



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA BAZILIO ROSA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS CARBENOS N-
HETEROCÍCLICOS DE Au(I) EM *Leishmania sp.*

CAMPINAS
2021

LETÍCIA BAZILIO ROSA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS CARBENOS N-HETEROCÍCLICOS DE Au(I) EM *Leishmania* sp.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Camilla Abbehausen

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Letícia Bazilio Rosa e orientada pelo Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel e Prof^a. Dr^a. Camilla Abbehausen.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R71a Rosa, Letícia Bazilio, 1996-
Atividade biológica de complexos organometálicos carbenos N-heterocíclicos de Au(I) em *Leishmania* sp. / Letícia Bazilio Rosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Danilo Ciccone Miguel.
Coorientador: Camilla Abbehausen.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania*. 2. Compostos de ouro. 3. Carbenos N-heterocíclicos. I. Miguel, Danilo Ciccone, 1984-. II. Abbehausen, Camilla, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biological activity of Au(I) N-heterocyclic carbene organometallic complexes against *Leishmania* sp.

Palavras-chave em inglês:

Leishmania

Gold compounds

N-heterocyclic carbenes

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Danilo Ciccone Miguel [Orientador]

Fernanda Ramos Gadelha

Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

Data de defesa: 19-07-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8303-0915>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4989520469991924>

Campinas, 19 de julho de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Prof^a. Dr^a. Fernanda Ramos Gadelha

Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Biologia Animal da Unidade UNICAMP/ Instituto de Biologia.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Marcel e Anakelem, que sempre me apoiaram no percurso dessa vida e nunca me permitiram desistir.

AGRADECIMENTOS

Chega o fim de outro ciclo na minha vida e, aos aqui citados, saibam que desempenharam um papel essencial nessa trajetória. A começar pelos mais importantes sempre, meus pais, Marcel e Anakelem, não tenho palavras para descrever minha gratidão. Desde sempre me estimularam a estudar e perseguir caminhos que não tinham percorrido antes sem nunca soltar minha mão. Vocês são pais, amigos e o suporte que eu sempre precisei. Obrigada! Se hoje esse trabalho está aqui, finalizado, é graças a vocês; e mal posso esperar pelos frutos que vou colher para dividir com vocês. Amo vocês!

À minha família toda, sem vocês também não poderia ter concluído esse trabalho. Vocês me permitiram a vida e sempre me deram tanto apoio! A admiração de vocês me motiva todo dia, e eu sou muito grata pelo tanto que me deram ontem, hoje e sempre. Amo vocês!

Aos meus orientadores, Danilo e Camilla, muito obrigada pela oportunidade de desenvolver esse trabalho todo. Depois de alguns tropeços pela academia, finalmente encontrei o suporte necessário. Vocês me ensinaram muito durante esses anos, muito mais que técnicas e procedimentos. Me ensinaram sobre um profissionalismo absurdo atrelado ao respeito e compreensão sempre. Eu agradeço de todo meu coração por todos os ensinamentos, paciência e incentivos. Cada conquista é graças a vocês e que nosso caminho se cruze muitas vezes mais no futuro.

Aos demais professores do departamento envolvidos na minha educação, Adriano, Marlene, Silmara, Fernanda, que também participaram de alguma forma na realização desse trabalho, quer seja ministrando disciplinas que me ensinaram muito, quer seja auxiliando em ensaios, muito obrigada!

Aos amores que o LEBIL (Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania*) me deu, faltam palavras pra agradecer todas vocês. Amanda, mesmo que a gente tenha convivido pouco tempo dentro do laboratório mesmo, o carinho que eu tenho por você é gigante, e eu torço muito pra que você seja muito feliz! Você é luz por onde passa, amiga, e que sorte a dos animaizinhos que você vai cuidar no futuro. Karen, parceira sempre, curtimos pouco, mas curtimos bem. Muito obrigada por me ensinar tanto e por ser tão amiga todo dia. Você é exemplo de força e superação e eu te admiro demais! Mariana, minha fofura, que saudade de voltar

no ônibus lotado do seu lado, amiga. Que sorte a minha te conhecer e conviver com você! Obrigada por todo o suporte e preocupação, ensinamentos e parceria, você é incrível! Nathalia, mãezona do nosso grupo, obrigada por todas as dicas e conversas e por sempre estar tão disposta a ajudar de qualquer maneira que fosse. Muito obrigada, parceiras! Que a vida seja gentil conosco e nos permita uma amizade e companheirismo pra sempre.

Ao meu amor da vida, parceiro e amigo de todos os dias, Eron, te agradeço muito por ser luz nesse ano de muitas sombras. Nossa parceria é o que me motiva a continuar e sempre perseguir sonhos maiores por nós. Obrigada pelos papos, pelas brincadeiras, pelas viagens, pelas comidas, pela família que veio junto e, óbvio, por sempre me estimular e torcer por mim. Esse mundo é pequeno pra nós dois.

Aos amigos da República Bar do Bira, que alegraram cada fim de semana desse último ano e me deram um gás pra continuar minha jornada. Cada um de vocês marcou de alguma forma esse ano e me deram força sempre! A amizade que eu tenho em vocês é algo único e que me faz muito grata. Obrigada por todas as conversas, músicas, almoços, zoeiras sem fim e parcerias!

E, por fim, você, caro leitor. Se você está lendo esse trabalho, saiba que há muita dedicação aqui e muito amor por trás. Amor pela ciência e pela universidade pública, que me foi berço e casa durante essa jornada e me permitiu crescer pessoal e profissionalmente desde o início. Esse não é o fim dessa relação, mas um ciclo que se finaliza na minha carreira com muito sucesso. Obrigada e boa leitura!

À morada e berço desse projeto, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Considerando que o atual arsenal de fármacos empregados no tratamento das leishmanioses apresenta várias limitações quanto à eficácia e custos, além da emergência de linhagens resistentes de parasitos, a necessidade urgente de busca por novas alternativas vem sendo amplamente explorada. Inspirados pelo fato de que os compostos à base de ouro são candidatos promissores a drogas antitumorais e antileishmânia, estudamos a ação biológica de uma série de seis complexos de ouro(I) simétricos contendo carbeno N-heterocíclico (NHC) como ligante, com variações sistemáticas da cadeia ligada ao nitrogênio. Todos os complexos foram ativos na faixa de micromolar com valores de EC₅₀ (*half maximal effective concentration*) variando de 1.57 a 8.30 µM contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*. O composto com cadeias laterais 1,3,5-trimetilbenzeno se mostrou o melhor candidato da série, com um índice de seletividade maior que 13 contra ambas as espécies. Também observaram-se alterações morfológicas a partir de 12.5 µM de cada composto para promastigotas após 24 h de incubação, além de um aumento na permeabilidade de membrana após apenas 15 min de incubação com o NHC3. Amastigotas intracelulares também se mostraram sensíveis aos compostos testados, com inibição significativa de taxas de infecção e de carga parasitária *in vitro*. Tais resultados mostram-se altamente promissores e abrem a possibilidade de explorar esses complexos de Au^I como moléculas leishmanicidas.

Palavras-chave: *Leishmania*; complexos de ouro(I); carbenos N-heterocíclicos.

ABSTRACT

Considering the limitations in effectiveness and cost of the current drug arsenal to treat leishmaniasis, as well as the emergence of resistance, novel options are an urgent need. Inspired by the fact that gold-based compounds are promising candidates for antitumor and antileishmanial drugs, we studied the biological action of a series of six gold(I)-N-heterocyclic-carbenes complexes containing varied N-aryl. All complexes were active in the micromolar range with EC₅₀ values (half maximal effective concentration) ranging from 1.57 to 8.30 μ M against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *L. (Viannia) braziliensis* promastigotes. The mesytil derivative (NHC3) proved to be the best candidate in the series, with a Selectivity Index greater than 13 against both species. We also observed morphological changes in promastigotes in the concentration of 12.5 μ M after 24h of incubation. Moreover, the membrane permeability increased after 15 min of incubation with NHC3. Intracellular amastigotes were also sensitive to the compounds tested, with significant inhibition of infection rates and parasite load *in vitro*. Such results are highly promising and open the possibility of exploring these Au^I complexes as leishmanicidal molecules.

Keywords: *Leishmania*; gold(I) complexes; N-heterocyclic carbenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> entre o hospedeiro mamífero e o inseto vetor, com suas diferentes formas biológicas.	18
Figura 2. Número de casos de leishmaniose visceral reportados no Brasil por Unidade Federativa no ano de 2019.	20
Figura 4. Número de casos de leishmaniose cutânea reportados no Brasil por Unidade Federativa no ano de 2019.	22
Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea.	24
Figura 6. Estrutura molecular do estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina.	26
Figura 7. Esquema de redução da tripanotiona oxidada pela tripanotiona redutase.	27
Figura 8. Estrutura molecular da pentamidina.	28
Figura 9. Estrutura molecular da anfotericina B.	29
Figura 10. Estrutura molecular da miltefosina.	30
Figura 11. Estrutura molecular da paromomicina.	31
Figura 12. Estruturas moleculares do aurotiomalato de sódio, aurotioglucose e auranofina.	33
Figura 13. Esquematização do mecanismo de ação do Au ^I na inibição da TrxR.	34
Figura 14. Carbenos N-heterocíclicos representativos de cada tipo.	36
Figura 15. Representação do sítio de ligação da TR inibido por um átomo de ouro.	37
Figura 16. Estrutura dos complexos de Au ^I -bisNHC, e complexos Au ^{III} coordenados a um esqueleto N [^] N bidentado com melhores resultados.	38
Figura 17. Rota sintética para a obtenção dos sais de imidazólio precursores dos carbenos N- heterocíclicos..	41
Figura 18. Esquema da reação do carbeno com o precursor de Au ^I .para a síntese de complexos com fórmula geral [NHC-Au-Cl].	42
Figura 20. Viabilidade celular de macrófagos de linhagem RAW 264.7 e BMDM.	51
Figura 22. Permeabilidade de membrana celular.	60
Figura 23. Parâmetros avaliados na infecção <i>in vitro</i> com <i>L. (L.) amazonensis</i> .	62
Figura 24. Parâmetros avaliados na infecção <i>in vitro</i> com <i>L. (V.) braziliensis</i> .	63
Figura 25. Número absoluto de amastigotas contados no ensaio de infecção <i>in vitro</i> .	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> circulantes no Brasil e formas clínicas da leishmaniose associadas a cada espécie.	17
Tabela 2. Descrição dos compostos testados.	48
Tabela 3. Atividades inibitórias de cada complexo testado para 50% das culturas de promastigotas de <i>Leishmania spp.</i>	52
Tabela 4. Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 24h de incubação.	55
Tabela 5. Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> após 24h de incubação.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQP	Aquaporinas
AR	Artrite reumatóide
ATP	Adenosina trifosfato
Au	Ouro
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i> , macrófagos derivados de medula óssea
BrEt	Brometo de etídeo
Bz	Benzila
C	Carbono
CC50	<i>Half maximal cytotoxic concentration</i> , concentração citotóxica de 50%
CP	Cisteíno protease
DMAP	Dimetilaminopiridina
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EC50	<i>Half maximal effective concentration</i> , concentração inibitória de 50%
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EV	Endovenoso
GPx	Glutationa peroxidase
HCl	Ácido clorídrico
HNO₃	Ácido nítrico
HSAB	<i>Hard and soft acid and bases theory</i>
IM	Intramuscular
iPr	2,6-isopropilfenila
kDNA	DNA do cinetoplasto
kg	Kilograma
L. (L.)	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
L. (V.)	<i>Leishmania (Viannia)</i>
L-Amb	Anfotericina B lipossomal
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
Mes	Mesitila
mg	Miligrama

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazólio
NCp7	<i>Nucleocapsid protein 7</i>
NHC	<i>N-heterocyclic carbene</i> , carbeno N-heterocíclico
N-Trp	Triptofano
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
Ph	Fenila
Pt	Platina
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Enxofre
Sb	Antimônio
SDS	Dodecil sulfado de sódio
-SH	Grupo tiol
t-Bu	Terc-butila
TR	Tripanotiona redutase
TrxR	Tioredoxina redutase
TS₂	Tripanotiona
Tx/Txp	Triparedoxina/triparedoxina peroxidase
UF	Unidades de fluorescência
VP	Vacúolo parasitóforo
ZF	<i>Zinc finger</i> , dedo de zinco
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>LEISHMANIA</i> E LEISHMANIOSE	16
1.1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL	19
1.1.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA	21
1.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	24
1.2.1 ANTIMONIAIS PENTAVALENTES	25
1.2.2 PENTAMIDINA	27
1.2.3 ANFOTERICINA B	28
1.2.4 MILTEFOSINA	29
1.2.5 PAROMOMICINA	30
1.2.6 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	31
1.3 O OURO NA MEDICINA	32
1.3.1 COMPLEXOS DE OURO	35
1.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS Au-NHC	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 SÍNTESE DOS COMPLEXOS Au ^I -NHC	41
4.2 CULTIVO DE PARASITOS	42
4.3 CULTIVO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	43
4.4 TESTES DE VIABILIDADE	44
4.5 PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA PARASITÁRIA	44
4.6 PERMEABILIDADE DE MEMBRANA	45
4.7 INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 COMPLEXOS Au ^I -NHC TESTADOS	47
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	49

5.2.1 VIABILIDADE DOS PROMASTIGOTAS	49
5.2.2 VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS	51
5.2.3 ANÁLISE DE MORFOLOGIA DE PROMASTIGOTAS	53
5.2.3 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR	59
5.3 INFECÇÕES <i>IN VITRO</i>	61
5.3.1 INFECÇÃO COM <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i>	61
5.3.2 INFECÇÃO COM <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	63
<u>6 CONCLUSÃO</u>	<u>66</u>
<u>7 REFERÊNCIAS</u>	<u>67</u>
<u>ANEXO A - DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS</u>	<u>73</u>
<u>ANEXO B – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</u>	<u>74</u>

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) impactam mais de 1 bilhão de pessoas mundialmente e contribuem com o dano na economia e comprometimento de populações vulneráveis, principalmente em países pobres e em desenvolvimento.^{1, 2} No atual contexto da pandemia da COVID-19, espera-se que muitas destas populações sejam impactadas a médio e longo prazo, visto que a curto prazo já são relatados casos de co-infecções por diferentes agentes parasitários e SARS-CoV-2.³ A leishmaniose é um importante exemplo de DTN declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando de 0,7 a 1 milhão de pessoas e mais 350 milhões em risco nos 98 países em que é endêmica.^{1, 4} É primariamente zoonótica, com algumas exceções na África Oriental e Ásia, onde humanos podem atuar como reservatórios e envolverem-se na transmissão antroponótica da leishmaniose. Trata-se de uma infecção causada por um parasita intracelular transmitido por vetores flebotomíneos, popularmente conhecido como mosquito-palha. Os sintomas variam de lesões cutâneas de cura espontânea a uma forma visceral potencialmente fatal.²

Os tratamentos disponíveis representam um desafio devido ao alto custo dos fármacos, necessidade de alta dosagem, administração parenteral, casos de resistência e efeitos colaterais importantes. Devido a esses motivos, a pesquisa por novas alternativas terapêuticas, menos tóxicas, mais econômicas, eficazes e acessíveis é absolutamente necessária.⁵

1.1 *Leishmania* e leishmaniose

As leishmanioses pertencem a um complexo grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae). As primeiras tentativas de classificação da *Leishmania* começaram no início do século XX, mas somente em 1987 os pesquisadores Lainson e Shaw propuseram um sistema ainda aceitável atualmente, que agrupa as espécies em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento no vetor. O subgênero *Leishmania* engloba espécies que se desenvolvem no intestino médio e anterior enquanto aquelas que se desenvolvem no intestino posterior e piloro são alocadas no subgênero *Viannia*.^{6, 7}

São parasitas unicelulares obrigatórios com ciclo de vida heteroxênico e dimórfico, ou seja, necessitam de pelo menos dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida (inseto vetor e hospedeiro mamífero) e apresentam duas morfologias

principais (promastigota e amastigota). Aproximadamente 53 espécies já foram descritas, das quais 31 são capazes de infectar mamíferos, sendo 20 patogênicas para humanos.^{7, 8} As espécies que ocorrem no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) pertencem ao subgênero *Leishmania* e são transmitidas por flebotomíneos, principalmente, do gênero *Phlebotomus*. As do Novo Mundo (Américas) pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e são transmitidas por flebotomíneos, principalmente, do gênero *Lutzomyia*.⁹ No Brasil, as principais espécies circulantes estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* circulantes no Brasil e formas clínicas da leishmaniose associadas a cada espécie.

LEISHMANIOSE CUTÂNEA				LEISHMANIOSE VISCERAL
Localizada	Disseminada	Mucocutânea	Difusa	
<i>L. braziliensis</i> **				<i>L. infantum</i> * (sin. <i>chagasi</i>)
<i>L. guyanensis</i> **				
<i>L. amazonensis</i> *	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>		
<i>L. lainsoni</i> **	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	
<i>L. naiffi</i> **		<i>L. guyanensis</i>		
<i>L. shawi</i> **				
<i>L. lindenbergi</i> **				

*Subgênero *Leishmania*

**Subgênero *Viannia*

Fonte: Adaptado.¹⁰

A transmissão ocorre quando a forma extracelular flagelada e infectiva (promastigota metacíclico) é regurgitada no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos.^{5, 8} No hospedeiro mamífero, os promastigotas são fagocitados principalmente por macrófagos e, no interior do vacúolo parasitóforo, se diferenciam para a forma intracelular não flagelada (amastigota) e se multiplicam por fissão binária até consequente lise celular. Os amastigotas livres continuam sendo fagocitados e infectando novas células e, ocasionalmente, podem ser ingeridos pelo vetor novamente.⁵ No intestino do inseto, os amastigotas se diferenciam para formas proliferativas (promastigotas procíclicos), que se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicos por 3 dias. Após

esse período, migram para a probóscide do inseto para dar sequência ao ciclo biológico da *Leishmania* (**Figura 1**).^{2, 11, 12}

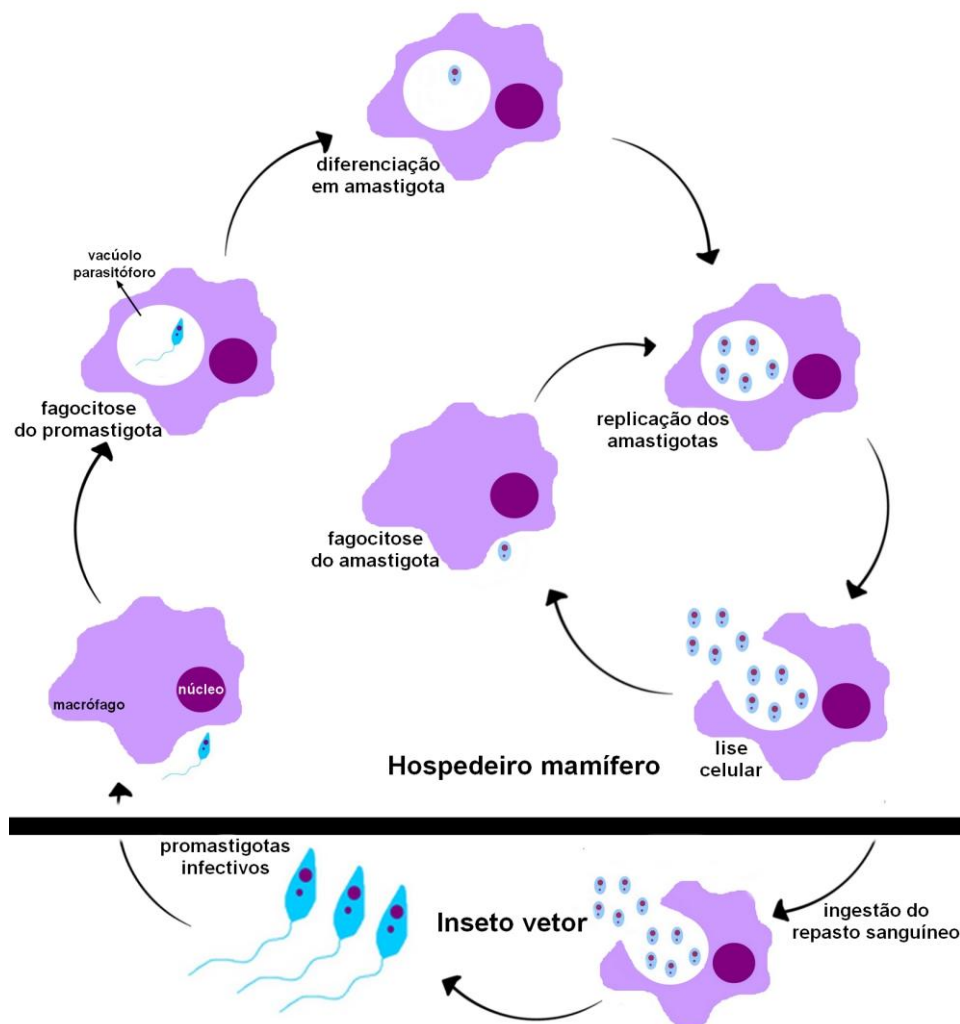


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* entre o hospedeiro mamífero e o inseto vetor, com suas diferentes formas biológicas.

Fonte: Adaptado.¹²

As manifestações clínicas variam de acordo com o sistema imune e localização geográfica do hospedeiro, o que determina as diferentes espécies circulantes e seus respectivos sintomas, podendo ser classificadas como leishmaniose visceral (LV) ou cutânea (LC).^{8, 13} Dos 200 países e territórios que reportaram à OMS em 2019, 98 foram considerados endêmicos para leishmaniose, dos quais 71 foram endêmicos para LV e LC, 8 para LV apenas e 19 para LC apenas.⁴

1.1.1 Leishmaniose visceral

Também conhecida como calazar, é a forma sistêmica e mais severa da doença que se desenvolve de meses a anos após a inoculação do parasita como resultado da disseminação dos macrófagos infectados pelo sistema reticuloendotelial do hospedeiro.¹⁴

É reportada em muitos países da Ásia, África, Mediterrâneo, Oriente Médio e Américas do Sul e Central,¹⁴ com uma estimativa de 50.000 a 90.000 novos casos anualmente, sendo estimado que apenas 25 a 45% dos casos sejam reportados à OMS. Cerca de 95% dos casos registrados em 2018 ocorreram no Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão.⁴

Dentre as DTN do Brasil, a LV é a terceira mais mortal, causando mais mortes que a dengue e malária no período de 2000 a 2011. De 2001 a 2014 foram reportados 47.859 novos casos, com média anual de 3.419 novos casos/ano e aumento no número de municípios atingidos (11.7% em 2002 a 16.8% em 2014).¹⁵ O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é responsável pela transmissão do principal agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, que tem os canídeos como principais hospedeiros reservatórios.¹⁶ De acordo com o Ministério da Saúde¹⁷, a maior parte dos casos de LV em 2019 concentrou-se nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e leste da região Norte do Brasil (**Figura 2**).

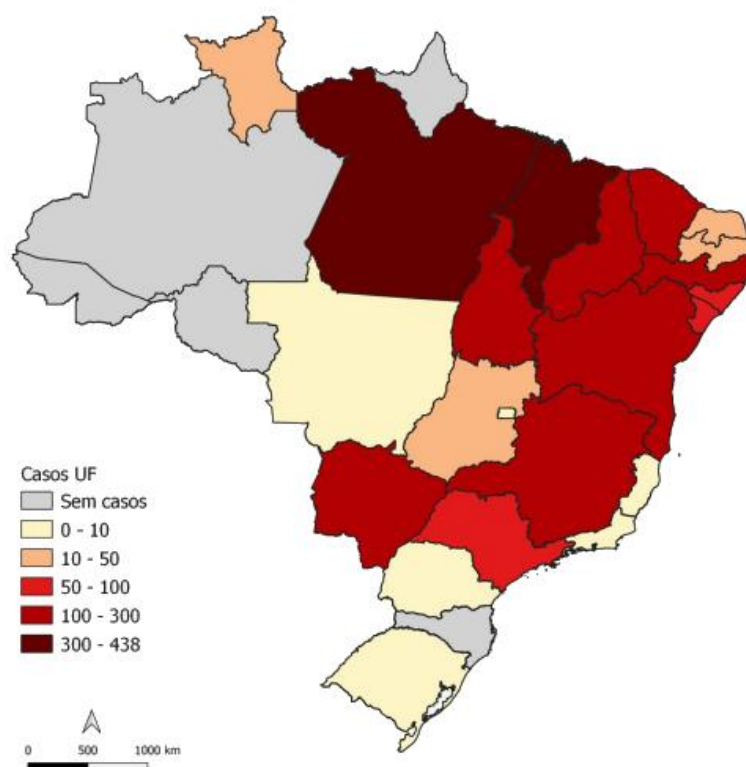


Figura 2. Número de casos de leishmaniose visceral reportados no Brasil por Unidade Federativa no ano de 2019.

Fonte: Ministério da Saúde.¹⁷

Baseado em diferentes espécies, a LV pode ser classificada como antroponótica ou zoonótica. A primeira é transmitida entre humanos pelos vetores e é causada principalmente por *L. (L.) donovani* por toda África Oriental e Oriente Médio, especialmente Sudão, Somália, Iêmen e Arábia Saudita.¹⁸ Porém, no Brasil a transmissão é exclusivamente zoonótica na disseminação de *L. (L.) infantum chagasi*.¹⁹

Os sinais e sintomas da LV incluem febre, perda de peso, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, diarreia, epistaxe, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e retardo do crescimento em crianças (**Figura 3A**).¹⁴ Os achados laboratoriais incluem pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Se a doença permanece sem tratamento, caquexia e falência multissistêmica, hemorragia devido à trombocitopenia e infecções superpostas podem causar a morte em mais de 90% dos casos.^{9, 19}

Uma possível consequência da LV é a leishmaniose dérmica pós-calazar, que se manifesta com máculas hipopigmentadas difusas, erupção malar, pápulas, nódulos e placas em todas as partes do corpo (**Figura 3B**). É quase exclusivamente encontrada na África Oriental e Índia, onde *L. (L.) donovani* é o agente etiológico.¹⁴



Figura 3. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. Pacientes com (A) leishmaniose visceral, evidenciada pela hepatoesplenomegalia, e (B) leishmaniose dérmica pós-calazar, evidenciada pelas lesões dérmicas nodulares.

Fonte: WHO.⁴

1.1.2 Leishmaniose cutânea

É a forma mais comum dentre as leishmanioses, sendo caracterizada por uma ou mais lesões que se desenvolvem de semanas a meses após a inoculação e comumente se curam espontaneamente. Os parasitas podem permanecer na cicatriz da lesão e nos linfonodos mais próximos e, mesmo em indivíduos tratados, pode ocorrer reativação durante períodos de imunossupressão.¹⁴

A maioria dos casos ocorre nos países das Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, com uma estimativa de ao menos 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente. Cerca de 85% dos casos reportados em 2018 ocorreram no Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Síria e Tunísia.⁴

No Velho Mundo, a LC geralmente é causada pela *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, enquanto no Novo Mundo principalmente por *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. O grande número de espécies circulantes, diversos hospedeiros reservatórios, insetos vetores, manifestações clínicas e respostas terapêuticas variáveis tornam a compreensão dos aspectos epidemiológicos e o controle dessa doença muito complexo.²⁰

No Brasil, *L. (V.) braziliensis* é a espécie de maior relevância, seguida por *L. (L.) amazonensis*. A LC pode ser caracterizada como localizada (LCL), mucocutânea (LMC), disseminada (LD) ou difusa (LCD). A LCL por *L. (V.) braziliensis* normalmente resulta em uma única lesão dérmica, com poucos parasitas e uma forte resposta de hipersensibilidade do tipo retardada, ou seja, um forma de

resposta mediada por células efectoras do tipo fagócito-mononuclear (macrófago) ativado.²¹ A LC só não foi reportada em 2019 no estado do RS e no Distrito Federal, segundo dados do Ministério da Saúde (**Figura 4**).²²

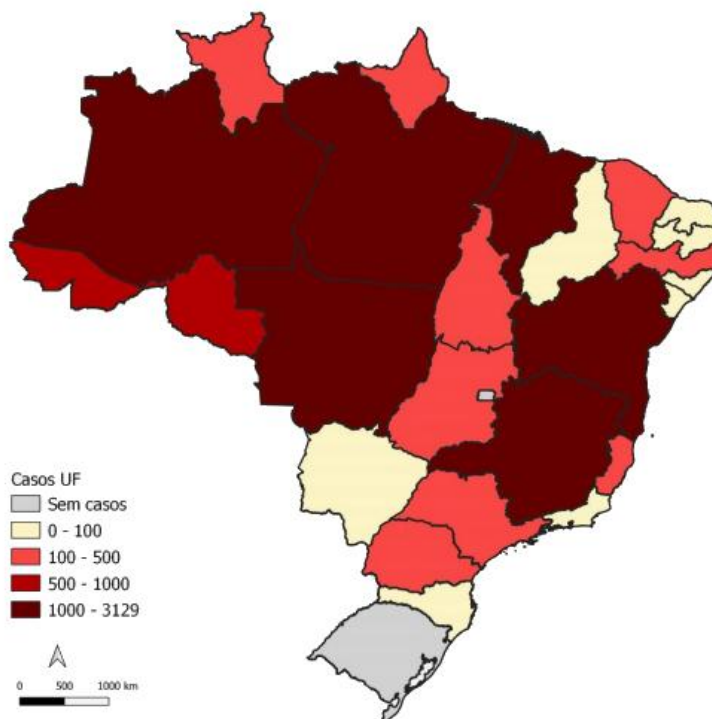


Figura 4. Número de casos de leishmaniose cutânea reportados no Brasil por Unidade Federativa no ano de 2019.

Fonte: Ministério da Saúde.²²

Na LCL, observa-se o desenvolvimento de uma úlcera arredondada com bordas nodulares ou espessas e o interior mostrando tecido de granulação que sangra ao esfregar (**Figura 5A**). Em alguns casos, secreção abundante forma uma crosta aderente. A lesão não é dolorosa se não for secundariamente infectada. O desenvolvimento da lesão ocorre em cada local de inoculação pelo vetor, podendo haver mais de uma no mesmo indivíduo. O quadro clínico geralmente é afebril e com adenopatia local.⁹ Pode ocorrer cura espontânea a partir do centro e desenvolvimento de cicatrizes atróficas e cribriformes com um halo hiperpigmentado.¹⁴

Aproximadamente 1–10% das infecções pelo subgênero *Viannia* podem progredir para a forma mucocutânea desfigurante da doença,²⁰ sendo que 90% dos casos estão concentrados na Bolívia, Brasil e Peru.⁴ Normalmente, as lesões

começam na mucosa nasal e se espalham para a mucosa oral e faríngea, a laringe e a pele do nariz e lábios (**Figura 5B**). As lesões da mucosa oral geralmente produzem sintomas que variam de simples desconforto e dor leve ou odinofagia a caquexia em casos extremos; este último é observado apenas nos casos em que a lesão envolve a totalidade da faringe, laringe (com rouquidão) e esôfago (com disfagia). No início da doença, ocorre infiltração da mucosa com ulcerações superficiais; posteriormente, quando as úlceras estão bem desenvolvidas, suas bordas apresentam aspecto necrótico, rasgadas e descoladas. A úvula, os pilares do teto do palato e as amígdalas podem ser destruídos. Devido a infecções superpostas, os gânglios linfáticos locais podem sofrer enfarte e tornar-se doloridos. Quando a infecção é na cavidade nasal, pode ocorrer atrofia das conchas nasais e destruição do septo cartilaginoso com odor fétido e, em casos extremos, pode causar a morte.^{9, 14, 20}

A LD, causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, é uma forma rara de manifestação clínica e representa aproximadamente 2% dos casos notificados de LC no Brasil. É caracterizada por apresentar múltiplas lesões acneiformes papulares, comprometendo áreas expostas, como membros, face e tronco. O número de lesões pode chegar a centenas (**Figura 5C**).²³

Infecções por *L. (L.) amazonensis* às vezes podem se manifestar como LCD, no que os parasitas multiplicam-se descontroladamente em lesões difusas pela pele.²¹ Se desenvolve como múltiplas pápulas ou nódulos não ulcerativos. A condição reflete a ausência de uma resposta imune celular, e a derme está tipicamente e fortemente infiltrada por parasitas, sendo definida por dez ou mais lesões de tipo misto localizadas em duas ou mais partes do corpo, podendo envolver a mucosa (**Figura 5D**).^{9, 20, 23}

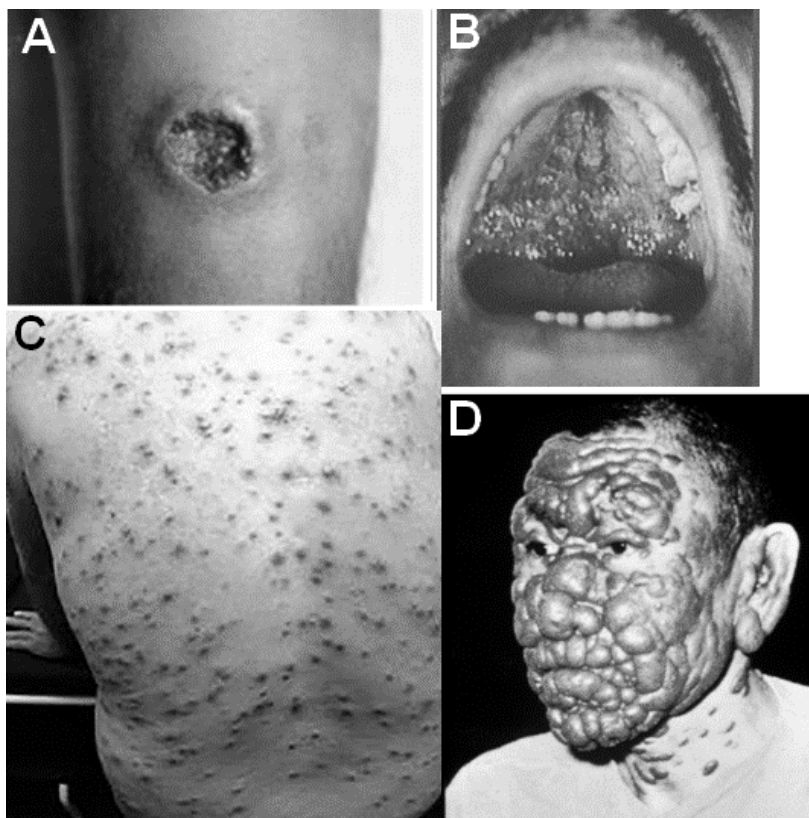


Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea. Pacientes com leishmaniose cutânea (A) localizada, evidenciada pela lesão ulcerativa, (B) mucocutânea, com comprometimento do palato, (C) disseminada, com múltiplas lesões nas costas, e (D) difusa, com múltiplas lesões nodulares não-ulceradas.

Fonte: Adaptado.^{23, 24}

1.2 Tratamento das leishmanioses

Considerando a importante prevalência da LC no Brasil, o principal objetivo do tratamento é reduzir a morbidade, prevenindo reativação e disseminação para mucosa. Apesar das lesões se curarem espontaneamente na maioria dos casos, o tratamento é recomendado e, idealmente, deve ser individualizado de acordo com a espécie de *Leishmania* e a localização geográfica do indivíduo.²⁵ No Velho Mundo, há casos em que as lesões são tratadas intralesionalmente, mas devido ao reconhecido potencial de metástase das lesões pelas espécies do Novo Mundo, o tratamento adotado é sistêmico.²⁶

Em 1912, após observar o efeito promissor do antimônio trivalente (Sb^{III} , tártaro emético) contra tripanossomatídeos em estudos ingleses, Gaspar Vianna decidiu reposicionar esse composto para o tratamento de alguns casos de LC no Rio de Janeiro. Levando em consideração a alta toxicidade desse composto, ele o diluiu

em soro fisiológico para administração. Esse foi o tratamento da LC até o desenvolvimento dos antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) na década de 1920 por Bramachari, que possibilitaram uma redução da toxicidade do antimonial trivalente e permaneceram como tratamento de primeira escolha ao redor do mundo.²⁷

Por mais de 100 anos, o tratamento padrão para leishmaniose baseou-se no uso dos antimoniais pentavalentes comercialmente distribuídos, como o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (**Figura 6**). Com sua ação clínica comprometida devido à seleção de linhagens resistentes de parasitas, principalmente na Índia, onde foram observadas taxas de falha de mais de 60% no tratamento da LV causada por *L. (L.) donovani*, seu uso foi descontinuado em algumas províncias daquele país.^{27, 28}

Entretanto, na África, seu uso é recomendado somente associado com paromomicina para LV e como monoterapia em leishmaniose dérmica pós-calazar. Também pode ser indicado como monoterapia para LV do Novo Mundo, embora se prefira anfotericina B lipossomal. Antimoniais administrados por via intralesional ou sistêmica como monoterapia ou em combinação ainda representam o arsenal de primeira escolha para as leishmanioses cutâneas e mucocutâneas.²⁶

A crescente necessidade por drogas menos tóxicas e mais eficazes levou ao uso de outras opções, como a pentamidina em 1949, anfotericina B lipossomal em 1996, miltefosina em 2004 e paromomicina em 2006, aprovadas para o tratamento da LV.²⁸ Ainda assim, existem diversas limitações como alto custo, eficácia limitada e efeitos colaterais incapacitantes devido à alta toxicidade e período prolongado de tratamento. De todos os fármacos citados acima, a miltefosina é a única administrada oralmente. Coletivamente, esses fatores contribuem para a falha terapêutica observada na prática clínica e exigem a contínua pesquisa por alternativas terapêuticas.⁵

1.2.1 Antimoniais pentavalentes

No Brasil, somente o antimoniato de meglumina é comercializado e o tratamento segue o esquema terapêutico da OMS, que recomenda dose calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb^{V}) por quilograma de peso corporal por dia ($\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$), não ultrapassando 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$. É administrado em todas as formas clínicas da leishmaniose pelas vias intramuscular (IM), endovenosa (EV) ou

intralesional (para LCL), apesar desta última via ser pouco utilizada em nosso território.²⁹

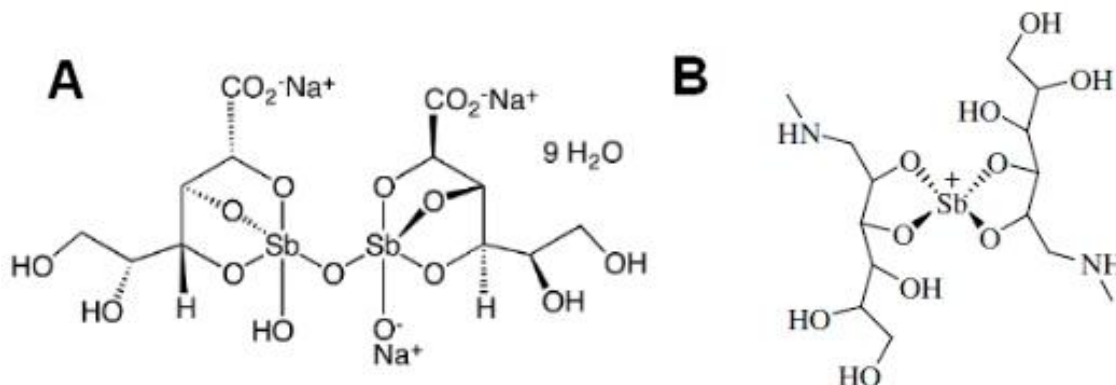


Figura 6. Estrutura molecular do (A) estibogluconato de sódio e (B) antimoniato de meglumina.

Fonte: Adaptado.¹²

Os mecanismos de ação destas moléculas ainda não foram completamente elucidados, mas estudos vêm mostrando a necessidade da redução do Sb^V à sua forma trivalente para atividade. Parte dessa redução ocorre dentro do macrófago hospedeiro e o Sb^{III} resultante parece ser internalizado, também, por meio do transportador de membrana aquaporina-1 (AQP1) do amastigota.³⁰ Além disso, o Sb^V pode acessar o parasita por meio de outro(s) mecanismo(s) de transporte, ainda não caracterizado(s), sendo posteriormente reduzido a Sb^{III} dentro da célula.³¹ Essa redução é facilitada pelo pH ácido do interior do VP e temperatura levemente aumentada do organismo.²⁸

Tais moléculas também são conhecidas por inibir a tripanotona redutase (TR), uma enzima considerada crucial para a sobrevivência do parasita no hospedeiro. A TR reduz a tripanotona (TS₂), usada pelo sistema triparedoxina/triparedoxina peroxidase (Tx/TxP) de *Leishmania*, para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelos macrófagos durante a infecção (**Imagem 7**).²⁸ A demonstração de que Sb^{III} desloca o Zn^{II} no sítio de ligação da NCp7 (*nucleocapsid protein 7*) de HIV-1, uma proteína com domínio dedo de zinco, indica outro possível alvo dos medicamentos baseados em Sb.³²

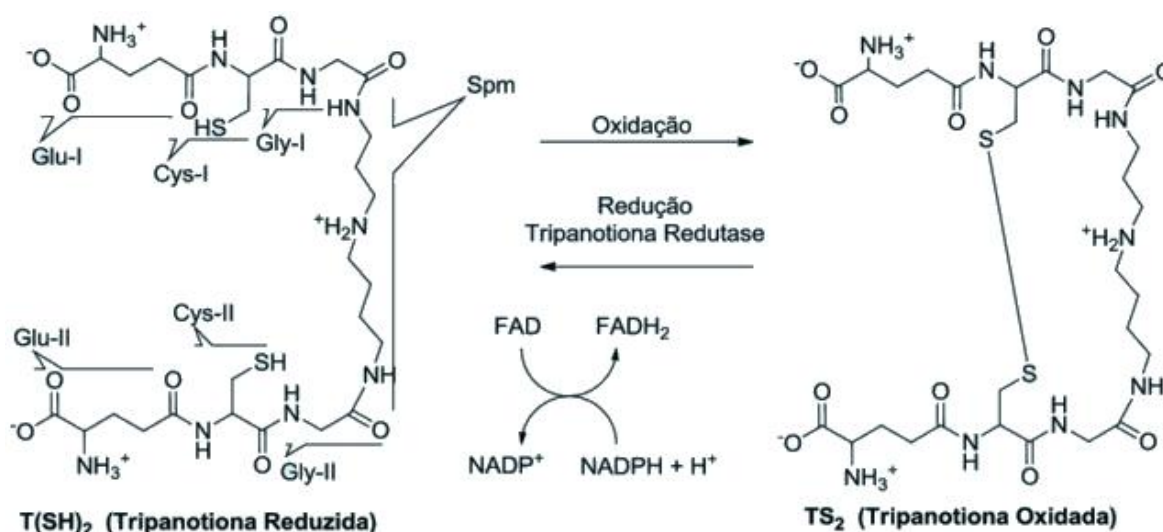


Figura 7. Esquema de redução da tripanotona oxidada pela tripanotona redutase.
 Fonte: Adaptado.³³

Os principais efeitos adversos do seu uso incluem cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal, anemia, leucopenia, trombocitopenia, dor abdominal, náuseas, vômitos, distúrbios sanguíneos e dor no local da injeção quando administrados via IM. Este regime de tratamento tem limitações para gestantes e idosos,^{29, 34} sendo indicado o uso de outras opções como segunda escolha.

1.2.2 Pentamidina

Inicialmente usada para tratar casos de resistência ao antimoniato na Índia em 1949, a pentamidina é atualmente administrada em casos de LC causada por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*. No entanto, a resistência emergente e os efeitos colaterais adicionais, como cardiotoxicidade e distúrbios metabólicos (com efeito diabetogênico dose-dependente) fazem desse medicamento uma opção ruim para o tratamento da LC.^{27, 28}

Comercializado no Brasil como Pentacarinat® (**Figura 8**), é apresentado como o sal isotionato de pentamidina, com administração recomendada de 3-4 mg/kg/dia, em dias alternados, de 3-12 doses, via IM ou EV.²⁹ Estudos mostram que o mecanismo de ação parece basear-se no acúmulo do fármaco no parasita, permitindo sua associação com o DNA mitocondrial (kDNA), talvez bloqueando seu processo de replicação, além de interromper o potencial de membrana mitocondrial

do parasita. O acúmulo mitocondrial de pentamidina também pode induzir a morte apoptótica.²⁸

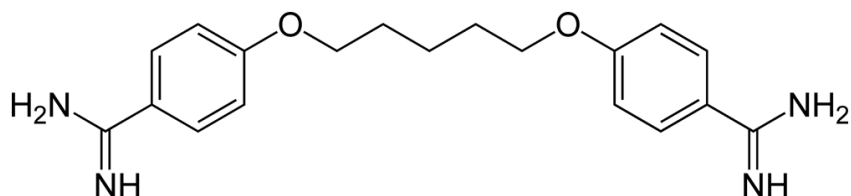


Figura 8. Estrutura molecular da pentamidina.

Fonte: Adaptado.¹²

1.2.3 Anfotericina B

Trata-se de um antifúngico originalmente extraído da cepa *Streptomyces nodosus* e tem sido usada como um tratamento alternativo para as leishmanioses, mas causa efeitos colaterais graves, como febre, náusea, vômito, anemia, hipocalemia, nefro-, hepato- e cardiotoxicidade, hipersensibilidade e anafilaxia. Já que mostra má absorção gastrointestinal, é administrada como infusão EV diária ou em dias alternados e exige hospitalização prolongada.^{27, 34}

A formulação lipossomal da anfotericina B (L-AmB) tornou o medicamento menos tóxico e mais eficaz, apesar do alto custo, e é a formulação mais utilizada para o tratamento da LV. Esta formulação está licenciada para uso na Índia, EUA e Europa para o tratamento da forma visceral e é usada como um medicamento de segunda linha para o tratamento de LV na África Oriental e no Brasil.²⁷

Comercializado como AmBisome® (**Figura 9**), recomenda-se o tratamento com 2-5 mg/kg/dia, sem limite de dose máxima diária até atingir a dose total de 25 a 40 mg/kg e com administração EV.²⁹ O mecanismo de ação parece envolver a interação com os esteróis da membrana do parasito, resultando na desorganização e no aumento da permeabilidade da membrana celular. Também pode afetar as células por sua auto-oxidação e subsequente formação de radicais livres.²⁸

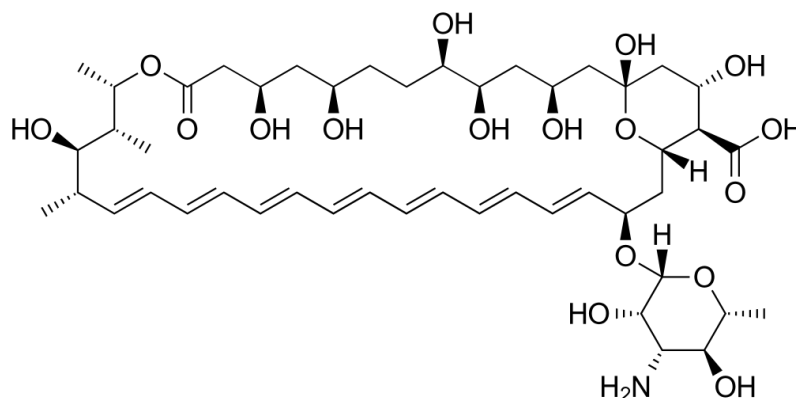


Figura 9. Estrutura molecular da anfotericina B.

Fonte: Adaptado.¹²

Esta formulação é menos tóxica, mais biodisponível e melhor tolerada pelos pacientes, além de ser captada seletivamente pelos macrófagos e ser menos nefrotóxica. Em comparação com a anfotericina B convencional, L-AmB tem geralmente efeitos colaterais adversos leves, como urticária e insuficiência renal, que são resolvidos após o tratamento. No entanto, o principal fator limitante na aplicação da L-AmB é seu alto custo.³⁴

Relatos de falha terapêutica são raros, especialmente em pacientes imunocompetentes. No entanto, nos últimos anos foram reportadas falhas no tratamento, tanto em pacientes imunocompetentes como imunossuprimidos, com seleção de organismos resistentes. Estudos têm mostrado que a perda de ergosterol, mutações no gene que codifica esterase 14 α -desmetilase e indução de estresse oxidativo estão associados aos mecanismos de resistência. Com o uso generalizado de dose única de L-AmB no subcontinente indiano, deve-se monitorar a eficácia do regime para detecção precoce de falhas no tratamento afim de se prevenir o desenvolvimento e disseminação da resistência à L-AmB.^{26, 31}

1.2.4 Miltefosina

O único medicamento administrado por via oral hoje não está disponível no Brasil para tratamento humano (somente veterinário) e foi inicialmente desenvolvido como um medicamento anticâncer e aprovado para o tratamento da LV na Índia em 2002, com taxas de cura de pacientes de aproximadamente 94%

(Figura 10). Porém, após uma década de uso no país, vários casos de recrudescência e diminuição da eficácia do tratamento foram descritos.^{28, 31}

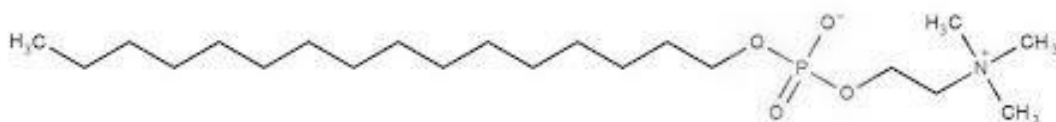


Figura 10. Estrutura molecular da miltefosina.

Fonte: Adaptado.¹²

Apesar da vantagem de ser administrado por via oral, o uso da miltefosina também está relacionado a diversos efeitos colaterais, principalmente no trato gastrointestinal e eventual toxicidade hepática e renal, além de seu potencial teratogênico.^{27, 28}

O mecanismo de ação não é bem compreendido, embora tenha sido descrito o efeito direto sobre os parasitas ao interferir na biossíntese de fosfolípidos e no metabolismo de alquil-lípidos, afetando as oxidases do citocromo c mitocondrial e induzindo despolarização mitocondrial com diminuição dos níveis intracelulares de ATP e morte celular tipo apoptose.^{28, 31}

1.2.5 Paromomicina

Trata-se de um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro usado pela primeira vez no tratamento das leishmanioses em 2006 como sulfato de paromomicina. É administrado por via parenteral para a LV e por via parenteral e tópica para a LC. Existem várias vantagens associadas ao uso da paromomicina, como baixo custo, melhor eficácia e menos efeitos colaterais. No entanto, há uma probabilidade de se selecionar parasitos resistentes quando expostos à monoterapia (Figura 11).²⁷

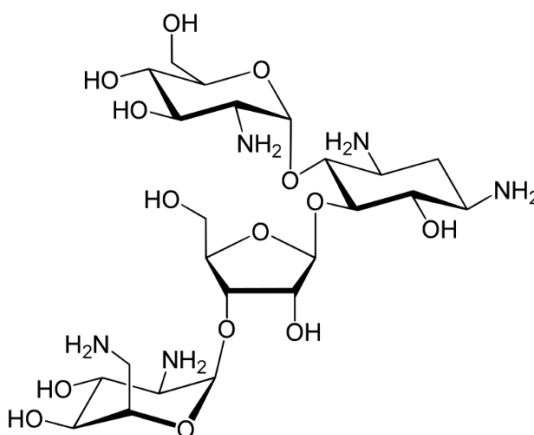


Figura 11. Estrutura molecular da paromomicina.

Fonte: Adaptado.¹²

Em *Leishmania* pode atuar inibindo a síntese proteica por meio da ligação à subunidade ribossômica 16S, provocando uma mudança conformacional local no sítio A do RNA ribossômico 16S. Outros mecanismos de ação foram propostos como modificação da fluidez da membrana e do metabolismo lipídico, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e indução de estresse na cadeia respiratória.²⁸

1.2.6 Alternativas terapêuticas

Não exclusivo das leishmanioses, os medicamentos usados nos tratamentos das DTN são antigos e geralmente causam efeitos adversos indesejados. Ainda assim, muito se especula sobre o real interesse da indústria farmacêutica em desenvolver novos medicamentos ou vacinas para essas doenças, uma vez que a população afetada encontra-se majoritariamente concentrada em áreas carentes e com poder socioeconômico prejudicado.³⁵

Por essa razão, uma parcela considerável das pesquisas relacionadas ao tratamento das DTN é realizada na academia e por organizações sem fins lucrativos, que visam aprimorar abordagens para identificar e otimizar novos candidatos terapêuticos, incluindo a descoberta de novos medicamentos. Há um foco maior na identificação de novas moléculas por meio da triagem de bibliotecas de produtos químicos e naturais e estratégias de curto prazo, incluindo terapias combinatórias, novas formulações para medicamentos em uso e reposicionamento de medicamentos usados para outras doenças.^{5, 36}

Considerando que o tratamento de primeira escolha atualmente utilizado para a leishmaniose é um composto metálico, outros metais vêm sendo explorados como agentes leishmanicidas, tais como prata³⁷, paládio³⁸, platina,³⁹ cobre,⁴⁰ dentre outros. Uma das maiores vantagens dos compostos metálicos é apresentar mais de um modo de ação e/ou inibir mais de uma enzima, o que dificultaria a seleção de linhagens resistentes de parasitos.³⁶

Nesse cenário, o ouro (Au) ganhou especial atenção por ser um agente tiofílico (possui alta afinidade por ligantes contendo enxofre) e desempenhar ação antiinflamatória,⁴¹ anticâncer⁴² e antiparasitária,⁴³ inclusive leishmanicida.⁴⁴ Esses complexos podem agir em uma infinidade de alvos devido à diversidade estrutural de ligantes e seus complexos resultantes, incluindo alteração do ciclo celular, geração de EROs que podem levar a danos mitocondriais e/ou no DNA, inibição de proteossoma, inibição da tioredoxina redutase (TrxR) e inibição da topoisomerase IB, culminando com eventos de apoptose. A alta afinidade dos compostos de ouro com selenoproteínas e proteínas contendo grupo tiol (-SH) os torna candidatos a fármacos poderosos, podendo interagir com importantes enzimas envolvidas na homeostase redox em *Leishmania*.^{36, 45}

1.3 O ouro na medicina

O uso medicinal do ouro, ou auroterapia, data de tempos muito antigos com as civilizações egípcias e chinesas, antes mesmo de ser possível sua dissolução com água régia ($\text{HNO}_3 + 3 \text{HCl}$). O primeiro estudo sistemático do efeito terapêutico do ouro foi realizado por Robert Koch, que reportou a atividade de sais de ouro contra *Mycobacterium tuberculosis*, em 1890.⁴⁶ Esses estudos deram origem à chamada “década de ouro” no tratamento da tuberculose.

Baseado na suposição de que a artrite reumatoide (AR) é infecciosa, como a tuberculose, Jacques Forestier iniciou seus estudos com tiolatos poliméricos injetáveis de Au^I, que resultou na posterior aprovação do aurotiomalato de sódio (Myocrisin, **Figura 12A**) e da aurotioglucose (Solganol, **Figura 12B**).⁴⁷ Para superar a desvantagem da administração parenteral dos primeiros sais de ouro, Sutton e colegas reportaram as propriedades antiinflamatórias de complexos de ouro administrados oralmente que resultaram na posterior aprovação da auranofina (**Figura 12C**) para o tratamento da AR em 1985.⁴⁸

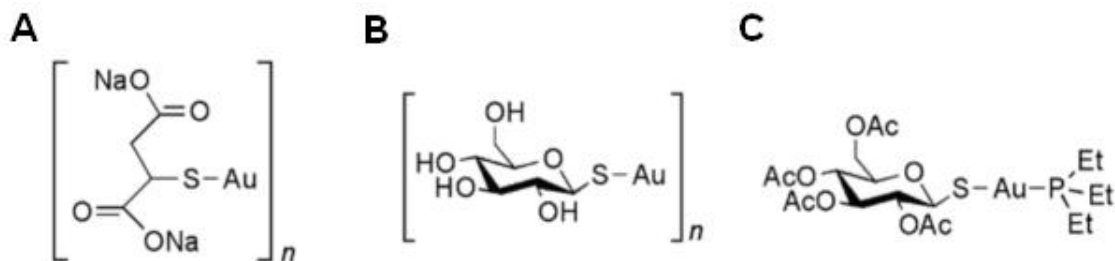


Figura 12. Estruturas moleculares do (A) aurotiomalato de sódio, (B) aurotioglucose e (C) auranofina.

Fonte: Adaptado.⁴⁷

Embora considerada mais segura do que as primeiras alternativas injetáveis, observou-se um declínio no uso clínico da auranofina devido, em parte, aos seus efeitos adversos, geralmente associados ao uso prolongado. Mesmo assim, diversos estudos foram realizados para avaliar o seu reposicionamento para o tratamento de outras doenças, principalmente câncer e doenças infecciosas (revisado por Roder & Thomson).⁴⁹

Com tantos resultados promissores, os compostos de ouro ganharam grande atenção da comunidade científica e um número impressionante de complexos de Au^I e Au^{III} estruturalmente diversos vem sendo testados. No entanto, apesar dos promissores resultados *in vitro*, a maioria desses compostos não foi ativa em modelos *in vivo*, inviabilizando a realização de estudos clínicos. Assim, uma das principais questões a ser abordada no desenvolvimento de novas moléculas a base de metal é a estabilidade *in vivo*, que depende da seleção dos ligantes e metais correspondentes mais adequados.⁵⁰

A teoria HSAB (*hard and soft acid and bases*) foi proposta em 1963 por Ralph Pearson e é usada para tentar explicar a estabilidade de compostos de coordenação, sendo baseada na polarizabilidade da espécie (ácido ou base). Nesse sentido, ácidos moles tendem a ser grandes e mais polarizáveis com alta preferência por bases moles, enquanto ácidos duros tendem a ser pequenos e pouco polarizáveis com alta preferência por bases duras.⁵¹

A natureza mole do ouro sugere interações com grupos tióis como possível mecanismo de ação dessas moléculas. Mais de uma vez a tioredoxina (Trx) foi reportada como alvo,^{52, 53} bem como cisteíno proteases (CP)⁵⁴ e, mais recentemente, até mesmo a glutatona peroxidase (GPx) e a tripanotona redutase

(TR), devido à afinidade do ouro por grupos tióis igualmente moles.⁴⁵ Outro possível mecanismo de ação foi demonstrado nos primeiros estudos sobre complexos de ouro antiartríticos, que demonstraram a deformação/inativação de proteínas com domínios dedos de zinco (ZF, *zinc fingers*) pelo deslocamento do Zn^{II} (coordenado por resíduos de cisteína e histidina) e consequente formação dos "dedos de ouro".⁵⁵

Ensaio com compostos de $Au(I)$ estabilizados por ligantes de fosfinas ou organometálicos mostram melhores efeitos anticâncer tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Graças a vários estudos mecanísticos, a ligação preferencial do ouro a proteínas, ao invés de DNA, foi demonstrada com a ocorrência de diferentes vias de citotoxicidade.⁵⁶

A auranofina, por exemplo, é um composto de fosfina contendo Au^I que tem como alvo a tioredoxina redutase, tanto a forma citosólica TrxR1 quanto a forma mitocondrial TrxR2, que possuem um resíduo de selenocisteína no sítio ativo altamente nucleofílico e facilmente acessível, o que as torna especialmente suscetíveis à inibição irreversível pelo ouro. A morte celular induzida em células cancerosas está associada a níveis excessivos de estresse oxidativo e vias redutoras prejudicadas tanto no citosol quanto na mitocôndria (**Figura 13**).^{53, 57} Ensaio clínico de reposicionamento da auranofina para câncer de ovário (NCT03456700), leucemia linfocítica crônica (NCT01419691) e câncer de pulmão (NCT01737502) estão em andamento.⁵⁸

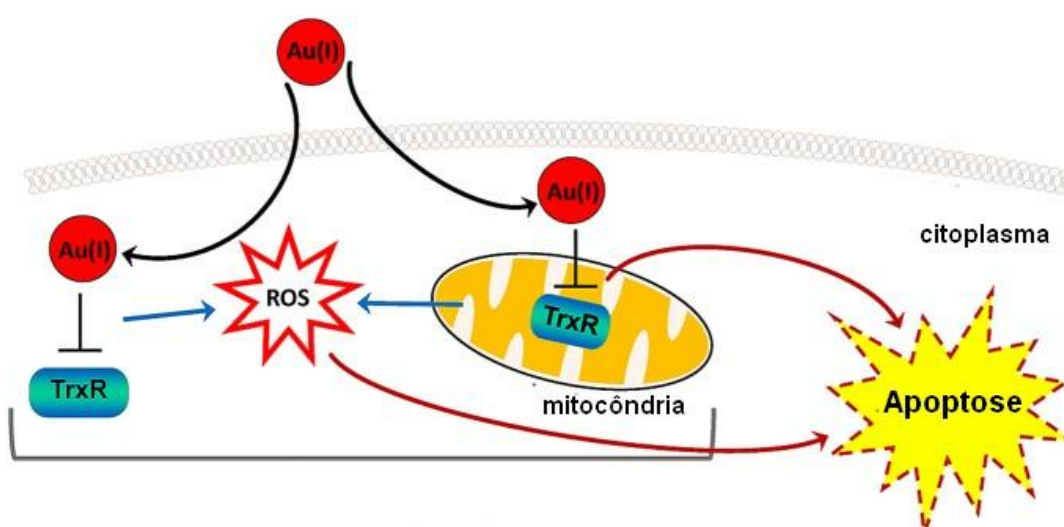


Figura 13. Esquematização do mecanismo de ação do Au^I na inibição da TrxR.
Fonte: Adaptado.⁵⁷

Especificamente contra *Leishmania*, um estudo de 1989 relata o uso do aurotiomalato de sódio em pacientes com LV que tiveram recaída após o tratamento ou não responderam ao tratamento com estibogluconato de sódio. Todos os pacientes demonstraram excelente resposta clínica, com redução do tamanho do fígado e baço para o normal e ausência de parasitas na medula óssea. Os autores finalizam o trabalho recomendando a substituição dos tratamentos tóxicos pelo baseado em ouro.⁵⁹

1.3.1 Complexos de ouro

Um complexo metálico refere-se à combinação de um íon metálico, que atua como ácido de Lewis (receptor de elétrons), com um ligante, que atua como base de Lewis (doador de elétrons) numa ligação coordenada de Werner. O ligante varia de pequenos íons a moléculas maiores, desde que sejam capazes de doar um par de elétrons. O arranjo do complexo final está intrinsecamente relacionado às propriedades do composto obtido.⁶⁰

Complexos de metais com configuração eletrônica de valência d^8 apresentam geometria quadrática planar e são conhecidos por se coordenarem ao DNA e/ou inibidores de enzimas, como os de Pt^{II} (cisplatina) e Au^{III} . Ao contrário da Pt^{II} , porém, o Au^{III} é menos estável em condições fisiológicas devido ao seu alto potencial de redução e rápida taxa de hidrólise, e a redução a Au^I/Au^0 geralmente causa a liberação dos ligantes.⁴⁷

Como um metal de caráter mole, o Au^I forma complexos estáveis com ligantes C-, P- ou S-doadores, tipicamente arilos, alcinilos, carbenos, isonitrilos, fosfinas ou tiolatos. Do ponto de vista estrutural, os complexos de Au^I apresentam uma geometria linear e uma tendência acentuada de estabelecer interações $Au \cdots Au$, chamada de aurofilia, que são originadas por efeitos relativísticos. As interações aurófilas intra ou intermoleculares são comumente observadas nas estruturas de estado sólido dos complexos Au^I .⁶¹

Os compostos de estrutura geral $[AuXL]$ são tipicamente representados pela presença de um ligante L doador σ e um ligante X lábil (usualmente haletos) e permitem a modificação de ambos os ligantes para ajustar as propriedades do complexo geral em direção ao alvo biomolecular desejado. Fosfinas e carbenos são particularmente adequados para trabalhar como ligantes doadores σ ao desenvolver

complexos de Au^{I} , pois eles são capazes de formar ligações estáveis e fortes com o metal, bem como possibilitar estabilidade ao ar e à umidade.^{62, 63}

Carbenos são espécies com um átomo de carbono divalente com diversos substituintes e um único par de elétrons desemparelhados. Carbenos N-heterocíclicos (NHCs, **Figura 14**) foram desenvolvidos mais recentemente e amplamente utilizados na catálise de reações orgânicas por ouro. Derivam principalmente dos sais de imidazol, benzimidazol e benzotiazol que, após a desprotonação, fornecem o carbeno livre que pode coordenar o centro de ouro.⁶³

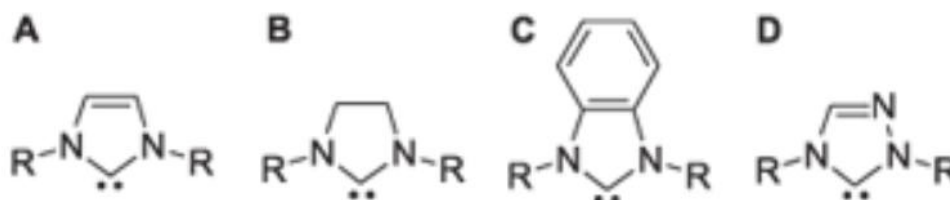


Figura 14. Carbenos N-heterocíclicos representativos de cada tipo: (A) imidazolin-2-ilideno e seu derivado saturado (B) imidazolidin-2-ilideno, (C) benzimidazolin-2-ilideno e (D) 1,2,4-triazolin-5-ilideno.

Fonte: Adaptado.⁶⁴

Muitos complexos de ouro com ligantes NHCs de diferentes estequiometrias foram relatados, sendo dos tipos $[\text{AuX}(\text{carbeno})]$, $[\text{AuL}(\text{carbeno})]^+$ ou $[\text{Au}(\text{carbeno})_2]^+$, sendo L = molécula neutra e X = ânion, e são excelentes σ -doadores.⁶³ Também são mais fáceis e versáteis em suas propriedades eletrônicas, estéricas e físicas. Além disso, as ligações metal-carbono são termodinamicamente mais fortes do que as ligações metal-fósforo das fosfinas. Com base nisso, os NHCs ganham cada vez mais atenção na química medicinal e diversos estudos relataram o seu uso nesta área (revisado por Dominelli, Correia & Kühn).⁵⁰ O grande interesse nos complexos Au^{I} -NHC está supostamente relacionado ao caráter de ácido mole do Au^{I} , que facilita as interações com o grupo tiol da cisteína ou de outros ligantes moles.⁴⁶

1.3.2 Mecanismos de ação dos Au-NHC

Como mencionado anteriormente, a TR é uma enzima do sistema redox da *Leishmania* considerada crucial para a sobrevivência do parasita. Ela contém

resíduos de cisteína no seu sítio ativo e pode ser inibida por metais tiofílicos (**Figura 15**), como Sb^{III} e Au^{I} . De fato, um grupo de pesquisa demonstrou a inibição dos sítios ativos da TR por ambos os metais.^{65, 66}

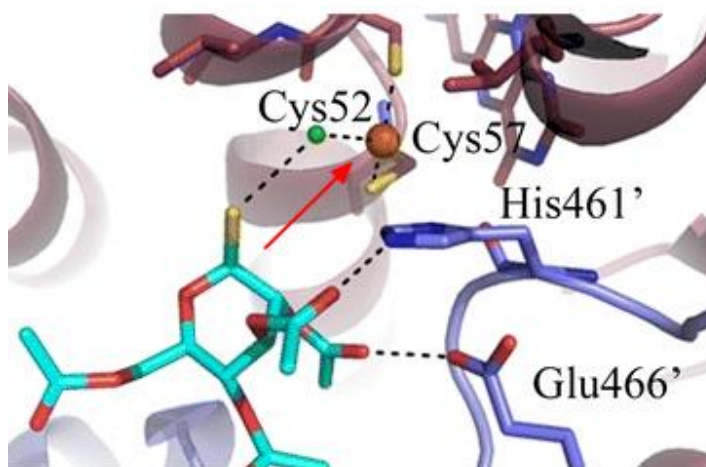


Figura 15. Representação do sítio de ligação da TR inibido por um átomo de ouro (sinalizado pela seta vermelha).

Fonte: Adaptado.⁶⁶

As CP pertencem a uma família de proteases que contém uma cisteína como o nucleófilo na tríade catalítica. Eles estão presentes principalmente nos lisossomos e atuam como enzimas proteolíticas. Algumas CP são expressas durante todo o ciclo de vida dos tripanossomatídeos e são essenciais para a nutrição, reprodução, invasão e desvio da resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, são centrais na progressão da doença associada e um possível alvo para novas alternativas terapêuticas.¹²

Em *Leishmania*, as mais bem caracterizadas são as do tipo catepsinas CPA, CPB e CPC. Um estudo avaliou a inibição da CPB recombinante de *L. (L.) mexicana* por complexos de Au^{I} e Au^{III} , comparando com catepsina B e L humanas. Como resultado, os complexos de Au^{III} inibiram a catepsina humana e de *Leishmania* na mesma faixa, enquanto o Au^{I} se mostrou mais potente contra a catepsina humana.⁵⁴

Os dedos de zinco são domínios em proteínas que contêm um íon zinco estrutural coordenado a cisteínas e histidinas em uma geometria tetraédrica. Como maior família de fatores de transcrição no genoma humano, esse domínio está

envolvido em várias funções celulares, como transcrição, apoptose, reparo de DNA e empacotamento de RNA. Os estudos de ZF revelaram que o deslocamento ou substituição do zinco por outros metais diminui ou interrompe a capacidade do domínio de se ligar ao DNA/RNA, representando um possível mecanismo de toxicidade de metais. Como proteínas ricas em cisteína, as ZFs são excelentes alvos para compostos ouro.^{12, 55, 67}

Diversos estudos demonstraram a possibilidade de substituir o Zn^{II} dos ZF por outros metais com maior afinidade pelos resíduos de cisteína, como Sb^{III} ,⁶⁸ Au^{III} , formando os "dedos de ouro" em modelos de câncer,⁶⁹ e uma série de complexos de Au^{I} e Au^{III} foram testados contra ZFs e demonstraram resultados promissores.⁷⁰

Um estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade leishmanicida de complexos de Au^{I} e Au^{III} , inclusive com ligantes NHC, contra as formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Os resultados apontam 3 complexos (**Figura 16**) com $\text{EC}_{50} < 20\mu\text{M}$ contra promastigotas e discute a interferência na manutenção da permeabilidade de membrana do parasita como um novo possível mecanismo de ação.⁷¹

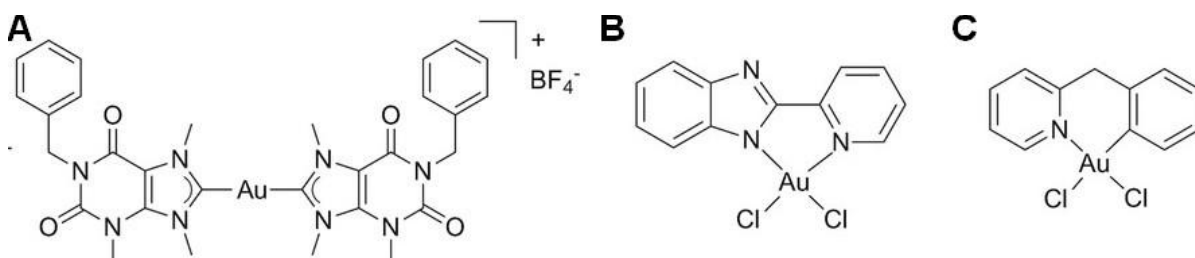


Figura 16. Estrutura dos complexos de (A) Au^{I} -bisNHC, (B) e (C) complexos Au^{III} coordenados a um esqueleto N^N bidentado com melhores resultados.

Fonte: Adaptado.⁷¹

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o atual cenário para o tratamento das leishmanioses, os complexos metálicos apresentam vantagens em relação à especificidade ao alvo celular e, após muitas pesquisas na área, representam possíveis alternativas terapêuticas para doenças negligenciadas com tratamentos tóxicos e dispendiosos.

Especificamente, os complexos de ouro possuem uma elevada afinidade pelos tióis, grupo abundante em diversas proteínas com papel crucial no desenvolvimento e manutenção celular do parasita, tais como a tripanotiona, triparredoxina (importantes para o sistema redox), cisteíno proteases, proteínas com domínios dedo de zinco, dentre outras.

Nosso grupo de pesquisa publicou recentemente os resultados promissores obtidos com complexos de Au^I e Au^{III} estruturalmente diversos e avaliou a ação leishmanicida desses compostos.⁷¹ Nesse sentido, o presente trabalho relata os estudos realizados com uma série de complexos de Au^I com ligantes do tipo carbenos N-heterocíclicos contra *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e discute os possíveis mecanismos de ação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a eficácia de novos compostos metálicos inibidores de proteínas de *Leishmania* spp.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar complexos organometálicos carbenos-N-heterocíclicos de Au(I);
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de seis candidatos sintetizados, com estabelecimento de concentrações inibitórias para 50% de culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* determinando alterações na morfologia dos parasitos;
- Obter o perfil de citotoxicidade *in vitro* dos candidatos em macrófagos primários de camundongos e de linhagem (RAW 264.7) para definição dos índices de seletividade;
- Determinar os índices de infectividade para macrófagos primários de camundongos infectados na ausência e presença de concentrações crescentes dos inibidores *in vitro*;
- Avaliar a capacidade dos compostos com melhor atividade leishmanicida de alterar a permeabilidade de membrana plasmática de *Leishmania*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese dos complexos Au^I-NHC

Os ligantes carbeno são formados a partir de sais de imidazólio sintetizados por métodos descritos na literatura⁷²⁻⁷⁴ e demonstrado resumidamente na **Figura 17**.

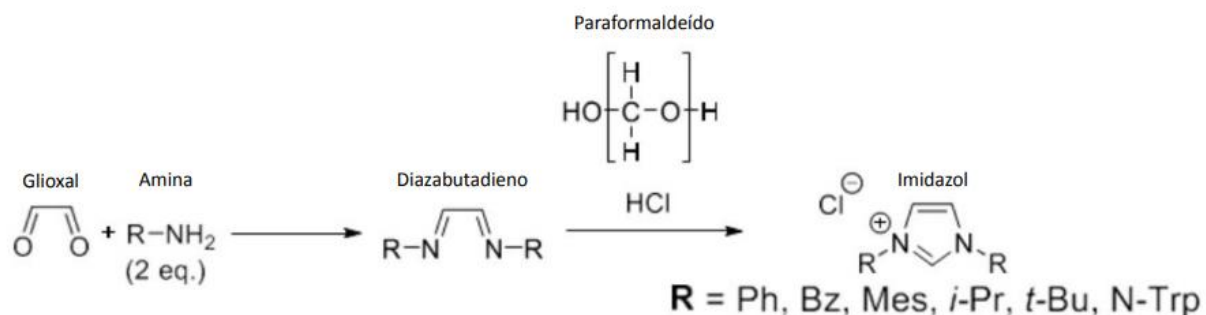


Figura 17. Rota sintética para a obtenção dos sais de imidazólio precursores dos carbenos N- heterocíclicos. Ph = fenila, Bz = benzila, Mes = mesitila, iPr = 2,6-isopropilfenila, t-Bu = terc-butila, N-Trp = triptofano.

Fonte: Adaptado.⁷²

Há duas abordagens sintéticas para a obtenção dos complexos Au-NHC: a clássica rota via transmetalização e a reação do NHC com o precursor de ouro na presença de base fraca.⁷⁵

Na primeira, o respectivo sal de imidazol é misturado com um equivalente de Ag₂O em diclorometano seco e atmosfera inerte. A mistura reacional é agitada por 4 h. O precursor de Au(I) (tetrahidrothiopheno de ouro [Au(tht)Cl]) é adicionado e a mistura é mantida sob agitação por 3 h. A separação e purificação envolvem a remoção de metais por filtração em Celite, adição de carbono ativado para remover compostos orgânicos e precipitação do composto pela adição de pentano ou éter.⁷⁶ A segunda rota (**Figura 18**) envolve a mistura do sal de imidazólio e K₂CO₃ (um ou dois equivalentes, dependendo do carbeno) em refluxo de acetona seguido da adição do precursor de [Au(tht)Cl] em atmosfera inerte.⁷⁵

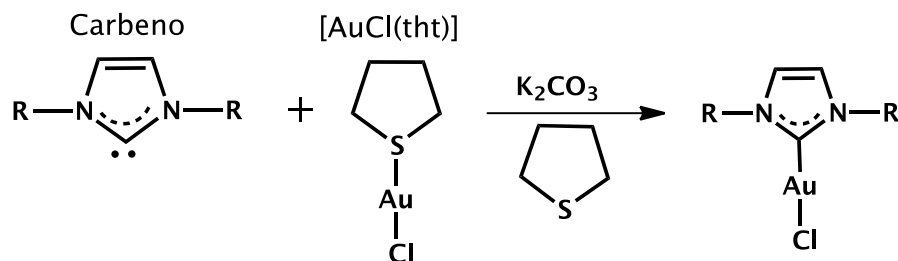


Figura 18. Esquema da reação do carbeno com o precursor de Au^I para a síntese de complexos com fórmula geral [NHC-Au-Cl].

Fonte: Adaptado.⁷⁵

Neste trabalho, derivados foram gerados pela substituição do ligante cloreto por dimetilaminopiridina (DMAP) nos complexos indicados, utilizando métodos descritos por Abbehausen e colaboradores.⁵⁵ Em resumo, uma solução em clorofórmio de [NHC-Au-Cl] foi misturada com uma solução etanólica contendo um equivalente de AgNO₃. O precipitado de AgCl foi removido por filtração em celite ou filtro de seringa e uma solução contendo um equivalente de DMAP em clorofórmio foi adicionado e mantido sob agitação, sob proteção da luz por 8 h. Após este tempo o solvente foi removido em evaporador rotativo e o produto cristalizado em acetona a baixa temperatura. Os cristais foram filtrados, lavados com acetona e secos a vácuo.

Todas as etapas acima descritas foram realizadas em parceria com o grupo da co-orientadora, Dra. Camilla Abbehausen, que possui domínio pleno das referidas técnicas, rotineiramente empregadas em seu laboratório no Depto. de Química Inorgânica do Instituto de Química – UNICAMP. Os compostos foram solubilizados a 25 mM (solução-estoque) em DMSO puro para uso imediato a cada ensaio.

4.2 Cultivo de parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1994/H3227) foram cultivadas a 25°C em meio 199 (Gibco-BRL, Invitrogen), preparado diluindo-se o pó em água destilada e suplementado com penicilina 50 unidades/mL, estreptomicina 50 µg/mL, HEPES 40 mM, adenina 0,1 M, biotina 0.0001%, hemina 0.0005% e 10% de soro fetal bovino - SFB (Invitrogen®) com pH final 7,4. Quanto à manutenção de *L. (V.) braziliensis*, houve suplementação

adicional de 10% de SFB e 2% de urina humana estéril masculina obtida por doação durante os repiques.⁷⁷ Os repiques foram realizados a cada 3-4 dias para obtenção de culturas em fase logarítmica de promastigotas procíclicos para os ensaios de viabilidade celular e a cada 6-7 dias para culturas em fase estacionária de promastigotas metacíclicos para os ensaios de infecção *in vitro*.⁷⁸

4.3 Cultivo das células hospedeiras

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI completo suplementado com 10% de SFB a 37°C e atmosfera de 5% CO₂, com repiques a cada 3 dias. Para o meio R2030, fibroblastos da linhagem L929 foram cultivados a 37°C e atmosfera de 5% CO₂ em meio RPMI completo suplementado com 10% de SFB até atingirem confluência de 80-90% para retirada do sobrenadante que contém fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*).⁷⁹

Os macrófagos primários (BMDM - *bone marrow-derived macrophages*) foram obtidos após diferenciação de células precursoras extraídas da medula óssea (de fêmures e tíbias) de camundongos fêmeas Balb/C eutanasiados conforme aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório – CEUA/UNICAMP (nº 5398-1/2019, **ANEXO A**). Os camundongos foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório-CEMIB com 4 semanas de vida e mantidos no Biotério de Parasitologia do Depto. de Biologia Animal em isoladores (Alesco®) com ração autoclavada e água filtrada *ad libitum* (n-5 animais por isolador).

O conteúdo medular dos ossos foi lavado com o auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha 21G com meio RPMI suplementado com 20% de SFB e 30% de sobrenadante de culturas de fibroblastos L929 (meio R2030) em placas de 7,5 cm de diâmetro e volume final de 10 mL de meio. As placas (uma para cada osso) foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂. No quarto dia, foram adicionados mais 5 mL de meio R2030.

Ao fim de 7 dias, os macrófagos diferenciados foram recolhidos em meio RPMI após raspagem da placa com *cell scraper* estéril (Biofil®) e centrifugados a 1000 x g por 5 minutos a 4°C, ressuspensos em meio R105

(RPMI suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de L929) para contagem em câmara de Neubauer.^{71, 77, 79}

4.4 Testes de viabilidade

A viabilidade celular foi avaliada em culturas de promastigotas em fase logarítmica (5×10^6 células/poço) e macrófagos (4×10^5 células/poço) incubadas com 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.6 e 0.8 μM dos compostos por 2h, 16h (para promastigotas) e 24h (para promastigotas e macrófagos), utilizando-se o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazólio, Sigma-Aldrich) em placas de cultura estéreis de 96 poços de fundo redondo. Culturas em meio sem o composto serviram de grupo controle. Os resultados do teste de inibição foram obtidos a partir da porcentagem de viabilidade celular após incubação com os compostos em relação ao controle não tratado. Para a realização do teste do MTT, após as incubações em diferentes tempos, foram adicionados 30 μL de MTT (5 mg/mL) por poço e as placas foram armazenadas por 2h a 25°C (para promastigotas) e 37°C (para macrófagos) para posterior interrupção da reação pela adição de 30 μL de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio). A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro de placa a 595 nm, utilizando como referência um comprimento de onda de 690 nm.^{71, 80}

Os valores de densidade ótica foram convertidos em porcentagens de células viáveis em relação ao grupo controle não tratado (100% de viabilidade) para posterior cálculo de EC50, no software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA). Vale ressaltar que o teste de viabilidade celular foi feito por diluição seriada em placa de 96 poços, a partir da solução estoque, fazendo-se a diluição direto no meio de cultura antes da adição das células (para promastigotas) ou no sobrenadante do meio (para macrófagos já aderidos).

4.5 Preparação de lâminas para avaliação morfológica parasitária

Esfregaços foram realizados em lâminas a partir de 10 μL das culturas de parasitos do teste de viabilidade, ao fim das 24h de incubação e antes da adição do MTT, dos grupos controle e tratados, secos à temperatura ambiente por ao menos 30 minutos, fixados com metanol puro e corados utilizando-se o kit Instant Prov (Pinhais, PR, Brasil). As lâminas foram analisadas por microscopia ótica com 100x de aumento e auxílio do óleo de imersão para detecção de

possíveis alterações morfológicas e estruturais e obtenção de imagens utilizando-se o microscópio óptico. Foram analisadas imagens de pelo menos 150 promastigotas para cada concentração e as formas foram categorizadas em uma tabela para determinação da frequência de eventos observados considerando-se formato do corpo celular, formas em divisão, estrutura flagelar, além de aberrações morfológicas após incubação com os compostos.

4.6 Permeabilidade de membrana

Para avaliar alterações de permeabilidade de membrana celular, 5×10^6 promastigotas foram incubados ou não (controle negativo) com os compostos em 600 μ L de meio 199 em placas de 24 poços por 15min e 24h nas concentrações relativas às EC₂₅ e EC₅₀ de cada um. Após o tempo de incubação, a cultura foi transferida para uma cubeta de vidro e, com o auxílio do fluorímetro HITACHI F2500, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 580 nm, respectivamente, foi possível detectar mudanças no sinal de fluorescência devido à adição de 100 μ M de brometo de etídio. O ensaio é finalizado com a adição de 1,6 mM de digitonina para completa lise celular, gerando o pico máximo de fluorescência.⁸¹ Esse ensaio foi realizado no laboratório coordenado pela Dra. Fernanda Ramos Gadelha (LABDAT - DBBT, IB-UNICAMP).

4.7 Infecção *in vitro*

Para avaliar a viabilidade dos amastigotas intracelulares em ensaios de infecção, 4×10^5 macrófagos/poço foram cultivados com meio RPMI completo sobre lamínulas em placas de 24 poços por, no mínimo 2h (para completa adesão das células), a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂.

Após a adição dos promastigotas em fase estacionária na proporção de 5:1 para *L. (L.) amazonensis* e 10:1 para *L. (V.) braziliensis*, a infecção foi mantida por 16h a 34°C e atmosfera com 5% de CO₂. Ao fim desse período, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS para retirada de células soltas. Após adição de meio fresco, foram expostos ou não a diferentes concentrações dos compostos por 24h a 34°C.

A carga parasitária foi quantificada por contagem direta de amastigotas a cada 100 macrófagos aderidos nas lamínulas, que foram fixadas com metanol e coradas utilizando-se o kit Instant Prov (NewProv, Pinhais, PR)

para análise em imersão com 100x de aumento em microscópio ótico. Com base nos resultados obtidos para inibição parasitária (EC50 – 50% *effective concentration*) e perfis de citotoxicidade (CC50 – 50% *cytotoxic concentration*), foram estabelecidos os índices de seletividade para cada composto (IS = CC50/EC50). Os resultados também refletiram a taxa de infecção (% de macrófagos infectados), número de amastigotas a cada 100 macrófagos e o índice de infectividade (multiplicação da taxa de infecção com o número de amastigotas).^{71, 77}

4.8 Análises estatísticas

A maioria dos testes foram feitos em triplicatas e as inibições foram testadas estatisticamente em relação ao grupo controle. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 6.0 Software* (San Diego, CA, USA), levando-se em conta o tipo de teste mais adequado para cada condição experimental. Foram determinados os valores de concentração inibitória para 50% das culturas. Apenas valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

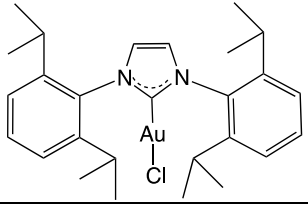
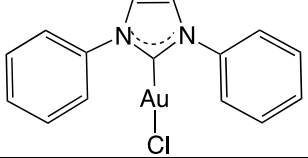
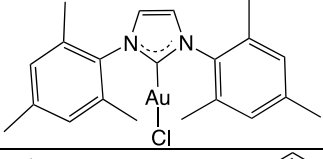
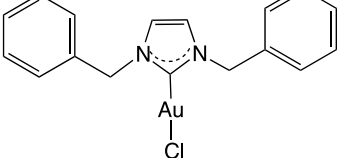
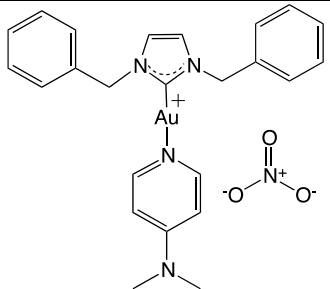
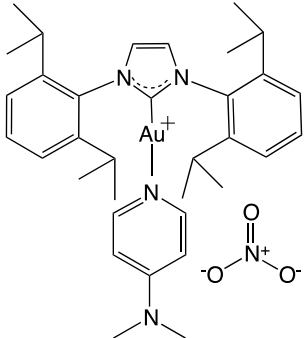
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Complexos Au^I-NHC testados

Acompanhar a síntese dos compostos desde o início sob a orientação da Dra. Camilla Abbehausen não foi possível devido à pandemia do COVID-19, mesmo sendo um dos objetivos do projeto. Portanto, os compostos testados foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da professora e os ensaios *in vitro* terão seus resultados a seguir discutidos. Os compostos recebidos (**Tabela 2**) apresentaram-se na forma de pó para diluição em DMSO a cada experimento individualmente na concentração de 25 mM (solução estoque).

Os ligantes NHC foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN) e espectrometria de massas. Os complexos Au^I-NHC foram caracterizados por espectroscopia por RMN, espectrometria de massas e análise elementar. Os dados confirmaram a identidade e pureza dos compostos dentro dos limites das técnicas utilizadas. Detalhes dos espectros destes compostos podem ser encontrados nas referências citadas neste parágrafo.^{55, 75}

Tabela 2. Descrição dos compostos testados.

CÓDIGO	NOME	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA MOLECULAR
NHC1	[(IPr)AuCl]	$C_{27}H_{36}AuClN_2$	621,01	
NHC2	[(IPh)AuCl]	$C_{15}H_{12}AuClN_2$	452,69	
NHC3	[(IMes)AuCl]	$C_{21}H_{24}AuClN_2$	536,85	
NHC4	[(IBn)AuCl]	$C_{17}H_{16}AuClN_2$	480,74	
NHC5	[Au(IBn)(dmap)]NO ₃	$C_{24}H_{26}AuN_5O_3^-$	629,46	
NHC6	[Au(IPr)(dmap)]NO ₃	$C_{34}H_{46}AuN_5O_3^-$	769,73	

A diferença entre as moléculas testadas está na modificação de uma estrutura inicial (NHC2) com a adição de isopropilas em orto (NHC1) e metilas em orto e para (NHC3), além de um grupo espaçador entre o carbeno e o anel benzênico (NHC4). Além disso, NHC1 e NHC4 tiveram seu ligante iônico modificado para uma 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para formar NHC6 e NHC5,

respectivamente, formando as únicas duas moléculas catiônicas dentre as demais neutras.

5.2 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e macrófagos (primários e de linhagem) foram incubados com concentrações crescentes dos compostos por 2h, 16h e 24h. Os resultados foram obtidos com o teste do MTT, que envolve a conversão do MTT (corante amarelo solúvel) em formazan (corante roxo insolúvel) pela ação da oxidoredutases mitocondriais dependentes de NAD(P)H.⁸⁰ O formazan é então solubilizado com SDS 20% para que a concentração seja determinada por densidade óptica e, posteriormente, transformada em porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado para o cálculo das concentrações inibitórias.

5.2.1 Viabilidade dos promastigotas

A avaliação inicial se deu com 5×10^6 promastigotas em fase logarítmica de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, incubados com 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.6 e 0.8 μM de cada composto, em placa de 96 poços por 24h (**Figura 19**). Além disso, para verificar se a ação dos compostos era tempo-dependente, incubações de 2h e 16h também foram realizadas (dados não apresentados), porém, o resultado obtido após incubação por 2h se mostrou insuficiente para acusar danos aos parasitos por limitações da técnica, que exige maior densidade celular. No caso do tempo de 16 h, foram observados resultados de inibição muito próximos daqueles observados para 24 h.

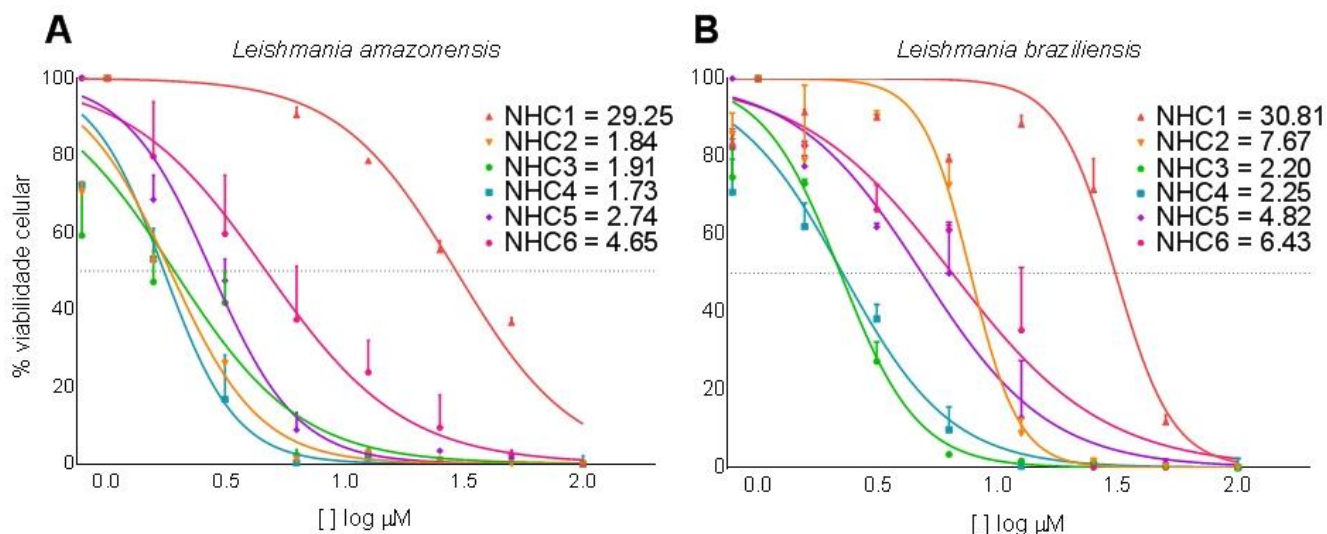


Figura 19. Viabilidade celular de promastigotas de (A) *L. (L.) amazonensis* e (B) *L. (V.) braziliensis* incubados com os compostos NHC(1-6) por 24h. Cada concentração está expressa como média $\pm$ desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas de um único ensaio e os valores de EC₅₀ expressos em μM .

Levando em consideração os critérios estabelecidos pelo GHIT Fund (Global Health Innovative Technology), que prevê que um bom candidato deve apresentar EC₅₀ inferior ou igual a 10 μM contra amastigotas intracelulares,^{5, 82} usamos esse critério para selecionar somente os compostos com EC₅₀ < 10 μM para os demais ensaios *in vitro* por apresentarem atividade efetiva em baixas concentrações, ao contrário do NHC1, que não foi utilizado nos demais ensaios.

Al-Majid e colaboradores testaram a atividade da molécula aqui representada como NHC1 e outras três variando o ligante iônico. Seus resultados, porém, mostraram boa atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. (L.) major* com o NHC1 (8.2 $\pm$ 0.24 μM), indicando que diferentes espécies de *Leishmania* apresentam sensibilidades distintas. Contra fibroblastos da linhagem 3T3-L1, porém, apresentou EC₅₀ de 8.85 $\pm$ 0.25 μM , apontando que a molécula não apresenta seletividade contra o parasito em relação à célula mamífera.⁸³ A escolha de fibroblastos para o ensaio *in vitro*, porém, não é padrão para avaliação de moléculas antileishmania por não serem as células hospedeiras clássicas do parasito.¹²

Essa diferença pode nos ajudar a compreender a importância dos ligantes no desenho de complexos metálicos para atividade biológica, podendo explicar a diferença entre os compostos NHC1 (ligante Cl) e NHC6 (ligante DMAP), que

diferem somente no ligante X e apresentaram atividade leishmanicida distinta. A comparação direta, entretanto, não é possível, pois NHC1 é uma molécula neutra e NHC6 é catiônica, o que também interfere na atividade biológica dos compostos.

5.2.2 Viabilidade dos macrófagos

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados inicialmente com 5×10^5 células de macrófagos de linhagem RAW 264.7 com 24h de incubação com os compostos NHC(2-5). Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c (BMDM) também foram avaliados para a viabilidade celular a fim de se comparar ambos os resultados, com o adicional do composto NHC6 que não havia sido testado antes. As diluições foram seriadas, em triplicata, partindo da concentração inicial de $100 \mu\text{M}$ e os resultados foram plotados para obtenção da CC_{50} no GraphPad Prism 6 (**Figura 20**).

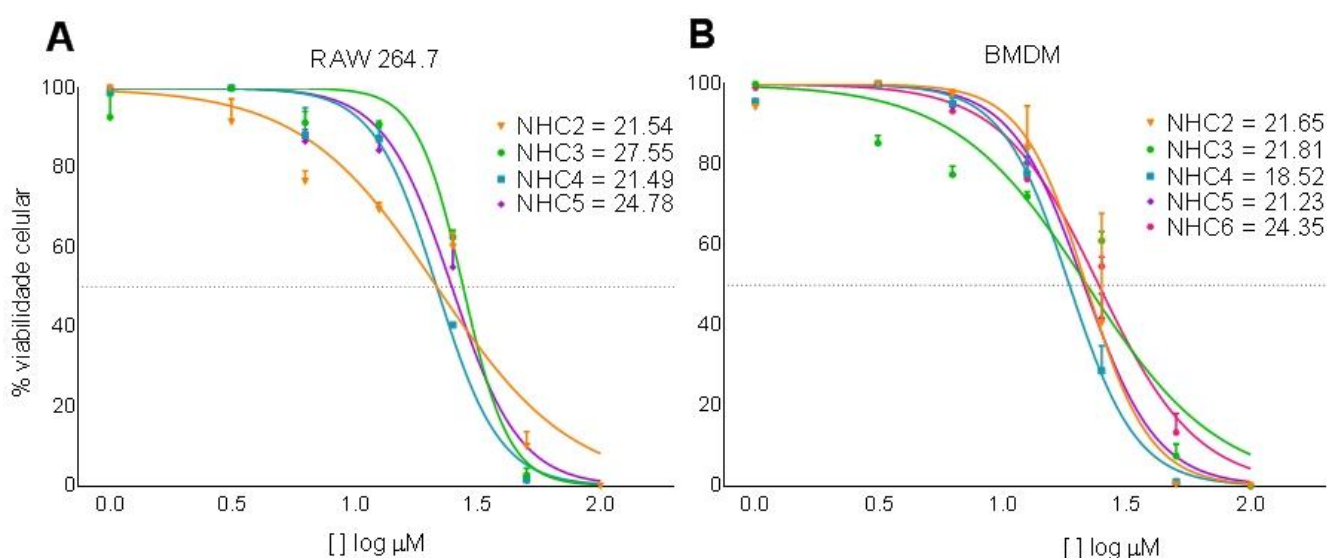


Figura 20. Viabilidade celular de macrófagos de (A) linhagem RAW 264.7 e (B) BMDM incubados com os compostos testados por 24h. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas experimentais e os resultados de CC_{50} como μM .

No comparativo de ambos os tipos celulares de macrófagos, as CC_{50} se mostraram próximas. Com esses valores, foi possível determinar o Índice de Seletividade (IS), que nos mostra quantas vezes cada composto é mais seletivo contra o parasito em relação à célula hospedeira ($\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$). O IS foi calculado

usando os valores de CC50 dos BMDM, pois todos os compostos puderam ser testados nesse tipo celular (**Tabela 3**).

Tabela 3. Atividades inibitórias de cada complexo testado para 50% das culturas de promastigotas de *Leishmania spp.* (EC50) e macrófagos de linhagem e primários (CC50). 'IS BMDM' indica o índice de seletividade utilizando-se macrófagos primários como referência. Os resultados apresentados de EC50 são representativos de três ensaios independentes realizados em triplicata; replicatas experimentais não puderam ser realizadas para ensaios de CC50 devido à interrupção de atividades laboratoriais por conta da pandemia de COVID-19, porém, todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas.

	EC50±DP (µM)		CC50 (µM)		IS BMDM	
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	RAW 264.7	BMDM	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
NHC1	25.99 ± 4.61	27.83 ± 4.22	-	-	-	-
NHC2	2.11 ± 1.11	8.30 ± 0.88	21.54	21.65	10.28	2.61
NHC3	1.57 ± 0.41	1.68 ± 0.36	27.55	21.81	13.94	13.02
NHC4	1.65 ± 0.16	1.70 ± 0.42	21.49	18.52	11.25	10.91
NHC5	1.96 ± 0.66	2.41 ± 1.62	24.78	21.23	10.83	8.80
NHC6	6.35 ± 3.72	8.14 ± 1.79	-	24.35	3.83	2.99

Para tentar explicar a diferença entre os compostos testados, podemos relacionar cada estrutura com sua atividade. O composto NHC2, que possui a estrutura mais básica, se mostrou ativo contra os promastigotas de ambas as espécies, porém *L. (L.) amazonensis* se mostrou ligeiramente mais sensível. A adição das isopropilas tornou o NHC1 muito menos eficiente, porém a substituição do ligante iônico pelo DMAP tornou o NHC6 uma molécula catiônica com atividade melhorada (embora ainda menos ativa que as demais).

A adição do grupo espaçador entre o carbeno e o anel benzênico tornou o NHC4 mais ativo principalmente contra *L. (V.) braziliensis*, porém, a substituição do ligante iônico pelo DMAP não alterou a atividade de NHC5. Por outro lado, a adição dos grupos metilas tornou o NHC3 o melhor candidato dentre os testados. Nenhuma

das alterações na estrutura mais básica parece ter interferido na atividade citotóxica contra macrófagos, que se manteve semelhante com todos os compostos testados.

Paloque et al. demonstraram a síntese, caracterização e atividade biológica de uma série de Au^I-NHC contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos de linhagem J774A.1. Dentre as moléculas testadas, a que apresentou melhor atividade leishmanicida ($EC_{50} = 1.53 \pm 0.62 \mu M$, $CC_{50} = 9.45 \pm 0.42 \mu M$ e $IS = 6.19$) era a única neutra Au^I-NHC-Cl.⁸⁴

Posteriormente, incentivados pelos resultados do primeiro estudo, o grupo de Zhang et al. continuou explorando a neutralidade de uma série de Au^I-NHC contra *L. (L.) infantum*. Seus resultados mostraram atividade leishmanicida para 50% da cultura de promastigotas de até 10 μM para a maioria dos complexos, porém, a atividade citotóxica contra macrófagos J774A.1 permaneceu na mesma faixa, ou seja, não apresentaram boa seletividade contra o parasito, sendo que o melhor candidato teve EC_{50} de $2.52 \pm 0.51 \mu M$, CC_{50} de $7.79 \pm 1.14 \mu M$ e IS equivalente a 3.09.⁸⁵

A literatura considera um bom candidato leishmanicida aquele que apresenta EC_{50} menor ou igual a 10 μM contra amastigotas intracelulares e seletividade maior ou igual a 10 contra o parasito em relação à célula hospedeira.^{86,}

⁸⁷ Todos os nossos complexos, com exceção do NHC1, apresentaram EC_{50} menores que 10 μM para promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e, portanto, foram selecionados para os ensaios de infecção *in vitro*. Quanto à seletividade, todos os compostos testados apresentaram $IS > 10$ contra *L. (L.) amazonensis*, com exceção do NHC6. A observação de que o composto NHC3 apresentou os melhores valores de IS nos encorajou a selecioná-lo para os ensaios de possíveis mecanismos de ação discutidos a seguir.

5.2.3 Análise de morfologia de promastigotas

Durante o ensaio de viabilidade celular com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, observou-se que nos primeiros minutos de incubação as células perdiam motilidade e, com o passar do tempo, apresentavam morfologia alterada. Portanto, alíquotas foram retiradas de cada concentração ao fim das 24h de incubação para avaliação da morfologia celular e quantificação das alterações morfológicas (**Figura 22, Tabelas 4 e 5**).

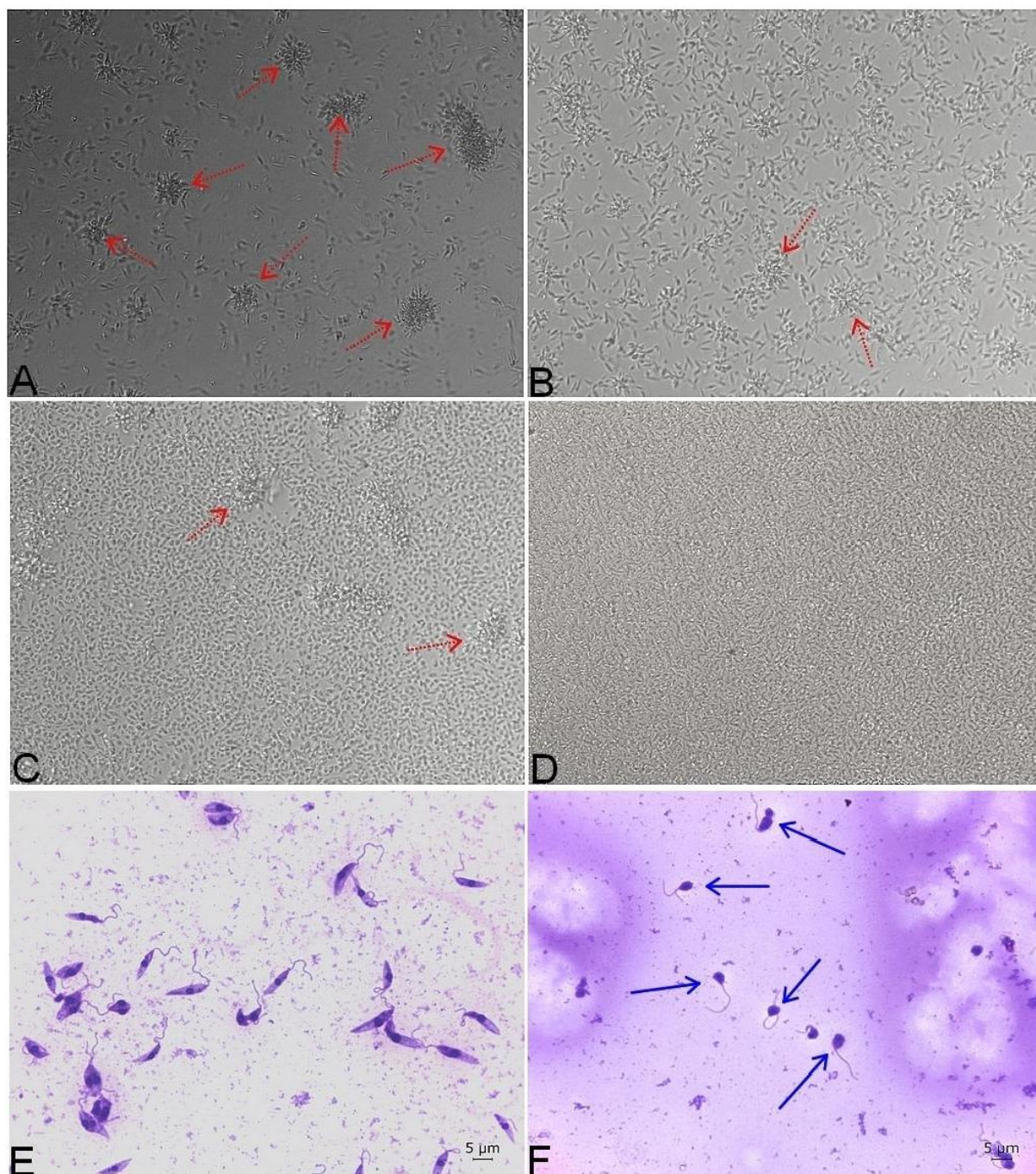
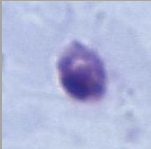


Figura 21. Morfologia celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Controle mantido apenas em meio de cultura (A); culturas após incubação com o composto NHC3 por 24h com 1.6 μM (B), 6.25 μM (C) e 25 μM (D). As setas vermelhas apontam para rosáceas. As alterações morfológicas foram observadas microscopicamente em culturas fixadas e coradas de parasitos, comparando-se promastigotas fusiformes do grupo controle não tratado (E) com o grupo tratado com 25 μM de NHC3 (F). As setas azuis apontam para formas espermatozoide-like com alongamento de flagelo.

Os grupos de alteração morfológica foram definidos de acordo com as observações durante o ensaio e incluem a forma normal fusiforme do promastigota, células em divisão (flagelo e/ou núcleo duplicados), espermatozoide-*like* (flagelo alongado e corpo celular arredondado), formas arredondadas (sem flagelo) e formas aberrantes (alterações sem padrão comum) (**Tabelas 4 e 5**).

As alterações morfológicas mostradas na **Tabela 4** ficaram mais frequentes a partir da concentração de 12.5 μM para os compostos NHC(2-5), que apresentaram as menores EC50 para *L. (L.) amazonensis* (**Figura 19, Tabela 3**). Na maior concentração de 25 μM , 100% das células mostraram alterações morfológicas. NHC6, entretanto, alterou somente 71% das células observadas na maior concentração e menos que 85% nas demais concentrações, refletindo sua menor atividade leishmanicida observada nos testes de viabilidade celular.

Tabela 4. Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos testados NHC(2-6) (n = 150 promastigotas por condição).

					
	Fusiforme	Em divisão	Espermatozoite- <i>like</i>	Arredondado	Aberrante
Controle	78%	22%			
NHC2					
0.8 μM	80%	19%			1%
1.6 μM	74%	22%		2%	2%
3.125 μM	85%	14%	1%		
6.25 μM	75%	6%		16%	3%
12.5 μM	4%	4%	1%	91%	
25 μM			85%	15%	
NHC3					
0.8 μM	85%	15%			
1.6 μM	81%	17%			2%
3.125 μM	82%	16%	2%		

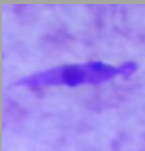
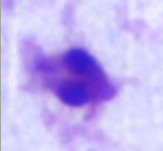
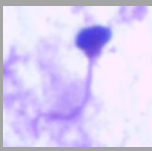
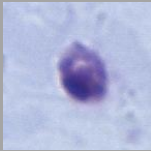
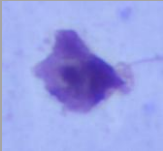
6.25 µM	64%	5%	4%	27%	
12.5 µM	10%		5%	85%	
25 µM			24%	76%	
NHC4					
0.8 µM	82%	18%			
1.6 µM	90%	8%	1%		1%
3.125 µM	93%	7%			
6.25 µM	73%	4%	7%	15%	1%
12.5 µM	3%	2%	11%	80%	4%
25 µM			78%	22%	
NHC5					
0.8 µM	83%	17%			
1.6 µM	81%	19%			
3.125 µM	91%	9%			
6.25 µM	74%	6%	2%	18%	
12.5 µM	4%	3%	5%	88%	
25 µM			97%		3%
NHC6					
0.8 µM	90%	10%			
1.6 µM	89%	9%		2%	
3.125 µM	88%	10%		2%	
6.25 µM	87%	10%	2%	1%	
12.5 µM	90%	6%	1%	1%	2%
25 µM	29%			71%	

Para *L. (V.) braziliensis* (**Tabela 5**) observou-se menor porcentagem de células em divisão, tanto no controle quanto nas diferentes concentrações de tratamento. A forma arredondada sem flagelo também se mostrou mais rara em relação à *L. (L.) amazonensis*. De maneira geral, o padrão de alterações morfológicas entre as espécies se mostraram semelhantes, porém algumas diferenças podem ser apontadas com a incubação com NHC2, NHC4 e NHC6.

A concentração de 12.5µM do NHC2 foi o suficiente para alterar 82% das células de *L. (L.) amazonensis*, mas somente 20% das células de *L. (V.) braziliensis*, refletindo menor sensibilidade de *L. (V.) braziliensis* no ensaio de viabilidade celular.

Na concentração de 25µM, 100% e 96% das células apresentaram alterações, respectivamente. Porém, o que se observa com NHC4 é que 69% das células de *L. (V.) braziliensis* se mostraram alteradas na concentração de 6.25µM, contra 23% das células de *L. (L.) amazonensis*. Já o NHC6 se mostrou igualmente menos eficiente contra *L. (V.) braziliensis*, alterando somente 31% das células na maior concentração.

Tabela 5. Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* após 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos testados NHC(2-6) (n = 150 promastigotas por condição).

					
	Fusiforme	Em divisão	Espermatozoite- like	Arredondado	Aberrante
Controle	96%	4%			
NHC2					
0.8 µM	98%	2%			
1.6 µM	99%				1%
3.125 µM	98%	2%			
6.25 µM	94%	6%			
12.5 µM	75%	5%	17%	3%	
25 µM	4%		89%		7%
NHC3					
0.8 µM	97%	3%			
1.6 µM	98%	2%			
3.125 µM	96%	4%			
6.25 µM	92%	2%	3%	1%	2%
12.5 µM	3%		94%		3%
25 µM			100%		
NHC4					
0.8 µM	95%	5%			
1.6 µM	86%	8%	6%		
3.125 µM	88%	2%	10%		
6.25 µM	31%		62%		7%

12.5 μM	8%		90%		2%
25 μM	3%		94%		3%
NHC5					
0.8 μM	98%	2%			
1.6 μM	97%	2%	1%		
3.125 μM	93%	3%	4%		
6.25 μM	87%		13%		
12.5 μM	16%	2%	76%		6%
25 μM			100%		
NHC6					
0.8 μM	97%	3%			
1.6 μM	97%	3%			
3.125 μM	91%	3%	3%	1%	2%
6.25 μM	96%	4%			
12.5 μM	95%	2%	2%		1%
25 μM	67%	2%	30%		1%

Ainda que se tenha contado pelo menos 150 células, a quantidade de campos necessários para atingir esse número foi aumentando de acordo com a concentração, visto que muitas células morrem e restam os debris celulares (**Figura 22D**). Na literatura, diversos estudos relatam alterações morfológicas causadas por diferentes compostos. Lorete-Terra e colaboradores demonstraram alterações na forma e tamanho do corpo celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, bem como a ocorrência de flagelo duplo, invaginação, arredondamento e aberrações no corpo celular do parasita quando tratados com complexos de Co(II).^{88, 89}

Outro estudo realizado com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratados com diferentes chalconas sintéticas demonstrou alterações ultraestruturais nas mitocôndrias, vacuolização intensa, dois núcleos com arredondamento dos parasitas e encolhimento celular e nuclear. Também foram reportadas mudanças ultraestruturais e morfológicas, sugerindo que as chalconas induzem morte celular semelhante à apoptose.⁹⁰

De fato, estímulos que induzem a morte celular apoptose-like em *Leishmania* incluem arredondamento celular, encolhimento celular, alterações da membrana plasmática com manutenção de sua integridade, modificações

mitocondriais, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e fragmentação de DNA.⁹¹ Ao contrário, morte celular por necrose é morfologicamente caracterizada por ganho de volume celular, aumento das organelas e ruptura da membrana plasmática com consequente perda do conteúdo intracelular.⁹²

Tendo observado as alterações morfológicas e levando em consideração a morte celular apoptose-like, questionamos se os compostos poderiam estar interferindo na permeabilidade da membrana plasmática dos promastigotas de *Leishmania*.

5.2.3 Avaliação da permeabilidade da membrana celular

Para responder se um dos mecanismos de ação dos compostos poderia ser a interferência na permeabilidade da membrana celular, 5×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram incubados com a EC50 do composto NHC3 por 15 e 25 minutos para avaliar alterações de curto prazo e com a EC25 e EC50 por 24h para avaliar alterações de longo prazo. A escolha desse composto em específico se deve ao melhor IS observado para ambas as espécies (**Tabela 3**).

O ensaio consistiu na detecção de fluorescência emitida após o influxo de brometo de etídeo, um intercalante de DNA. A entrada da molécula ocorre caso a membrana celular apresente aumento da permeabilidade celular, indicando a existência de poros ou perda de integridade membranar. O ensaio é finalizado com a adição de digitonina, que atua como detergente e lisa por completo a membrana celular, gerando o pico máximo de fluorescência (**Figura 23**).

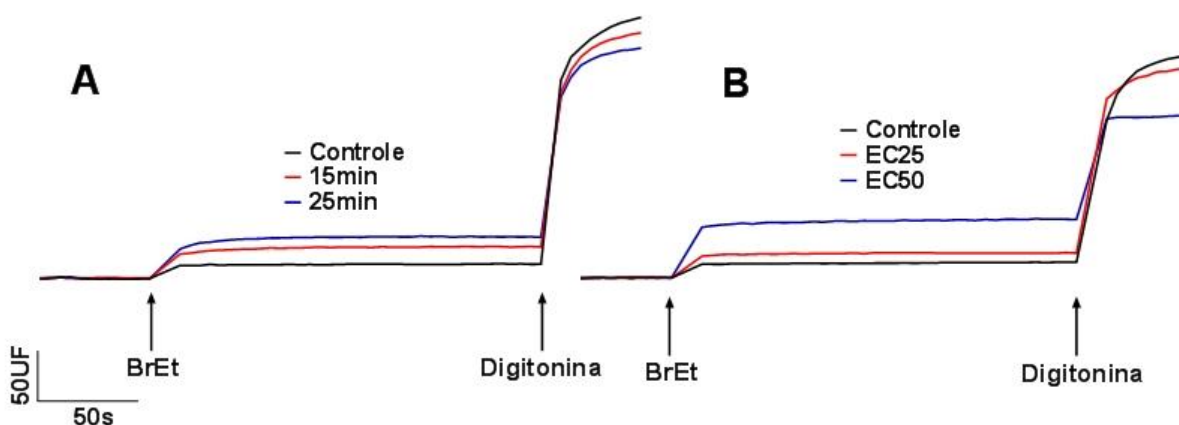


Figura 22. Permeabilidade de membrana celular. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (5×10^6 /mL) foram incubados em triplicata com (A) a EC50 do composto NHC3 por 15 e 25 minutos e com (B) a EC25 e EC50 por 24 horas. Setas indicam o momento da adição do brometo de etídeo (BrEt) e da digitonina; barra de escala indica as Unidades de Fluorescência (UF) pelo tempo do ensaio (segundos).

Nossos resultados mostram um aumento de 30% e 50% na permeabilidade de membrana celular após 15 min e 25 min de incubação, respectivamente, com a EC50 do composto NHC3 (**Figura 23A**). Com 24h de incubação, observou-se um aumento de 20% e 86% na permeabilidade com as concentrações de EC25 e EC50, respectivamente (**Figura 23B**). Esses resultados mostram atividade concentração- e tempo-dependente e apontam um possível mecanismo de ação do composto testado nesse ensaio.

Minori e colaboradores também demonstraram alterações na permeabilidade da membrana celular de promastigotas e amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis* tratados com a EC50 de complexos de Au^I e Au^{III} . O candidato mais efetivo, um complexo de Au^{III} coordenado a um esqueleto bidentado N^N (**Figura 16B**), causou um aumento de ~50% na permeabilidade de promastigotas após 3h de incubação.⁷¹

Outro estudo com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* demonstrou a indução de uma morfologia arredondada dependente da concentração de auranofina após 5h de incubação. Os autores discutem que esse fenótipo pode ser atribuído à inibição da tripanotona redutase e ao aumento da permeabilidade de membrana, que levam a uma resposta semelhante a apoptose. Também relatam um aumento da atividade semelhante à caspase 3/7 e fragmentação do DNA após a exposição à auranofina.⁹³

No estudo de Mello et al., arredondamento, encolhimento e condensação citoplasmática foram observados em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* após 24-96h de incubação com chalconas sintéticas. Formas aberrantes também foram observadas devido à retração da membrana plasmática no corpo celular que podem indicar o início da formação de corpos celulares apoptóticos. Também observaram aumento de ~60% na permeabilidade celular após 96h de incubação.⁹⁰ Ressalta-se aqui que essas alterações são características dos processos de morte celular por apoptose.

Um estudo conduzido por Khan et al. demonstrou o potencial da droga hirudina de induzir morte celular por apoptose-like em promastigotas de *L. (L.) tropica*. Seus resultados demonstraram aumento na permeabilidade de membrana, além de condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Aparentemente, seu mecanismo de ação pode estar ligado à alta afinidade pela GP63, uma das principais moléculas de superfície em promastigotas de *Leishmania*.⁹⁴ Interessantemente, a GP63 é uma metaloprotease Zn-dependente com importante papel na virulência parasitária que poderia ser alvo dos compostos de Au^I, já que possuem alta afinidade pelo sítio de ligação do zinco.

A identificação de compostos que induzem a morte celular por mecanismo apoptose-like em *Leishmania* parece ser uma estratégia terapêutica interessante, pois proporcionaria a eliminação do parasito sem induzir inflamação ou prejudicar o hospedeiro.⁹⁰

5.3 Infecções *in vitro*

Para avaliar a eficácia dos compostos contra a forma amastigota intracelular, BMDM foram infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e incubados com diferentes concentrações dos compostos por 24h.

Os parâmetros avaliados incluíram a porcentagem de macrófagos infectados (taxa de infecção) e a carga parasitária (número de amastigotas intracelulares a cada 100 macrófagos contados); a multiplicação desses parâmetros nos forneceu o índice de infectividade. Os resultados foram representados pela porcentagem de redução dos parâmetros em relação ao controle, ou seja, quanto cada concentração de cada composto reduziu cada parâmetro em relação ao controle (100%).

5.3.1 Infecção com *L. (L.) amazonensis*

Após a adesão de 4×10^5 macrófagos BMDM em lamínulas, a infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (5:1) foi mantida por 16h. Após esse período, 20, 10 e 5 μM de cada composto foram incubados por 24 h. Em seguida, os macrófagos foram fixados com metanol e corados com o kit Instant Prov para contagem de, no mínimo, 300 macrófagos por lamínula com o auxílio do microscópio óptico (**Figura 24**).

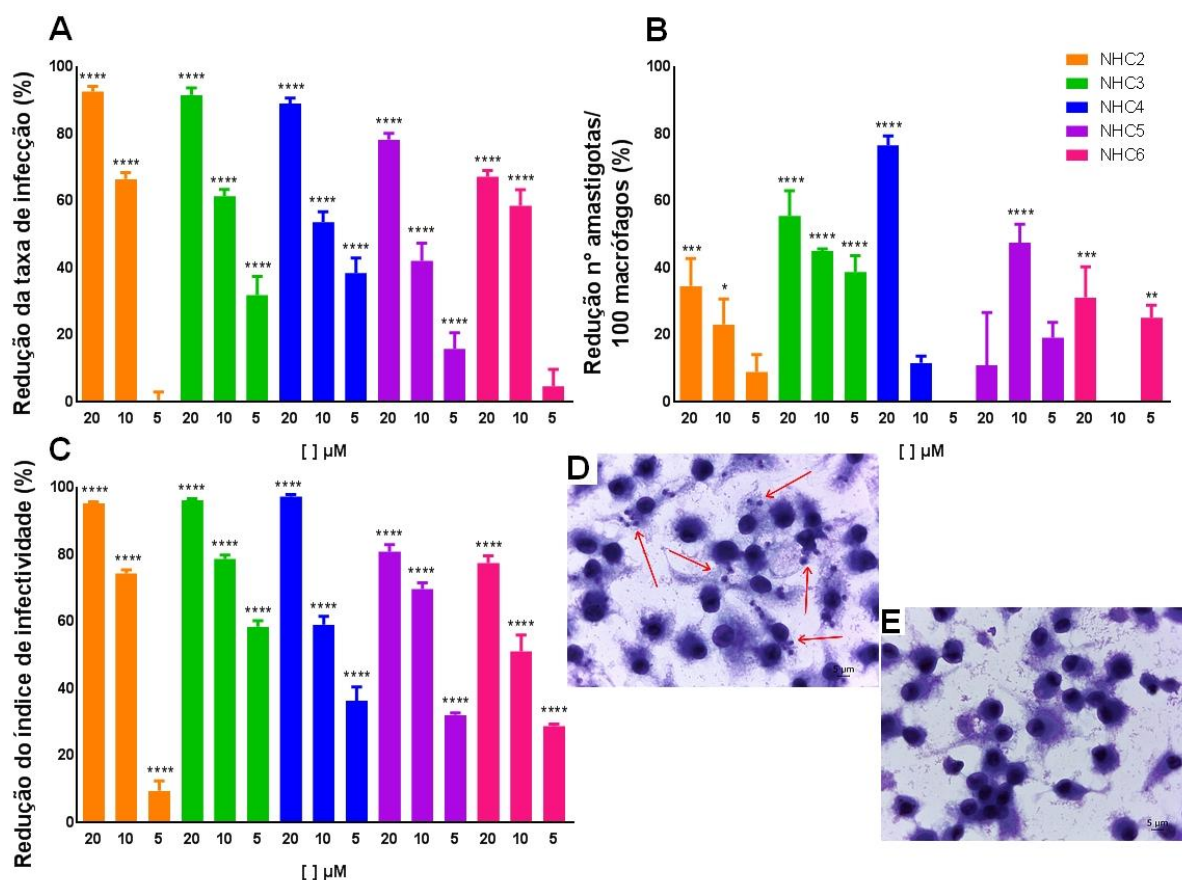


Figura 23. Parâmetros avaliados na infecção *in vitro* com *L. (L.) amazonensis*. BMDM foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5:1 e então incubados com os compostos NHC(2-6). Os resultados apresentados são representativos de dois ensaios independentes realizados em triplicata. Gráficos representam a porcentagem de redução da (A) taxa de infecção, (B) número de amastigotas a cada 100 macrófagos e (C) índice de infectividade em relação ao controle não tratado. As células fixadas e coradas foram contadas e fotografadas: (D) controle não tratado (setas apontam amastigotas intracelulares) e (E) tratado com 20 μM do composto NHC3. Ordinary One Way ANOVA foi aplicado como teste estatístico comparando cada concentração com o controle não tratado: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Foi possível observar uma redução de ~90% da taxa de infecção para os compostos NHC(2-4), ~80% para NHC5 e ~70% para NHC6 na concentração de 20 μM. Com exceção de 5 μM para NHC(2 e 6), todas as demais concentrações reduziram significativamente a taxa de infecção (**Figura 24A**). Quanto à carga parasitária (**Figura 24B**), o composto NHC4 apresentou o melhor resultado, com redução superior a 75% na maior concentração, embora todos os compostos tenham apresentado redução significativa em relação ao controle a 20 μM. As reduções observadas no índice de infectividade (**Figura 24C**) refletem os resultados

discutidos anteriormente e indicam uma tendência concentração-dependente de ação dos compostos contra os amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

5.3.2 Infecção com *L. (V.) braziliensis*

Após a adesão de 4×10^5 macrófagos BMDM em lamínulas, a infecção com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (10:1) foi mantida *overnight*. Após esse período, 20, 10 e 5 μ M de cada composto foram incubados por 24h. Em seguida, os macrófagos foram fixados com metanol e corados com o kit Instant Prov para contagem de, no mínimo, 300 macrófagos por lamínula com o auxílio do microscópio óptico (**Figura 25**).

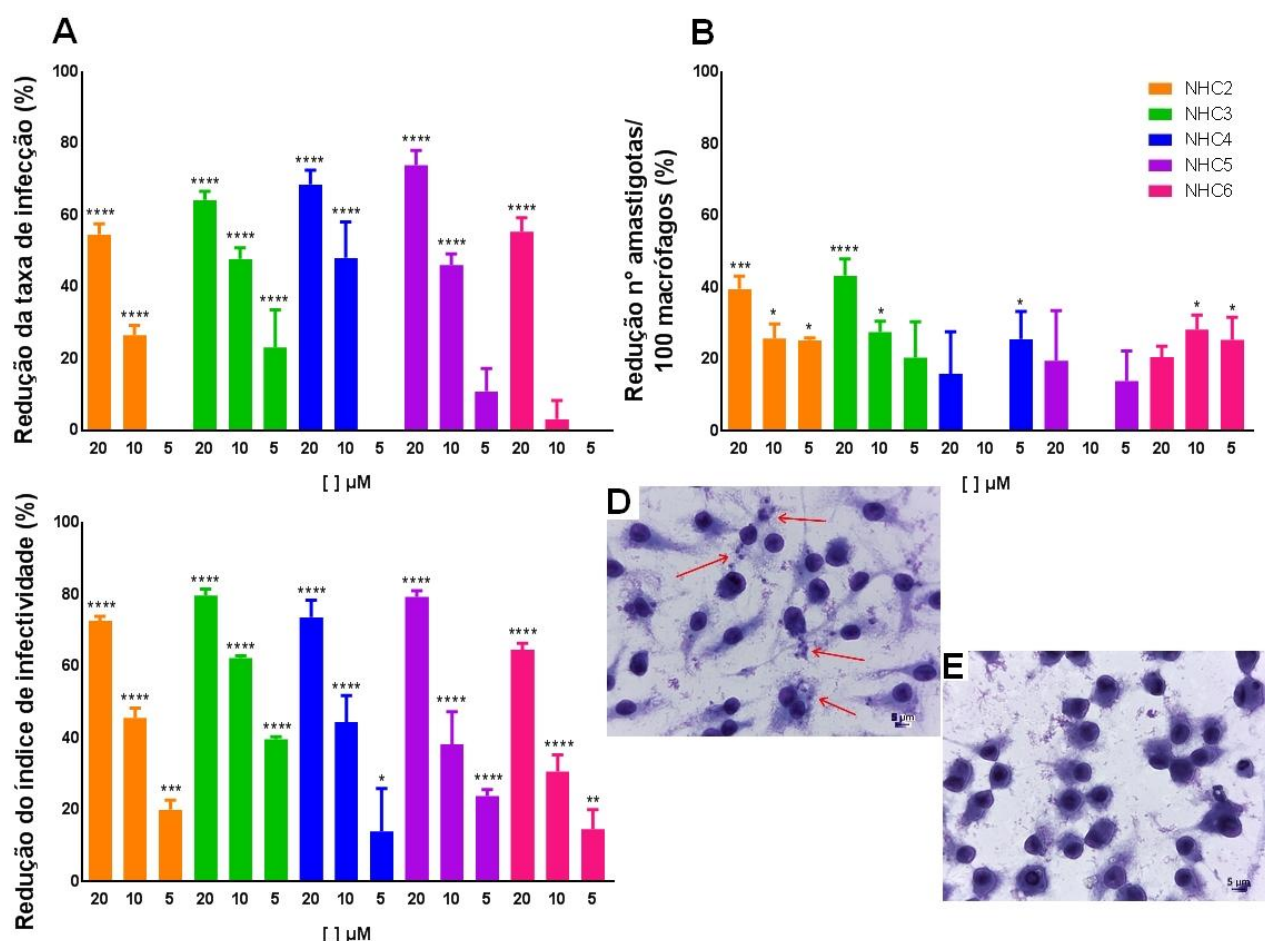


Figura 24. Parâmetros avaliados na infecção *in vitro* com *L. (V.) braziliensis*. BMDM foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* na proporção de 10:1 e então incubados com os compostos NHC(2-6). Os resultados apresentados são representativos de dois ensaios independentes realizados em triplicata. Gráficos representam a porcentagem de redução da (A) taxa de infecção, (B) número de amastigotas a cada 100 macrófagos e (C) índice de infectividade em relação ao controle não tratado. As células fixadas e coradas foram contadas e fotografadas: (D) controle não tratado (setas apontam amastigotas intracelulares) e (E) tratado

com 20 μM do composto NHC3. Ordinary One Way ANOVA foi aplicado como teste estatístico comparando cada concentração com o controle não tratado: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

É possível observar uma redução de ~75% da taxa de infecção para o composto NHC5, ~65% para os compostos NHC(3-4) e ~55% para NHC(2 e 6) na concentração de 20 μM . O composto NHC3 apresentou a melhor atividade, com uma redução significativa da taxa de infecção em todas as concentrações (**Figura 25A**). Nenhum composto reduziu a carga parasitária em mais de 50%, embora o NHC3 tenha reduzido 43% com 20 μM (**Figura 25B**). As reduções observadas no índice de infectividade (**Figura 25C**) também indicam uma tendência dose-dependente de ação dos compostos contra os amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*, reduzindo ~80% para os compostos NHC(3 e 5), 72% para NHC2 e 65% para NHC6 na maior concentração.

De maneira geral, os compostos com melhores IS para ambas as espécies (NHC3-5) apresentaram reduções significativas nos parâmetros avaliados na infecção *in vitro* e são candidatos leishmanicidas promissores. Porém, para melhor avaliar a carga parasitária, podemos observar o número absoluto de amastigotas, como mostrado na **Figura 26**.

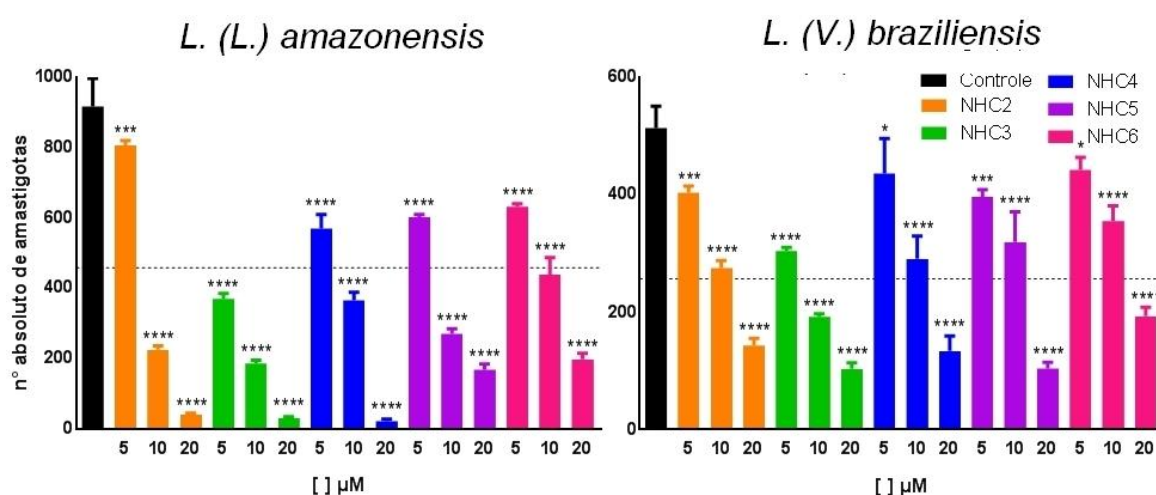


Figura 25. Número absoluto de amastigotas contados no ensaio de infecção *in vitro*. Linhas pontilhadas na horizontal marcam a metade do número de amastigotas contados no controle não tratado. Ordinary One Way ANOVA foi aplicado como teste estatístico comparando cada concentração com o controle não tratado: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Tal resultado nos mostra que a concentração de 10 μM de cada composto foi eficiente para reduzir mais da metade do número de amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, com uma redução bastante expressiva na maior concentração para NHC(2-4). Somente o composto NHC3 reduziu mais da metade da carga parasitária até mesmo na menor concentração. Para *L. (V.) braziliensis*, porém, somente a concentração de 20 μM foi capaz de reduzir mais da metade da carga parasitária, com exceção do composto NHC3, que também reduziu mais de 50% com 10 μM . Esses dados se mostram coerentes com os resultados dos testes de viabilidade celular.

A diferença entre as EC_{50} para promastigotas e amastigotas pode estar relacionada à maior dificuldade das moléculas de acessar o vacúolo parasitóforo no interior das células hospedeiras, além das reações/interações que os complexos sofrem nos diferentes meios de cultura utilizados nos ensaios. Chaves et al. discutem o envolvimento de mecanismos dependentes da célula hospedeira relacionados à ação das moléculas testadas, já que elas inicialmente dependem da captação/transporte através da membrana celular e do vacúolo parasitóforo para atingir amastigotas intracelulares.⁴⁴ Os trabalhos de Paloque et al. e Zhang et al. também apontaram diferenças na sensibilidade dos amastigotas em relação aos promastigotas, com melhores valores de IS para a forma intracelular.^{84, 85}

Chaves também aponta que a susceptibilidade a drogas em parasitas de *Leishmania* é espécie-específica e pode variar até mesmo entre cepas da mesma espécie como resultado de metabolismos distintos, mostrando que *L. (V.) braziliensis* foi menos sensível aos derivados de $\text{Au}(\text{PEt}_3)$ quando comparada a *L. (L.) infantum* e *L. (V.) guyanensis*, apresentando valores médios de EC_{50} de 7.3, 4.5 e 3.5 μM , respectivamente. Este fato direciona as pistas sobre o modo de ação dos complexos à base de ouro (I) antileishmania em direção às propriedades bioquímicas específicas de cada espécie.⁴⁴

Minori et al. também testou a eficácia de seus complexos contra amastigotas intracelulares e verificou diferenças na sensibilidade entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Essa diferença não foi demonstrada no ensaio de viabilidade contra promastigotas, mas ficou bastante evidente a maior sensibilidade de uma espécie em relação à outra na infecção *in vitro*.⁷¹

6 CONCLUSÃO

Com exceção do NHC1, todos os complexos Au^I-NHC aqui testados induziram um efeito antiproliferativo concentração-dependente em promastigotas, o estágio extracelular das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. A 25 µM, estes compostos de ouro induziram 100% de mortalidade contra promastigotas, enquanto concentrações inferiores determinaram atividade leishmanistática, com diferentes taxas de atividade de inibição para as duas espécies de *Leishmania*. Nessas concentrações subletais, os parasitas apresentaram inibição da motilidade e alterações morfológicas, não presentes nas células controle. No ensaio mecanístico do melhor candidato (NHC3), o aumento da permeabilidade de membrana sugere a ocorrência de eventos relacionados à morte celular do tipo apoptose. De maneira geral, todos os compostos se mostraram eficazes na redução da infecção intracelular, com diferenças de sensibilidade entre as espécies. Logo, os complexos de Au^I testados no presente trabalho se mostraram bastante promissores contra essa doença que precisa urgentemente de alternativas terapêuticas mais eficientes.

7 REFERÊNCIAS

1. Jones CM, Welburn SC. Leishmaniasis Beyond East Africa. *Front Vet Sci* 2021;8:618766.
2. Valero NNH, Uriarte M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitol Res* 2020;119(2):365-384.
3. Miguel DC, Brioschi MBC, Rosa LB, Minori K, Grazzia N. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect? *Trends in Parasitology* 2021;37(8):694-697.
4. World Health Organization. Leishmaniasis. WHO 2019. Disponível em <who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em maio de 2021.
5. Alcântara LM, Ferreira TC, Gadelha FR, Miguel DC. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Resist* 2018;8(3):430-439.
6. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
7. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(6):e0004770.
8. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Sci J* 2017;11:519.
9. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res* 2017;6(F1000 Faculty Rev):750.
10. Anversa L, Tiburcio MG, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras* 2018;64(3):281-289.
11. Miguel DC, Flannery AR, Mittra B, Andrews NW. Heme Uptake Mediated by LHR1 Is Essential for Leishmania amazonensis Virulence. *Infect Immun* 2013;81(10):3620-3626.
12. Rosa LB, Aires RL, Oliveira LS, Fontes JV, Miguel DC, Abbehausen C. A “Golden Age” for the discovery of new antileishmanial agents: Current status of leishmanicidal gold complexes and prospective targets beyond the trypanothione system. *Chem Med Chem* 2021;16(11):1681-1695.
13. Sabzevari S, Mohebbali M, Hashemi SA. Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Parasites, Vectors and Reservoir Hosts in Endemic Foci of North Khorasan, Northeastern Iran - a Narrative Review. *J Med Microbiol Infect Dis* 2020;8(2):40-44.
14. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Dermatologic Clinics* 2015;33(3):579-593.
15. Reis LLD, Balieiro AAdS, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017;50(5):638-645.
16. Azevedo TSd, Lorenz C, Chiaravalloti-Neto F. Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019;52:e20190240.

17. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. In: Governo Federal; 2020. Disponível em <antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Gr-ficos-e-Mapas.pdf>. Acesso em maio de 2021.
18. Bi K, Chen Y, Zhao S, Kuang Y, Wu C-HJ. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. Biomed Res Int 2018; 9872095.
19. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde: leishmaniose visceral. In: Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, editor. 1 ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2016. p. 1-25. Disponível em <portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf>. Acesso em maio de 2021.
20. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet 2018;392(10151):951-970.
21. Christensen SM, Belew AT, El-Sayed NM, Tafuri WL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis 2019;13(3):e0007152.
22. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar (LT). In: Governo Federal; 2020. Disponível em <antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Gr-ficos-e-Mapas.pdf>. Acesso em maio de 2021.
23. Membrive NA, Kazuma FJ, Silveira TGV, Teixeira JJV, Reinhold-Castro KR, Teodoro U. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2017;59:e37.
24. Benevides L. Leishmanioses. In: Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2013. Disponível em <lineu.icb.usp.br/~farmacia/ppt/Leishmania.pdf>. Acesso em abril de 2021.
25. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. Infect Dis Clin N Am 2019;33:101-117.
26. Sundar S, Chakravarty J, Meena LP. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. Expert Opin Orphan D 2018;1-10.
27. Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Faioes VdS, Martins TP, Silva RL, Leon LL, et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. Front Biosci 2018;23:967-996.
28. Capela R, Moreira R, Lopes F. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. Int J Mol Sci 2019;20(22) 5748.
29. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. In: Brasília, DF; 2017. Disponível em <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em maio de 2021.
30. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, et al. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. J Biol Chem 2004;279:31010-31017.
31. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis 2017;11(12):e0006052.
32. Demicheli C, Frézard F, Mangrum JB, Farrell NP. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. Chemical communications (Cambridge, England) 2008(39):4828-4830.
33. Pita SSdR, Pascutti PG. Therapeutic targets in Chagas's disease: a focus on trypanothione reductase. Rev Virtual Quim 2011;3(4):307-324.

34. Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica* 2017;172:86-90.
35. Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. 2017;389(10066):312-325.
36. Ong YC, Roy S, Andrews PC, Gasser G. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. *Chem Rev* 2018;119(2):730-796.
37. El-khadragy M, Alolayan EM, Metwally DM, El-Din MFS, Alobud SS, Alsultan NI, et al. Clinical Efficacy Associated with Enhanced Antioxidant Enzyme Activities of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Moringa oleifera* Leaf Extract, Against Cutaneous Leishmaniasis in a Murine Model of *Leishmania major*. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(5):1037.
38. Lima NMA, Bezerra TT, Almeida MO, Rodrigues NLdC, Braga CHC, Miranda JIS, et al. Photodynamic effect of palladium porphyrin derived from cashew nut shell liquid against promastigote forms of *Leishmania braziliensis*. *Photodiagn Photodyn Ther* 2021;33:102083.
39. Ghasemi E, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sadraei J. In-vitro and In-vivo Antileishmanial Activity of a Compound Derived of Platinum, Oxaliplatin, against Leishmania Major. *Iran J Pharm Res* 2019;18(4):2028-2041.
40. Méndez-Arriaga JM, Rodríguez-Diéguez A, Sánchez-Moreno M. In vitro leishmanicidal activity of copper (II) 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine complex and analogous transition metal series. *Polyhedron* 2020;176:114272.
41. Reena K, Prabakaran M, Leeba B, Gajendiran M, Antony SA. Green Synthesis of Pectin-Gold-PLA-PEG-PLA Nanoconjugates: In Vitro Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Activity. *J Nanosci Nanotechnol* 2017;17(7):4762-4770.
42. Pérez SA, Haro Cd, Vicente C, Donaire A, Zamora A, Zajac J, et al. New Acridine Thiourea Gold(I) Anticancer Agents: Targeting the Nucleus and Inhibiting Vasculogenic Mimicry. *ACS Chem Biol* 2017;12(6):1524-1537.
43. Capparelli EV, Bricker-Ford R, Rogers MJ, McKerrow JH, Reed SL. Phase I Clinical Trial Results of Auranofin, a Novel Antiparasitic Agent. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e01947-16.
44. Chaves JDS, Tunes LG, Franco CHdJ, Francisco TM, Corrêa CC, Murta SMF, et al. Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 2017;127:727-739.
45. Colotti G, Ilari A, Fiorillo A, Baiocco P, Cinellu MA, Maiore L, et al. Metal-based compounds as prospective antileishmanial agents: inhibition of trypanothione reductase by selected gold complexes. *ChemMedChem* 2013;8(10):1634-1637.
46. Ott I. Chapter Four - Metal N-heterocyclic carbene complexes in medicinal chemistry. *Adv Inorg Chem* 2020:121-148.
47. Bertrand B, Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans* 2014;43(11):4209-4219.
48. Sutton BM. Gold compounds for rheumatoid arthritis. *Gold Bulletin* 1986;19(1):15-16.
49. Roder C, Thomson MJ. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* 2015;15(1):13-20.
50. Dominelli B, Correia JDG, Kühn FE. Medicinal Applications of Gold(I/III)-Based Complexes Bearing N-Heterocyclic Carbene and Phosphine Ligands. *J Organomet Chem* 2018;866:153-164.

51. Pearson RG. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc* 1963;85(22):3533-3539.
52. Schmidt C, Karge B, Misgeld R, Prokop A, Franke R, Brönstrup M, et al. Gold(I) NHC complexes: antiproliferative activity, cellular uptake, inhibition of mammalian and bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive directed antibacterial effects. *Chem Eur J* 2017;23(8):1869-1880.
53. Gandin V, Fernandes AP, Rigobello MP, Dani B, Sorrentino F, Tisato F, et al. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol* 2010;79(2):90-101.
54. Massai L, Messori L, Micale N, Schirmeister T, Maes L, Fregona D, et al. Gold compounds as cysteine protease inhibitors: perspectives for pharmaceutical application as antiparasitic agents. *Biometals* 2017;30(2):313-320.
55. Abbehausen C, Peterson EJ, Paiva REFd, Corbi PP, Formiga ALB, Qu Y, et al. Gold(I)-phosphine-N-heterocycles: Biological activity and specific (ligand) interactions on the C-terminal HIVNCp7 zinc finger. *Inorg Chem* 2013;52(19):11280-11287.
56. Massai L, Grguric-Sipka S, Liu W, Bertrand B, Pratesi A. Editorial: The Golden Future in Medicinal Chemistry: Perspectives and Resources From Old and New Gold-Based Drug Candidates. *Front Chem* 2021;9:665244.
57. Sze, JH; Raninga, PV; Nakamura, K; Casey, M; Khanna, KK; Berners-Price, SJ. et al. Anticancer activity of a Gold(I) phosphine thioredoxin reductase inhibitor in multiple myeloma. *Redox Biol* . 2020;28:101310.
58. Zhang X, Selvaraju K, Saei AA, D'Arcy P, Zubarev RA, Arnér ES, et al. Repurposing of auranofin: Thioredoxin reductase remains a primary target of the drug. *Biochimie* 2019;162:46-54.
59. Singh MP, Mishra M, Khan AB, Ramdas SL, Panjiyar S. Gold treatment for kala-azar. *BMJ* 1989;299(6711):1318.
60. Buffon R. Catálise por Compostos de Coordenação. *Revista Chemkeys* 2002(10): 1-42.
61. Gil-Rubio J, Vicente J. The Coordination and Supramolecular Chemistry of Gold Metalloligands. *Chem Eur J* 2018;24:32-46.
62. Wurm T, Asiri AM, Hashmi ASK. N-Heterocyclic Carbenes: Effective Tools for Organometallic Synthesis. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2014.
63. Laguna A. Modern Supramolecular Gold Chemistry: Gold-Metal Interactions and Applications: Wiley-VCH; 2008.
64. Pastre JC, Correia CRD. Catalisadores contendo carbenos n-heterocíclicos como ligantes: propriedades, sínteses, aplicações e comparação com outros ligantes. *Quím Nova* 2008;31(4):872-884.
65. Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J Med Chem* 2009;52(8):2603-2612.
66. Ilari A, Baiocco P, Messori L, Fiorillo A, Boffi A, Gramiccia M, et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* 2012;42(2-3):803-811.
67. Abbehausen C. Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds – an update. *Metallomics* 2019;11(1):15-28.

68. Frézard F, Silva H, Pimenta AMdC, Farrell N, Demicheli C. Greater binding affinity of trivalent antimony to a CCCH zinc finger domain compared to a CCHC domain of kinetoplastid proteins. *Metallomics* 2012;4(5):433-440.
69. Wenzel MN, Meier-Menches SM, Williams TL, Rämisch E, Barone G, Casini A. Selective targeting of PARP-1 zinc finger recognition domains with Au(III) organometallics. *Chem Commun* 2017;54(6):611-614.
70. Paiva REFd. Gold(I,III) complexes designed for selective targeting and inhibition of zinc finger proteins: Springer Thesis; 2017.
71. Minori K, Rosa LB, Bonsignore R, Casini A, Miguel DC. Comparing the antileishmanial activity of gold(I) and gold(III) compounds in *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in vitro. *ChemMedChem* 2020;15(22):2146-2150.
72. Bantreil X, Nolan SP. Synthesis of N-heterocyclic carbene ligands and derived ruthenium olefin metathesis catalysts. *Nature Protocols* 2011;6(1):69-77.
73. Chang Y-C, Chang M-F, Lee Y-C, Hong F-E. Heteroatom-Substituted Secondary Phosphine Oxides for Suzuki-Miyaura Cross-coupling Reactions. *J Organomet Chem* 2016;808:23-33
74. Dieck Ht, Rieger HJ, Fendesak G. Diazadiene complexes of Group 4 metals. I. Synthesis of mono-, bis- and tris(diazadiene)titanium complexes and the structure of diazadienedichlorotitanium. *Inorganica Chimica Acta* 1990;177:191-197.
75. Collado A, Gómez-Suárez A, Martin AR, Slawin AMZ, Nolan SP. Straightforward synthesis of [Au(NHC)X] (NHC = N-heterocyclic carbene, X = Cl, Br, I) complexes. *Chem Commun* 2013(49):5541-5543.
76. de Frémont P, Scott NM, Stevens ED, Nolan SP. Synthesis and Structural Characterization of N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes. *Organometallics* 2005(24):2411-2418.
77. Grazzia N, Boaventura S, Garcia VL, Gadelha FR, Miguel DC. Dihydroartemisinin, an active metabolite of artemisinin, interferes with *Leishmania braziliensis* mitochondrial bioenergetics and survival. *Parasitology Research* 2021;120(2):705-713.
78. Navabi A, Soleimanifard S. Enzymatic Characterization of Acid Phosphatase in the Logarithmic and Stationary Phase of *Leishmania major* Promastigotes. *Shiraz Med J* 2015;16(1):e26246.
79. Van den Kerkhof M, Van Bockstal L, Gielis JF, Delputte P, Cos P, Maes L, et al. Impact of primary mouse macrophage cell types on *Leishmania* infection and in vitro drug susceptibility. *Parasitology Research* 2018;117(11):3601-3612.
80. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018(6):469-471.
81. Beletsky IP, Umansky SR. A new assay for cell death. *J Immunol Methods* 1990;134(2):201-205.
82. GHIT Fund. Global Health Innovative Technology Fund. 2021. Disponível em <ghitfund.org/>. Acesso em maio de 2021.
83. Al-Majid A, Yousuf S, Choudhary M, Nahra F, Nolan S. Gold-NHC complexes as potent bioactive compounds. *ChemistrySelect* 2020;1(1):76-80.
84. Paloque L, Hemmert C, Valentin A, Gornitzka H. Synthesis, characterization, and antileishmanial activities of gold(I) complexes involving quinoline functionalized N-heterocyclic carbenes. *Eur J Med Chem* 2015;94:22-29.
85. Zhang C, Delmas SB, Álvarez ÁF, Valentin A, Hemmert C, Gornitzka H. Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of neutral N-

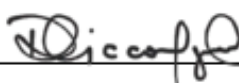
- heterocyclic carbenes gold(I) complexes. Eur J Med Chem 2018;143:1635-1643.
86. Antwi CA, Amisigo CM, Adjimani JP, Gwira TM. In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis 2019;13(2):e0007206.
 87. Don R, Ioset J-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 2014;141:140-146.
 88. Lorete-Terra A, da Matta R, Santana Filho C, Fernandes C, Horn Junior A, de Souza W, et al. *In vitro* activity on *Leishmania amazonensis* promastigote forms of a new Co(II) coordination complex. Braz J Dev 2021;7(2):14653-14668.
 89. Lorete-Terra A, da Matta R, Santana Filho C, Fernandes C, Horn Junior A, de Souza W, et al. Evaluation of ultrastructural changes and cell death on *Leishmania amazonensis* promastigote forms induced by a new coordinated complex Co(II). Braz J Dev 2021;7(2):20106-20118.
 90. Mello TFPd, Cardoso BM, Bitencourt HR, Donatti L, Aristides SMA, Lonardoni MVC, et al. Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. Exp Parasitol 2016;160:23-30.
 91. Basmaciyan L, Casanova M. Cell death in *Leishmania*. Parasite 2019;26:1-13.
 92. Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, MacLeod ET, Lüder CGK, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. Parasit Vectors 2010;3:104.
 93. Sharlow ER, Leimgruber S, Murray S, Lira A, Sciotti RJ, Hickman M, et al. Aurano-fin Is an Apoptosis-Simulating Agent with in Vitro and in Vivo Anti-leishmanial Activity. ACS Chem Biol 2014;9(3):663-672.
 94. Khan H, Nadhman A, Azam SS, Anees M, Imran Khan IU, Sohail MF, et al. In vitro antileishmanial potential of peptide drug hirudin. Chem Biol Drug Des 2017;89:67-73.

ANEXO A - Declaração de direitos autorais**DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada **ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS CARBENOS N-HETEROCÍCLICOS DE Au(I) EM *Leishmania* sp.**, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de outubro de 2021.

Assinatura:  _____
Nome da autora: Leticia Bazilio Rosa
RG 43.705.743-4

Assinatura:  _____
Nome do orientador: Danilo Ciccone Miguel
RG 27.895.647-6

ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



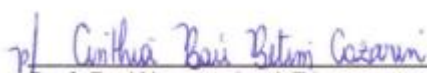
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Potenciais inibidores da Leishmania: da síntese à atividade antiparasitária**, registrada com o nº **5389-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel e Leticia Bazilio Rosa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **10/10/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	30/09/2019 a 30/06/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/10/2019 a 30/06/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	Fêmeas
Origem:	CEMIB - Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 18 de outubro de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.