuição das lesões cutâneas dos animais, com redução da carga parasitária de 79,4% e 66,5%, respectivamente, não indicando danos hepáticos e renais. Estes dados evidenciam o potencial desta classe de moléculas para as próximas etapas de desenvolvimento de fármacos antileishmaniais para o tratamento de leishmaniose cutânea e também para leishmaniose visceral.

Palavras chave: Antileishmaniais guanidínicos; Cisteíno proteases; *Leishmania infantum*; *Leishmania amazonensis*; Balb/c.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a set of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and affects thousands of people worldwide annually. To date, there are few drugs available for the treatment of these diseases, in addition to presenting high toxicity, severe side effects and low efficacy, which makes the search for new therapeutic options urgent. In this sense, this work aimed to identify guanidinic compounds with leishmanicidal activity and potential inhibitory activity of the cysteine protease enzyme rCPB2.8, an important virulence factor of the *Leishmania* parasite. The molecules were evaluated against *Leishmania infantum* and/or *Leishmania amazonensis*, with emphasis on compounds G1, G2, G3, G7 and G30, which showed potency against *L. infantum* promastigotes, especially G1, G6 and G7, which also showed promise against intracellular amastigotes ($IC_{50AMA} < 10 \mu M$), in addition to being little cytotoxic when evaluated in murine macrophages, indicating a selectivity index > 10 . In search of potential molecular targets to understand the mechanism of action, these guanidinium derivatives were evaluated for their ability to inhibit the recombinant enzyme rCPB2.8, an important protease for the survival and virulence of *Leishmania* spp, suggesting that G6 has this protease as a potential target of action ($IC_{50CPB} = 6 \mu M$), with analysis of the Lineweaver and Burk double-reciprocal plot, indicating that this molecule decreases the enzyme's affinity for the substrate. In vivo assays in an experimental model Balb/c infected with *L. amazonensis*, following a treatment protocol of intraperitoneal administration of 2 mg/kg/day for 15 days, show that G6 and G7 led to a decrease in the skin lesions of the animals, with reduction in parasite load of 79.4% and 66.5%, respectively, not indicating liver or kidney damage. These data show the potential of this class of molecules for the next steps in the development of antileishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis and also for visceral leishmaniasis.

Keywords: Guanidine antileishmanials; Cysteine proteases; *Leishmania infantum*; *Leishmania amazonensis*; Balb/c.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Leishmanioses	12
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivos gerais	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
2.2.1	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	17
2.2.2	Estudos de mecanismo de ação.....	17
2.2.3	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> das moléculas G6 e G7 para o tratamento da leishmaniose cutânea.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	Cultivo de parasitas e células de mamíferos	19
3.2	Compostos guanidínicos	19
3.3	Atividade anti-promastigota de compostos guanidínicos	20
3.4	Avaliação da Citotoxicidade dos compostos guanidínicos em Macrófagos Peritoneais Murinos	21
3.5	Cálculo do Índice de seletividade (IS)	22
3.6	Avaliação da atividade anti-amastigota de compostos guanidínicos	22
3.7	Atividade inibitória da enzima rCPB2.8 frente ao compostos guanidínicos.....	23
3.8	Avaliação do mecanismo de inibição da enzima rCPB2.8 pelos compostos guanidínicos	24
3.9	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> e segurança em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados com compostos guanidínicos G6 e G7	255
3.10	Comitê de Ética em Experimentação animal	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Resultados da atividade leishmanicida e citotóxica de compostos guanidínicos frente a promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	27

4.2	Avaliação da capacidade inibitória dos compostos guanidínicos frente à protease rCPB2.8.....	31
4.3	Cinética enzimática de rCPB2.8 na presença de G6	32
4.4	Avaliação da eficácia do tratamento de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> utilizando as moléculas guanidínicas G6 e G7.	34
5	CONCLUSÃO.....	42
6	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são patologias infecto-parasitárias geradas por espécies de parasitas do gênero *Leishmania* transmitidas através do vetor flebotomíneo ao hospedeiro humano. São divididas principalmente como leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, dentre outras manifestações que afetam as mucosas. Estas manifestações clínicas são distintas e variam entre úlceras na pele, mucosas ou acometimento das vísceras (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

O parasita responsável por essas infecções pertence à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e possui duas formas diferentes tanto do ponto de vista morfológico quanto biológico: (1) promastigota, forma extracelular que se desenvolve no inseto vetor e (2) amastigota, forma intracelular do parasita, que se desenvolve no hospedeiro mamífero (ALVAR et al., 2012).

O ciclo de vida da *Leishmania* inicia-se através da picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, da família Psychodidae, que durante o repasto sanguíneo, regurgita formas promastigotas do parasita na derme do hospedeiro mamífero. O parasita quando em contato com células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, subverte a resposta imunológica para escapar dos efeitos microbicidas destas células. Promastigotas diferenciam-se em amastigotas, estabelecendo a infecção (REY, 2008).

O ciclo irá se completar quando o vetor picar novamente outro hospedeiro contaminado, os macrófagos infectados presentes no sangue que o vetor ingeriu irão romper-se e liberar formas amastigotas de *Leishmania* no trato digestivo do inseto. A partir desse momento, os parasitas se diferenciam em vários estágios de desenvolvimento desde a forma procíclica (não infectiva) até a forma metacíclica (infectiva) de promastigotas à medida que se migram no intestino médio do inseto (REY, 2008).

Em relação aos aspectos epidemiológicos, dados recentes da Organização Mundial da Saúde mostram que as leishmanioses afetam 98 países no mundo com mais de 2 milhões de novos casos estimados e 350 milhões de pessoas sob risco de serem afetadas. Essa parasitose apresenta uma maior prevalência e incidência em países da

África, Sudeste asiático e América Latina, mas também há registros no sul da Europa (WHO, 2020).

Existem poucos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses atualmente. Os mais recomendados são os antimoniais pentavalentes, anfotericina B (Anf B) e suas formulações lipídicas e pentamidina (PAHO, 2018). Além de existirem poucas soluções terapêuticas, esses medicamentos apresentam, em geral, efeitos adversos como dores musculoesqueléticas, cefaléia, dispnéia, náuseas, vômitos, além de mostrarem toxicidade hepática e renal (PAHO, 2018). Outra limitação decorrente do uso desses medicamentos refere-se à administração por via parenteral, intravenosa ou intramuscular, o que diminui a adesão dos pacientes ao tratamento, com exceção da miltefosina administrada de forma oral (PAHO, 2018). De acordo com a nota informativa nº 13/2020 do Ministério da Saúde, a recomendação de miltefosina foi autorizada recentemente para o tratamento de leishmaniose cutânea no Brasil, porém, esse fármaco é potencialmente teratogênico, o que restringe seu uso em gestantes (BRASIL, 2020).

Diante das limitações apresentadas acima, torna-se imprescindível a busca por novas alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras. Por esse motivo, o laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP/Araraquara vem nos últimos anos identificando novas moléculas de origem natural ou sintética que apresentem boa eficácia e baixa toxicidade durante o estágio pré-clínico de desenvolvimento. Dentre as moléculas sintéticas já caracterizadas pelo grupo, destacamos os compostos contendo o grupamento N -óxido, como furoxanos e benzofuroxanos (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021; DE ALMEIDA, 2017; DUTRA et al., 2014) e ciclopaladados (VELÁSQUEZ et al., 2016, 2021, 2017), os quais foram também caracterizados quanto aos mecanismos de ação envolvidos, como a inibição de proteases, topoisomerases, alteração da homeostase do cálcio e da função mitocondrial, importantes para a sobrevivência do parasita (D'ANNESSA; CASTELLI; DESIDERI, 2015; DAS et al., 2013).

Adicionalmente, compostos guanidínicos, (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019; ESPÍRITO SANTO et al., 2014), também mostraram-se bastante promissores para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para as leishmanioses. Em 2019, do Espírito Santo e colaboradores demonstraram a síntese, caracterização química e atividade antileishmanial de derivados guanidínicos frente à espécie causadora da leishmaniose cutânea, *Leishmania amazonensis*, em ensaios *in vitro*, com destaque para a molécula LQOFG2 (**G2**), a qual foi capaz de reduzir a carga parasitária de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019).

As guanidinas são encontradas na natureza e estão presentes em microrganismos,

plantas, invertebrados marinhos e até mesmo em animais terrestres. Essas moléculas apresentam várias atividades biológicas (BERLINCK; ROMMINGER, 2016), incluindo atividades de dilatação cardiovascular (SHORT; DARBY, 1968), anti histamínicas (SATO et al., 1985), antiparasitárias (ESPIRITO SANTO et al., 2014), leishmanicidas (SALEM; WERBOVETZ, 2006), com destaque para o potencial terapêutico frente à leishmaniose cutânea (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019). Adicionalmente, há produtos disponíveis no mercado farmacêutico contendo compostos guanidínicos com aplicações importantes como o polihexametileno biguanida, um biocida com amplo espectro e ação rápida, utilizado como agente antisséptico e que se mostra eficaz na diminuição da carga bacteriana em úlceras (BORGES et al., 2018; KATHURIA et al., 2021). Estudos mostram que derivados guanidínicos são potentes em ensaios realizados para investigação de suas propriedades anti - tripanosomatidas, sendo um potencial mecanismo de ação, a alteração do metabolismo bioenergético (MARTINS et al., 2016) ou inibição de cisteíno proteases (CPs) (CHEN et al., 2010; JONES et al., 2016; MCKERROW, 2018).

As CPs são enzimas hidrolíticas, portanto possuem a capacidade de reconhecer de forma específica as regiões de certas moléculas, clivando-as na presença de água. Elas também realizam a clivagem de ligações peptídicas dos aminoácidos dentro da proteína, o que as caracterizam como endopeptidases. Estão envolvidas em diversos processos patogênicos de doenças parasitárias como a leishmaniose, malária e doença de Chagas (MCKERROW, 2018; VIEIRA; SANTOS; FERREIRA, 2017)

CPs estão presentes na maioria dos organismos, incluindo plantas, mamíferos, bactérias, vírus e parasitas. *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* spp. possuem diferentes CPs (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998), sendo a maioria pertencentes ao clã CA, o qual compreende enzimas similares à papaína, mas que também inclui as CPs de mamíferos como as catepsinas B, C, K, L e S. Dentre as CPs de protozoários pertencentes a este clã, temos a cruzaina de *Trypanosoma cruzi*, assim como CPA e CPB de *Leishmania* e falcipainas (FP1, 2 e 3) de *Plasmodium falciparum* (MOTTRAM et al., 2003). A CPA é codificada por genes em cópia única e foi descrita em *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania infantum*, enquanto CPB, por genes de cópias múltiplas organizados em tandem. Adicionalmente, as CPBs apresentam uma extensão C-terminal não usual de 100 aminoácidos, que é frequentemente glicosilada, e que pode distingui-la da demais CPs na superfamília da papaína (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; REBELLO et al., 2009).

A CPB, objeto de estudo deste projeto, é um fator de virulência do parasita e contribui para a permanência da *Leishmania* no interior dos macrófagos, subvertendo os processos microbicidas dos macrófagos (DE ALMEIDA, 2017). As CPBs facilitam a

diferenciação do parasita de formas promastigotas para amastigotas com o objetivo de empregar diferentes estratégias para escapar dos efeitos microbicidas do hospedeiro, modulando também as respostas imunes do mesmo, através da indução de células T helper 2 (Th2) e inibição das respostas de células T helper 1 (Th1). Em um mecanismo de ativação convencional, os macrófagos respondem às citocinas Th1, as quais auxiliam na eliminação do parasita, em contrapartida, os macrófagos, quando ativados por citocinas Th2, contribuem para a sobrevivência da *Leishmania* no interior das células do hospedeiro. Dentro deste contexto, CPB degrada fatores de transcrição importantes, interferindo negativamente na transcrição de citocinas importantes, tais como IL-12 e TNF-alfa, importantes para manutenção da atividade anti-inflamatória dos macrófagos (CAMERON et al., 2004; MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Uma das CPBs que foram estudadas anteriormente como alvo de ação de compostos leishmanicidas e a forma recombinante da CPB, LmCPB2.8ΔCTE (rCPB2.8) de *L. mexicana* expressa em bactérias (DE LUCA et al., 2018). Estudos indicam que moléculas que mostraram-se capazes de inibir essa protease em ensaios *in vitro*, apresentaram redução da carga parasitária de *Leishmania infantum*, como também diminuíram lesões em camundongos BALB/c quando testadas *in vivo* (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021).

Vale ressaltar que moléculas guanidínicas também vêm sendo estudadas quanto à atividade inibitória de outras CPs, como, por exemplo, o derivado guanidínico K11777 que é capaz de inibir a cruzaina, a principal CP do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, também pertencente à família *Trypanosomatidae*. E esse composto avançou em ensaios clínicos para doença de Chagas, porém, devido a questões de segurança, não prosseguiu ao longo da fase clínica de desenvolvimento, sendo interrompida no estágio pré clínico. Por esse motivo alguns análogos da molécula K11777 foram caracterizados e avaliados quanto à inibição de cruzaina. Nesse aspecto, a molécula oxi guanidínica WRR483 mostrou ser inibitória à cruzaina e potente contra *T. cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo* (CHEN et al., 2010; JONES et al., 2016; MCKERROW, 2018).

As catepsinas são proteases humanas análogas à CPB, influenciam também na modulação da resposta imune frente à patógenos. Presentes na maioria das células de mamíferos, incluindo as células apresentadoras de antígenos, atuam ativamente na degradação de proteínas exógenas e endógenas no lisossomo. Em um estudo anterior, foi descoberto que as catepsinas humana B e L, funcionam como proteases participadoras no processamento de antígeno. Foi observado que camundongos infectados com *L. major* quando tratados com um inibidor de catepsinas B e L mostraram um aumento no desenvolvimento de respostas Th2, a qual promove estabelecimento e proliferação da

doença. Esse resultado indica uma semelhança da ação dessas catepsinas à outras proteases moduladoras de resposta imune, como por exemplo a CPB que atua na ativação de MHC II para uma resposta do tipo Th2 promovendo a sobrevivência da *Leishmania*, enquanto a catepsina L ativa MHC II de forma contrária à CPB, resultando na resposta Th1 que elimina o parasito (ONISHI et al., 2004). Sendo assim, o estudo da caracterização de moléculas que inibem seletivamente CPB sem interferir na ação de catepsinas humanas, é uma forma elegante de identificar compostos para desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para tratamento de leishmaniose.

Diante destes resultados promissores obtidos pelo nosso grupo em 2019 (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019), um dos objetivos deste trabalho é dar continuidade à pesquisa desse grupo de moléculas, estendendo sua caracterização biológica frente à espécie *L. Infantum*, causadora da leishmaniose visceral, além de avaliar o potencial destas moléculas em inibir a enzima cisteíno protease (CPB) de *L. mexicana*, recentemente expressa em *Pichia pastoris* e purificada pelo nosso grupo de pesquisa (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021). Adicionalmente, novos ensaios *in vivo* foram realizados para ampliar o portfólio de guanidinas capazes de diminuir a carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral a identificação e caracterização das propriedades leishmanicidas de 16 derivados guanidínicos em estudos *in vitro* frente aos parasitas *L. infantum* e *L. amazonensis*, avaliação do potencial inibitório destas moléculas contra rCPB2.8 e estudos de eficácia *in vivo* dos derivados **G6** e **G7** utilizando o modelo experimental Balb/c infectado com *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*

1. Determinação da atividade anti-promastigota (IC_{50PRO}) e anti-amastigota (IC_{50AMA}) frente às espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*;
2. Determinação da atividade citotóxica (CC_{50}) em macrófagos murinos e do Índice de Seletividade ($IS = CC_{50} / IC_{50}$);

2.2.2 Estudos de mecanismo de ação

1. Avaliação do potencial inibitório de moléculas guanidínicas frente à enzima rCPB2.8 e determinação do mecanismo de inibição;

2.2.3 Avaliação da eficácia *in vivo* das moléculas **G6** e **G7** para o tratamento da leishmaniose cutânea.

1. Infecção de camundongos com *L. amazonensis*
2. Administração das guanidinas leishmanicidas **G6** e **G7**;
3. Determinação da carga parasitária;
4. Avaliação de marcadores bioquímicos de função renal e hepática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de parasitas e células de mamíferos

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram cultivadas em meio LIT adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos estreptomicina (10 mg/ mL) e penicilina (10000 µM/ mL) em garrafas de 25 cm² (TPP®) à temperatura de 27 °C. As formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA67ITMAP263) foram cultivadas em meio schneider adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% antibióticos estreptomicina (10 mg /mL) e penicilina (10000 µM/mL) e 2% de hemina em garrafas de 25 cm² (TPP®) à temperatura de 27 °C, como previamente descrito em (DE ALMEIDA et al., 2017; VELÁSQUEZ et al., 2017).

A curva de crescimento foi realizada ao longo de seis dias determinando-se a concentração de *L. infantum* e *L. amazonensis* usando câmara de Neubauer.

3.2 Compostos guanidínicos

As guanidinas estudadas no presente trabalho foram planejadas, sintetizadas e caracterizadas pelas suas constantes físico-químicas (RMN (Ressonância Magnética Nuclear), EM (Espectrometria de Massas), FTIV (Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier), CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e Ponto de fusão) no Laboratório de Química Orgânica Fina (LQOF) liderado pelo Professor Dr. Eduardo Rene Perez Gonzalez na Unesp de Presidente Prudente.

Os compostos guanidínicos disponibilizados para esse trabalho, são: LQOF G1 (**G1**), LQOF G2 (**G2**), LQOF G3 (**G3**), LQOF G6 (**G6**), LQOF G7 (**G7**), LQOF G29 (**G29**), LQOF G30 (**G30**), LQOF G32 (**G32**), LQOF G33 (**G33**), LQOF G34 (**G34**), LQOF G35 (**G35**), LQOF G36 (**G36**), LQOF G37(**G37**), LQOF T4 (**T4**), LQOF T5 (**T5**) e LQOF T6 (**T6**). As estruturas das moléculas **G1** a **G7** estão descritas em (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019). As demais, devido ao ineditismo, não estão descritas neste trabalho para fins de proteção e posterior redação de solicitação de pedido de patente junto a Agência Unesp de Inovação.

Os compostos: **T4**, **T5** e **T6** 'não são guanidinas'. Estas moléculas correspondem a

produtos intermediários na síntese das guanidinas e pelo fato de serem prévios à obtenção do composto final da síntese, podem chamar-se de pro-guanidinas.

3.3 Atividade anti-promastigota de compostos guanidínicos

Foi realizado ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) seguindo o protocolo descrito em (DE ALMEIDA et al., 2017; VELÁSQUEZ et al., 2017) com algumas alterações. A concentração de *Leishmania* em fase logarítmica foi ajustada para 1×10^7 promastigotas/ mL e incubadas em placas de 96 poços. Os compostos guanidínicos foram diluídos de forma seriada em concentrações de 100 μ M a 1,6 μ M (razão de 1:2) para determinação da concentração com atividade inibitória em 50% dos parasitas (IC_{50PRO}). Em seguida a placa foi incubada em estufa BOD à temperatura de 27 °C por 72 horas.

Após incubação, foi adicionado 10 μ L de uma solução de MTT 6 mM/PMS 0,7 mM, seguido por nova incubação por 75 minutos. Então foi adicionado 100 μ L de etanol e 100 μ L de isopropanol:PBS (1:1) para solubilizar os cristais de formazana, e logo após foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 570 nm (Tecan®) (DE ALMEIDA, 2017).

A porcentagem de parasitos mortos expressos em porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GÓMEZ-BARRIO, 2000).

$$\%C = \left[\frac{(G_C - G_P)}{G_C} \right] \times 100$$

$$G_C = A_C - A_m$$

G_C representa o número de parasitos/ mL nos poços controles sem a presença de substância; A_C o valor de absorbância nos poços controle de *Leishmania* (na ausência de substância); A_m o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito.

$$G_P = A_P - A_{pm}$$

Sendo que, Gp representa o número de parasitos/ mL detectados em diferentes concentrações de substâncias; Ap o valor da absorbância nos testes e Apm, o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito.

Ao final foi determinada por regressão não linear a concentração efetiva para 50% das formas promastigotas (IC_{50PRO}) através do software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de triplicatas independentes.

3.4 Avaliação da Citotoxicidade dos compostos guanidínicos em Macrófagos Peritoneais Murinos

Para avaliar a citotoxicidade das moléculas guanidínicas frente a macrófagos de mamíferos, realizou-se a extração de macrófagos peritoneais de camundongos machos Swiss, com idade entre 4 a 6 semanas. Após a extração, foram distribuídos em placas de 96 poços na razão de 5×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI-1640 e depois mantidos por 6 horas em 37 °C e 5% de CO₂.

Após o período de adesão dos macrófagos, descartou-se o sobrenadante para realizar o tratamento e adicionou-se 97 μ L de meio RPMI-1640 e 3 μ L das moléculas a serem avaliadas, diluídas em diferentes concentrações iniciando de 300 μ M a 2,34 μ M. Deixando também poços somente com 100 μ L de meio RPMI-1640 para controle de macrófagos sem tratamento. Feito o tratamento, as placas foram deixadas a 37 °C e 5% CO₂, como descrito acima, por 24 horas (VELÁSQUEZ et al., 2016).

Após incubação, foi adicionado 10 μ L de uma solução de MTT 6 mM/PMS 0,7 mM, seguido por nova incubação por 75 minutos. Então foi adicionado 100 μ L de etanol e 100 μ L de isopropanol:PBS (1:1) para solubilizar os cristais de formazana, e logo após foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 570 nm (Tecan®) (DE ALMEIDA et al., 2017).

Para determinar a concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC_{50}), foi feito uma conversão da densidade óptica obtida em porcentagem de inibição, uma análise de regressão dos dados usando o software BioEstat e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de duas replicatas independentes.

3.5 Cálculo do Índice de seletividade (IS)

Para determinar a segurança dos compostos, o IS foi calculado a partir da relação dos resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade de macrófagos peritoneais murinos (CC₅₀) e dos ensaios anti *Leishmania* (IC₅₀AMA e IC₅₀PRO).

$$\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$$

IS com valores acima de 10 sugerem que o composto pode ser considerado seguro para ser utilizado em outros testes (KATSUNO et al., 2015).

3.6 Avaliação da atividade anti-amastigota de compostos guanidínicos

Para avaliar a atividade anti-amastigota de compostos guanidínicos, seguiu-se a metodologia descrita por (CLEMENTINO et al., 2018; VELÁSQUEZ et al., 2016), com algumas modificações descritas a seguir. Foram extraídos macrófagos peritoneais murinos, os quais foram mantidos durante 24 horas em meio RPMI-1640 a 37 °C e 5% de CO₂, distribuídos em placas de 24 poços para aderência nas lamínulas presentes nos poços das placas.

Após aderência essas células foram infectadas com promastigotas da espécie de *Leishmania* a ser testada na fase estacionária de crescimento, em razão de 5 parasitas para 1 macrófago (5:1) para *L. amazonensis* e incubadas por 18 horas a 37 °C e 5% de CO₂ e razão 10:1 para *L. infantum*, incubadas por 6 horas a 37 °C e 5% de CO₂. O volume final dos poços era de 500 µL.

Após o período de infecção, foi realizada uma lavagem com PBS para remoção dos parasitas não internalizados e tratados por 24 horas com compostos guanidínicos em várias concentrações em razão de 1:2 (20 µM a 0,62 µM).

Em seguida, o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram secas à temperatura ambiente. As células foram fixadas com metanol e coradas utilizando Giemsa (MERCK®) a 10% em tampão PBS por 8 minutos.

A determinação do IC₅₀AMA foi feita posteriormente por contagem sob microscopia óptica, contando o número de amastigotas internalizadas por 100 macrófagos, os valores obtidos das lâminas tratadas foram comparados com o controle correspondente às células

infectadas na ausência de quaisquer tratamentos. Os ensaios foram realizados em triplicatas experimental e biológica.

3.7 Atividade inibitória da enzima rCPB2.8 frente ao compostos guanidínicos

O ensaio de inibição da enzima rCPB2.8 (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021), foi realizado em placas pretas de 96 poços contendo:

- Tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 contendo 200 mM de NaCl e 0.01% de Triton-X 100;
- 2 nM da enzima rCPB2.8
- 2 mM de ditioneitol DTT
- 5 μ M de substrato Z-F-Arg-MCA (Calbiochem).
- Os compostos em concentração de 20 μ M.

Em primeiro momento, foi realizado a leitura da fluorescência basal, ou seja, a atividade das substâncias sem a presença da enzima, como tampão, DTT e substrato. Nos poços são adicionadas essas três substâncias: 196 μ L de tampão, 2 μ L de DTT e 2 μ L de substrato e realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível (Tecan®) a 30 °C por 2 minutos para registrar a fluorescência emitida em cada um dos poços.

Depois, foram preparados novos poços para testar a atividade da enzima sem a presença do composto em análise, contendo: 198 μ L de um mix contendo tampão, DTT e enzima nas mesmas concentrações de trabalho e feito uma leitura no Tecan® nas mesmas condições descritas acima. Após essa leitura, adicionou-se 2 μ L do substrato e realizou-se uma nova leitura dos mesmos poços, para registrar a fluorescência.

Finalmente, foi preparado os poços para o teste de inibição da enzima pelos compostos guanidínicos, contendo: 196 μ L de do MIX (Tampão, DTT e Enzima), após adicionar o MIX é feito a primeira leitura no Tecan®. Depois foi adicionado a esses poços 2 μ L do derivado guanidínico nas concentrações 20 μ M, 10 μ M e 5 μ M, foi feito uma segunda leitura e por fim, adicionou-se 2 μ L do substrato e realizou-se a terceira e última leitura.

Os resultados foram calculados e analisados quanto ao aumento ou diminuição da fluorescência, sendo considerado quanto menor a fluorescência do substrato, após adição

do composto, maior a inibição da enzima.

Ao final, foi feita uma comparação dos valores de fluorescência obtidos nos poços do teste de atividade da enzima sem inibidor em relação aos valores dos poços que foram adicionados os compostos guanidínicos, sendo descontados o valor da fluorescência basal nas duas situações. Os valores foram analisados via regressão não linear à concentração efetiva para 50% de inibição da rCPB2.8 (IC_{50-CPB}) através do software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de duas replicatas independentes.

3.8 Avaliação do mecanismo de inibição da enzima rCPB2.8 pelos compostos guanidínicos

Os ensaios de cinética enzimática de CPB foram realizados conforme descrito anteriormente (RIBEIRO, 2018) com algumas modificações:

- Tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 contendo 200 mM de NaCl e 0.01% de Triton-X100;
- 7 nM de rCPB2.8;
- 2 mM de DTT;
- Substrato em diversas concentrações;
- Diferentes concentrações do Inibidor.

De forma detalhada, cada ensaio foi feito com os seguintes passos:

Uma alíquota de estoque de enzima foi rapidamente descongelada a 37 °C e mantida em gelo até a ativação, foi incubada por 5 minutos no tampão de ensaio (acetato 100 mM pH 5,5 e 2 nM DTT) e distribuída em placas pretas de 96 poços em duplicata. Após esse momento, foi adicionado o inibidor em concentração fixa incubado por 5 minutos e por fim, foi feita a adição de diferentes concentrações do substrato nos poços.

A velocidade da reação foi monitorada usando um leitor de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan®) através da emissão de fluorescência em 460 nm (excitação em 380 nm) devido à hidrólise do substrato quando adicionado à solução sem a presença do inibidor e com o inibidor em concentração fixa.

Foi possível calcular as velocidades iniciais da hidrólise do substrato através do software Graphpad Prism com base no coeficiente de regressão linear do ajuste de dados da Unidade de Fluorescência Relativa (mRFU) em função do tempo (min). Também foi realizada medição de controle na ausência de inibidor (K_m) para cada placa.

E por fim, os dados foram expressos através do gráfico duplo recíproco obtido através do software Graphpad Prism, analisando também os valores de Km e Vmáx para determinar o tipo de inibição que ocorreu.

3.9 Avaliação da eficácia *in vivo* e segurança em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados com compostos guanidínicos G6 e G7

Para avaliar a eficácia dos compostos guanidínicos **G6** e **G7**, fêmeas de camundongos BALB/c, com 5 semanas de idade foram infectadas subcutaneamente com 1×10^7 promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na orelha direita e seguiu-se o protocolo descrito em VELÁSQUEZ et al., 2017.

Os camundongos foram separados em cinco grupos de cinco animais cada: G1 para o grupo de animais infectados e tratados com veículo (Tampão PBS + 1% de DMSO), G2 o grupo de infectados e tratados com Anf B, G3 grupo de animais infectados e tratados com o composto **G6**, G4 grupo dos infectados e tratados com composto **G7** e G5 grupo de animais saudáveis, ou seja, não infectados.

Como não houve formação de lesões 30 dias pós infecção, uma nova infecção foi realizada seguindo os mesmos procedimentos citados acima. Ao surgir as lesões com diâmetro de 5 a 7 mm segundo as medidas aferidas usando um paquímetro digital (Mitutoyo), deu-se início ao tratamento, aproximadamente 60 dias pós-infecção. O tratamento ocorreu de forma intraperitoneal, usando doses diárias de 2 mg/kg por dia de Anf B, **G6** e **G7** por 15 dias.

Para o cálculo das doses dos compostos, foi utilizado os valores de IC₅₀ obtidos através de ensaio anti-amastigota (**G6** = 17 µM e **G7** = 7 µM), peso e volume de sangue do animal (1,5 mL) levando em consideração que o volume de sangue de um camundongo BALB/c se refere a 6% da massa corpórea e o peso médio dos animais foi de ± 25 mg. A partir desse cálculo, foi utilizado nos tratamentos doses de 2 mg/kg/dia, essa dose se refere à exatamente 10x IC₅₀ da molécula **G7** e aproximadamente 10x IC₅₀ de **G6**. É importante ressaltar que a dose (2 mg/kg/dia) do fármaco utilizado como referência (Anf B) foi estabelecida em VELÁSQUEZ et al., 2017.

A cada 3 dias, foi aferido as medidas de diâmetro e espessura das lesões usando o paquímetro digital (Mitutoyo) seguindo três parâmetros: diâmetro menor (d), diâmetro maior (D) e espessura das orelhas (com e sem lesão). O peso dos animais foi

acompanhado, assim como também foram tiradas fotos das lesões ao longo do tratamento.

Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, o sangue foi coletado por punção cardíaca para coleta do plasma para análises das alterações em biomarcadores de função hepática e renal. Foram obtidos “inprints” das lesões da seguinte forma: Lâminas previamente limpas foram colocadas sobre a superfície das lesões e deixadas em temperatura ambiente até secar e, em seguida, foram coradas usando Giemsa.

Para a determinação da carga parasitária foi realizada a contagem do número de amastigotas intracelulares nas células contidas nas lâminas usando microscopia óptica. O peso da lesão foi obtido, para cálculo do índice LDU (Número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas x peso da lesão).

Os ensaios de toxicidade foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dra. Amanda Martins Baviera do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas da FCFAr, UNESP. Os biomarcadores determinados foram: bilirrubina total, alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST, respectivamente), fosfatase alcalina (ALP), ureia e creatinina, realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automatizado, com utilização de Kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste de One-way ANOVA e Two-way ANOVA no programa *GraphPad Prism*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

3.10 Comitê de Ética em Experimentação animal

Todos os experimentos realizados neste estudo que envolveram o uso de animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP sob os seguintes protocolos: CEUA/FCF/CAr: 12/2021 para os ensaios *in vitro* e CEUA nº: 32/2020 para o experimento *in vivo*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da atividade leishmanicida e citotóxica de compostos guanidínicos frente a promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Para a descoberta de moléculas bioativas, a estratégia de *screening* fenotípico é utilizada auxiliando na identificação de moléculas que possuem características apropriadas como permeação de membranas e viabilidade celular. No entanto, esta abordagem não permite a identificação do (s) alvo (s) de ação, informação importante no processo de desenvolvimento racional de drogas para obtenção de moléculas líderes. Diante do exposto, neste trabalho, foram utilizados inicialmente critérios de *screening* fenotípico para pesquisar a atividade leishmanicida de moléculas guanidínicas, com base nos critérios descritos por KATSUNO et al., 2015, tendo como parâmetros as seguintes características para prosseguimento experimental:

1. determinação da atividade anti-promastigota (IC_{50PRO});
2. avaliação de atividade anti-amastigota (IC_{50AMA}) das moléculas com $IC_{50PRO} < 10 \mu M$.
3. $IS > 10$

Ainda, considerando que há relatos na literatura de compostos guanidínicos capazes de inibir proteases parasitárias (CHEN et al., 2010; JONES et al., 2016), decidiu-se preliminarmente investigar se os compostos em estudo neste trabalho também apresentam capacidade de inibir a enzima recombinante CPB de *L. mexicana*, a qual foi expressa em *Pichia pastoris* e purificada por Leandro da Costa Clementino, durante o desenvolvimento de projeto de doutorado (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021; DA COSTA CLEMENTINO, 2022)

Para os ensaios de determinação da atividade anti-promastigota e anti-amastigota descritos a seguir, de acordo com a curva de crescimento de *Leishmania*, utilizou-se células nas fases logarítmica ou estacionária de crescimento, respectivamente.

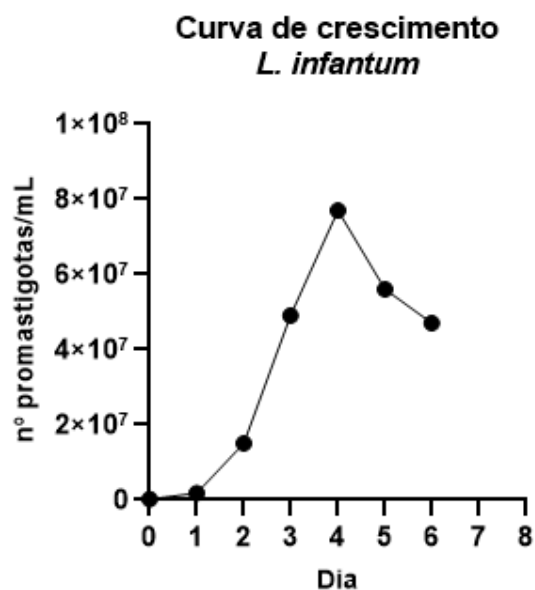


Figura 1: Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* durante 7 dias. Entre os dias 3 e 4 as promastigotas atingiram a fase logarítmica e nos dias 5 e 6, a fase estacionária.

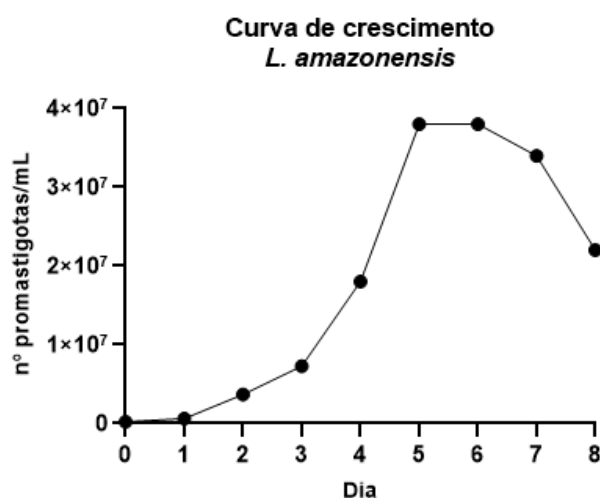


Figura 2: Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* durante 8 dias. Nos dias 4 e 5 as promastigotas atingiram a fase logarítmica e nos dias 5 e 6, a fase estacionária.

Neste estudo, dezesseis moléculas foram avaliadas quanto à atividade leishmanicida, dentre elas cinco anteriormente investigadas quanto ao seu potencial anti *L. amazonensis* *in vitro* (**G1, G2, G3, G6 e G7**) (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019) e onze inéditas (**G29, G30, G32, G33, G34, G35, G36, G37, T4, T5 e T6**). As moléculas **G1-G7** tiveram análise estendida para incluir suas propriedades frente a *L. infantum* e as demais, atividade leishmanicida frente às duas espécies.

Considerando os critérios aqui adotados baseados no artigo KATSUNO et al., 2015, apenas as moléculas que apresentaram potência < 10µM contra promastigotas de *L.*

amazonensis e *L. infantum* e seletividade ($IS > 10$) foram selecionadas para os ensaios anti amastigota subsequentes. Sendo assim, os compostos **G1** ($IC_{50PRO} = 5 \mu M$; $IS = 160$), **G2** ($IC_{50PRO} = 8 \mu M$; $IS = 92$), **G3** ($IC_{50PRO} = 10 \mu M$; $IS = 83$), **G7** ($IC_{50PRO} = 6 \mu M$; $IS = 103$) e **G30** ($IC_{50PRO} = 8 \mu M$; $IS > 37$), foram avaliados quanto à potência frente às formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Nestas análises, destacam-se as moléculas **G1** ($IC_{50AMA} = 6 \mu M$; $IS = 133$), **G6** ($IC_{50AMA} = 7 \mu M$; $IS = 160$) e **G7** ($IC_{50AMA} = 6 \mu M$; $IS = 103$) (Tabela 1), sendo que **G2** e **G7** também apresentam atividade leishmanicida frente a formas amastigotas de *L. amazonensis*, como previamente relatado (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019) (Tabela 1).

Quanto à citotoxicidade destas moléculas frente a macrófagos peritoneais, das moléculas testadas até então, **G1** a **G7** tiveram sua toxicidade determinada em DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019, enquanto que para o restante de compostos (**G29** a **T6**), a citotoxicidade é muito baixa e acima de $200 \mu M$ (Tabela 1).

Compostos Guanidínicos	Atividade anti- <i>L. infantum</i>		Atividade anti- <i>L. amazonensis</i>		Atividade citotóxica em macrófagos murinos (CC ₅₀) µM
	promastigota IC ₅₀ PRO µM (IS)	amastigota IC ₅₀ AMA µM (IS)	promastigota IC ₅₀ PRO µM (IS)	amastigota IC ₅₀ AMA µM (IS)	
G1	5 ± 0,4 (160)	6 ± 0,5 (133)	11 ± 0,7 (70)**	22 ± 3,4 (36)**	802 ± 0,3**
G2	8 ± 2,3 (92)	NA***	19 ± 0,2 (38)**	6 ± 2,5 (132)**	738 ± 0,3**
G3	10 ± 0,9 (83)	19 ± 1,3 (43)	20 ± 0,1 (42)**	41 ± 4,1(20)**	827 ± 1,6**
G6	13 ± 0,5 (86)	7 ± 0,5 (160)	26 ± 1 (43)**	17 ± 2,1 (65)**	1119 ± 105,4**
G7	6 ± 0,5 (103)	6 ± 0,4 (103)	16 ± 1 (39)**	7 ± 0,8 (87)**	619 ± 70,2**
G29	24 ± 3,4 (>12)	NA	38 ± 1,3 (>8)	NA	300*
G30	8 ± 0,1 (>37)	13 ± 1,4 (23)	29 ± 0,2 (>10)	NA	300*
G32	31 ± 1,5 (>10)	NA	14 ± 1,2 (>21)	NA	300*
G33	31 ± 1,5 (>10)	NA	61 ± 1,4 (>5)	NA	300*
G34	40 ± 9 (>7)	NA	53 ± 0,2 (>6)	NA	300*
G35	20 ± 2,1 (>15)	NA	56 ± 5,5 (>5)	NA	300*
G36	23 ± 1,2 (>13)	NA	37 ± 6,5 (>8)	NA	300*
G37	15 ± 0,4 (>20)	NA	15 ± 1,4 (>20)	NA	300*
T4	11 ± 0,6 (>27)	NA	42 ± 0,6 (>7)	NA	200*
T5	88 ± 4 (>3)	NA	56 ± 1,5 (>5)	NA	200*
T6	15 ± 1,2 (>20)	NA	13 ± 0,6 (>23)	NA	200*
Anf B	2 ± 0,4 (11)	4 ± 0,14 (6)	3 ± 0,1 (8)**	5 ± 0,14 (5)**	23 ± 2,5**

** Espírito Santo et al., 2019.

* Maior concentração testada.

*** Problemas na obtenção dos macrófagos peritoneais.

NA: Não avaliado.

IS: Índice de seletividade (CC₅₀ / IC₅₀).

Tabela 1: Resultados da atividade leishmanicida de compostos guanidínicos em *L. infantum* e *L. amazonensis* de promastigotas (IC₅₀PRO) e amastigotas (IC₅₀AMA), atividade citotóxica de macrófagos murinos (CC₅₀) e índice de seletividade (IS). Os valores estão apresentados, respectivamente, como média e ± desvio padrão.

4.2 Avaliação da capacidade inibitória dos compostos guanidínicos frente à protease rCPB2.8

O parasita *Leishmania*, intracelular obrigatório, reside no fagolisossomo de células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente macrófagos. Para evadir a resposta imune do hospedeiro, o parasita utiliza diferentes mecanismos incluindo a secreção de proteases como a CPB para modular a resposta Th1/Th2 do hospedeiro, favorecendo sua proliferação (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998; SIQUEIRA-NETO et al., 2018). A possibilidade de que inibidores de cisteíno proteases sejam utilizados como agentes antiparasitários vem sendo explorada (CHEN et al., 2010; DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021; JONES et al., 2016; MCKERROW et al., 1995; ROSA et al., 2022; SELZER et al., 1997). Cisteíno proteases de parasitas e mamíferos apresentam diferentes rotas preferenciais de processamento e tráfego intracelular, característica que pode ser utilizada para desenho de inibidores mais seletivos para os parasitas (MACH; MORT; GLOSSL, 1994).

Estudos mostram que derivados guanidínicos são capazes de inibir a atividade desta enzima, sendo, portanto, interessantes protótipos para o desenho de novas drogas antileishmaniais tendo como alvo de ação as cisteíno proteases (CHEN et al., 2010; JONES et al., 2016; MARTINS et al., 2016). Interessante destacar que um destes inibidores, o K11777, capaz de inibir a cruzipaina, uma cisteíno protease, avançou para estudos de fase clínica para desenvolvimento de um agente terapêutico para tratamento da doença de Chagas, não prosseguindo, porém, para as próximas fases devido a questões de segurança (MCKERROW, 2018). Outras moléculas guanidínicas foram caracterizadas como análogos de K11777, como por exemplo o composto WRR-483 e também mostraram inibição da cruzipaina (CHEN et al., 2010; JONES et al., 2016). Dentro deste contexto, decidiu-se avaliar se as moléculas guanidínicas aqui estudadas apresentam potencial inibitório frente à enzima rCPB2.8 (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021; DE LUCA et al., 2018).

Assim, analisou-se o potencial das guanidinas inibirem a rCPB2.8. Inicialmente, na concentração 20 μ M, a molécula **G6** foi capaz de inibir em 73% a atividade da enzima, enquanto as moléculas **G32**, **G36** e **T5** apresentaram atividade inibitória de 53, 34 e 9%, respectivamente. Análises posteriores revelaram que G6 apresenta um valor de IC_{50CPB} de 6 μ M. Importante destacar que G6 em concentrações de 2 a 10 μ M não inibe as catepsinas humanas L e B (comunicação pessoal, Eduardo R. P. Gonzalez).

4.3 Cinética enzimática de rCPB2.8 na presença de G6

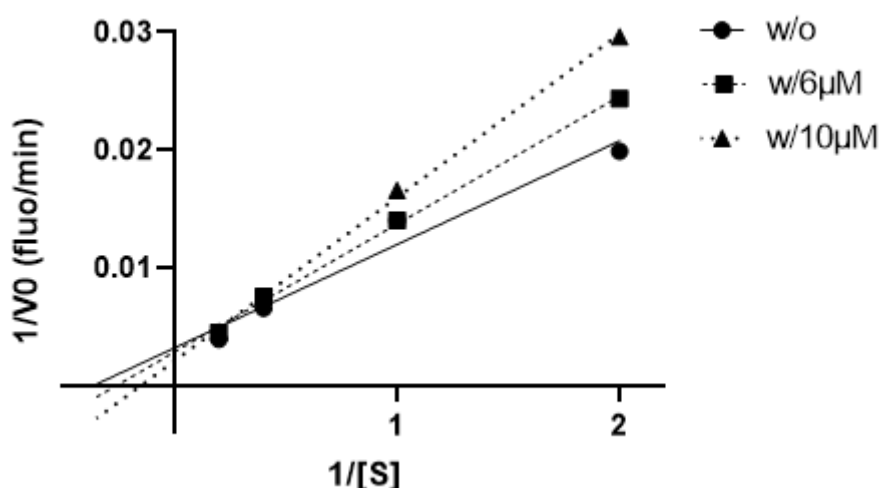
Avançando na investigação para entender o mecanismo de ação da molécula guanidínica **G6** sobre rCPB2.8, foram realizados estudos preliminares de cinética enzimática e, assim, avaliou-se o tipo de interação do inibidor e enzima, além de verificar se a interação é irreversível, reversível competitiva ou incompetitiva ou inibição mista (LEHNINGER, 2014)

Após os ensaios onde, diante de concentrações fixas da enzima (rCPB2.8 7 nM) e do inibidor (**G6** = 6 μ M e 10 μ M), variou-se a concentração do substrato Z-F-Arg-MCA. Os valores de fluorescência emitidos foram utilizados para determinar a velocidade da reação em função do tempo para cada concentração do substrato (V_o μ M/min) através da equação de Michaelis – Menten (K_m) e, assim, determinou-se via gráfico duplo recíproco de Lineweaver e Burk, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (YOSHINO; MURAKAMI, 2009).

A atividade da rCPB2.8 na presença de concentração aumentada de G6, apresentou valores de K_m aumentados, o que sugere que o inibidor está diminuindo a afinidade da enzima pelo seu substrato (Tabela 2 e Figura 3).

	$V_{m\acute{a}x}$	K_m
w/o	312,5	2,8
w/6 μM	344,8	3,8
w/10 μM	476	6,6

Tabela 2: Valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m obtidos através do ensaio de cinética enzimática de rCPB2.8 na ausência (w/o) ou presença do inibidor **G6** em 6 e 10 μ M (w/6 μ M ou w/10 μ M) com concentrações diversas do substrato Z-F-Arg-MCA.



Fonte: Autor

Figura 3: Gráfico duplo recíproco de Lineweaver e Burk mostrando a relação entre o recíproco da atividade da enzima ($1/V_0$) e o recíproco da concentração do substrato ($1/[S]$). A interceptação do gráfico com a abscissa dá o recíproco da constante de Michaelis-Menten ($1/K_m$) na ausência (w/o) e na presença de 6 ou 10 μM (w/6 μM ou w/10 μM) de **G6**.

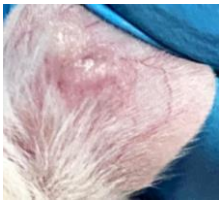
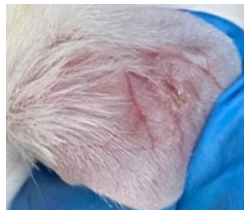
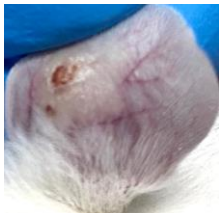
Embora algumas moléculas não tenham apresentado atividade anti - promastigota interessante, ainda assim, é importante destacar que estas deverão ser testadas quanto a potencial atividade anti - amastigota, pois eventualmente essas moléculas podem ter como alvo de ação proteínas que são importantes para a sobrevivência da forma amastigota no macrófago, mesmo não tendo relevância biológica para promastigota, como é o caso da enzima rCPB2.8 (DAS et al., 2013). Verifica-se que a molécula **G32** (*L. infantum* $\text{IC}_{50\text{PRO}} = 31\mu\text{M}$; *L. amazonensis* $\text{IC}_{50\text{PRO}} = 14\mu\text{M}$) também é capaz de inibir atividade de promastigotas, embora muito fracamente, podendo ser modificada para melhorar potência e ação inibitória frente à protease.

4.4 Avaliação da eficácia do tratamento de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* utilizando as moléculas guanidínicas G6 e G7.

Durante o desenvolvimento deste projeto, decidiu-se estender os estudos de potencial terapêutico frente a leishmaniose cutânea anteriormente realizados (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019), investigando-se a eficácia do inibidor de rCPB2.8, **G6** ($IC_{50AMA} = 17,2 \mu M$, IS= 65), na diminuição da carga parasitária do modelo experimental Balb/c infectado com *L. amazonensis*, incluindo ainda neste estudo a molécula **G7** ($IC_{50AMA} = 7,1 \mu M$; IS = 87), a qual também apresenta boa potência, seletividade e mecanismo de ação não relacionado à inibição de rCPB2.8. É importante ressaltar que, embora não abordado neste trabalho, estudos de eficácia destes compostos utilizando o modelo murino para leishmaniose visceral deverão ser realizados, visto a potência e a seletividade destes frente a *L. infantum* (Tabela 1).

Camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, oito semanas após a infecção, quando surgiram lesões no local da inoculação dos parasitas, foram tratados via intraperitoneal ao longo de 15 dias, uma vez ao dia. Para isso, a progressão das lesões nas orelhas dos animais infectados foi acompanhada pela medida do tamanho do diâmetro das lesões ($d \cdot D$; d = diâmetro menor e D = diâmetro maior), espessura, volume das lesões e peso dos animais ao longo de todo o tratamento, a cada três dias.

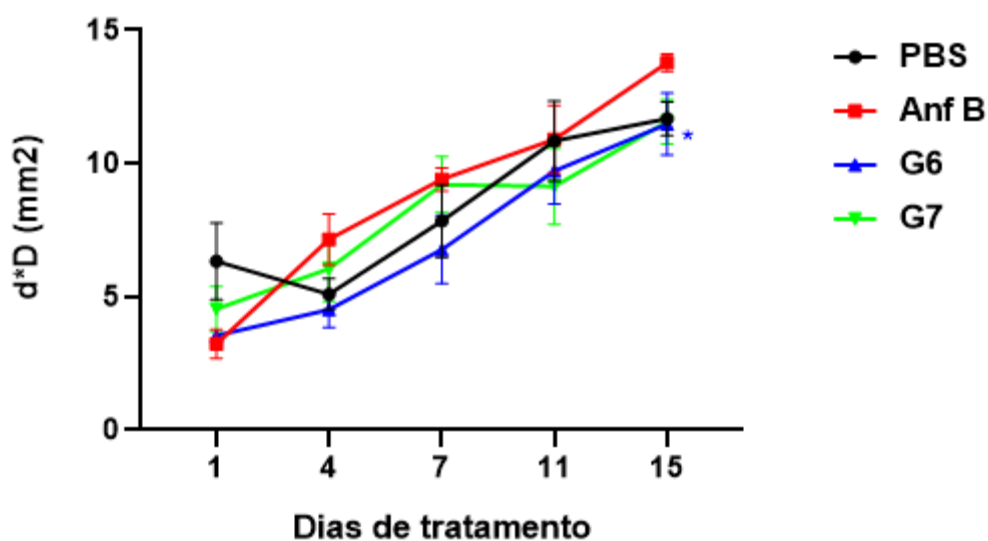
Após o tratamento foi possível observar boa evolução no aspecto das lesões dos grupos tratados com **G6** e **G7** quando comparados ao grupo tratado apenas com o veículo (Figura 4), não havendo, entretanto, desaparecimento total das lesões, o que pode estar associado à importante susceptibilidade dos camundongos BALB/c frente à infecção por *Leishmania*, sendo difícil a cura dessa linhagem, mesmo após o tratamento com o fármaco de referência (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Grupos	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Grupo 1 Infectados e tratados com PBS + 1% DMSO			
Grupo 2 Infectados e tratados com Anf B. 2 mg/kg/dia			
Grupo 3 Infectados e tratados com molécula G6 2 mg/kg/dia			
Grupo 4 Infectados e tratados com a molécula G7 2 mg/kg/dia			

Fonte: Autor

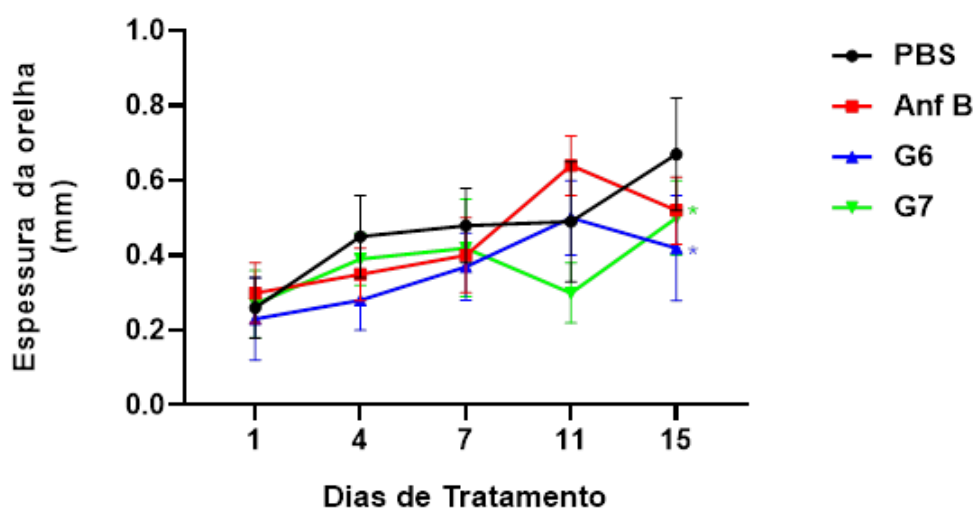
Figura 4: Fotos representativas do desenvolvimento da lesão na orelha direita de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* nos dias 1, 7 e 15 de tratamento por via intraperitoneal com PBS, Anf B e guanidinas **G6** e **G7**.

Após o final do tratamento, verificou-se que **G6** e **G7** foram capazes de reduzir as lesões quanto ao diâmetro, espessura e volume em relação ao grupo dos animais tratados com o veículo PBS (Figuras 5, 6 e 7).



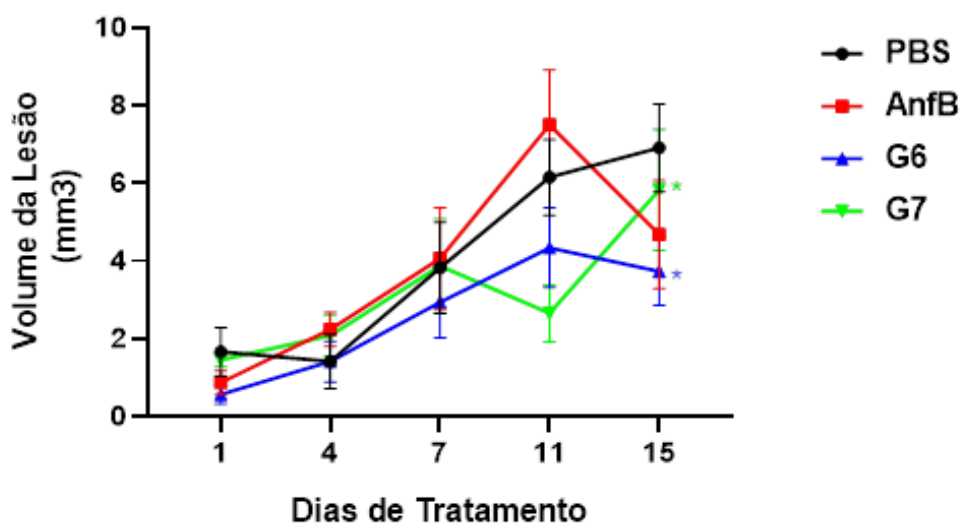
Fonte: Autor

Figura 5: Diâmetro das lesões nas orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e guanidinas **G6** e **G7**. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do diâmetro ($D \times d$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com **G6** e PBS ($p < 0.01$).



Fonte: Autor

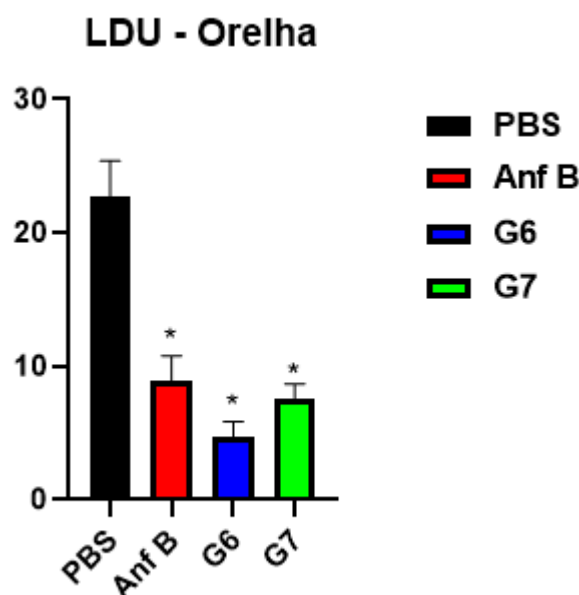
Figura 6: Espessura das lesões nas orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e guanidinas **G6** e **G7**. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias da espessura (mm) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados com PBS ($p < 0.05$).



Fonte: Autor

Figura 7: Volume das lesões nas orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e guanidinas **G6** e **G7**. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do volume ($v = D \times d \times e$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor, e: espessura) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados com PBS ($p < 0.05$).

Para determinar a eficácia do tratamento *in vivo*, determinou-se a carga parasitária dos grupos infectados utilizando o cálculo de índice *LDU*. Verifica-se que após o tratamento com Anf B, houve redução de 60,8% da carga parasitária, enquanto que para as moléculas **G6** e **G7**, diminuição de 79,4% e 66,5%, respectivamente. Todos os grupos (Anf B, **G6** e **G7**) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo tratado apenas com o veículo (Figura 8). Interessante notar que, embora os ensaios *in vitro* sugerem que **G7** é 2,5 vezes mais potente que **G6** (Tabela 1), fatores relacionados com parâmetros farmacocinéticos podem estar associados com esta diferença, desta forma, poderão ser futuramente avaliados quando sobre aos aspectos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) destes compostos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).



Fonte: Autor

Figura 8: Quantificação da carga parasitária de lesões cutâneas na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* utilizando o índice LDU. Os dados estão expressos como média ± DP de animais infectados e tratados durante 15 dias distintos por grupos, sendo eles: tratados com PBS, Anf B (2 mg/kg/dia), **G6** (2 mg/kg/dia) e **G7** (2 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais tratados com PBS em relação aos tratados com Anf B, **G6** e **G7** ($p < 0,001$).

Adicionalmente, avaliou-se marcadores bioquímicos de função hepática e renal para determinar possíveis efeitos tóxicos de **G6** e **G7**. Foram avaliados os níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), bilirrubina total, creatinina e ureia (Figura 9).

Alterações dos níveis de ALT e AST estão associados a possíveis perdas de integridade de células hepáticas, no local onde ocorrem os processos de biotransformação de fármacos (TIETZ et al., 2001). Neste trabalho, não houveram diferenças estatisticamente significantes para os níveis de ALT e AST obtidos para os tratamentos com relação ao grupo de animais saudáveis, indicando que não há dano para os hepatócitos decorrente da administração de **G6** e **G7** (Figuras 9 A e B).

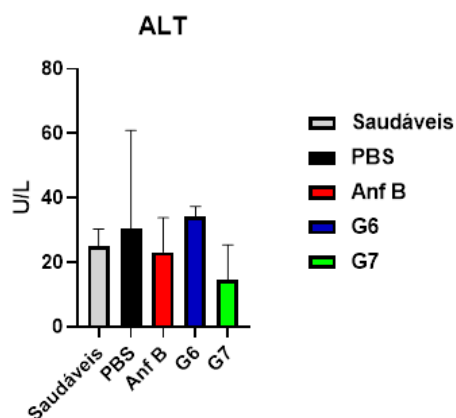
O aumento de níveis de ALP e bilirrubina no plasma, pode estar relacionado à possível obstrução do fluxo biliar devido à processos patológicos, ou até mesmo associado a perda de hepatócitos que podem causar liberação de bilirrubina no plasma (TIETZ et al., 2001). Em relação aos níveis de ALP, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudáveis e os tratados com **G6** e **G7** (Figura 9 C).

Já em relação aos níveis de bilirrubina (Figura 9 D), o grupo de animais infectados e

tratados com PBS apresentou um aumento no nível de bilirrubina quando comparado ao grupo de animais saudáveis, o que é esperado por consequência da doença (BRADLEY; IRKLEY SIR WILLIAM, 1977). Constata-se também que os grupos tratados com composto **G7** foram prevenidos de danos hepáticos, visto que apresentaram uma diminuição nos níveis de bilirrubina comparados ao grupo de tratados com PBS, reforçando a segurança desta molécula no tratamento de leishmaniose cutânea.

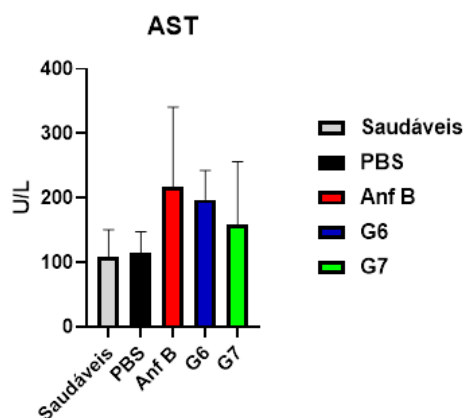
Os rins, são órgãos geralmente afetados em decorrência das leishmanioses e entre os biomarcadores que indicam tais alterações renais estão a creatinina e ureia (WANG, HONGKAI; JIANG, 2014). De acordo com a figura 9 E e 9 F, os grupos de tratamento analisados não exibiram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de creatinina, entretanto, os animais que receberam tratamento com Anf B e o composto **G6** exibiram aumento estatisticamente significativo nos níveis de ureia em relação aos animais sadios, o que pode indicar um possível efeito nefrotóxico causado pela própria doença, uma vez que a leishmaniose cutânea, provoca danos aos rins do hospedeiro mesmo que de forma mais branda que em casos de leishmaniose visceral (MENESES et al., 2020).

A)



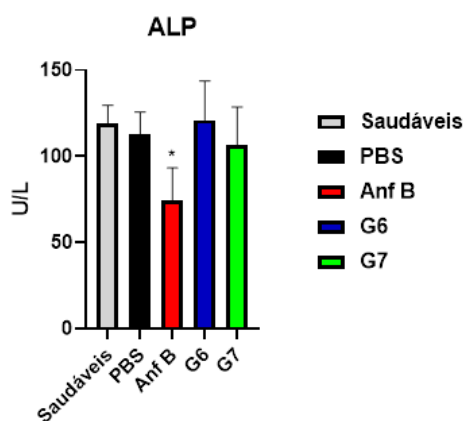
Fonte: Autor

B)



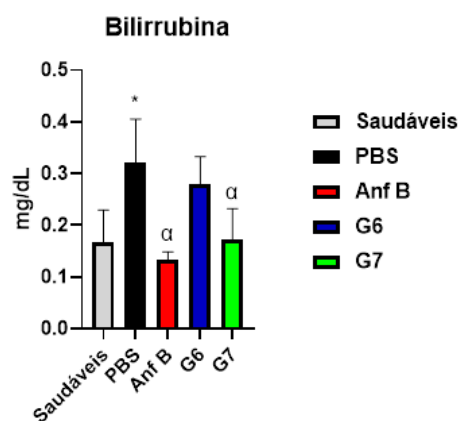
Fonte: Autor

C)



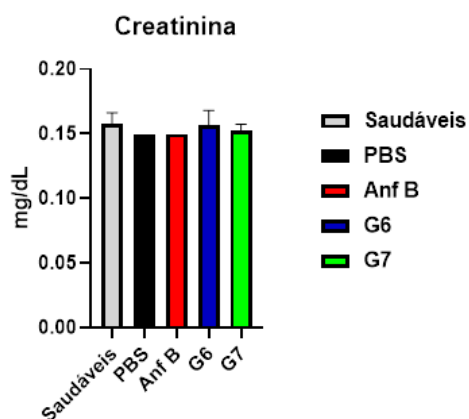
Fonte: Autor

D)



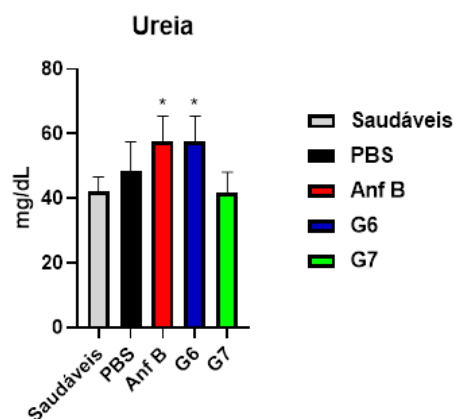
Fonte: Autor

E)



Fonte: Autor

F)



Fonte: Autor

Figura 9: Níveis plasmáticos de biomarcadores de função hepática e renal em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratados durante 15 dias com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, 4 e 5. **A)** níveis de ALT; **B)** níveis de AST; **C)** níveis de ALP; **D)** níveis de bilirrubina; **E)** níveis de

creatinina; **F**) níveis de ureia. Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. * Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$); α : diferença estatisticamente significativa com animais infectados, tratados com PBS ($p < 0,05$).

Interessante observar que as moléculas **G6** e **G7**, foram eficazes em reduzir a carga parasitária e melhorar os aspectos das lesões, a um nível parecido com o tratamento de Anf B, além de não induzirem comprometimento nas funções renais e hepáticas.

Visto que para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para tratamento das leishmanioses é necessário levar em consideração a eficácia de uma molécula em tratar os aspectos da patologia, bem como reduzir a carga parasitária e não ser tóxico para o organismo, os compostos **G6** e **G7** atingiram os critérios mencionados, portanto, estes compostos podem ser considerados promissores e seguros para serem utilizados em futuras avaliações no tratamento de leishmaniose cutânea.

5 CONCLUSÃO

Foram testadas 16 moléculas guanidínicas contra formas promastigotas de *L. infantum* e 11 para *L. amazonensis*, dentre elas, **G1** ($IC_{50PRO} = 5 \mu M$; $IS = 160$), **G2** ($IC_{50PRO} = 8 \mu M$; $IS = 92$), **G3** ($IC_{50PRO} = 10 \mu M$; $IS = 83$), **G7** ($IC_{50PRO} = 6 \mu M$; $IS = 103$) e **G30** ($IC_{50PRO} = 8 \mu M$; $IS > 37$) se destacaram em sua potência em *L. infantum*. Estas moléculas foram então avaliadas frente às formas amastigotas intracelulares, sendo **G1** ($IC_{50AMA} = 6 \mu M$; $IS = 133$), **G6** ($IC_{50AMA} = 7 \mu M$; $IS = 160$) e **G7** ($IC_{50AMA} = 6 \mu M$; $IS = 103$) as mais promissoras.

Buscando investigar os mecanismos de ação dessas moléculas, **G6** apresentou inibição a atividade de rCPB2.8 ($IC_{50CPB} = 6 \mu M$) e adicionalmente, através de ensaios de cinética enzimática pode-se sugerir que **G6** diminui a interação da enzima rCPB2.8 pelo substrato. Dados prévios mostraram que as moléculas **G6** e **G7** possuem potência e seletividade frente à *L. amazonensis*, sendo assim, foram selecionadas para serem usadas no tratamento *in vivo* de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com uma dose de 2 mg/kg/dia. O resultado desse tratamento foi muito satisfatório, visto que as moléculas guanidínicas diminuíram as lesões provocadas pela doença e reduziram significativamente a carga parasitária nas lesões (79,4% e 66,5% respectivamente), sem causar danos hepáticos e renais nos animais. Ao final, constata-se que os compostos guanidínicos **G6** e **G7** devem ser investigados como moléculas promissoras no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de leishmanioses.

6. REFERÊNCIAS

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

BERLINCK, R. G. S.; ROMMINGER, S. The chemistry and biology of guanidine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 456–490, 2016.

BORGES, E. L. et al. Effect of Polyhexamethylene Biguanide Solution on Bacterial Load and Biofilm in Venous Leg Ulcers: A Randomized Controlled Trial. **Journal of wound, ostomy, and continence nursing: official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society**, v. 45, n. 5, p. 425–431, 2018.

BRADLEY, D. J.; IRKLEY SIR WILLIAM, J. K. Regulation of Leishmania populations within the host I the variable course of Leishmania donovani infections in mice. **Immunol**, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa nº 13/2020**. Brasília, DF: Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial, 2020. Assunto: Orientações sobre o uso da miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar no âmbito do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/estudos-e-notas-informativas/2020/nota-informativa-miltefosina.pdf>.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMERON, P. et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Macrophage IL-12 Production by Leishmania mexicana Amastigotes: The Role of Cysteine Peptidases and the NF-κB Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297–3304, 2004.

CHEN, Y. T. et al. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against Trypanosoma cruzi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

CLEMENTINO, L. DA C. et al. In vitro activities of glycoalkaloids from the Solanum lycocarpum against Leishmania infantum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 673–677, 2018.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

D'ANNESSA, I.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A. Topoisomerase 1B as a Target Against Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 203–210, 2015.

DA COSTA CLEMENTINO. Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas. Tese. **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**. Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, São Paulo, 2022.

DA COSTA CLEMENTINO, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of N-oxide derivatives with potent in vivo antileishmanial activity. **PLoS ONE**, v. 16, n. November, p. 1–22, 2021.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017.

DAS, P. et al. Protease inhibitors in potential drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 50, n. 5, p. 363–376, 2013.

DE ALMEIDA, L. **Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano : atividade biológica in vitro e in vivo e potenciais mecanismos de ação**. Tese. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, São Paulo, 2017.

DE ALMEIDA, L. et al. In vivo antileishmanial activity and histopathological evaluation in *Leishmania infantum* infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 536–547, 2017.

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

DO ESPÍRITO SANTO, R. D. et al. N, N' N"-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 116–128, 2019.

DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.

ESPIRITO SANTO, R. et al. Use of Guanidine Compounds in the Treatment of Neglected Tropical Diseases. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 20, p. 2572–2602, 2014.

JONES, B. D. et al. Synthesis and Evaluation of Oxyguanidine Analogues of the Cysteine Protease Inhibitor WRR-483 against Cruzain. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 77–82, 2016.

KATHURIA, D. et al. Biguanides: Species with versatile therapeutic applications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 219, p. 113378, 2021.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.

LEHNINGER, Albert; NELSON, David. L.; COX, Michel M. **Princípios de Bioquímica. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed**, 2014.

MACH, L.; MORT, J. S.; GLOSSL, J. Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 17, p. 13030–13035, 1994.

MARTINS, L. F. et al. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against Trypanosoma cruzi and Selectively Eliminate Leishmania (L.) infantum Intracellular Amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 9, p. 2202–2210, 2016.

MCKERROW, J. H. et al. **The Cysteine Protease of Trypanosoma cruzi as a Model for Antiparasite Drug Design**, 1995.

MCKERROW, J. H. Update on drug development targeting parasite cysteine proteases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 4–7, 2018.

MENESES, G. C. et al. **Novel kidney injury biomarkers in tropical infections: A review of the literature** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2020.

MOTTRAM, J. C. et al. **Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa** *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2003.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 455–460, 1998.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, 2004.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999–1002, 2000.

ONISHI, K. et al. Cathepsin L is crucial for a Th1-type immune response during Leishmania major infection. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 5, p. 468–474, abr. 2004.

PAHO; WHO. **TREATMENT RECOMMENDATIONS LEISHMANIASIS IN THE AMERICAS**, 2018.

REBELLO, K. M. et al. Cysteine proteinases from promastigotes of Leishmania (Viannia) braziliensis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 95–104, jan. 2009.

REY, L. - Parasitologia, 4ª ed, p. 359-362, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO, J. F. R. Inibidores de Cisteíno Proteases como Candidatos Terapêuticos para o Tratamento de Doenças Parasitárias. p. 94, 2018.

ROSA, L. B. et al. Antileishmanial activity and insights into the mechanisms of action of

symmetric Au(I) benzyl and aryl-N-heterocyclic carbenes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 229, 1 abr. 2022.

SALEM, M.; WERBOVETZ, K. Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006.

SATOH, T. et al. Medicinal chemical studies on synthetic protease inhibitors, trans-4-guanidinomethylcyclohexanecarboxylic acid aryl esters. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 2, p. 647–54, 1985.

SELZER, P. M. et al. **Leishmania major: Molecular Modeling of Cysteine Proteases and Prediction of New Nonpeptide Inhibitors**, 1997.

SHORT, J. H.; DARBY, T. D. Sympathetic Nervous System Blocking Agents. IV. Synthesis of 2-(2-Methylthioethylamino)ethylguanidine Sulfate and Related Compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 848–854, 1968.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. **Cysteine proteases in protozoan parasites** PLoS Neglected Tropical Diseases Public Library of Science, 2018.

TIETZ, N. W. et al. **Tietz fundamentals of clinical chemistry.**, 2001. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001.

VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against leishmania amazonensis and trypanosoma cruzi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1032–1039, 2016.

VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. 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**, v. 66, n. 1, p. e00767-21, 2021.

VELÁSQUEZ, Á. M. A. et al. 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**,

v. 61, n. 8, p. e00688-17, 2017.

VIEIRA, R. P.; SANTOS, V. C.; FERREIRA, R. S. Structure-based Approaches Targeting Parasite Cysteine Proteases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4435–4453, 2017.

WANG, HONGKAI; JIANG, J. R. AND T. Urea. In: **Urea Transporters**, p. 7–29, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis surveillance 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**. Geneva, 2020.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. A graphical method for determining inhibition constants. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1288–1290, 2009.