

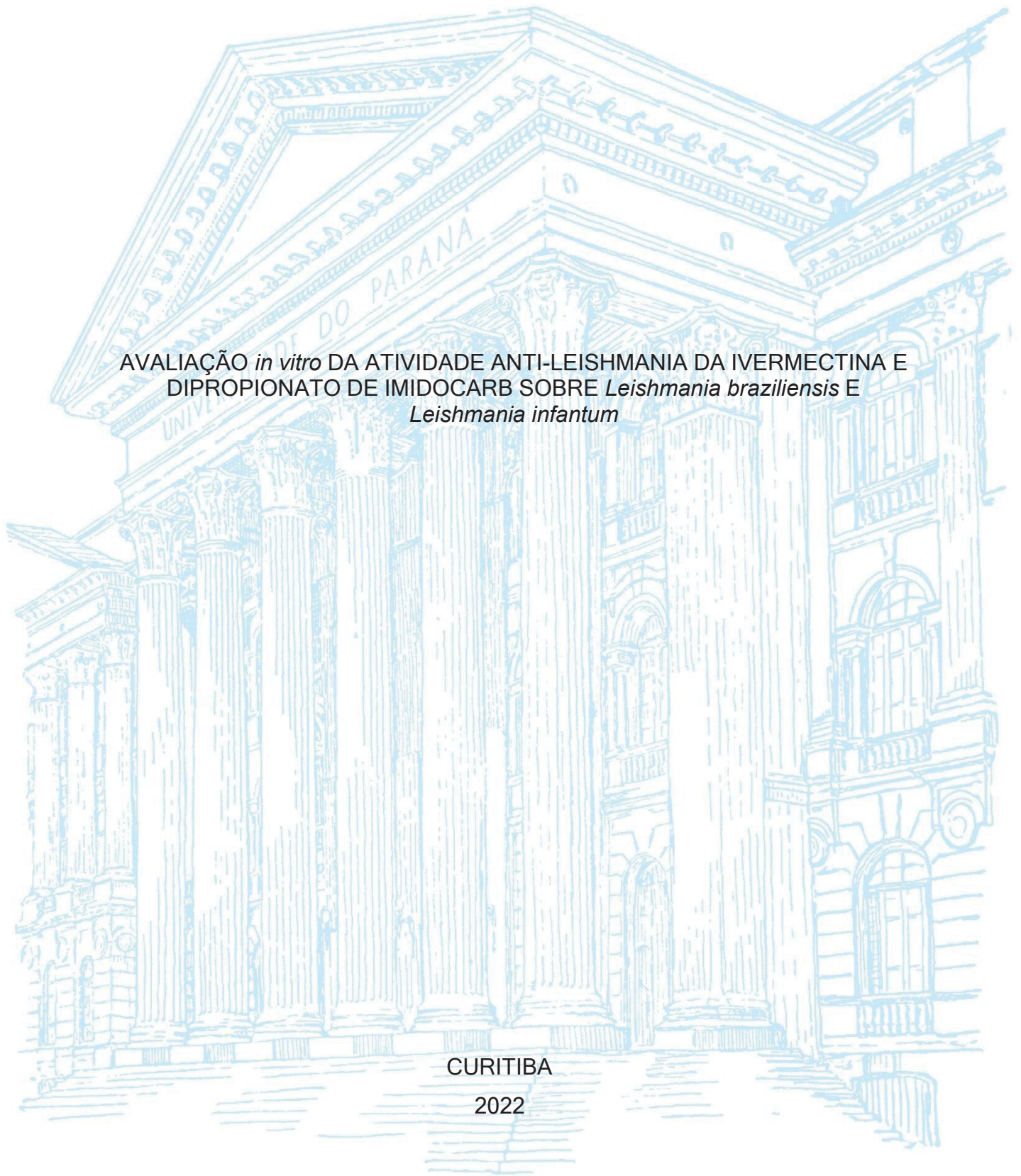
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHALIA MARIA DREHMER DE LARA SIGNORINI

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DA IVERMECTINA E
DIPROPIONATO DE IMIDOCARB SOBRE *Leishmania braziliensis* E
Leishmania infantum

CURITIBA

2022



NATHALIA MARIA DREHMER DE LARA SIGNORINI

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DA IVERMECTINA E
DIPROPIONATO DE IMIDOCARB SOBRE *Leishmania braziliensis* E *Leishmania*
infantum

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason.

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo.

Coorientador: Dr. Gustavo Gonçalves.

CURITIBA

2022

S578 Signorini, Nathalia Maria Drehmer de Lara
Avaliação *in vitro* da atividade anti-leishmania da ivermectina e dipropionato de imidocarb sobre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* [recurso eletrônico] / Nathalia Maria Drehmer de Lara Signorini. - Curitiba, 2022.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason.

1. Reposicionamento de medicamentos. 2. Ivermectina – uso terapêutico. 3. Imidocarbo – uso terapêutico. 4. Leishmaniose cutânea – tratamento farmacológico. 5. Leishmaniose visceral – tratamento farmacológico. I. Messias-Reason, Iara José de. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WC 715

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.

Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734.



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATHALIA MARIA DREHMER DE LARA** intitulada: "**ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB .**", sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

22/12/2022 09:43:09.0

IARA JOSE DE MESSIAS REASON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/12/2022 16:48:27.0

ALTAIR ROGERIO AMBROSIO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica

21/12/2022 01:45:05.0

LORENA BAVIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º andar, - Bairro Alto da Glória, Curitiba/PR, CEP 80060-150
Telefone: (41) 3360-1099 - <http://www.ufpr.br/>

CERTIDÃO

Processo nº 23075.022686/2020-73

ARQUIVO COMPLEMENTAR - TERMO DE APROVAÇÃO

Certificamos, para fins de comprovação, atendendo ao disposto na resolução 32/17-CEPE no que tange a necessidade de correções e ajustes no Termo de Aprovação para realização do depósito legal da dissertação de Mestrado, junto ao Sistema de Bibliotecas da UFPR (SIBI). No documento expedido pela banca avaliadora da discente **NATHALIA MARIA DREHMER DE LARA SIGNORINI**, que ocorreu no dia 20 de dezembro de 2022, às 14:00 nas dependências deste Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, conferem as seguintes alterações:

Sobre o nome da discente titulada:

- ONDE SE LÊ: NATHALIA MARIA DREHMER DE LARA
- LEIA-SE: NATHÁLIA MARIA DREHMER DE LARA SIGNORINI

Sobre o título do trabalho de conclusão:

- ONDE SE LÊ: "ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB"
- LEIA-SE: "AVALIAÇÃO in vitro DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DA IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB SOBRE Leishmania braziliensis E Leishmania infantum"

Sem mais para o momento,

EMILTON LIMA JÚNIOR

Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Medicina Interna e Ciências da Saúde - UFPR



Documento assinado eletronicamente por **EMILTON LIMA JUNIOR, COORDENADOR(A) DE CURSO DE POS-GRADUACAO (PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM MEDICINA INTERNA E CIENCIAS DA SAUDE) - SD**, em 27/03/2023, às 11:02, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

Dedico este trabalho à minha família por todo apoio e incentivo ao longo da caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela proteção, amor e misericórdia para comigo durante toda minha vida. Sei que com Ele nunca estou sozinha.

Agradeço ao meu marido Luiz, por ser meu maior incentivador. Te amo incondicionalmente.

À minha avó Elza, que com sua preocupação demonstra todo seu amor, cuidado e carinho, para mim você será eterna.

À minha mãe Ezalda, mulher forte e determinada que me ensinou sobre gratidão e empatia. Você é uma inspiração.

Aos meus tios e padrinhos Elaine e Geraldo. Agradeço por me receberem em sua casa há mais de 15 anos e me ensinarem sobre responsabilidade, companheirismo, união, afeto e muito amor. Vocês são os melhores dindos que eu poderia ter tido na vida.

Aos meus sogros Terezinha e Renato, obrigada pelo forte incentivo para que este trabalho se concretizasse.

Às minhas amigas maravilhosas que sempre tornam cada momento não tão alegre em risadas estonteantes.

À Amanda Praça Bialli Drehmer Cruz pela ajuda com os gráficos, agradeço pelo tempo dedicado a mim e pelos ensinamentos.

Agradeço profundamente à minha orientadora Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason por ter confiado em mim e me recebido em seu laboratório e, posteriormente, como sua orientanda. Obrigada por ter me reaproximado de Jesus, isso fez toda a diferença na minha vida desde então.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo por ter aberto as portas de seu laboratório e sempre me receber com um sorriso.

Ao meu coorientador Dr. Gustavo Gonçalves, meu grande parceiro nessa caminhada. Sem sua ajuda este trabalho não seria possível. Obrigada por cada ensinamento prático dentro do laboratório, e pela infundável paciência.

Por fim, agradeço a todos meus colegas do laboratório LIPM, lugar onde aprendi muito, conheci pessoas maravilhosas e inspiradoras, das quais lembrarei para sempre.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

RESUMO

As leishmanioses compõem um grupo de doenças tropicais infecciosas, endêmicas e prioritárias globalmente. Frente à indisponibilidade vacinal, baixa disponibilidade, alto custo e toxicidade de fármacos, o uso de drogas comercializadas para tratamento de outras doenças, que não àquelas tradicionalmente propostas pelo fabricante, é desejável. Neste contexto destacam-se os fármacos Ivermectina (IVM) e Dipropionato de Imidocarb (DPI), cuja potencial atividade anti-leishmania pode ser investigada. O objetivo geral é avaliar a atividade anti-leishmania dos fármacos veterinários IVM e DPI. Os materiais e métodos compreendem experimentação *in vitro*, realizada por meio de teste de viabilidade das promastigotas (obtido pelo teste MTT) e amastigotas (obtido por leitura no equipamento Operetta®) de *L. braziliensis* e *L. infantum* frente aos fármacos, teste de citotoxicidade das linhagens celulares VERO e THP-1 frente aos fármacos. Para as formas amastigotas foi empregada a linhagem THP-1 como células hospedeiras. A curva de crescimento das promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* frente aos fármacos IVM e DPI foi realizada ao longo de oito dias consecutivos. Os resultados foram analisados com auxílio de testes estatísticos; $p < 0,05$ representou diferença estatística significativa entre o teste e o grupo controle. A análise da viabilidade da IVM frente à promastigota de *L. braziliensis* e de *L. infantum* apresentou diferença estatística em todas as concentrações. A viabilidade do DPI frente à promastigota de *L. braziliensis* apresentou diferença estatística entre as concentrações de 100 e 1,23 $\mu\text{g/mL}$; e entre 100 a 3,7 $\mu\text{g/mL}$ frente à promastigota de *L. infantum*. Quanto à citotoxicidade da IVM frente às células VERO, houve diferença em todas as concentrações; quanto ao DPI houve diferença estatística apenas na concentração de 333,33 $\mu\text{g/mL}$. No teste de citotoxicidade da IVM frente às células THP-1 houve diferença estatística nas duas maiores concentrações, 100 e 33,33 $\mu\text{g/mL}$; para DPI a análise mostrou não haver diferença nas diversas concentrações. Na análise da viabilidade das amastigotas de *L. braziliensis* com IVM, não houve diferença entre as concentrações testadas, diferentemente dos testes com amastigotas de *L. infantum*, em que houve diferença estatística das concentrações mais altas, 17 e 3,4 $\mu\text{g/mL}$. Na viabilidade das amastigotas de *L. braziliensis* com DPI, houve diferença estatística nas concentrações 25, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$; para amastigotas de *L. infantum* houve diferença nas concentrações de 25 e 5 $\mu\text{g/mL}$. A IVM foi eficaz contra os parasitos, porém tóxica contra as células; o DPI foi eficaz contra os parasitos e apresentou baixa toxicidade para as células. Conclui-se que o reposicionamento de DPI para o tratamento de leishmanioses causadas por *L. braziliensis* e *L. infantum* é promissor considerando a atividade anti-leishmania com baixa toxicidade demonstrada *in vitro*. Resultado esse inédito e promissor para futuros ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: Leishmaniose 1. Parasitos 2. Vetores de doenças 3. Reposicionamento de fármacos 4. Leishmaniose cutânea 5. Leishmaniose visceral 6. Drogas veterinárias 7.

ABSTRACT

Leishmaniases make up a group of infectious, endemic and priority tropical diseases globally. Faced with vaccine unavailability, low availability, high cost and drug toxicity, the use of drugs marketed for the treatment of other diseases, other than those traditionally proposed by the manufacturer, is desirable. In this context, the drugs Ivermectin (IVM) and Imidocarb Dipropionate (DPI) stand out, whose potential anti-leishmania activity can be investigated. The general objective is to evaluate the anti-leishmanial activity of the veterinary drugs IVM and DPI. The materials and methods include in vitro experimentation, carried out by means of a viability test of promastigotes (obtained by the MTT test) and amastigotes (obtained by reading in the Operetta® equipment) of *L. braziliensis* and *L. infantum* against drugs, cytotoxicity test of VERO and THP-1 cell lines against drugs. For amastigotes, the THP-1 cell line was used as host cells. The growth curve of *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes against the drugs IVM and DPI was carried out over eight consecutive days. The results were analyzed with the aid of statistical tests; $p < 0.05$ represented a statistically significant difference between the test and the control group. The viability analysis of IVM against the promastigotes of *L. braziliensis* and *L. infantum* showed statistical difference in all concentrations. The viability of DPI against the promastigote of *L. braziliensis* showed statistical difference between the concentrations of 100 and 1.23 $\mu\text{g/mL}$; and between 100 and 3.7 $\mu\text{g/mL}$ against the promastigotes of *L. infantum*. As for the cytotoxicity of IVM against VERO cells, there was difference in all concentrations; as for the DPI, there was a statistical difference only in the concentration of 333.33 $\mu\text{g/mL}$. In the IVM cytotoxicity test against THP-1 cells, there was a statistical difference in the two highest concentrations, 100 and 33.33 $\mu\text{g/mL}$; for DPI the analysis showed no difference in the different concentrations. In the viability analysis of *L. braziliensis* amastigotes with IVM, there was no difference between the tested concentrations, unlike the tests with *L. infantum* amastigotes, in which there was a statistical difference in the highest concentrations, 17 and 3.4 $\mu\text{g/mL}$. In the viability of *L. braziliensis* amastigotes with DPI, there was statistical difference in the concentrations 25, 5 and 1 $\mu\text{g/mL}$; for amastigotes of *L. infantum* there was a difference in the concentrations of 25 and 5 $\mu\text{g/mL}$. IVM was effective against parasites, but toxic against cells; DPI was effective against parasites and showed low toxicity to cells. It is concluded that the repositioning of DPI for the treatment of leishmaniasis caused by *L. braziliensis* and *L. infantum* is promising considering the anti-leishmanial activity with low toxicity demonstrated in vitro. This unprecedented and promising result for future in vivo tests.

Keywords: Leishmaniasis 1. Parasites 2. Disease vectors 3. Drug repositioning 4. Cutaneous leishmaniasis 5. Visceral leishmaniasis 6. Veterinary drugs 7.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÊMEA DE FLEBOTOMÍNEO INGURGITADA.....	22
FIGURA 2 - CICLO DE TRANSMISSÃO DA <i>Leishmania spp.</i>	23
FIGURA 3 - FORMAS FLAGELADA OU PROMASTIGOTA (A) E NÃO FLAGELADA OU AMASTIGOTA DA <i>Leishmania spp.</i> (B).....	24
FIGURA 4 - FORMA PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania spp</i> EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).	24
FIGURA 5 - CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL EM 2020	26
FIGURA 6 - CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL EM 2020	28
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DE PESQUISA REALIZADAS	34
FIGURA 8 - IMAGENS PROVENIENTES DO EQUIPAMENTO OPERETTA® - CÉLULAS AMASTIGOTAS	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> FRENTE À IVERMECTINA.....	39
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	40
GRÁFICO 3 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> FRENTE À IVERMECTINA.....	41
GRÁFICO 4 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	42
GRÁFICO 5 - CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA FRENTE ÀS CÉLULAS VERO.....	43
GRÁFICO 6 - CITOTOXICIDADE DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS VERO.....	44
GRÁFICO 7 - CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1.....	45
GRÁFICO 8 - CITOTOXICIDADE DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1	46
GRÁFICO 9 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> FRENTE À IVERMECTINA.....	48
GRÁFICO 10 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB	49
GRÁFICO 11 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> FRENTE À IVERMECTINA.....	50
GRÁFICO 12 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB	51
GRÁFICO 13 - CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>L. braziliensis</i> FRENTE À AÇÃO DA IVERMECTINA.....	54
GRÁFICO 14 - CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>L. braziliensis</i> FRENTE À AÇÃO DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB	55
GRÁFICO 15 - CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>L. infantum</i> FRENTE À AÇÃO DA IVERMECTINA.....	56

GRÁFICO 16 - CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>L. infantum</i> FRENTE À AÇÃO DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB	56
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPI	- Dipropionato de imidocarb
IC ₅₀	- Menor concentração do fármaco capaz de reduzir 50% da viabilidade celular dos parasitos
IC ₉₀	- Menor concentração do fármaco capaz de reduzir 90% da viabilidade celular dos parasitos
IS	- Índice de seletividade
IVM	- Ivermectina
kg	- Quilograma
LT	- Leishmaniose tegumentar
LV	- Leishmaniose visceral
mg	- miligrama
MS	- Ministério da Saúde
MTT	- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
nM	- nanomolar
nm	- nanômetro
NNN	- Meio de cultura Novey-MacNeal Nicole
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PMA	- phorbol myristate acetate
SBF	- Soro fetal bovino
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
THP-1	- Linhagem celular de monócito humana
VERO	- Célula de rim de macaco-verde africano (<i>Chlorocebus aethiops</i>)
µL	- microlitro
µM	- micromolar
µm	- micrômetro
°C	- grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	JUSTIFICATIVA.....	19
1.2	HIPÓTESE	20
1.3	OBJETIVOS.....	20
1.3.1	Objetivo geral.....	20
1.3.2	Objetivos específicos	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	<i>Leishmanias spp</i>	20
2.1.1	CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO.....	21
2.1.2	MORFOLOGIA DA <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	23
2.1.3	LEISHMANIOSES	24
2.1.4	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	24
2.1.4.1	Epidemiologia da leishmaniose tegumentar.....	25
2.1.5	LEISHMANIOSE VISCERAL	26
2.1.5.1	Epidemiologia da leishmaniose visceral.....	27
2.1.6	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	28
2.1.7	REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS.....	31
2.2	IVERMECTINA.....	31
2.2.1	APRESENTAÇÃO DO FÁRMACO.....	31
2.2.2	UTILIZAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO.....	31
2.3	DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	32
2.3.1	APRESENTAÇÃO DO FÁRMACO.....	32
2.3.2	UTILIZAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	PARASITOS E FÁRMACOS UTILIZADOS.....	35
3.2	ENSAIOS DE VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> DOS PARASITOS FRENTE AOS FÁRMACOS	35
3.2.1	ENSAIOS EM PROMASTIGOTA.....	35
3.2.2	ENSAIOS EM AMASTIGOTAS	36
3.3	CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS VERO E THP-1 FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE	

IMIDOCARB.....	37
3.4 CURVA DE CRESCIMENTO.....	38
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i> FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	39
4.2 CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS VERO.....	42
4.3 CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1	44
4.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	46
4.5 VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i> FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	47
4.6 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	53
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	57
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	63
DADOS BRUTOS DA VIABILIDADE DAS <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.....	63
DADOS BRUTOS DA CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS VERO.....	64
DADOS BRUTOS DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	64
PARTICIPAÇÃO COMO CO AUTORA EM ARTIGOS CIENTÍFICOS	65
Publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, em 2022	65
Submissão de manuscrito à Revista Elsevier, em 2022.....	66
APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO 57º CONGRESSO DA SOCIEDADE	

BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL EM BELÉM-PA, EM 2022	67
--	----

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença transmitida por vetores flebotomíneos e causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania spp.* Existem dois tipos clínicos de leishmaniose: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). No Brasil, a primeira, causada por duas formas principais de protozoários: *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Caracteriza-se por feridas na pele e localizadas, mais frequentemente, nas partes descobertas do corpo. Tardiamente, podem surgir feridas nas mucosas do nariz, boca e garganta. O segundo tipo, é causado pela *Leishmania infantum* e é considerada uma doença sistêmica, pois acomete vários órgãos, principalmente fígado, baço e medula óssea. É uma doença de evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano (GHORBANI; FARHOUD, 2018).

A transmissão do protozoário ocorre da seguinte forma: O hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) pica o hospedeiro vertebrado, injetando formas promastigotas (flageladas). Estas formas de protozoário são fagocitadas por macrófagos, ou outros tipos de células fagocíticas, transformando as promastigotas em amastigotas. Estas, por sua vez, multiplicam-se dentro das células hospedeiras e infectam outras células. O hospedeiro invertebrado, ao se alimentar do hospedeiro vertebrado, ingere macrófagos infectados com amastigotas e essas transformam-se em promastigotas no intestino do flebotomíneo, e se multiplicam. Segundo o Ministério da Saúde (SAÚDE, 2017a), os vetores mais comuns no Brasil são os gêneros de flebotomíneos *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

Os exames de eleição para o diagnóstico das leishmanioses são clínicos, epidemiológicos e laboratoriais como, por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), histopatológico, imunofluorescência indireta, ELISA e até mesmo exame parasitológico (SAÚDE, 2014; 2017a; 2017b).

Os medicamentos atualmente preconizados pelo MS para o tratamento das leishmanioses são o antimoniato de meglumina, isetionato de pentamidina e anfotericina B, todos de uso sistêmico (BRASIL, 2022a). Recentemente adicionou-se a Miltefosina como tratamento para LT. Além de não haver vacinas para humanos, existe a problemática da pequena gama de fármacos disponíveis, seu alto custo, alta

toxicidade e também o potencial de resistência a esses medicamentos, observado em vários países endêmicos (GHORBANI; FARHOUD, 2018).

Quanto ao reposicionamento de fármacos, trata-se de uma estratégia onde utilizam-se fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças que não àquelas tradicionalmente propostas pelo fabricante. O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo difícil, vagaroso e de alto custo, visto que a proposição de um novo composto, fármaco ou nova utilização de um fármaco, é um processo que necessita integrar informações de diversos campos do conhecimento (MARION *et al.*, 2020). Por isso a importância do reposicionamento de fármacos, cuja metodologia diminui gastos, estudos clínicos e burocracia, visto que a farmacologia e toxicologia desses medicamentos já são conhecidas (MARION *et al.*, 2020).

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário amplamente utilizado na medicina veterinária desde a década de 1970. Atualmente, é indicada para o combate a parasitos internos e externos em bovinos, ovinos e suínos, além do tratamento da sarna sarcóptica e demodécica, verminoses gastrointestinais e dirofilariose (verme do coração) em cães e gatos (LAING *et al.*, 2017).

O dipropionato de imidocarb (DPI), também licenciado na década de 1970, é o principal produto de escolha contra *Babesia spp* (*B. bovis*; *B. bigemina*) em bovinos, ovinos, equinos e cães (BRANDER *et al.*, 1991), além de combater anaplasma (*A. marginale*) em bovinos e infecções por erliquiose (*E. canis*) em cães (MARTINS, 2019). Esse fármaco é considerado um inibidor da síntese de ácidos nucléicos, imobilizando e inviabilizando helmintos (SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2008).

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido à falta de uma ampla gama de medicamentos para combater os diversos tipos de leishmanioses, esse trabalho se faz necessário, utilizando-se outros medicamentos, previamente aprovados, há muito tempo utilizados e com eficácia garantida ao tratamento inicialmente proposto.

De acordo com estudos, sabe-se da importância e eficácia da IVM no combate a endo e ectoparasitas. Frente a isso, testou-se o fármaco para verificar sua possível atividade anti-leishmania. A mesma condição se aplica ao DPI e apesar de não ser tão explorado, seus resultados são potencialmente promissores.

1.2 HIPÓTESE

Tem-se como hipótese de pesquisa: Os fármacos veterinários IVM e DPI apresentam atividade anti-leishmania *in vitro* frente à *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-leishmania dos fármacos veterinários Ivermectina e Dipropionato de imidocarb.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar a IC₅₀ das *Leishmanias braziliensis* e *infantum* promastigotas frente às drogas IVM e DPI;
- Analisar a citotoxicidade da IVM e DPI frente às células VERO;
- Analisar a citotoxicidade da IVM e DPI frente às células THP-1;
- Obter o índice de seletividade de ambas drogas (IVM e DPI) frente à formas promastigotas e amastigotas de *Leishmanias spp* (*L. braziliensis* e *L. infantum*);
- Analisar a curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmanias braziliensis* e *infantum* frente às drogas IVM e DPI;
- Comparar os efeitos dos fármacos IVM e DPI sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmanias braziliensis* e *infantum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmaninas spp.*

Leishmanias spp. são protozoários da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, causadores das leishmanioses, doenças infecciosas de notificação obrigatória. Acometem mamíferos, domésticos e silvestres; e secundariamente o homem. Consistem em agravo à saúde com evolução crônica; sendo considerados primariamente como zoonose, podendo acometer o homem frente seu contato no ciclo

de transmissão do parasito, transformando-se em antroponose. A LT, também denominada de mucocutânea, compromete a pele e/ou mucosas. A LV se apresenta com comprometimento de órgãos internos. (FIOCRUZ, 2022; BRASIL, 2014; 2022b; DUARTE, BADARÓ; 2009). As leishmanioses estão entre o grupo de doenças tropicais negligenciadas; compreendem uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo que 90% dos casos de LV correspondem à Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (CDC, 2017).

2.1.1 Ciclo biológico e transmissão

Nas diversas formas de leishmaniose é imperativa a participação de um vetor previamente infectado (BRASIL, 2022b). Na América, incluindo o Brasil, as fêmeas de insetos flebotomíneos, das espécies *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, são hospedeiros intermediários e vetores do protozoário (SAÚDE, 2017b), a partir de animais silvestres e cachorros domésticos (GOLDSMITH, 2004), assim como do homem, considerados hospedeiros definitivos (FALQUETO, SESSA; 2009). Por meio da picada de fêmeas infectadas ocorre a transmissão do parasito, cujo desenvolvimento se dá, em média, dois meses depois para os casos de LT, ou de dois a seis meses para os casos de LV (BRASIL, 2022b).

A depender da localização geográfica, o flebotomíneo é conhecido como mosquito palha, tatuquira, birigui ou asa-dura, entre outros (Figura 1). Caracteristicamente, esses insetos apresentam coloração amarelada ou de cor palha, dando origem ao nome popular; quando em repouso suas asas permanecem semiabertas e eretas. (BRASIL, 2022b). Os cães (*Canis familiaris*) são a principal fonte de infecção, sendo essa mais prevalente nesses animais quando comparados ao ser humano. A enzootia precede a ocorrência no homem; porém, no ambiente silvestre, roedores, raposas, edentados, marsupiais e canídeos são hospedeiros e possíveis reservatórios naturais (ROQUE, JANSEN; 2021).

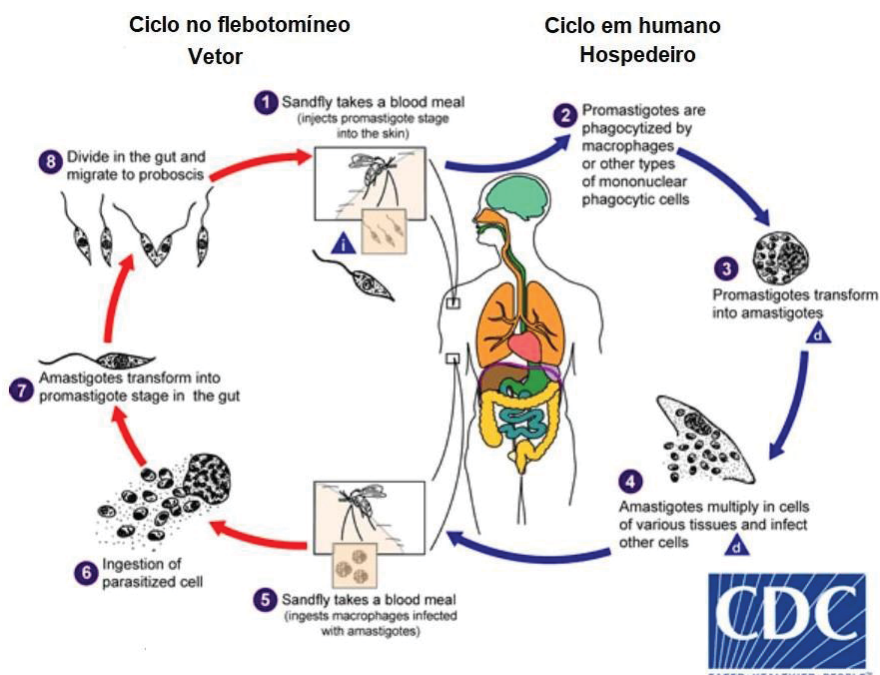
Há duas formas distintas no ciclo vital das leishmanias (Figura 2). Após o repasto, as formas amastigotas, pelas células hospedeiras (fagocíticas), alcançam o tubo digestivo do vetor e se transformam em promastigotas no intestino do flebotomíneo, após múltiplos estágios. Passados quatro a cinco dias, o flebotomíneo, também considerado hospedeiro invertebrado e intermediário, é capaz de transmitir o

parasito a um novo hospedeiro vertebrado; o promastigota inoculado na pele do mamífero, por regurgitação no repasto sanguíneo, se acopla ao macrófago, é fagocitado, perde o flagelo e inicia sua replicação por divisão binária, caracterizando o segundo ciclo vital (amastigota). No hospedeiro do mamífero, portanto, o parasito encontra-se na forma amastigota, dentro do fagócito (BRASIL, 2010; GOLDSMITH, 2004; FALQUETO, SESSA; 2009; DUARTE, BADARÓ; 2009), o parasito se multiplica nessa única célula, até destruí-la, liberando os protozoários que serão novamente fagocitados ou ingeridos pelos insetos flebotomíneos, ao sugarem o sangue do hospedeiro definitivo (DUARTE, BADARÓ; 2009).

FIGURA 1 - FÊMEA DE FLEBOTOMÍNEO INGURGITADA



FONTE: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar 2017 (SAÚDE, 2017).

FIGURA 2 - CICLO DE TRANSMISSÃO DA *Leishmania* spp.

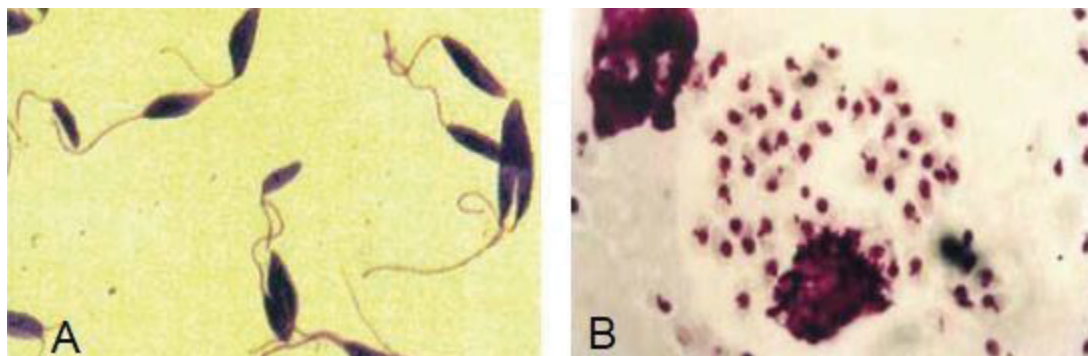
FONTE: CDC, 2017.

LEGENDA: (1) Flebotomíneo pica o hospedeiro (humano) injetando promastigotas. (2) Promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos ou outros tipos de células fagocíticas mononucleares. (3) Promastigotas se transformam em amastigotas. (4) Amastigotas multiplicam-se dentro das células ou diferentes tecidos e infectam outras células. (5) Flebotomíneos se alimentam deste hospedeiro, ingerindo macrófagos infectados com amastigotas. (6) Ingestão de células parasitadas. (7) Amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino do flebotomíneo. (8) Promastigotas se multiplicam no intestino do flebotomíneo.

2.1.2 MORFOLOGIA DA *L. braziliensis* E *L. infantum*

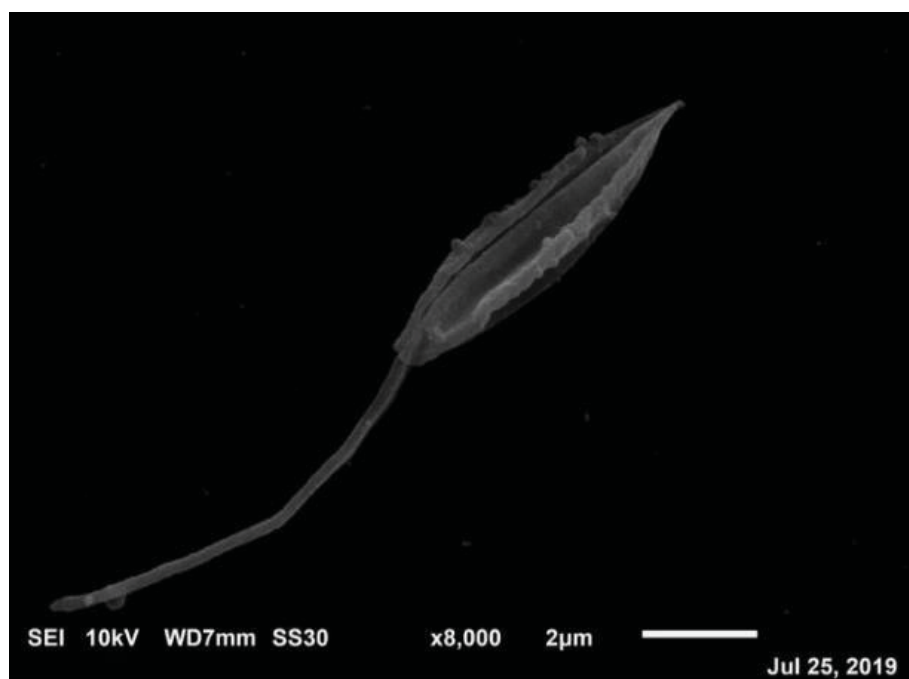
Caracterizadas como parasitos intracelulares obrigatórios, as leishmanias se reproduzem dentro do sistema mononuclear dos mamíferos suscetíveis. Os parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* possuem duas formas principais: promastigota e amastigota (Figura 3). A primeira possui forma flagelada (extracelular) e se encontra presente no tubo digestivo de flebotomíneos e nos meios de cultura a 25° C (RANGEL; LAINSON, 2009). A promastigota tem forma de losango adelgado de 10 a 15 µm, com flagelo móvel, que emerge da base, medindo entre 15 a 28 µm (Figura 4). Sua função é impulsionar o parasito para frente (DUARTE; BADARÓ; 2009). A segunda forma, amastigota, apresenta-se não flagelada, encontra-se intracelular e mede entre 3 e 6 µm de diâmetro.

FIGURA 3 - FORMAS FLAGELADA OU PROMASTIGOTA (A) E NÃO FLAGELADA OU AMASTIGOTA DA *Leishmania spp.* (B).



FONTE: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar 2017 (SAÚDE, 2017).

FIGURA 4 - FORMA PROMASTIGOTA DE *Leishmania spp* EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)



FONTE: Curso de Inverno ICC/FIOCRUZ. Arquivo pessoal, 2019.

2.1.3 LEISHMANIOSES

2.1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Caracterizada como zoonose infecciosa, não contagiosa, a LT é doença de evolução crônica que acomete, isoladamente ou em associação, a pele e mucosas do nariz, boca, faringe e laringe (FALQUETO; SESSA, 2009; BRASIL, 2010).

Os agentes etiológicos dessa enfermidade são distintos protozoários do gênero *Leishmania spp*; pelo menos 14 espécies de parasitos causam a LT no homem (FALQUETO; SESSA, 2009). Somente nas Américas foram identificadas 11 espécies dermatrópicas causadoras da doença no homem e oito em outros animais (BRASIL, 2010). Existem dois subgêneros, de acordo com a taxonomia proposta por Lainson e Shaw em 1987, *Viannia* e *Leishmania*. Os parasitos do subgênero *Viannia* são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. colombiensis* e *L. lindenbergi*. Os parasitos do subgênero *Leishmania* são: *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. amazonenses*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi* e *L. garnhami*. (FALQUETO; SESSA, 2009).

Dependendo da espécie envolvida na infecção e da resposta imune, as lesões evoluem desde pequenas pápulas para placas ulceradas e secas a grandes úlceras com bordas bem delimitadas, endurecidas e indolores (GOLDSMITH, 2004). A doença se manifesta desde infecções subclínicas até formas mucosas graves e mutilantes (FALQUETO; SESSA, 2009).

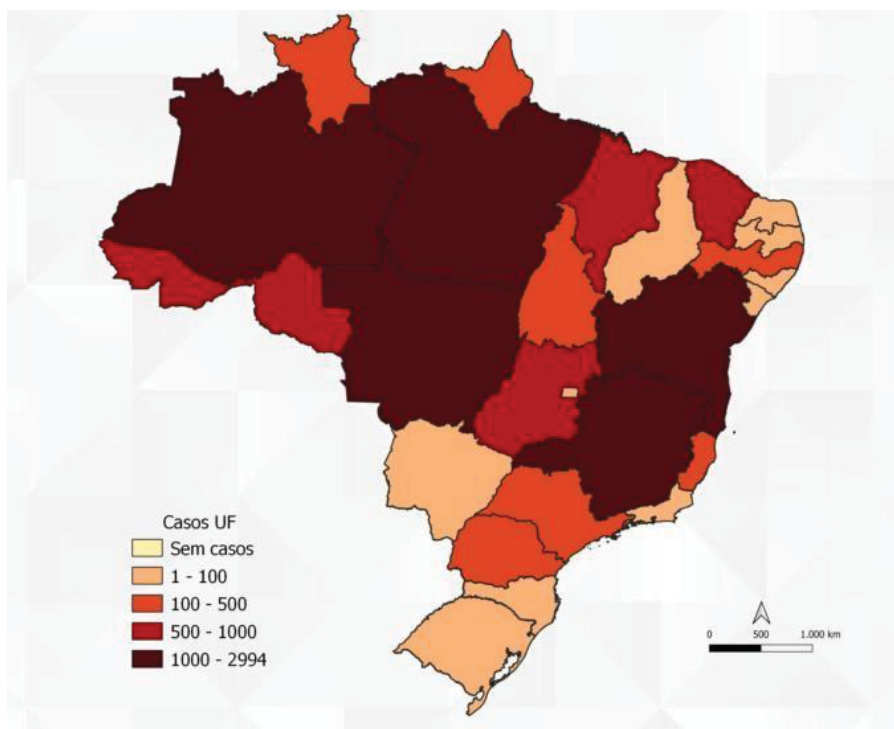
A precária assistência médica nas zonas rurais e cura espontânea da doença contribuem para baixo diagnóstico, falta de registro e subnotificação da doença. Contudo, deve-se considerar que a LT é autóctone nas Américas, exceto no Canadá, e Chile. A patologia pode ser classificada como uma doença profissional, por sua relação com a atividade de desmatamento associado à colonização, construção de estradas, mineração, garimpo, extração de madeira, plantação de cacau e extração de látex. Por outro lado, sua ocorrência tornou-se progressiva em ambiente domiciliar, em locais de aproximação entre a floresta e o ambiente urbano. (FALQUETO; SESSA, 2009).

2.1.4.1 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar

O agente *Leishmania (Viannia) braziliensis* ocorre na maioria dos estados brasileiros (Figura 5), inclusive na Região Sul, tanto em áreas florestais inexploradas quanto em áreas de colonização antiga, nas quais também acomete animais domésticos. A persistência da endemia nas cidades reforça a hipótese de que animais domésticos

representam fonte de infecção para o homem. Contudo, as populações rurais das Regiões Norte e Nordeste, pelas características de colonização recente, com abundantes áreas florestais, são francamente atingidas pela zoonose (FALQUETO; SESSA, 2009), a Região Norte registra o maior número de casos (BRASIL, 2022b).

FIGURA 5 - CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL EM 2020



FONTE: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf>

2.1.5 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é considerada uma doença sistêmica, com distribuição na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical. Esse agravo pode ser causado por três subespécies: *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) chagasi* e *Leishmania (L.) infantum*.

Reconhecida como protozoose, deixou de ser uma doença de caráter eminentemente rural, passando a se expandir para áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2010; 2014; 2022b). Essa enfermidade tem como agente etiológico, no Novo Mundo, a *Leishmania infantum*, como vetor flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, e o cão como principal reservatório vertebrado na área urbana (MORAIS

et. al., 2020). Embora existam outras formas de transmissão do protozoário ao homem, tais como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratórios, compartilhamento de agulhas e transmissão congênita, a transmissão habitual se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Frente ao acometimento sistêmico da doença, quando não tratada pode levar a óbito até 90% dos casos (BRASIL, 2022a).

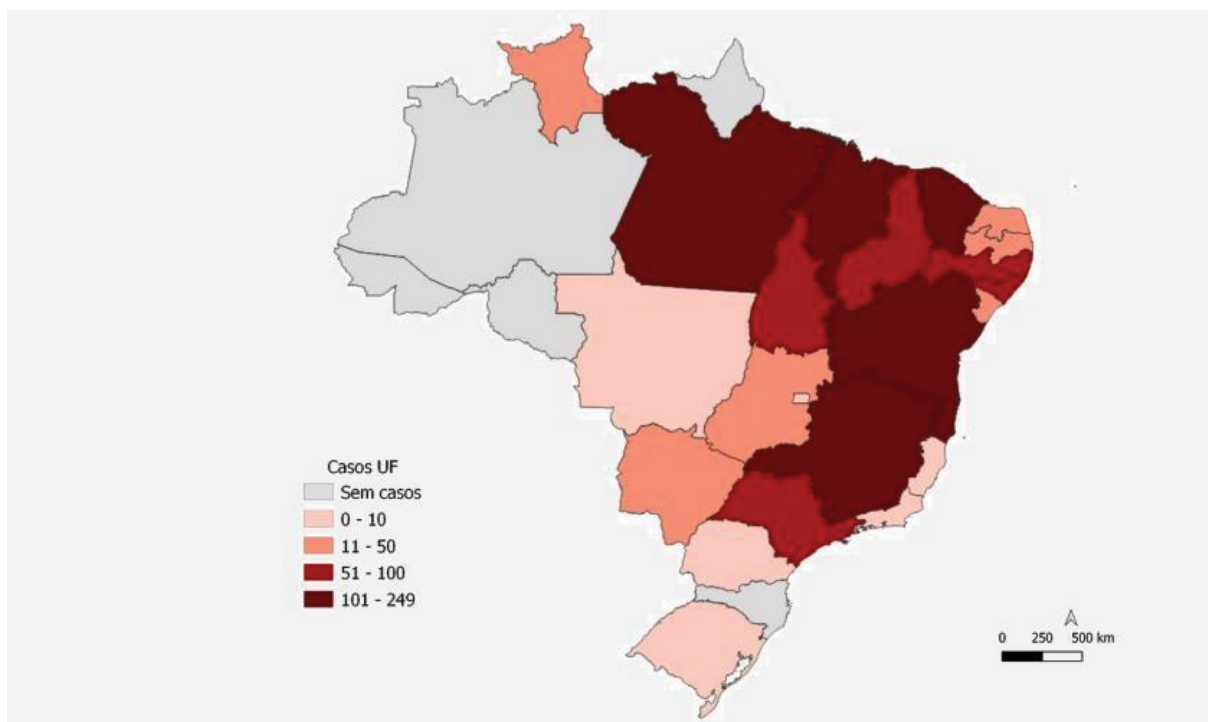
Também reconhecida como *Calazar* ou *Febre negra*, é caracterizada por exuberante hepatomegalia, leucopenia, anemia, febre irregular, emagrecimento e palidez. Pessoas caucasianas podem apresentar hiperpigmentação da pele, especialmente, nas mãos, pés, abdome e testa; negros podem manifestar erupções verrucosas ou úlceras cutâneas. (DUARTE; BADARÓ, 2009; GOLDSMITH, 2004). Coinfecção com HIV, com ou sem AIDS, são relatados no Mediterrâneo e América do Sul. (GOLDSMITH, 2004).

Há, na atualidade, poucas notificações de LV por falta da inclusão da enfermidade nos diagnósticos diferenciais, na clínica humana e veterinária, com discrepância entre maior prevalência frente aos casos notificados (DIAS *et al.*, 2022). Esses pesquisadores mostraram que um dos motivos da prevalência de LV em áreas endêmicas ser maior do que a doença clínica aparente é a falta da transformação dos dados em informações úteis. Os dados apontam que a qualidade das informações, e de sua organização, contribui para a tomada de decisão no manejo da endemia.

2.1.5.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral

Na América Latina, a LV foi descrita em pelo menos 12 países, com 90% dos casos ocorridos no Brasil. A Região Sul é a única com raros registros de casos de LV; o maior número de casos dessa doença concentra-se, historicamente, na Região Nordeste (Figura 6), a qual respondeu por 90% dos casos na década de 1990, com redução progressiva frente à expansão da doença para outras regiões do país (BRASIL, 2014; 2022b). Em 2012, o maior número de mortes foi registrado entre pessoas de faixa etária entre 35 e 49 anos (45 mortes), seguido de 50 a 64 anos (37 mortes) e 65 a 79 anos (25 mortes). Nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 7,6% em 2012 para 10,5% em 2021 (BRASIL, 2022b).

FIGURA 6 - CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL EM 2020



FONTE: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-graficos-e-mapas.pdf>

2.1.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Para tratamento das LT e LV são considerados três mesmos fármacos: antimoniato de N-methyl meglumina (Glucantime®), isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) e anfotericina B (Fungizon®), todos de uso sistêmico.

A diferença é que para a LT, somada a esses medicamentos, vêm-se utilizando a miltefosina (hexadecilfosfocolina) fornecida pelo SUS (Sistema Único de Saúde), com resposta positiva. Este medicamento foi originalmente desenvolvido para tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários e, posteriormente, em estudos realizados na Índia, descobriu-se a eficácia terapêutica no tratamento das leishmanioses (BRASIL, 2018).

Revisão de literatura mostrou a indução, pelo tratamento, de dores articulares, náuseas e vômitos, febres, anormalidade no eletrocardiograma e nos níveis de transaminases, pancreatite, neurotoxicidade, toxicidade hepática e toxicidade hematológica. (QUEIRÃO et al., 2019). O tratamento das Leishmanioses deve ser feito, de preferência, com o paciente hospitalizado para evitar falhas terapêuticas,

detecção e tratamento precoce dos efeitos secundários. A toxicidade sistêmica, em especial a renal e a cardíaca exigem acompanhamento especial aos pacientes. Dessa forma, deve-se considerar a idade, a presença de comorbidades e de gravidez. (COSTA; COSTA, 2021; LLANOS-CUENTAS, 20121; OVALLE-BRACHO, 2021).

Para pacientes com tratamento com antimoniais sugere-se o seguimento de pessoas com mais de 50 anos com eletrocardiograma semanal para monitorar possíveis alterações frente a tratamentos sistêmicos, acompanhamento com exames bioquímicos é recomendado frente a potenciais eventos adversos do medicamento ou com os sintomas do paciente; e sua orientação para procurar imediatamente atendimento médico caso eventos clínicos ocorram. (COSTA; COSTA, 2021; LLANOS-CUENTAS, 20121; OVALLE-BRACHO, 2021)

Quando em uso, o fármaco antimoniato de meglumina observou-se alterações crescentes no teor da amilase; no tratamento agudo descreve-se pequenas congestões celulares, toxicidade hepática subaguda e leve congestão; nos rins provoca alterações bioquímicas, como aumento de potássio, ureia e creatina. Outros efeitos colaterais são artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, herpes zoster e insuficiência renal aguda. Esse fármaco não deve ser administrado em gestantes; em pacientes com mais de 50 anos, em portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e/ou doença de Chagas, frente ao risco de toxicidade, exige vigilância permanente, com eletrocardiograma, provas de função renal e provas de função hepática. (QUEIRÃO et al., 2019).

Anfotericina B (Fungizon) é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial. Contudo, é necessária a avaliação clínica e laboratorial antes do início do tratamento, avaliação cardiológica e da função renal e hepática; as quais devem ser repetidas semanalmente; em caso de idosos, reavaliações da função renal e cardíaca deve ser feita duas vezes por semana, desde que haja alterações. Os efeitos colaterais desse fármaco são: febre, anorexia, náuseas, vômitos e flebite. (QUEIRÃO et al.; 2019).

Isotionato de Pentamidina (Pentacarinat) tem efeito hipoglicemiante, devendo ser de administração pós-prandial. As reações adversas mais frequentes são dor, endurecimento e abscessos estéreis no local da aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tonturas, fraqueza muscular, mialgia, cefaleia, hipotensão, síncope, hiperglicemia e hipoglicemia. Diabetes *mellitus* pode ocorrer a partir da administração da dose total de um grama; recomendando-se controle das funções renal, hepática e glicemia periodicamente, durante o tratamento. O acompanhamento eletrocardiográfico, antes, durante e no final do tratamento é também recomendado. Esse fármaco também é contraindicado para gestantes, portadores de diabetes, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e crianças com menos de oito quilogramas de peso. (QUEIRÃO et al., 2019).

Pacientes coinfectados por HIV respondem mal ao tratamento convencional da leishmaniose visceral, sendo a anfotericina o tratamento de eleição nas Américas e na região do Mediterrâneo. Ao escolher entre o antimonial e a anfotericina B deve-se considerar o perfil de toxicidade e as interações com outros medicamentos usados pelo paciente. A terapia antirretroviral deve ser iniciada durante o tratamento contra *Leishmania spp.* ou pouco depois para reduzir a possibilidade de aparecimento da síndrome inflamatória de reconstituição imune. As pessoas com AIDS que apresentam leishmaniose visceral como parte dessa síndrome devem ser tratadas imediatamente. (COSTA; COSTA, 2021; LLANOS-CUENTAS, 2012; OVALLE-BRACHO, 2021).

Além de não haver vacinas para humanos, as opções de tratamento das leishmanioses são limitadas devido ao pequeno número de medicamentos e, em parte, devido ao alto custo e efeitos adversos significativos (TASLIMI et al., 2016). Os diversos efeitos colaterais dos fármacos usados para o tratamento das Leishmanioses concorrem para a redução da adesão terapêutica e abandono do tratamento, reiterando a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de novas drogas, ajustes e readequação dos esquemas terapêuticos, incluindo o emprego de produtos naturais, com menor potencial de toxicidade. (QUEIRÃO et al.; 2019). Outro obstáculo no tratamento das leishmanioses é o potencial de resistência aos medicamentos, evento observado em vários países endêmicos (GHORBANI; FARHOUD, 2018; LLANOS-CUENTAS, 2021). Por isso se faz tão importante o

reposicionamento de fármacos: baratear e encurtar longos prazos de testes de novos medicamentos.

2.1.7 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

Devido ao processo de desenvolvimento de um novo fármaco ser lento e oneroso, opta-se, muitas vezes, pelo estudo do reposicionamento de fármacos, o que significa destinar um medicamento previamente aprovado e utilizado para o combate de doenças específicas, ao combate à outras enfermidades que não àquelas para as quais o fármaco foi desenvolvido inicialmente. Além disso, o reposicionamento promete rápido impacto clínico a um custo menor do que o desenvolvimento de novos medicamentos (FONSECA, 2013).

Devido à escassez de investimento, essa estratégia é de particular interesse para auxiliar no tratamento de doenças negligenciadas (MARION et al., 2020). Além de ser economicamente viável, o reposicionamento de fármacos representa menor risco para os pacientes, devido esses já serem aprovados clinicamente, tornando-se uma questão de crescente interesse. Ainda, a combinação entre fármacos reposicionados pode apresentar sinergia, superando o problema da fraca atividade de drogas individuais contra microorganismos multirresistentes (FONSECA, 2013).

2.2 IVERMECTINA

2.2.1 APRESENTAÇÃO DO FÁRMACO

A IVM é um antiparasitário que no final da década de 1970 foi destinado para uso veterinário (CAMPBELL, 2012). Graças a sua alta eficácia, amplo espectro de ação e margem de segurança, a IVM foi introduzida na medicina humana no final da década seguinte, principalmente para tratamento contra a oncocercose (SPINOSA et al., 2008). Atualmente, a IVM é muito utilizada no combate a parasitos internos e externos como piolhos e carrapatos em bovinos, ovinos e suínos, além do tratamento da sarna sarcóptica e demodécica, verminoses gastrointestinais e dirofilariose (verme do coração) em cães e gatos (LAING et al., 2017).

2.2.2 UTILIZAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação da IVM se dá através dos canais de cloro controlados pelo ácido glutâmico e, secundariamente, nos canais de cloro controlados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico), ocasionando aumento no fluxo destes ions nas sinapses nervosas em vermes redondos e na placa ou no botão neuromuscular em artrópodes. Conseqüentemente, há hiperpolarização das membranas nervosas, ocasionando paralisia flácida (motora), morte e eliminação dos parasitos. A aplicação da IVM se dá por via subcutânea, 1mL a cada 50kg de peso vivo (bovinos e ovinos) e 1 mL a cada 33 kg de peso vivo (suínos) (MARTINS, 2019). Para pequenos animais, sua apresentação é em comprimidos de 3, 6, e 12 mg.

2.3 DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

2.3.1 APRESENTAÇÃO DO FÁRMACO

O DPI foi licenciado por alguns países e introduzido no mercado na década de 1970. Assim que entrou em circulação, tornou-se rapidamente o produto de escolha para o tratamento contra *Babesia spp* (*B. bovis*; *B. bigemina*) em bovinos, ovinos, equinos e cães (BRANDER *et al.*, 1991). Além de combater anaplasma (*A. marginale*) em bovinos e *Ehrlichia canis* em cães, as quais são transmitidas por diferentes espécies de carrapatos e insetos, ou operações mecânicas (vacinações, descornas, castrações), e infecções por erliquiose (*E. canis*) em cães (MARTINS, 2019).

2.3.2 UTILIZAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO

O DPI é comumente utilizado em bovinos, ovinos, equinos (1 mL/50 kg), via intramuscular e em cães (5 a 7 mg/kg) por via intramuscular ou subcutânea em duas aplicações com um intervalo de quatorze dias (OLICHESKI, 2003). Quanto aos efeitos adversos do medicamento, observam-se sialorréia, diarreia, dispnéia, lacrimejamento e depressão, podendo ocorrer também dor no local da aplicação e vômitos (NELSON; COUTO, 1998). O DPI é considerado um inibidor da síntese de ácidos nucléicos. Seu mecanismo de ação se dá pela imobilização dos helmintos induzindo uma paralisia tônica da musculatura (SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2008). A paralisia é mediada pela

potencialização e/ou ativação direta dos canais de cloro sensíveis às avermectinas, controlados pelo glutamato (YOVANY et al., 2010).

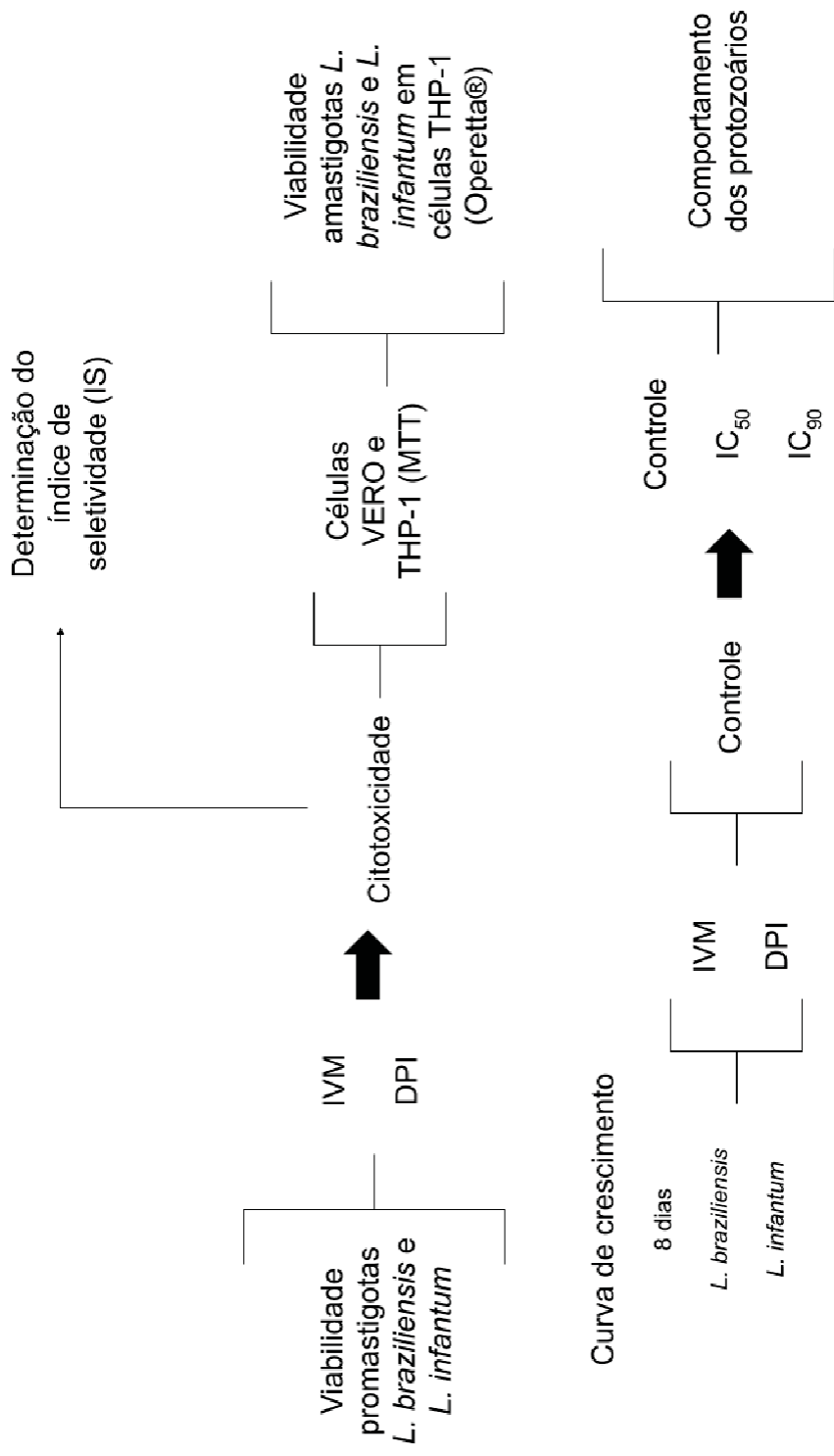
Além da toxicidade seletiva do DPI não estar totalmente clara, sabe-se que há uma relação estrutural com as poliaminas, ou interferindo na produção e/ou na utilização destas moléculas, ou prevenindo a entrada de inositol (fator de crescimento de animais e microorganismos) nos eritrócitos infectados (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Instituto Carlos Chagas, em Curitiba/PR, no Laboratório de Biologia Celular (LBC), realizou-se a experimentação de atividade anti-leishmania da IVM e do DPI, por meio de teste de viabilidade dos tipos de leishmania *L. braziliensis* e *L. infantum* frente aos fármacos, teste de citotoxicidade das linhagens celulares utilizadas, leitura final dos resultados e fornecimento de imagens através da utilização do Operetta®, equipamento responsável pela contagem de amastigotas intracelulares, e, por fim, comparação dos efeitos dos fármacos IVM e DPI sobre as *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Na figura 7 estão descritas as atividades de pesquisa realizadas, na forma de fluxograma.

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DE PESQUISA REALIZADAS



FONTE: A autora (2022).

3.1 PARASITOS E FÁRMACOS UTILIZADOS

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas as cepas referência de *L. braziliensis* (MCAN/BR/1998/R619) e *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Os parasitos foram mantidos em meio bifásico contendo Novy-MacNeal Nicole (NNN) e Schneider (suplementados com 10% SBF e antibiótico), por meio de repiques a cada 3-4 dias em estufa a 25°C.

Foram utilizados os medicamentos comerciais Ivomec® (Merial) e Imizol® (MSD) como fonte das drogas IVM e DPI, respectivamente. Para os cálculos de concentração das drogas nos ensaios foram utilizadas, como referência, a concentração dos princípios ativos dos medicamentos, tendo seus valores de concentrações expressos em μM , ambos fármacos ficaram com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

3.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE *IN VITRO* DOS PARASITOS FRENTE AOS FÁRMACOS IVM E DPI

3.2.1 ENSAIOS EM PROMASTIGOTAS

As culturas de ambos os parasitos (*L. braziliensis* e *L. infantum*) em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 parasitos/mL, por meio de contagem em câmara de Neubauer, e incubados (25°C) em placas de 96 poços, com as drogas em diversas concentrações, por 24 horas. Após a incubação, a IC_{50} - concentração das drogas capaz de reduzir 50% da viabilidade celular dos parasitos - (calculada pela regressão não linear através do GraphPad Prism®), determinou a viabilidade celular das culturas; o mesmo ocorreu com IC_{90} - concentração das drogas capaz de reduzir 90% da viabilidade celular dos parasitos - (determinada pela calculadora *ECanything* também do GraphPad Prism®). Para que isso ocorresse, foi feito o ensaio colorimétrico do MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) (MEERLOO, 2011), onde a redução do MTT a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Neste ensaio, após a incubação de 24h, as culturas tiveram suas viabilidades determinadas com a adição

de 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa, seguidos por incubação a 36°C por 3 horas, e solubilização dos cristais de formazam com 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 30 µL de DMSO (dimetilsufóxido) 100%.

A leitura da absorbância dos poços foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Para cada cepa de parasito foi utilizado um grupo controle (sem adição de drogas) ao qual se assumiu 100% de viabilidade celular. Todo o experimento foi realizado em triplicata. As concentrações utilizadas no teste de viabilidade das promastigotas tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. infantum* foram: 100 ug/mL, 33,33 ug/mL, 11,11 ug/mL, 3,7 ug/mL, 1,23 ug/mL, 0,41 ug/mL, 0,137 ug/mL, 0,045 ug/mL e zero (controle).

3.2.2 ENSAIOS EM AMASTIGOTAS

Para os ensaios frente às formas amastigotas dos parasitos, foi empregada a linhagem THP-1 como células hospedeiras. Os monócitos foram mantidos a 37°C em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO₂, em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, HEPES e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Sigma®). As culturas foram mantidas por meio de repiques semanais, até o crescimento com alcance de 1x10⁶ células/mL.

Posteriormente, as células THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5x10⁴ células/poço em meio RPMI 1640 contendo 200 nM de PMA (phorbol myristate acetate). As placas foram incubadas em estufa por 96 horas para haver diferenciação celular a macrófagos aderidos, sendo que, na metade deste tempo, o meio de cultura foi trocado por meio novo, sem PMA.

Concomitantemente a esse processo, parasitos referência de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivados por seis a sete dias para que ficassem viáveis para serem inoculados nas células já aderidas e diferenciadas em macrófagos. A inoculação foi realizada na proporção de 10 parasitos para uma célula (10:1) e incubados *overnight*. Após essa incubação, os poços foram lavados com meio RPMI 1640 e as placas incubadas por 48 horas. Nesse momento, as diferentes concentrações das drogas foram acrescentadas (em quintuplicata técnica por dose avaliada) a cada poço e as placas incubadas por mais 48 horas.

As concentrações de IVM utilizadas no teste de viabilidade das amastigotas tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. infantum* foram: 17 ug/mL, 3,4 ug/mL, 0,68 ug/mL, 0,136

ug/mL e zero (controle). As concentrações de DPI utilizadas no teste de viabilidade das amastigotas tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. infantum* foram: 25 ug/mL, 5 ug/mL, 1 ug/mL, 0,2 ug/mL e zero (controle).

Após o tratamento, as células foram fixadas com metanol e coradas com Hoechst (marcador fluorescente) para a realização da contagem das amastigotas intracelulares. Um grupo controle (sem tratamento) foi utilizado como 100% de infecção.

A atividade inibitória dos compostos foi avaliada por meio da contagem do número de amastigotas, por célula, através do sistema de contagem automatizada de alta performance Operetta® (PerkinElmer). Todo procedimento foi previamente padronizado para *Leishmania spp.* pelo grupo de pesquisa (TIRADO, 2020).

A análise foi feita com base em imagens de 25 campos, capturados de forma automatizada, na região central de cada poço. Após a captura, as imagens foram analisadas pelo *software* conjugado Harmony®, com base em parâmetros como área, formato e intensidade de fluorescência do núcleo e citoplasma das células THP-1, além das amastigotas intracelulares. Deste modo, o *software* proporciona análise robusta e precisa dos valores de amastigotas por célula, utilizada nos testes estatísticos para determinação das IC₅₀ dos medicamentos.

3.3 CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS VERO E THP-1 FRENTE AOS FÁRMACOS

A citotoxicidade das células foi obtida através da inoculação dos fármacos sobre as células VERO e THP-1. O motivo pelo qual foram utilizadas as células THP-1 para o experimento de citotoxicidade, foi devido a necessidade de avaliação do seu comportamento sobre a ação das drogas; visto que sua reação frente aos fármacos (IVM e DPI) não poderia ser muito discrepante das células VERO, as quais são muito utilizadas na prática laboratorial e de uso corriqueiro em testes de citotoxicidade. A necessidade do teste de citotoxicidade em células THP-1 também foi para tornar exatas as concentrações ideais dos testes em amastigotas, estabelecendo-se as concentrações limites, não tóxicas, para essa linhagem celular. As concentrações utilizadas para o teste de citotoxicidade das células THP-1 foram: 100 ug/mL, 33,3 ug/mL, 11,1 ug/mL, 3,7 ug/mL e zero (controle). Esse procedimento foi realizado em

quintuplicata técnica, utilizando-se quatro diferentes concentrações, além do controle (sem droga).

3.4 CURVA DE CRESCIMENTO

Para determinação da curva de crescimento dos parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* com as drogas, culturas em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 parasitos/mL e semeadas em placas de 24 poços (1 mL por poço). Cada cultura foi incubada com três diferentes tratamentos e em triplicata por concentração de droga analisada: o primeiro sem droga (grupo controle), o segundo com as drogas nas concentrações de IC₅₀ e o terceiro com as drogas em concentrações de IC₉₀.

Após a incubação, suas absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 800nm a cada 24 horas, por 8 dias totais, de modo a se correlacionar o aumento da absorbância com a concentração de parasitos na cultura (OUELLETTE *et al.*, 1990), o que significa que quanto mais parasitos na cultura, mais luz é absorvida e maior é a absorbância.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

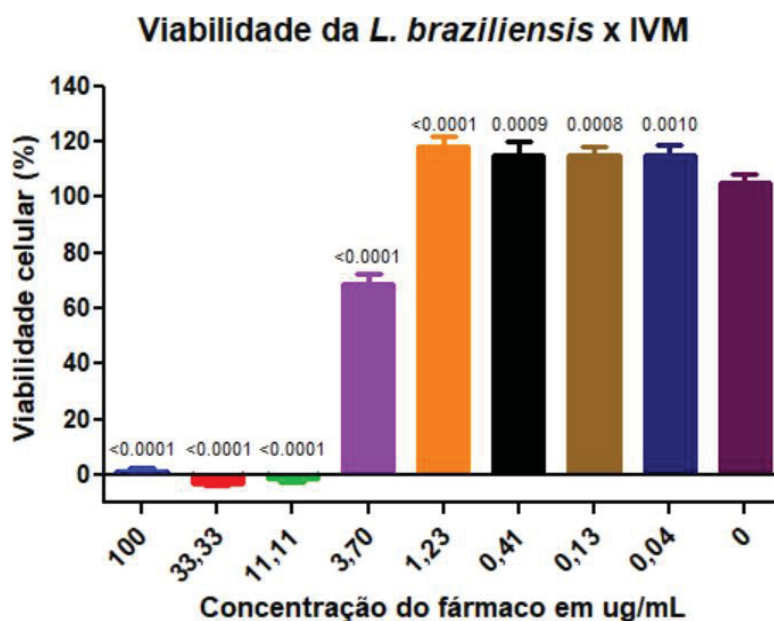
A normalidade dos dados foi constatada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os valores de IC₅₀ foram determinados por meio de regressão não linear com uso do Microsoft Excel 2016 e GraphPad Prism® (versão 8.0.0) utilizando-se os valores de viabilidade celular frente a cada concentração de cada droga. A comparação entre diferentes grupos foi feita com o uso da análise de variância *One-way* ANOVA seguida do pós teste de Tukey's para multi comparações. A comparação entre diferentes grupos das curvas de crescimento foram feitas com uso da análise de variância *Two-way* ANOVA, por se tratarem de dois grupos (tempo e as duas concentrações - IC₅₀ e IC₉₀ do fármaco utilizado - ao longo do tempo). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* e *L. infantum* FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

O gráfico 1 mostra a viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* frente à ação da IVM. A cultura de parasitos apresentou IC₅₀ de 6,22 µM, mostrando não haver protozoários hábeis entre as concentrações de 100 à 11,11 ug/mL.

GRÁFICO 1 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* FRENTE À IVERMECTINA



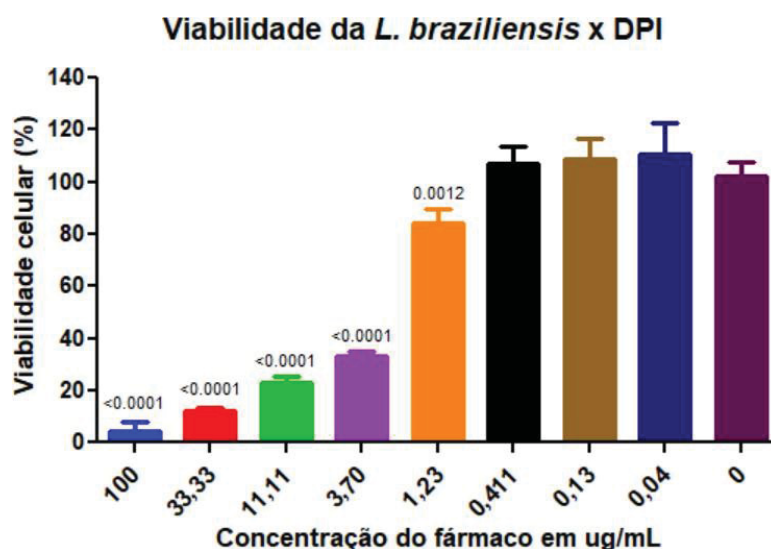
FONTE: A autora (2022)

A análise da viabilidade da IVM frente à promastigota de *L. braziliensis* apresentou diferença estatística em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle.

No gráfico 2, pode-se observar que a viabilidade das promastigotas *L. braziliensis* frente ao fármaco DPI nas concentrações de 100, 33,33, 11,11 e 3,70

ug/mL apresentam pouca atividade do parasito. A partir da concentração 1,23 ug/mL há mais de 50% de parasitos ativos. O valor calculado do IC₅₀ ficou em 5,62µM.

GRÁFICO 2 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB



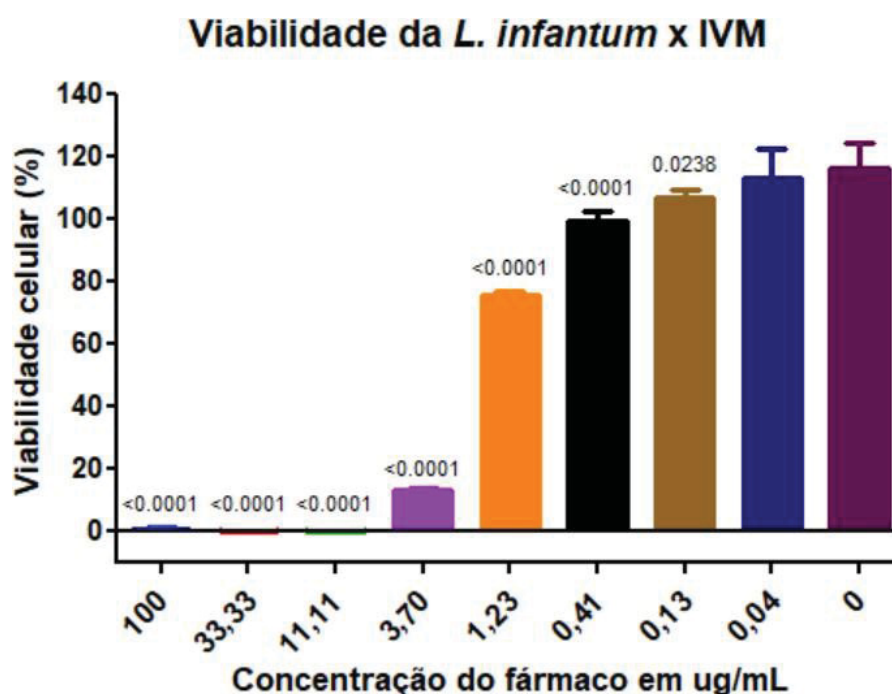
FONTE: A autora (2022)

A viabilidade do DPI frente à promastigota de *L. braziliensis* apresentou diferença estatística entre as concentrações de 100 e 1,23 ug/mL. Até o presente momento não foram encontrados estudos relacionados a esses medicamentos (IVM e DPI) frente à *L. braziliensis*, tornando esses resultados inéditos.

No gráfico 3, a IVM mostrou-se mais tóxica para as promastigotas de *L. infantum* do que para as promastigotas de *L. braziliensis*, desde a concentração de 100 ug/mL até a concentração de 1,23 ug/mL, apresentado no gráfico 1. Na concentração de 3,70 ug/mL a viabilidade dos parasitos de *L. infantum* é menor que 20%, enquanto que nesta mesma concentração, os parasitos de *L. braziliensis* no gráfico 1 estão com cerca de 75% de atividade. A IC₅₀ da *L. infantum* frente à IVM no gráfico 3 ficou em 2,23µM. REIS *et al.* (2021) testaram o potencial de tratamento da IVM humana em *L. infantum*. O medicamento efetivamente reduziu a porcentagem de infecção e carga parasitária em macrófagos infectados e tratados, além de exibir atividade profilática, inibindo a infecção de macrófagos com parasitas pré-tratados.

Além disso, estudos preliminares sugeriram que a IVM tem como alvo as mitocôndrias do parasita. Obteve-se IC₅₀ de 3,64μM e o IS ficou em 117,45, o que foi satisfatório, haja vista que em nosso estudo a IC₅₀ da *L. infantum* promastigota ficou em 2,23μM e o IS em 2,2. Além de que as células hospedeiras trabalhadas no estudo citado foram macrófagos murinos e glóbulos vermelhos humanos.

GRÁFICO 3 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. infantum* FRENTE À IVERMECTINA

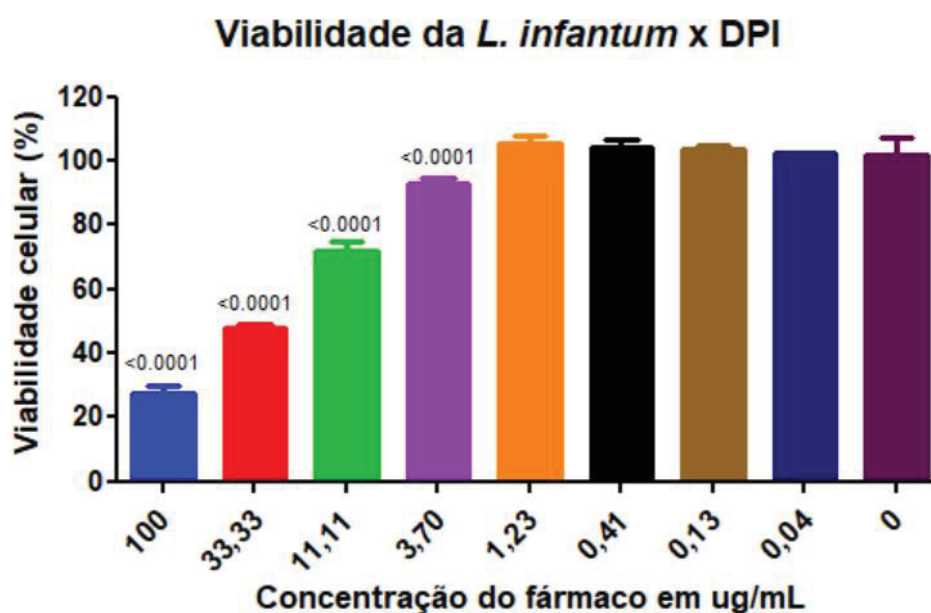


FONTE: A autora (2022)

A viabilidade da IVM frente à promastigota de *L. infantum* também apresentou diferença estatística em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle.

No gráfico 4 pode-se observar que houve cerca de 25% de viabilidade de parasitos *L. infantum* sobre a ação de 100ug/mL de DPI. O valor da IC₅₀ da *L. infantum* frente ao DPI ficou em 17,89μM, dentre todos os testes de viabilidade, este foi o maior valor.

GRÁFICO 4 - VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. infantum* FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB



FONTE: A autora (2022)

A viabilidade do DPI frente à promastigota de *L. infantum* apresentou diferença estatística entre as concentrações de 100 a 3,7 ug/mL, frente ao controle.

4.2 CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO FRENTE ÀS CÉLULAS VERO

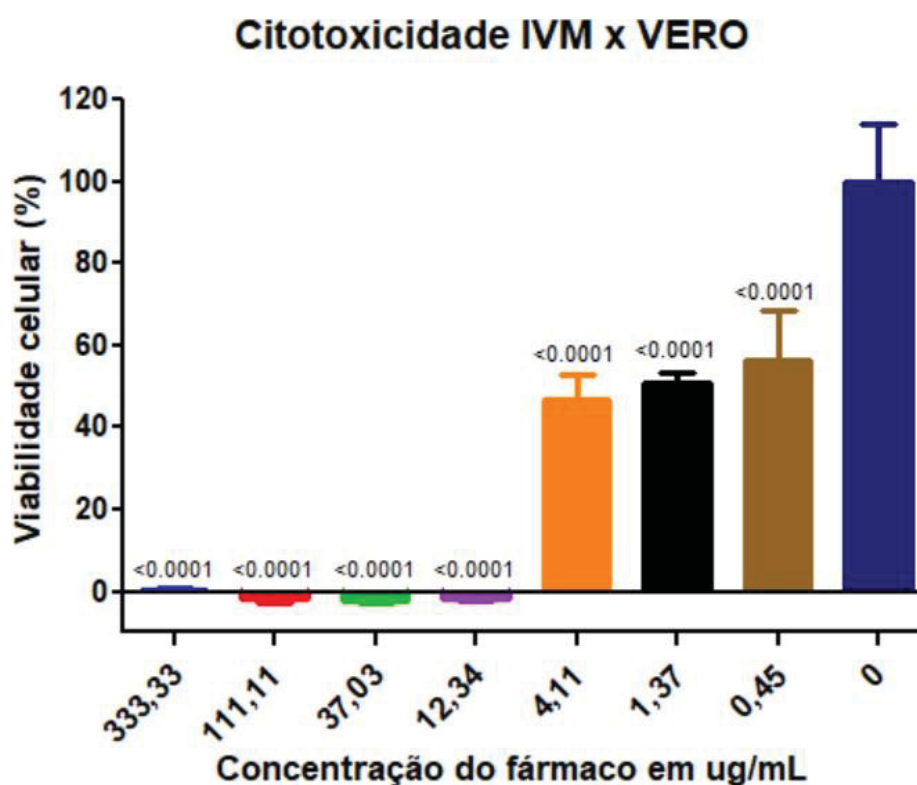
O resultado da citotoxicidade da IVM frente às células VERO foi de 4,94 μ M. Da mesma forma, a citotoxicidade do DPI frente às células VERO foi de 150,3 μ M, ou seja, 30 vezes superior. Isso significa que a IVM é muito mais tóxica para a célula, o que nos mostra o quanto o DPI é tolerado pelas células, tornando-se um fármaco promissor para estudos futuros.

As concentrações das drogas para o teste de citotoxicidade das células VERO foram 10 vezes maiores do que as concentrações das drogas utilizadas em células THP-1, devido àquelas serem células mais resistentes.

BILGIN *et al.* (2013) estudou a viabilidade do *Toxoplasma gondii* frente à IVM humana e a citotoxicidade foi testada em células Hep-2. Para esse tipo de célula a IVM não foi citotóxica. A IC₅₀ trabalhada foi de 0,2 ug/mL.

De acordo com o gráfico 5, não há viabilidade celular até a concentração de 4,11 ug/mL, com isso, pode-se observar o grau de toxicidade da IVM frente às células VERO. Sua IC₅₀ ficou em 4,94μM.

GRÁFICO 5 - CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA FRENTE ÀS CÉLULAS VERO

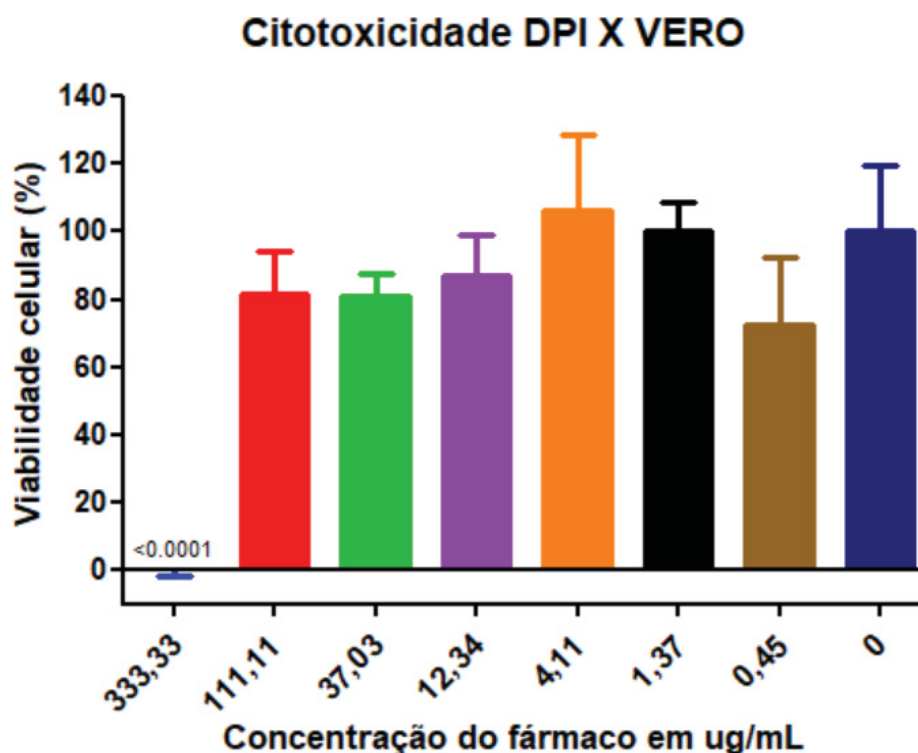


FONTE: A autora (2022)

Quanto à citotoxicidade da IVM frente às células VERO, houve diferença estatística em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle.

Diferentemente da IVM, o DPI não se mostrou tóxico para as células VERO, com exceção da alta concentração de 333,33 ug/mL observada no gráfico 6. O IC₅₀ do DPI foi calculado em 150,3μM.

GRÁFICO 6 - CITOTOXICIDADE DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS VERO



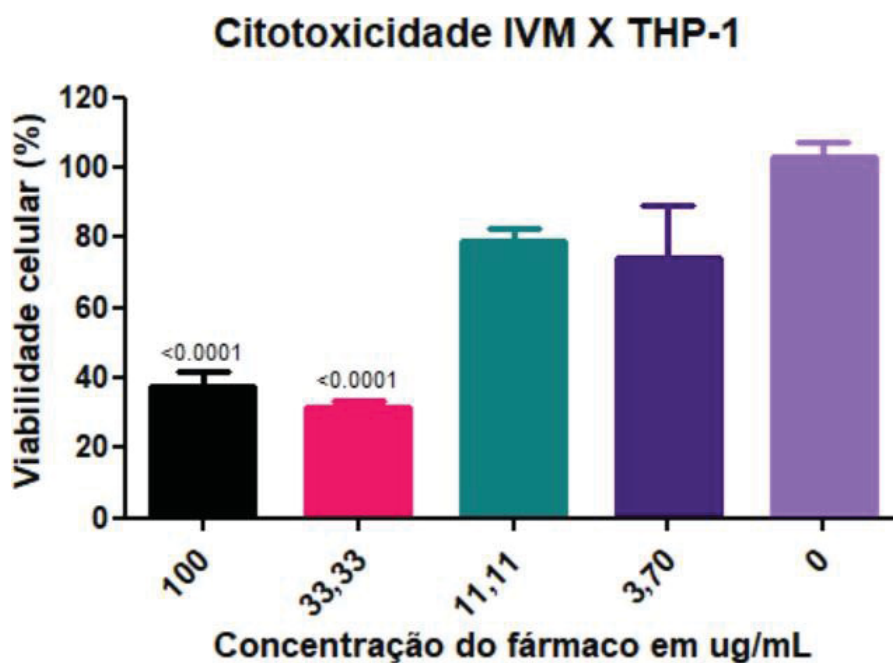
FONTE: A autora (2022)

No teste de citotoxicidade do DPI frente às células VERO houve diferença estatística apenas na concentração de 333,33 ug/mL comparado ao controle.

4.3 CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS IVM E DPI FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1

No gráfico 7 pode-se observar a citotoxicidade da IVM frente às células THP-1. O intuito deste teste nesse tipo celular é avaliar o limite de concentração do fármaco permitido sem inviabilizar a célula, por isso as doses respostas não necessariamente tem concentrações que inviabilizam a THP-1.

GRÁFICO 7 - CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1

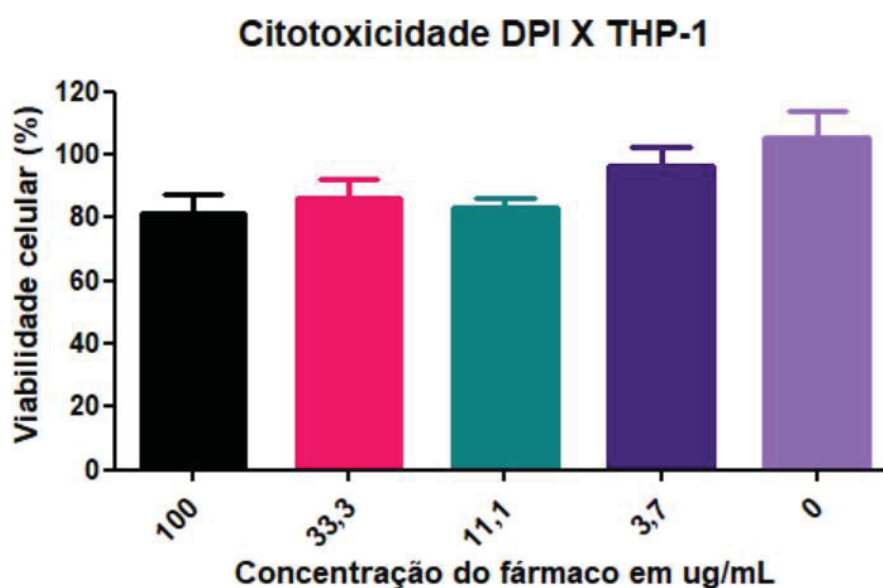


FONTE: A autora (2022)

No teste de citotoxicidade da IVM frente às células THP-1 houve diferença estatística nas duas maiores concentrações, 100 e 33,33 ug/mL, comparadas ao controle.

Como demonstrado no gráfico 8, o DPI possibilitou uma alta porcentagem de viabilidade da célula THP-1.

GRÁFICO 8 - CITOTOXICIDADE DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS THP-1



FONTE: A autora (2022)

No teste de citotoxicidade do DPI frente às células THP-1 não houve diferença estatística das concentrações quando comparadas ao controle.

4.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DOS DOS FÁRMACOS IVM E DPI FRENTE ÀS *L. braziliensis* E *L. infantum*

O IS mostrou que o DPI é mais efetivo contra os tipos de parasitos de *L. braziliensis* e *L. infantum* do que contra as células hospedeiras (THP-1) e do que contra células VERO. De acordo com a tabela 1, os IS da IVM para as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram calculados em 0,7 e 2,2 respectivamente. Os IS do mesmo fármaco para as amastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* ficaram em 1,4 e 1,3 respectivamente. Os IS do DPI para as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram calculados em 26,7 e 8,3 respectivamente. Os IS do mesmo fármaco para as amastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* ficaram em 32,8 e 39,9 respectivamente, sendo estes os melhores resultados comparados aos demais valores de IS.

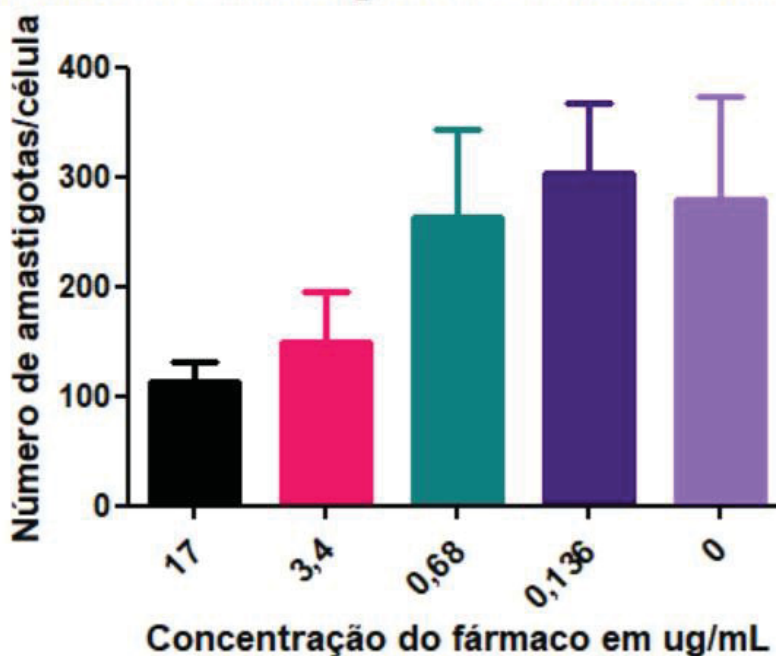
TABELA 1 - ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS DOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS *L. braziliensis* E *L. infantum*

Fármacos	Índice de seletividade (IS)			
	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>	
	Promastigota	Amastigota	Promastigota	Amastigota
IVM	0,7	1,4	2,2	1,3
DPI	26,7	32,8	8,3	39,9

FONTE: A autora (2022)

4.5 VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* e *L. infantum* FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

O cálculo do resultado se deu através da contagem do número de amastigotas/célula, utilizando-se o equipamento Opereta®. Tanto o IC₅₀ quanto o IS das amastigotas de *L. braziliensis* frente à IVM apresentaram um baixo número (3,48 e 1,4 respectivamente), o que significa que a IVM é extremamente tóxica tanto para a linhagem celular trabalhada (THP-1), quanto para os protozoários (*L. braziliensis*). No gráfico 9 pode-se perceber a ação da IVM nas amastigotas de *L. braziliensis*.

GRÁFICO 9 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* FRENTE À IVERMECTINA**Viabilidade da amastigota de *L. braziliensis* x IVM**

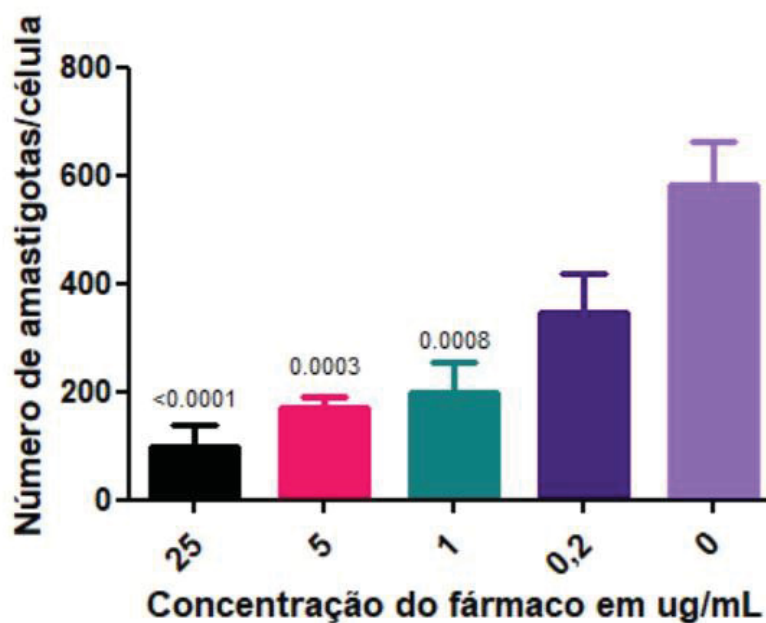
FONTE: A autora (2022)

Na viabilidade das amastigotas de *L. braziliensis* com IVM, não houve diferença estatística das concentrações comparadas com o controle.

Da mesma forma mostrada no gráfico 9, os resultados do gráfico 10 foram contabilizados pelo número de amastigotas/célula, também fornecido pelo equipamento Operetta®. Ao contrário do acontecido no gráfico 9, o teste de viabilidade das amastigotas de *L. braziliensis* frente ao DPI, apresentou alto valor de IS (32,8), enquanto que o IC₅₀ da amastigota de *L. braziliensis* ficou em 4,57µM, também maior que o resultado anterior.

GRÁFICO 10 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

Viabilidade da amastigota de *L. braziliensis* x DPI



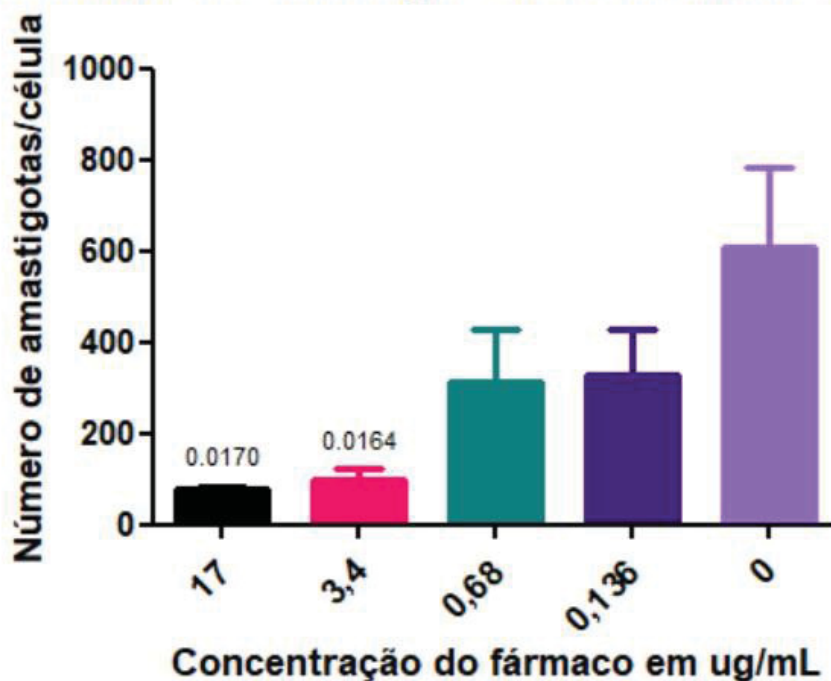
FONTE: A autora (2022)

Na viabilidade das amastigotas de *L. braziliensis* com DPI, houve diferença estatística nas concentrações 25, 5 e 1 ug/mL quando comparadas ao controle.

No gráfico 11, a IVM mostrou-se tão tóxica para as amastigotas de *L. infantum* quanto para as amastigotas de *L. braziliensis* mostradas no gráfico 9. Seu IS ficou em 1,3, enquanto que o IC_{50} ficou em $3,77\mu M$.

GRÁFICO 11 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE *L. infantum* FRENTE À IVERMECTINA

Viabilidade da amastigota de *L. infantum* x IVM



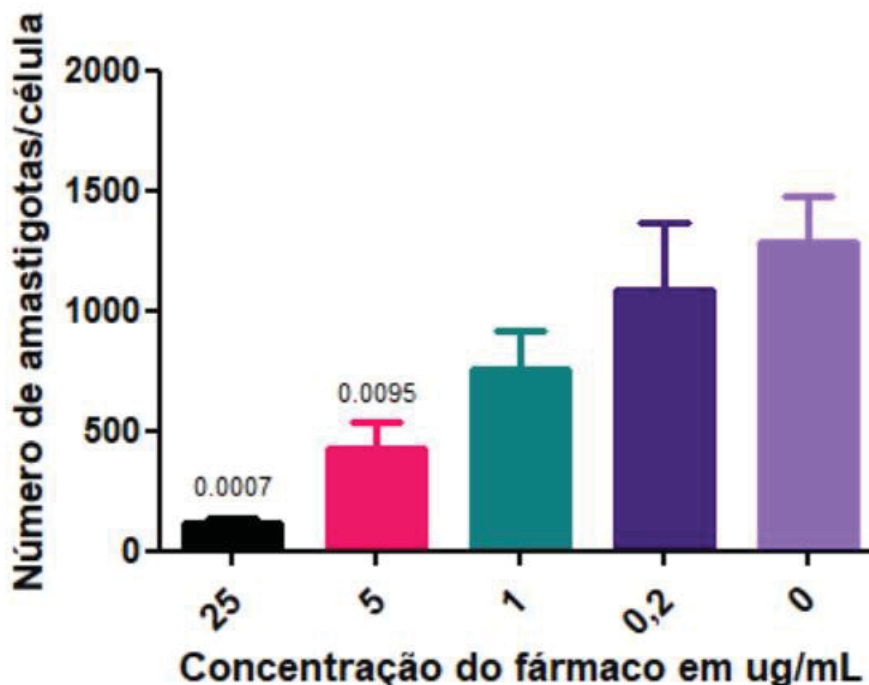
FONTE: A autora (2022)

Na viabilidade das amastigotas de *L. infantum* com IVM, houve diferença estatística das concentrações mais altas, 17 e 3,4ug/mL comparadas com o controle.

No gráfico 12 é apresentada a ação do DPI frente às amastigotas de *L. infantum*. Este resultado se mostrou muito promissor, com o DPI tendo o maior IS de todo o experimento, 39,9, enquanto que o IC₅₀ da amastigota de *L. infantum* ficou em 3,76μM.

GRÁFICO 12 - VIABILIDADE DAS AMASTIGOTAS DE *L. infantum* FRENTE AO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

Viabilidade da amastigota de *L. infantum* x DPI

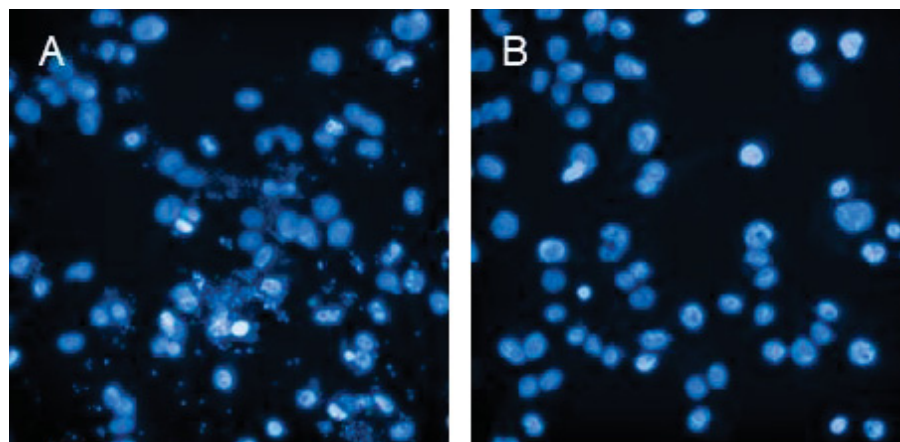


FONTE: A autora (2022)

Na viabilidade das amastigotas de *L. infantum* frente ao DPI, houve diferença estatística nas concentrações 25, e 5 µg/mL quando comparadas ao controle. Ambos os medicamentos utilizados mostraram atividade anti-leishmania importante. A IVM por mostrar a toxicidade contra as células VERO e, portanto, a inviabilidade da sua utilização no combate às *L. braziliensis* e *L. infantum*. Já o DPI teve alta eficácia contra os parasitos e, ao mesmo tempo, segurança para as células, não mostrando citotoxicidade e apresentando resultado de 39,9 para as amastigotas de *L. infantum* e 32,8 para as amastigotas de *L. braziliensis*. Na figura 8 temos 2 imagens fornecidas pelo equipamento OPERETTA® as quais mostram o tratamento do DPI em amastigotas de *L. infantum*.

Observa-se células THP-1 contaminadas com amastigotas de *Leishmania infantum* fixadas e coradas com *hoechst*. Não observadas (A) e tratadas (B) com 30µM de DPI por 48 horas. Na imagem A pode-se observar as amastigotas como pontos menores e o núcleo das células como maiores. Na imagem B não se observam as amastigotas, devido ao tratamento com DPI.

FIGURA 8 - IMAGENS PROVENIENTES DO EQUIPAMENTO OPERETTA® - CÉLULAS AMASTIGOTAS



FONTE: A autora (2022)

De acordo com os critérios de Lenta *et al.* (2007), valores de IS maiores de 10 podem sugerir uma melhor segurança do fármaco para uso em mamíferos, devido à ausência de toxicidade, enquanto que valores de IS abaixo de 10 são considerados tóxicos. O DPI, além de mostrar alta eficácia contra os parasitos e segurança para as células, é um medicamento muito promissor para utilização em futuros ensaios *in vivo*. Don e loset (2014) demonstraram que estudos feitos com *Leishmania spp.* em que o IS apresentou-se superior a 20 para os medicamentos, consideram-se adequados posteriores ensaios *in vivo*. Quanto ao reposicionamento do DPI, pouco se encontra na literatura. Costa (2005) testou diferentes doses de DPI em ratas prenhes e observou não haver toxicidade materna; em havendo alterações na prole, isso não se devia à interferências com a hemostasia materna.

Outros estudos envolvendo o DPI podem ser citados, como pesquisa de Basso *et al.* (2019) onde foi revelado o primeiro caso clínico autóctone de um gato adulto macho, domesticado, residente da Áustria, portador de *Hepatozoon felis*. Apesar de ser um caso isolado, o animal foi tratado com DPI associado com doxiciclina; como resultado obteve-se a recuperação completa do animal, visto que essa doença, causada pelo protozoário *Hepatozoon spp.*, e transmitida pelo carrapato, é de difícil e controverso tratamento. Já a pesquisa de Silva *et al.* (2008) se deu com ratos infectados com *Trypanosoma evansi*, os quais foram tratados pela associação de aceturato de diminazeno e DPI, onde concluiu-se que o tratamento feito por cinco dias consecutivos foi efetivo no combate ao parasito. Rodrigues *et al.* (2006) estudaram o efeito do DPI aplicado subcutâneo em camundongos BALB/c infectados com *L.*

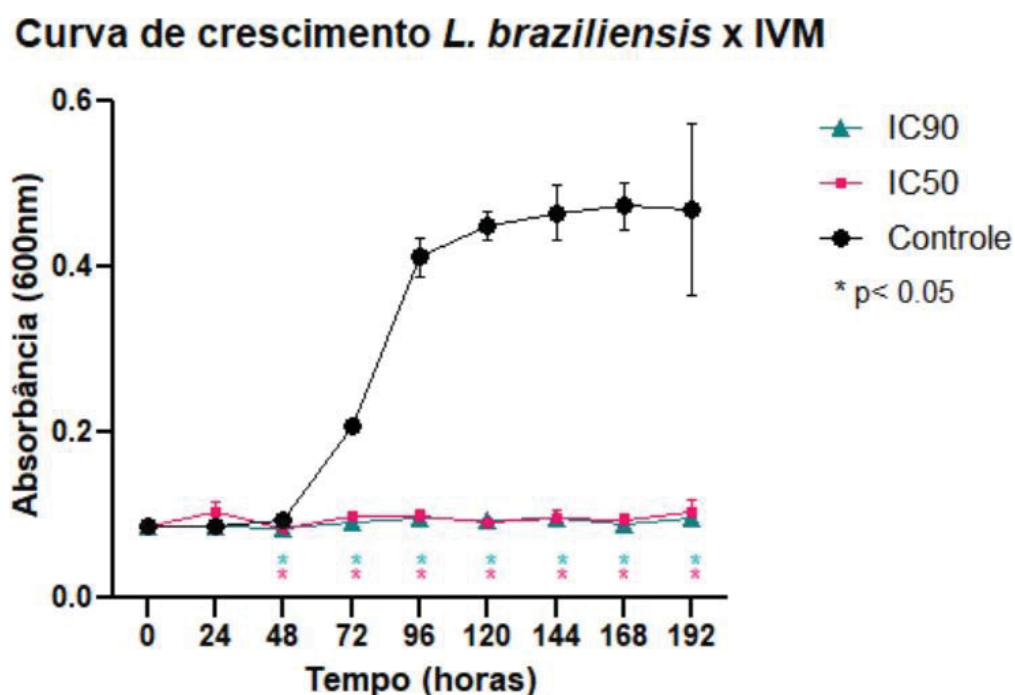
amazonensis (causadora da LT) e quando comparados aos controles, camundongos tratados com DPI apresentaram níveis mais baixos de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, menor carga parasitária nas lesões, sugerindo seu uso como potencial fármaco no tratamento de lesões tegumentares.

Quanto aos estudos onde se utilizou IVM, Santos *et al.* (2009) mencionam possível futura aplicação farmacológica do fármaco sobre LT causada por *L. amazonensis*, a qual pode servir para projetar moléculas mais otimizadas contra o parasito alvo. Gonçalves-Jr (2020) observou a influência da IVM sobre a testosterona em ratos de laboratório, onde foi avaliada como um anti tumoral, a qual também apresentou citotoxicidade para a célula em estudo (célula de melanoma). Batiha *et al.* (2019) demonstraram a eficácia da IVM e testaram o crescimento de *Babesia spp* e *Theileria sp in vitro* e *in vivo*. Os pesquisadores concluíram que o fármaco tem potencial para ser um remédio alternativo para o tratamento da piroplasmose. Kadir *et al* (2009) estudaram a eficácia da IVM *in vitro* e *in vivo* no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. tropica*, causadora de LT. Concluíram que a IVM leva à diminuição acentuada em promastigotas viáveis *in vitro* e sua eficácia foi maior seguida da Rifampicina, Anfotericina B e Nistatina. A eficácia da IVM foi maior do que a das outras drogas em matar os parasitas *in vitro* e por inoculação subcutânea, enquanto que a eficácia da Rifampicina foi maior por tratamento tópico.

4.6 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS *L. braziliensis* E *L. infantum*

A necessidade de se realizar as curvas de crescimento foi justamente para conhecer o comportamento das promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* frente aos fármacos IVM e DPI.

No gráfico 13, a curva de crescimento da *L. braziliensis* frente à IVM mostrou que houve atividade leishmanicida do medicamento, tanto nas concentrações de IC₅₀ (6,22µM) quanto nas concentrações de IC₉₀ (8,13µM) havendo morte do parasito, em um período de 8 dias de tratamento.

GRÁFICO 13 - CURVA DE CRESCIMENTO DA *L. braziliensis* FRENTE À AÇÃO DA IVERMECTINA

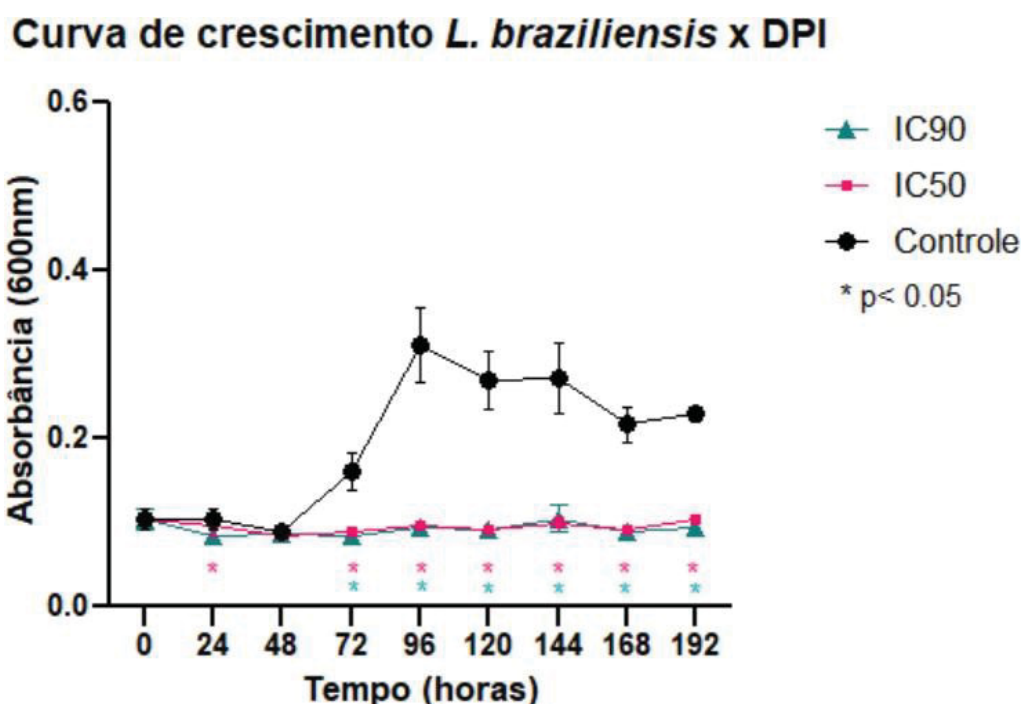
FONTE: A autora (2022)

Houve diferença estatística nas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ quando comparadas ao controle, com exceção da hora 24.

No gráfico 14, a curva de crescimento da *L. braziliensis* frente ao DPI mostrou que houve atividade leishmanicida do medicamento, tanto nas concentrações de IC₅₀ (5,62μM) quanto nas concentrações de IC₉₀ (33,52μM) havendo morte do parasito, em um período de 8 dias de tratamento.

A curva de crescimento da *L. braziliensis* frente ao DPI mostrou que houve atividade leishmanicida do medicamento, havendo morte do parasito nas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀, por um período de 8 dias de tratamento. A diferença é que o DPI não foi tão tóxico para o parasito quanto a IVM, como podemos observar no gráfico 14, mesmo assim houve atividade leishmanicida. Houve diferença estatística nas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ quando comparadas ao controle, em todo o período do tratamento, com exceção da hora 48.

GRÁFICO 14 - CURVA DE CRESCIMENTO DA *L. braziliensis* FRENTE À AÇÃO DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

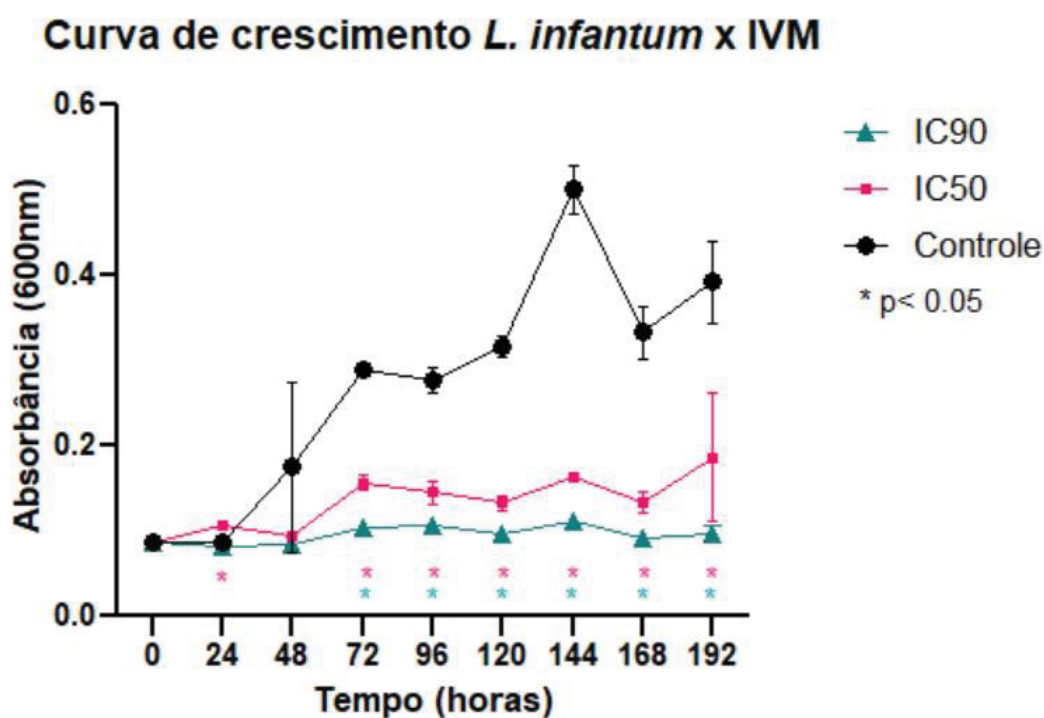


FONTE: A autora (2022)

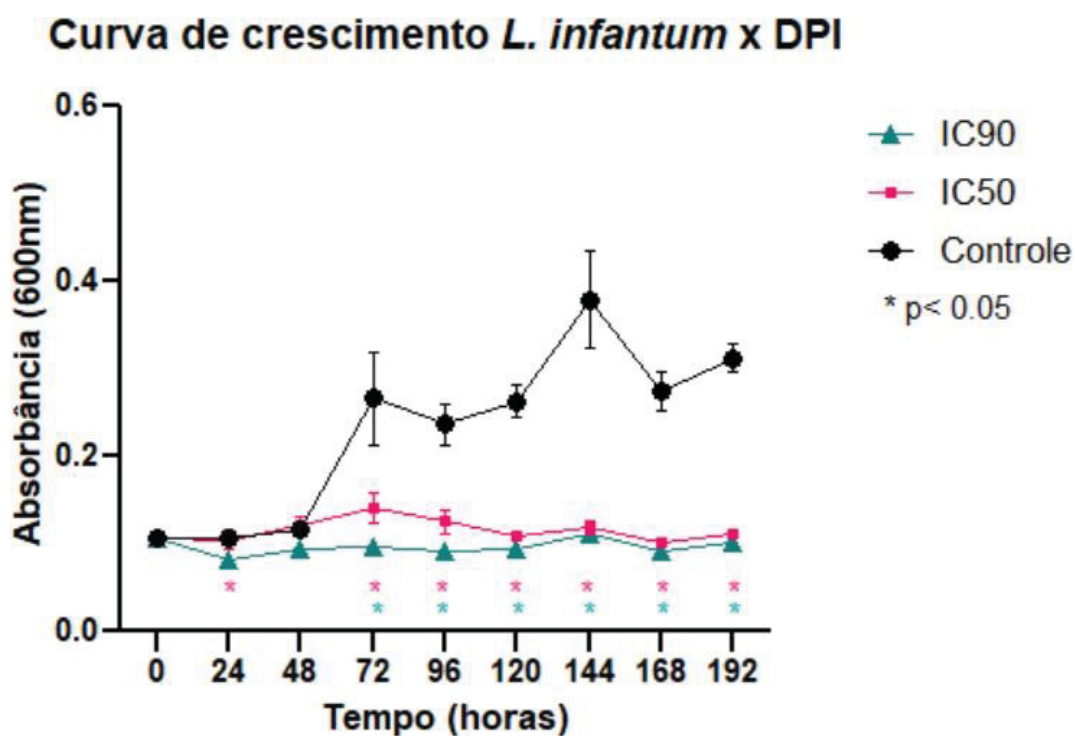
No gráfico 15, pode-se observar a curva de crescimento da *L. infantum* frente à IVM. O controle teve as fases de crescimento dos parasitas definidas, principalmente a fase estacionária e de declínio.

A curva de crescimento da *L. infantum* frente à IVM mostrou que houve atividade leishmanicida do medicamento frente às concentrações de IC₉₀ (5,57μM) e atividade leishmanicida frente às concentrações de IC₅₀ (5,62μM). Isso porque frente à *L. infantum*, a IVM não se mostrou tão tóxica, quando comparada à *L. braziliensis*. O tratamento também foi feito por um período de 8 dias. Houve diferença estatística nas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ quando comparadas ao controle, em todo o período do tratamento, com exceção da hora 48.

No gráfico 16, a curva de crescimento das *L. infantum* frente à ação do DPI, mostrou-se leishmanicida tanto nas concentrações de IC₅₀ (17,89μM) quanto de IC₉₀ (103,19μM), durante todo o tratamento. A cultura dos parasitos de *L. infantum* como controle (sem adição de fármaco), alcançou sua fase estacionária próximo ao 6o dia de cultivo, e após esse período entrou em fase de declínio (morte).

GRÁFICO 15 - CURVA DE CRESCIMENTO DA *L. infantum* FRENTE À AÇÃO DA IVERMECTINA

FONTE: A autora (2022)

GRÁFICO 16 - CURVA DE CRESCIMENTO DA *L. infantum* FRENTE À AÇÃO DO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

FONTE: A autora (2022)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Ambos medicamentos, IVM e DPI, mostraram eficácia contra os parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum*. Porém, apenas o DPI teve alta eficácia contra os parasitos e paralelamente apresentou baixa toxicidade para as células VERO e THP-1. Devido a esses promissores resultados, recomenda-se que esse estudo evolua para ensaios *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

- A hipótese deste estudo foi confirmada, sendo possível afirmar que os fármacos veterinários IVM e DPI apresentaram atividade anti-leishmania *in vitro* frente à *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.
- Ambos medicamentos, IVM e DPI, mostraram-se tóxicos para células VERO, porém a IVM em concentrações maiores, o que impede a continuidade do tratamento deste medicamento num possível teste *in vivo*. Já o DPI apresentou resultados muito promissores, o que poderia levar à testes *in vivo*.
- A IVM mostrou-se mais tóxica para as células THP-1 do que o DPI, o qual também se mostra mais promissor frente a esse tipo celular, visto que com as mesmas concentrações da IVM, houve praticamente 100% de viabilidade celular.
- O índice de seletividade obtido foi alto para as amastigotas tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. infantum* frente ao DPI. Foi relativamente alto também para as promastigotas de *L. braziliensis* frente a mesma droga. Porém, frente à IVM, os índices de seletividade foram todos baixos, tanto em promastigotas quanto em amastigotas de ambos tipos de *Leishmania spp*. O que nos leva a concluir que a toxicidade da IVM fica muito próxima tanto contra células VERO quanto contra os parasitos, sendo mais tóxica para as *Leishmanias spp*.
- A curva de crescimento nos mostrou que há ação dos fármacos frente às *Leishmanias braziliensis* e *infantum*, ambos fármacos se mostraram leishmanicidas.
- Comparando-se a IVM e o DPI, este mostrou-se mais adequado nos experimentos, além de não apresentar citotoxicidade às células, foi muito eficaz contra as *Leishmanias spp* estudadas, o que poderia ser promissor em ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- BASSO, W. *et al.* First autochthonous case of clinical *Hepatozoon felis* infection in a domestic cat in Central Europe. **Parasitology International**, v.72: 101945, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101945>. Acesso 13 mai. 2022.
- BATIHA G. *et al.* Evaluation of the inhibitory effect of ivermectin on the growth of Babesia and Theileria parasites in vitro and in vivo. **Tropical Medicine and Health**, v. 47, 2019.
- BILGIN, M. *et al.* In Vitro Effects of Ivermectin and Sulphadiazine on Toxoplasma gondii. **Balkan Medical Journal**, v. 30, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2012.098>. Acesso 10 dez. 2022.
- BRANDER G.C. *et al.* **Veterinary applied pharmacology & therapeutics**. 5. ed. Toronto: Ballière Tindall/Saunders, 1991. 624p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. **Semana Nacional de Controle e Combate à Leishmaniose**. 2022a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmanioses**. Caderno Temático do Programa Saúde na Escola: Prevenção de doenças negligenciadas / Ministério da Saúde. Ministério da Educação- Brasília: Ministério da Saúde, 2022b. p. 22-23. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_tematico_pse_doencas_negligenciadas.pdf. Acesso 05 dez. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceral_1edicao.pdf. Acesso 05 dez. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, 2018.
- CAMPBELL, W.C. History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 853 - 865, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920112800399095>. Acesso 12 mai. 2022.
- CDC. Centers for Diseases Control. DPDx- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em: CDC - DPDx - Leishmaniasis. Acesso 08 dez. 2022
- COSTA, D.C.; COSTA, C.H.N. **Leishmaniose visceral**. In: Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais © Organização Pan-Americana da Saúde, 2021. p.493-532. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso 13 dez. 2022.
- COSTA, P.P. **Evaluation of the possible embryotoxic effects of imidocarb dipropionate administered during organogenesis in rats**. 2005. 64f. Dissertação

(Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

DANTAS-TORRES F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: a brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.197-203, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>. Acesso 04 dez. 2022.

DON, R.; IOSET, J.R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140-146, 2014. Disponível em: <https://doi: 10.1017/S003118201300142X>. Acesso 12 mai. 2022.

DIAS T.P. et al. Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: análise crítica frente à evolução epidemiológica. **Research, Society and Development**, v. 11, e45711528361, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28361>. Acesso 04 dez. 2022.

DUARTE M.I.S.; BADARÓ R.S. **Leishmaniose visceral (Calazar)**. In: Veronesi: tratado de infectologia. 4. ed. rev. e atualiz. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p. 1107-1736.

FALQUETO A.; SESSA P.A. **Leishmaniose tegumentar americana**. In: Veronesi: tratado de infectologia. 4. ed. rev. e atualiz. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p.1691-1706.

FIOCRUZ. Doenças no portal. **Leishmaniose**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose>. Acesso 07 dez. 2022.

FONSECA, R.J.M. **Estudo de reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas causadas por protozoários através da integração de bases de dados biológicas usando Web Semântica**. Rio de Janeiro, 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7027>. Acesso 04 nov. 2020.

GHORBANI, M.; FARHOUD, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Des Devel Ther.** v.12, p.25-40, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29317800/>. Acesso 20 out. 2020.

GOLDSMITH, S.R. **Doenças infecciosas: protozoários e helmintos**. Tradução: Solange Savério e Silas P. Barbosa Jr. In: LAWRENCE, M; TIERNEY Jr.; McPHEE S.J.; PAPADAKIS, M.A. Diagnóstico e tratamento: um livro médico. São Paulo: Atheneu Editora, 2004. p. 1480-1485.

GONÇALVES Jr., V. **Estudos *in vivo* e *in vitro* da influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de melanoma**. 2020. 110 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.10.2020.tde-13052020-160401>. Acesso 04 nov. 2020.

KADIR, M.A. et al. Comparison between the efficacy of ivermectin and other drugs in treatment of cutaneous leishmaniasis. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Abdul->

Samarai/publication/237481636_Comparison_between_the_efficacy_of_ivermectin_and_other_drugs_in_treatment_of_cutaneous_leishmaniasis/links/564e050d08aeafc2aab16809/Comparison-between-the-efficacy-of-ivermectin-and-other-drugs-in-treatment-of-cutaneous-leishmaniasis.pdf. Acesso 12 dez. 2022.

LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? **Trends in Parasitology**, v.33, 463-472, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>. Acesso 01 jul. 2022.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. **Leishmaniose**. In: Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais © Organização Pan-Americana da Saúde, 2021. P. 356-488. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso 13 dez. 2022.

LENTA, B.N. et al. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, p. 8-12; 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.036>. Acesso 01 nov. 2022.

MARION, S. et al. Reposicionamento de drogas como nova alternativa de tratamento em doenças infecciosas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 3 mar. 2020. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/100238>. Acesso 04 nov. 2020.

MARTINS, I.V.F. M386p **Parasitologia veterinária** [recurso eletrônico] / Isabella Vilhena Freire Martins. - Dados eletrônicos. - 2.ed - Vitória/ES: Universidade Federal do Espírito Santo (EDUFES), 2019. 320 p.

MEERLOO J.V.; KASPERS G.J.L.; CLOOS J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Mol. Biol.**, v.731, p.237-245, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20. Acesso 04 dez. 2020.

MORAIS, N.B.D et al. **Aspectos gerais da doença**. In. BRASIL (Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV). Guia de Bolso Leishmaniose Visceral. Brasília: Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária; 2020. p.10-18.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso 04 dez. 2020.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Doenças protozoárias polissistêmicas**. Medicina interna de pequenos animais. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. p. 1035-1036.

OLICHESKI, A.T. **Diagnóstico de protozoários do gênero Babesia (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero Ehrlichia (Ehrlich, 1888) em cães (Canis familiaris) no município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2003. 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

OUELLETTE M.; FASE-FOWLER F.; BORST, P. The amplified H circle of methotrexate resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene. **The EMBO Journal**, v.9, p.1027-1033, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08206.x>. Acesso 10 dez. 2022.

OVALLE-BRACHO, C. **Leishmaniose cutânea**. In: Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais © Organização Pan-Americana da Saúde, 2021. p.100-347. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso 13 dez. 2022.

QUEIRÃO, A.L. et al.; 2019. A toxicidade das drogas empregadas no tratamento de leishmaniose e tripanossomíase americana. **Mostra Científica de Biomedicina**, v.4, n. 1, 2019.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 104, n. 7, p. 937-954, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700001>. Acesso 04 dez. 2020.

REIS, T.A. et al. Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 221, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108059>. Acesso 10 dez. 2022.

RODRIGUES, F.H. et al. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 37-46, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.032>. Acesso 10 dez. 2022.

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. **Reservatórios**. In: Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais © Organização Pan-Americana da Saúde, 2021. p.53-65. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso 10 dez. 2022.

SANTOS, A.R. et al. Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. **Bioorganic Med Chem**, v.17, p. 496-502, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.003>. Acesso 12 mai. 2022.

SAÚDE, M.D.; SAÚDE, S.D.V.E. **Leishmaniose Visceral**. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2017a. 120 p.

SAÚDE, M.D. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2017b. 189 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso 08 dez. 2022.

SAÚDE, M.D. **Manual da Vigilância de Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf>. 2014. Acesso 08 dez. 2022.

SILVA, A.S. et al. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1357-1362, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500025>. Acesso 03 nov. 2020.

SILVA, J.C.S. **Avaliação do perfil citotóxico da associação de Doxorrubicina com Ivermectina em um modelo celular de melanoma canino**. 2019. X FL. Dissertação. (Mestrado em Patologia) - Setor Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.10.2020.tde-09122019-163257>. Acesso 21 out.2020.

SPINOSA, H.S.; XAVIER, F. G.; MARUO, V. M. **Toxicologia dos medicamentos**. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; NETO, J.P. (Ed.). Toxicologia aplicada à Medicina veterinária. Barueri: Manole, 2008. cap. 6, p. 117-189.

TASLIMI, Y. et al. **Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches**. Cambridge University Press, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27974063/>. Acesso 29 out. 2020.

TIRADO, T.C.; ANDRADE, A.J.; RIBEIRO, M.C.V.C.; FIGUEIREDO, F.B. Use of the high-content imaging system equipment to evaluate in vitro infection by *Leishmania braziliensis* in response to sand fly *Nyssomyia neivai* saliva. **Acta Tropica**, v.209:1055402020., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020>. Acesso 2 dez. 2022.

YOVANY, M.; JOSEPH, F.N.; JONATHAN,S.; CHARLES, D.M.; TIMOTHY,G.G. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia Malayi*. **PNAS**, v.107:20120-20125, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1011983107>. Acesso 21 out. 2020.

WHO. **Leishmaniasis**, 2022.

ANEXOS

DADOS BRUTOS DA VIABILIDADE DAS *L. braziliensis* e *L. infantum* FRENTE AOS FÁRMACOS IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

IVM X <i>L. braziliensis</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,535	0,208	0,195	0,196	0,529	0,746	0,771	0,75	0,73	0,712	
C		0,629	0,208	0,199	0,203	0,566	0,755	0,731	0,776	0,753	0,731	
D		0,74	0,212	0,197	0,207	0,529	0,785	0,718	0,741	0,767	0,709	
E		0,66	0,211	0,195	0,209	0,564	0,777	0,769	0,753	0,766	0,736	
F		0,698	0,226	0,195	0,203	0,55	0,75	0,743	0,733	0,729	0,705	
G		0,551	0,213	0,198	0,205	0,499	0,615	0,64	0,64	0,627	0,53	
H		Controle +	100ug/mL	33,3ug/mL	11,1ug/mL	3,7ug/mL	1,23ug/mL	0,41ug/mL	0,13ug/mL	0,045ug/mL	Controle +	

IVM X <i>L. infantum</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1,03	0,216	0,195	0,167	0,347	1,006	1,212	1,282	1,519	1,52	
C		1,264	0,206	0,192	0,164	0,341	1,005	1,273	1,352	1,387	1,449	
D		1,05	0,207	0,191	0,169	0,343	0,972	1,199	1,321	1,44	1,406	
E		1,232	0,217	0,189	0,16	0,342	1,013	1,243	1,3	1,307	1,362	
F		0,835	0,206	0,19	0,16	0,334	0,987	1,243	1,314	1,294	1,318	
G		0,636	0,215	0,192	0,162	0,323	0,963	1,21	1,396	1,336	1,349	
H		Controle +	100ug/mL	33,3ug/mL	11,1ug/mL	3,7ug/mL	1,23ug/mL	0,41ug/mL	0,13ug/mL	0,045ug/mL	Controle +	

DPI X <i>L. braziliensis</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,595	0,238	0,291	0,333	0,374	0,54	0,594	0,608	0,596	0,59	
C		0,597	0,231	0,295	0,343	0,396	0,571	0,647	0,672	0,713	0,651	
D		0,624	0,251	0,304	0,353	0,387	0,544	0,638	0,671	0,683	0,644	
E		0,612	0,255	0,294	0,333	0,386	0,566	0,64	0,668	0,67	0,624	
F		0,643	0,265	0,294	0,334	0,389	0,523	0,606	0,635	0,652	0,615	
G		0,556	0,253	0,294	0,328	0,39	0,531	0,591	0,622	0,605	0,59	
H		Controle +	100ug/mL	33,3ug/mL	11,1ug/mL	3,7ug/mL	1,23ug/mL	0,41ug/mL	0,13ug/mL	0,045ug/mL	Controle +	

DPI X <i>L. infantum</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1,384	0,564	0,755	1,063	1,26	1,399	1,37	1,357	1,35	1,338	
C		1,33	0,534	0,757	0,99	1,256	1,361	1,312	1,367	1,34	1,326	
D		1,364	0,5	0,766	1,05	1,283	1,373	1,325	1,348	1,335	1,282	
E		1,291	0,511	0,731	0,985	1,227	1,339	1,364	1,336	1,339	1,324	
F		1,251	0,515	0,774	0,996	1,229	1,338	1,335	1,352	1,344	1,262	
G		1,243	0,517	0,767	0,982	1,215	1,286	1,306	1,329	1,32	1,275	
H		Controle +	100ug/mL	33,3ug/mL	11,1ug/mL	3,7ug/mL	1,23ug/mL	0,41ug/mL	0,13ug/mL	0,045ug/mL	Controle +	

DADOS BRUTOS DA CITOTOXICIDADE DA IVERMECTINA E DIPROPIONATO DE IMIDOCARB FRENTE ÀS CÉLULAS VERO

Citotoxicidade IVM X VERO									
Concentração	1000	333,33	111,11	37,03	12,34	4,11	1,37	0,45	0
Absorbância células viáveis	0,407	0,246	0,238	0,234	0,233	0,601	0,62	0,586	0,565
	0,309	0,258	0,239	0,235	0,236	0,618	0,645	0,717	0,627
	0,337	0,248	0,249	0,234	0,234	0,631	0,628	0,805	0,583
	0,363	0,252	0,233	0,23	0,231	0,656	0,653	0,681	0,626
	0,354	0,25	0,236	0,231	0,232	0,533	0,612	0,59	0,573
Absorbância células fixadas	0,258	0,248	0,252	0,25	0,246	0,258	0,248	0,252	0,25
Citotoxicidade DPI X VERO									
Concentração	1000	333,33	111,11	37,03	12,34	4,11	1,37	0,45	0
Absorbância células viáveis	0,252	0,251	0,681	0,742	0,623	0,649	0,745	0,562	0,629
	0,249	0,247	0,648	0,755	0,796	0,889	0,832	0,589	0,836
	0,262	0,262	0,838	0,71	0,776	0,922	0,817	0,687	0,884
	0,25	0,242	0,718	0,674	0,733	0,98	0,839	0,691	0,909
	0,244	0,242	0,738	0,678	0,763	0,846	0,871	0,849	0,836
Absorbância células fixadas	0,252	0,249	0,262	0,25	0,244	0,252	0,249	0,262	0,25

DADOS BRUTOS DA CURVA DE CRESCIMENTO

Horas		Ivermectina						Imizol					
		L. infantum			L. braziliensis			L. infantum			L. braziliensis		
24	Controle	0,085	0,086	0,089	0,087	0,086	0,088	0,105	0,108	0,109	0,119	0,099	0,095
	IC50	0,108	0,109	0,104	0,11	0,112	0,089	0,093	0,111	0,113	0,104	0,106	0,082
	IC90	0,082	0,084	0,082	0,084	0,087	0,089	0,084	0,083	0,082	0,083	0,082	0,087
48	Controle	0,291	0,119	0,116	0,093	0,093	0,097	0,116	0,116	0,12	0,09	0,092	0,09
	IC50	0,094	0,096	0,092	0,084	0,084	0,083	0,12	0,116	0,132	0,083	0,086	0,083
	IC90	0,085	0,085	0,083	0,088	0,088	0,082	0,094	0,091	0,098	0,094	0,085	0,084
72	Controle	0,294	0,291	0,286	0,214	0,203	0,205	0,211	0,269	0,318	0,186	0,145	0,154
	IC50	0,185	0,157	0,148	0,105	0,098	0,093	0,158	0,14	0,125	0,091	0,09	0,088
	IC90	0,105	0,105	0,101	0,096	0,094	0,09	0,093	0,095	0,101	0,087	0,084	0,085
96	Controle	0,285	0,26	0,284	0,401	0,439	0,396	0,221	0,226	0,263	0,273	0,361	0,301
	IC50	0,181	0,134	0,143	0,106	0,099	0,093	0,117	0,12	0,141	0,101	0,098	0,093
	IC90	0,111	0,102	0,105	0,099	0,095	0,095	0,093	0,093	0,093	0,09	0,092	0,103
120	Controle	0,323	0,325	0,302	0,341	0,37	0,336	0,274	0,242	0,272	0,308	0,248	0,25
	IC50	0,142	0,135	0,125	0,099	0,091	0,09	0,111	0,105	0,112	0,094	0,09	0,091
	IC90	0,098	0,093	0,099	0,094	0,094	0,093	0,094	0,096	0,095	0,088	0,088	0,103
144	Controle	0,514	0,466	0,519	0,432	0,298	0,465	0,314	0,412	0,41	0,298	0,225	0,293
	IC50	0,185	0,186	0,181	0,109	0,093	0,093	0,129	0,114	0,117	0,107	0,095	0,099
	IC90	0,117	0,106	0,116	0,1	0,097	0,093	0,119	0,11	0,104	0,098	0,096	0,123
168	Controle	0,388	0,312	0,319	0,501	0,443	0,474	0,251	0,281	0,293	0,193	0,226	0,232
	IC50	0,149	0,125	0,129	0,103	0,092	0,088	0,101	0,101	0,101	0,092	0,09	0,094
	IC90	0,097	0,092	0,091	0,094	0,09	0,088	0,091	0,093	0,093	0,089	0,088	0,09
192	Controle	0,445	0,354	0,375	0,588	0,432	0,39	0,293	0,32	0,322	0,225	0,242	0,226
	IC50	0,274	0,144	0,142	0,119	0,104	0,093	0,111	0,113	0,11	0,106	0,098	0,109
	IC90	0,109	0,09	0,093	0,101	0,094	0,094	0,099	0,105	0,1	0,097	0,096	0,094

PARTICIPAÇÃO COMO CO AUTORA EM ARTIGOS CIENTÍFICOS

Publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, em 2022.

Link de acesso: <https://www.jbpml.org.br/pt/article/4821/>

ORIGINAL ARTICLE

J Bras Patol Med Lab. 2022; 58: 1-7.

Evaluation of the Lectin Pathway in the Serum of Patients with Chronic Chagas Disease by Detection of C4 by Elisa

Avaliação da via das lectinas no soro de pacientes com doença de Chagas crônica pela detecção de C4 por Elisa

Renan Polachini, Lorena Bavia, Fabiana A. Andrade, Kírta C. F. Lidari, Vanessa F. Piccoli, Nathalia M. D. L. Signorini, Pâmela D. Fontana, Helena M. B. S. Plácido, Lara J. M. Reason

Universidade Federal do Paraná, Department of Medical Pathology, Curitiba, PR Paraná, Brazil.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a chronic tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi*, affecting about 8 million people in Latin America. The lectin pathway (LP) of the complement system is one of the first lines of host defense in the response against *T. cruzi*, and can continue to be activated in chronic infection due to the escape of the parasite to its action. Although some components of this pathway have been investigated in CD, there are no reports on its activation in patient serum. In this context, our objective was to evaluate the activation of LP in chronic chagasic patients and controls by the detection of the C4 component, using the direct ELISA assay. For this purpose, serum of 80 patient with chronic CD (clinical forms: asymptomatic n=17; symptomatic n=63; cardiac n=45; cardio digestive n=13; digestive n=5) followed at the Ambulatory of Attention to Chagasic Patients (HC/UFPR) and 80 healthy controls (donors of the Blood Bank of HC) were evaluated regarding the evaluation of the LP. The results showed that LP activation by mannose-binding lectin (MBL) was found reduced while activation by ficolins was increased in patients with CD when compared to controls. The same results were observed when the patients were categorized according to the indeterminate and symptomatic clinical forms. We conclude that the detection of the C4 component by ELISA is an efficient methodology to assess LP activation in serum from patients with chronic CD, enabling to differentiate the activation profile between patients and controls.

Key words: chagas disease; complement system; complement activation; lectin pathway; mannose-binding lectin; ficolins.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi*, atingindo cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina. A via das lectinas (VL) do sistema complemento é uma das primeiras linhas de defesa na resposta imunológica contra a infecção pelo *T. cruzi*, e pode continuar sendo ativada na infecção crônica devido ao escape do parasito à sua ação. Embora alguns componentes dessa via tenham sido investigados na DC, não existem relatos sobre sua ativação em soro de pacientes. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar a ativação da VL no soro de pacientes com DC crônica e controles pela detecção do componente C4 empregando a técnica de ELISA. Para isso, amostras de soro de 80 pacientes com DC crônica (formas clínicas: indeterminada n=17; sintomática n=63; cardíaca n=45; cardiodigestiva n=13; digestiva n=5) atendidos no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico (HC/UFPR) e 80 controles saudáveis (doadores do Banco de Sangue do HC) foram avaliados quanto a ativação da VL. Os resultados demonstraram que a ativação da VL pela lectina ligante de manose (MBL) encontra-se reduzida, enquanto que a ativação pelas ficolinas está aumentada em pacientes com DC quando comparados aos controles. Os mesmos resultados foram observados quando os pacientes foram categorizados quanto às formas clínicas indeterminada e sintomática.

First submission on 03/10/2021; accepted for publication on 10/21/2021; published on 10/25/2021

e4002022

1

Submissão na revista Elsevier, em 2022.

Sent: Thursday, June 2, 2022 4:06:29 AM

To: Camila de Freitas Oliveira Toré <camila_oliveira15@hotmail.com>

Subject: Submission to BBA - Reviews on Cancer - manuscript number

This is an automated message.

Manuscript Number: BBACAN-D-22-00203

Non-canonical complement system roles in cancer: a forgotten but crucial connection

Dear Dr de Freitas Oliveira Toré,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: BBACAN-D-22-00203.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/bbacan/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

BBA - Reviews on Cancer

APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO 57º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL EM BELÉM/PA, EM 2022.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
 Instituto Carlos Chagas

ggoncalves@aluno.fiocruz.br / labbiocel.icc@gmail.com

Anti-*Leishmania* Action of Ivermectin and Imidocarb Dipropionate

 Gustavo Gonçalves¹, Nathalia Maria Drehmer de Lara Signorini², Iara José Taborda de Messias-Reason², Fabiano Borges Figueiredo¹
¹Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná); ²Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a group of diseases caused by species of parasites of the genus *Leishmania* (WHO, 2022). They are divided into two main groups depending on their clinical manifestations: Tegumentary and visceral leishmaniasis, caused in Brazil mainly by *L. braziliensis* and *L. infantum* respectively (Ghorbani, 2018). Currently the available treatments focus on 3 main drugs, pentavalent antimonials, amphotericin b and miltefosine. These drugs, however, have serious side effects, difficulties in administration, high cost and are related to cases of therapeutic failures and emergence of parasitic resistance (Taslimi, 2016). Drug repositioning is a faster and cheaper strategy for the development of new therapies compared to the traditional method, since it is based on the use of a drug already known to be safe and effective against a disease for another etiological agent different from the one originally developed. This strategy is especially important in the context of drug discovery for neglected diseases, an area that lacks investment (Fonseca, 2013; Marion, 2020). Ivermectin (IVM) is an antiparasitic with high efficacy, large spectrum and safety margin, used in the treatment of the most diverse parasitic diseases such as sarcoptic and demodectic mange, gastrointestinal worms and heartworm disease (Laing, 2017). Imidocarb dipropionate (DPI) is another large-spectrum antiparasitic, being used in the treatment of babesiosis, anaplasma and ehrlichiosis in animals (Silva, 2008).

OBJECTIVE

Evaluate the anti *Leishmania* action of Ivermectin and imidocarb dipropionate against the promastigote and amastigote forms of *L. braziliensis*, *L. infantum* and its cytotoxicity against Vero cells.

MATERIAL AND METHODS

The action against the promastigote forms was determined by incubating the parasites with different concentrations of the drugs for 48 hours. The cell viability of each treatment was determined using the MTT colorimetric assay. Assays with amastigote forms were performed using the THP-1 as host cells. After the cells were infected, they were exposed to drugs at different concentrations for 48 hours. After this period, the cells were fixed with methanol, stained with Hoestch and the number of amastigotes per cell determined by analyzing the plates in the Operetta™ automated bioimaging platform followed by the analysis of the images obtained in the Diva™ software. The cytotoxicity of the compounds was determined by incubating Vero cells with the drugs at different concentrations, followed by analysis of their cell viability by the MTT colorimetric assay. IC₅₀ values of parasites and cells were calculated in the GraphPad Prism™ program by means of non-linear regression.

RESULTS AND CONCLUSION

The results indicated strong anti-*Leishmania* action of both drugs against both species. In the promastigote forms challenged with IVM, the results found were 2.23 μM and 6.22 μM for *L. infantum* and *L. braziliensis*, respectively. For the DPI the results obtained were 17.89 μM and 5.62 μM, respectively. The amastigote forms showed the same sensitivity pattern. In relation to IVM, the results found were 3.77 μM and 3.48 μM for *L. infantum* and *L. braziliensis*, respectively. For the DPI, the results obtained were 7.63 μM and 4.57 μM, respectively. The selectivity indices showed relevant values for the DPI, being 30 to 40 times more active against the amastigote forms of *L. braziliensis* and *L. infantum* than with the host cell. The results found point to DPI as a promising drug for additional in vivo trials aimed at the development of a new treatment.

Table 1: IC₅₀ (μM) of Ivermectin (IVM) and imidocarb dipropionate (DPI) against promastigote and amastigote forms of *L. infantum*, *L. braziliensis* and cytotoxicity against Vero cells. Drug selectivity index values (IC₅₀ of drugs against Vero cells/IC₅₀ of drug against parasites) in parentheses.

	Cytotoxicity Vero cels	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>	
		Amastigote	Promastigote	Amastigote	Promastigote
IVM	4,94	3,77 (1,3)	2,23 (2,2)	3,48 (1,4)	6,22 (0,7)
DPI	150,3	3,76 (39,9)	17,89 (8,3)	4,57 (32,8)	5,62 (26,7)

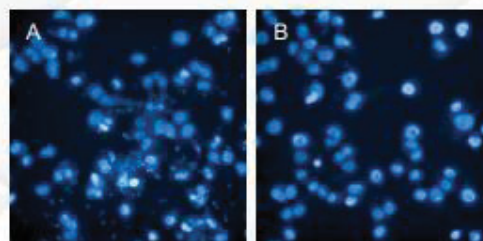


Figure 1: Cells fixed and stained with Hoestch, untreated (A) and treated with 30 μM DPI for 48 hours (B).

KEY WORDS

Cutaneous leishmaniasis; Visceral leishmaniasis; drug repositioning

REFERENCES

- World Health Organization. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acesso em 29 out 2020.
- Ghorbani, M., Farhoud, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Discov Innov Ther*. 12: 25–40, 2018.
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4), 497–507, 2018.
- Marion, S.; Mainardi, A.; Segabinazzi Fioletto, V.; Mota, A.; Hörner, R.; Bolson Serafin, M. Reposicionamento de drogas como nova alternativa de tratamento em doenças negligenciadas. *Anais do Sétimo Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 10, n. 2, 2020.
- Fonseca, R. J. M. Estudo de reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas causadas por protozoários através da integração de bases de dados biológicas usando Web Semantics. Rio de Janeiro, 176 f. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- Laing, R.; Gillan, V.; Devaney, E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6):483–492, 2017.
- Silva, A.S.; Tochetto, C.; Zanette, R.A.; Pierezan, F.; Bissi, D.R.; Santuro, J.M.; Monteiro, S.G. Acetato de dimetilo e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectado experimentalmente. *Ciência Rural*, 38:1357–1362, 2008.