



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

CURSO BIOMEDICINA

GABRIELA BITTENCOURT GRIMALDI

**APLICAÇÃO DE UM ENSAIO DE ANÁLISE DE IMAGEM
AUTOMATIZADO PARA A TRIAGEM DE MOLÉCULAS CONTRA
AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis***

SALVADOR – BA

2019

GABRIELA BITTENCOURT GRIMALDI

**APLICAÇÃO DE UM ENSAIO DE ANÁLISE DE IMAGEM
AUTOMATIZADO PARA A TRIAGEM DE MOLÉCULAS
CONTRA AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha

SALVADOR – BA

2019

GABRIELA BITTENCOURT GRIMALDI

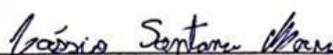
**APLICAÇÃO DE UM ENSAIO DE ANÁLISE DE IMAGEM AUTOMATIZADO
PARA A TRIAGEM DE MOLÉCULAS CONTRA AMASTIGOTAS DE
*Leishmania amazonensis***

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 09 de novembro de 2019.



Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha
INSTITUTO GONÇALO MONIZ- BA



Dr. Cássio Santana Meira
INSTITUTO GONÇALO MONIZ- BA



Prof. Dr. Amâncio José de Souza
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.*

-Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer ao meu orientador Vinícius por ter aceitado essa jornada longa me orientando na bancada, com bastante paciência, discutindo artigos, experimentos, sempre estimulando meus pensamentos críticos e científicos. Além de tudo, o mais importante é que ele me deu total confiança e segurança para desenvolver meu projeto, fez de tudo para que eu enfrentasse os meus medos e encarasse a vida profissional.

Agradeço também à Dra. Milena Soares chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, FIOCRUZ-BA, por ter me recebido em seu laboratório, dado a oportunidade de fazer iniciação científica e desenvolver esse projeto em um laboratório bem equipado com a infraestrutura necessária para que tudo ocorresse.

À Arlene Lessa, Jacqueline Silva, Márcio Santos, Dra. Adriana Rangel e Dr. Cláudio Figueira, responsáveis pela Plataforma de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA, por me auxiliarem com os experimentos, por toda paciência e dedicação que sempre tiveram comigo.

À Dra. Tanira Bastos por todo o apoio no laboratório e parcerias em experimentos;

À Ivanilson Pimenta, Gabriele Martins, Gabriela Sampaio, Patrícia Kauanna, Breno Cardim, Thaís Santana, Girlaine Café, Pamela Daltro, Jadson Borges, Paula Ladeia, Carine Azevedo, Tiago Pereira, Alexandra Neuenschwander, Rute Ribeiro, Roquelina Assis, Roseane Barreto, Anna Ritt, Karoline Felix e todos os meus amigos e colegas de laboratório que estiveram comigo todo esse tempo me ensinando e compartilhando suas experiências;

À Antônio, porteiro da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, unidade cabula, por sempre alegrar os meus dias quando eu chegava na faculdade;

À maioria dos meus professores da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, que me apoiaram muito durante a minha carreira acadêmica e científica, e me deram oportunidades incríveis de aprendizado;

Ao pessoal do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, HOSPITAL SÃO RAFAEL pelo acolhimento e parceria;

À todos do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, FIOCRUZ-BA;

Aos órgãos de fomento FAPESB, CAPES, CNPQ, FINEP, FIOCRUZ;

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitida por flebótomos fêmeas. A doença apresenta alta morbidade e mortalidade, sendo de grande importância para a saúde pública. O tratamento com os antimoniais pentavalentes está associado a alta toxicidade e à falha terapêutica. Assim, a descoberta de novos fármacos é extremamente importante para o desenvolvimento do tratamento contra a doença. Diante disso, validamos e aplicamos um ensaio de análise automatizada de imagem na triagem de moléculas com potencial anti-*Leishmania*. Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento. O tratamento com as moléculas em teste foi realizado durante 72 horas, na concentração máxima de 10 μ M. As células foram fixadas e marcadas com *Hoechst33342*. Imagens de fluorescência foram adquiridas utilizando o *Operetta High Content System*. As imagens foram submetidas à um algoritmo de segmentação e quantificação parasitária padronizado. O número de células foi utilizado como parâmetro de toxicidade e a porcentagem da redução de amastigotas como parâmetro da atividade leishmanicida. Moléculas com estrutura *N-acil-hidrazona*, tiazolidinonas, tiossemicarvazida e derivados halogenados de flavonóides diméricos, foram triadas. Ao todo foram avaliados 109 compostos puros. Setenta e seis por cento das moléculas da classe das tiazolidinonas apresentaram atividade antiparasitária superior a 50%, sendo que dezessete moléculas apresentaram 100% de da atividade leishmanicida, sem toxicidade aos macrófagos. Entretanto o composto mais ativo não foi eficaz no tratamento de camundongos infectados com *L. amazonensis*. Derivados halogenados de flavonóides diméricos apresentaram atividade anti-*Leishmania* e seletividade contra o parasito. Moléculas *N-acil-hidrazonas* e tiossemicarvazida não apresentaram atividade biológica significativa. O ensaio automatizado aplicado neste trabalho representa uma ferramenta promissora para a triagem de moléculas com potencial farmacológico contra *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania*, Moléculas, Triagem.

ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of infectious diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and transmitted by female sandflies. This disease shows high morbidity and mortality, so, the study of this illness represents a significant importance to public health. The treatment using pentavalent antimonials is associated with a high toxicity and therapeutic failure. Thus, it is necessary to consider that it is extremely important to develop new molecules against leishmaniasis. Then, we standardized an automated image analysis assay to screen new molecules against the parasite. Peritoneal macrophages were collected from BALB/c mice and infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes in stationary growth phase. The experiments using the molecules lasted 72 hours, at the maximum concentration of 10 μ M. The cells were fixed and stained with *Hoechst33342*. Fluorescent images were acquired by Operetta High Content System. The images were submitted to segmentation of algorithm and standard parasite quantification. The number of cells were used as a parameter for toxicity and the percentage of amastigote reduction for leishmanicide activity parameter. Molecules with N-acil-hydrazone, thiazolidinediones, thiossemicarbazide and halogenated derivatives from dimeric flavonoids structure were screened. In total 109 pure compounds. Seventy six percent of the thiazolidinediones molecules showed more than 50% of antiparasitic activity, and seventeen molecules presented a hundred percent of anti-*Leishmania* activity without cytotoxicity. However, the most active compound wasn't effective in the treatment in infected mice with *L. amazonensis*. Halogenated derivatives from dimeric flavonoids presented anti-*Leishmania* activity and selectivity against the parasite. N-acil-hydrazones and thiossemicarbazides molecules didn't have a biological significance. The high content assay used in this work represents a promising instrument for screening of molecules with pharmacological potential.

Keywords: *Leishmania*, Molecules, Screening.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO.....	30
2.1 REVISTA: CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS	30
2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO	30
3 ANEXOS.....	37

1 ARTIGO CIENTÍFICO

APLICAÇÃO DE UM ENSAIO DE ANÁLISE DE IMAGEM AUTOMATIZADO PARA A TRIAGEM DE MOLÉCULAS CONTRA AMASTIGOTAS DE *Leishmania* *amazonensis*

APPLICATION OF AN AUTOMATED IMAGE ANALYSIS ASSAY TO THE SCREENING OF MOLECULES AGAINST *Leishmania amazonensis* AMASTIGOTES

Gabriela Bittencourt Grimaldi^{1,2}; Vinícius Pinto Costa Rocha²

¹ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador/BA, Brasil;

² Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (IGM/FIOCRUZ)

RESUMO: Introdução. As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam alta morbidade e mortalidade. O tratamento de primeira escolha é realizado com antimoniais pentavalentes e está associado à alta toxicidade e à falha terapêutica. Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos é importante para o tratamento dessas doenças. A contagem automatizada de células infectadas *in vitro* facilita a triagem de moléculas e constitui uma ferramenta importante na triagem de compostos contra o parasito. **Objetivo.** Validar e aplicar um ensaio automatizado de análise de imagens para avaliação de moléculas contra *Leishmania*. **Metodologia.** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* e tratados por 72 horas com os compostos na concentração máxima de 10µM. Alterações ultraestruturais nos parasitos intracelulares foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. A eficácia das moléculas *in vivo* foi avaliada em modelo murina de leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*. **Resultados.** *N-acil-hidrazona*, tiazolidinonas, tiossemicarvazida e flavonóides diméricos foram triadas, totalizando 109 compostos puros. As tiazolidinonas apresentaram atividade leishmanicida sem toxicidade à célula hospedeira. Derivados halogenados de flavonóides diméricos, apresentaram atividade anti-*Leishmania* e seletividade contra o parasito.

Moléculas com estrutura *N-acil-hidrazonas* e tiossemicarvazida não apresentaram atividade biológica significativa. Parasitos tratados com tiazolidinonas apresentaram alterações na membrana nuclear. Entretanto, a tiazolidinonas mais ativa *in vitro* não demonstrou eficácia *in vivo*. **Conclusão.** As tiazolidinonas apresentaram atividade significativa contra o parasito, assim como os derivados halogenados de flavonoides diméricos, associada à seletividade contra o parasito. O ensaio automatizado aplicado neste trabalho representa uma ferramenta promissora para a triagem de moléculas com potencial farmacológico anti-*Leishmania*.

Palavras chaves: *Leishmania*, Moléculas, Triagem.

Gabriela Bittencourt Grimaldi (gabrielagrimaldi16.1@bahiana.edu.br)

Rua Silveira Martins, nº 3386, Cabula /CEP: 41150-100

tel.: (71) 99690-3933

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses são endêmicas em 98 países, com uma população de 350 milhões de indivíduos sob o risco de contrair a infecção e uma incidência de 2 milhões de casos, incluindo os casos das formas tegumentar (1,5 milhões de novos casos por ano) e visceral (500.000 novos casos por ano) (ALVAR et al., 2012). Atualmente, estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito, sendo que este cenário pode estar sendo influenciado por subnotificações, uma vez que a notificação é compulsória em apenas 32 dos 98 países afetados (Control of the leishmaniasis, 2010).

O tratamento de primeira escolha para as leishmanioses é realizado com os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil-D-glucamina. Este tratamento é de longa duração, requer múltiplas injeções, monitoramento cuidadoso dos pacientes, além de apresentarem eficácia variável e alta toxicidade (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). A segunda opção para tratamento é a anfotericina B, um fungicida altamente tóxico utilizado em casos de resistência aos medicamentos de primeira escolha. Além disso, o alto custo da formulação lipossomal desse medicamento é um fator limitante para o uso do mesmo. (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Nos últimos anos, a miltefosina surgiu como o único medicamento com biodisponibilidade oral para o tratamento das leishmanioses, entretanto também está associada à efeitos adversos graves (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; HILGARD et al., 1997). Dessa forma, é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos com melhor perfil de eficácia e segurança, associado à alta seletividade contra o parasito, para constituírem novos tratamentos para a leishmaniose.

Parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético. As formas promastigotas são encontradas no inseto vetor e a forma metacíclica (infectiva) migra para o aparelho bucal do inseto de onde é inoculada no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. Uma vez nos mamíferos, os parasitos serão fagocitados por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente por macrófagos. Dentro da célula hospedeira, as formas promastigotas irão se diferenciar dentro do vacúolo parasitóforo em amastigotas, que é

a forma do parasito encontrada em mamíferos, sendo responsável pela manutenção da infecção. Dessa forma, as amastigotas constituem a forma parasitária de maior relevância clínica, sendo o alvo para o desenvolvimento de qualquer terapia anti-*Leishmania*. (KAYE; SCOTT, 2011). Entretanto, as formas promastigotas têm sido amplamente utilizadas em ensaios de triagem de moléculas. As promastigotas diferem consideravelmente das amastigotas em relação à expressão gênica e, conseqüentemente, em seu metabolismo (BROTHERTON et al., 2010). Desse modo, a biologia do parasito pode refletir na sensibilidade do mesmo às moléculas bioativas em teste.

Ensaios envolvendo a forma amastigota em cultura axênica são utilizados para triagem de novos compostos (XINGI et al., 2009). Novamente, a ausência da célula hospedeira pode influenciar na resposta biológica da molécula em teste, uma vez que a mesma pode ser metabolizada em um derivado mais ativo ou ativar mecanismos microbicidas do macrófago (AULNER et al., 2013). Além disso, aspectos relacionados à célula hospedeira, como permeabilidade de membrana celular e do vacúolo parasitóforo, também são aspectos que influenciam na atividade de moléculas (DE MUYLDER et al., 2011). Diante desse cenário, a aplicação de um ensaio de atividade farmacológica anti-*Leishmania* deve ser contra formas amastigotas intracelulares para que reflita ao máximo o que ocorre no hospedeiro mamífero.

A utilização de um sistema automatizado de contagem de amastigotas intracelulares permite a redução de vieses de observador associados a contagem convencional de lâminas coradas contendo as células infectadas e amplia a capacidade de triagem. Assim, a análise de imagens automatizada constitui uma ferramenta de extrema importância na busca por novas moléculas para o tratamento de diversas doenças, incluindo as leishmanioses (SIQUEIRA-NETO et al., 2012; TEGAZZINI et al., 2016). Desta forma, este projeto tem como finalidade validar e aplicar um teste farmacológico de análise de imagem automatizada de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis* para que seja possível triar moléculas para posteriores testes *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de *Leishmania amazonensis*.

Leishmania amazonensis da cepa MHOM/BR88/BA-125, isoladas de pacientes com a forma cutânea localizada da doença (DE SOUZA et al., 2011), foram periodicamente isoladas

do linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 infectados na pata direita com 2×10^6 promastigotas em fase estacionária. Em seguida os parasitos foram cultivados em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Hipolabor, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil), como descrito por Rocha et al., 2013 (ROCHA et al., 2013), a 24 °C. O crescimento celular foi acompanhado diariamente e os parasitos foram utilizadas nos experimentos quando atingiram a fase estacionária de crescimento. A utilização de animais foi previamente aprovada pelo comitê de ética local (L-IGM-018/2015).

Toxicidade das células hospedeiras.

Macrófagos do exudato peritoneal ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram extraídos de camundongos BALB/c fêmeas após cinco dias de estímulo com tioglicolato 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Assim, foram inseridos em cultura em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,2 U/mL de Penicilina-Streptomicina (completo em DMEM) (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA). As células foram inseridas em placas de 96 poços e plaqueadas na densidade de 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, e posteriormente incubadas *overnight* a 37° C e 5% CO_2 . Em seguida as células foram tratadas com as drogas por 72 horas de incubação nas mesmas condições. A máxima concentração utilizada para avaliar a toxicidade foi 100 μM , exceto a anfotericina B que foi testada na máxima concentração de 50 μM . Após os tratamentos, as células foram lavadas utilizando salina estéril em solução, e a viabilidade das células foram determinadas através do ensaio de AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante (10% de alamar blue completo em DMEM). As leituras colorimétricas foram avaliadas após 24 horas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, utilizando o espectrofotômetro. A citotoxicidade de 50% das células (CC_{50}) foi determinada após 72 horas depois do tratamento através da curva

de regressão não linear. A porcentagem de diminuição de células foi comparada com o controle não tratado. Os cálculos foram realizados utilizando o GraphPad Prism versão 5.01.

Infecção *in vitro* e testes farmacológicos.

Camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 4 a 6 semanas foram utilizados para coleta de macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram obtidos de acordo com (GOMES et al., 2003), após cinco dias de estímulo com tioglicolato 3% (Sigma Aldrich). As células foram plaqueadas em meio RPMI-1640 (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) na densidade de 5×10^4 /poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas. A infecção foi realizada durante 24 horas a 35°C e 5% CO₂ com parasitos na fase estacionária de crescimento, na proporção de 10 parasitos:1 macrófago. A triagem dos compostos foi realizada em células infectadas na concentração máxima 10µM com duração de 72 horas, a 35°C e 5% CO₂. As amostras ativas foram testadas em diferentes concentrações para cálculo do IC₅₀ (concentração inibitória para 50% das amastigotas) partindo da concentração máxima de 10µM. Para determinar a porcentagem de resposta biológica dos compostos foi utilizada a equação: % resposta = $(X_1 - X_x / X_1 - X_2) * 100$, onde X₁ representa 0% de atividade (controle negativo), X₂ representa 100% de atividade (células não infectadas) e X_x representa as amostras em teste (TEGAZZINI et al., 2016).

Análise automatizada em *High Content Screening*.

Após o tratamento por 72 horas com os compostos em teste, os macrófagos peritoneais infectados foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram incubadas com *Hoechst33342* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) a 16µM e analisadas no *Operetta High Content System* (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA). Os macrófagos tiveram o núcleo e o citoplasma segmentados utilizando o programa *Harmony* versão 5.1.2 (Perkin Elmer). As formas amastigotas foram detectadas como pontos no canal de fluorescência do *Hoechst33342*, especificamente no citoplasma. Medidas de intensidade de fluorescência foram utilizadas para detectar os parasitos intracelulares. Células não infectadas serviram de controle para determinação dos parâmetros

de classificação e detecção das amastigotas. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo, na concentração máxima de 10 μ M.

No mesmo ensaio de avaliação da atividade farmacológica anti-*Leishmania* foi possível determinar a citotoxicidade das moléculas em teste. Dessa forma, a segmentação nuclear das células fornece o número de macrófagos em cada poço das placas de 96 poços.

Amostras para teste.

Uma série de cinquenta e oito moléculas puras (série FC e CAH) com estrutura *N-acil-hidrazona*, tiveram a atividade farmacológica anti-*Leishmania* avaliada. Estes compostos foram sintetizados no Laboratório de Design e Síntese Aplicada a Química Medicinal da Universidade Federal de Pernambuco, em parceria com o professor Dr. Maurício Santos.

Dezesseis compostos derivados de flavonóides diméricos isolados da raiz de *A. brachypoda*, foram produzidos através de reações de halogenação, produzindo derivados com iodo, bromo e cloro. Estes compostos também foram sintetizados em colaboração com o professor Dr. Emerson Queiroz e Alexandra Neuenschwander do Laboratório de Fitomedicina de Compostos Naturais Bioativos da Universidade de Genebra.

Uma série de trinta moléculas pertencentes a classe das tiazolidinonas e 5 moléculas da classe tiossemicarvazida (série TSC) foram testadas em parceria com o professor Dr. Maurício Santos do Laboratório de Planejamento e Síntese Aplicados à Química Medicinal.

Microscopia eletrônica de transmissão.

Macrófagos peritoneais foram coletados de camundongos BALB/c, quatro dias depois da injeção de tioglicolato a 3%. As células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁶ células por poço em uma placa de seis poços. Após 24 horas de incubação, os macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* a 35°C e 5% de CO₂. Os compostos foram adicionados nas concentrações de 1 e 5 μ M, e as culturas foram incubadas por 24 e 48 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Posteriormente, as células foram fixadas em uma solução de 2% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 2,5 mM de CaCl₂ em 0,1M de cacodilato de sódio buffer pH 7,2, seguida de uma pós fixação com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio no mesmo tampão. Depois das lavagens sucessivas, as amostras foram removidas das placas,

seguido de desidratação em gradiente crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Por fim, as amostras foram incubadas em resina PolyBed. Os cortes foram marcados com acetado de uranila e citrato de chumbo. Em seguida, as amostras foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão, JEOL JEM 1320 (Peabody, Massachusetts, EUA).

Infecção *in vivo* com *L. amazonensis*.

Camundongos BALB/c fêmeas com idade de 4 a 6 semanas, foram infectados na derme da orelha direita com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária, em 10 μ L de salina. Após três semanas de infecção, os camundongos foram tratados diariamente por via oral durante quatro semanas. A lesão da orelha foi monitorada semanalmente desde o início da infecção, utilizando um paquímetro digital. Assim, foi possível determinar a diferença de espessura entre uma orelha infectada e não infectada. A molécula em teste foi utilizada nas concentrações de 50 e 25 mg/Kg, diluídas em solução contendo 10% de tween 80 e 30% de sorbitol. O grupo controle foi tratado apenas com veículo. No grupo controle positivo, foi administrado 100mg/Kg de Glucantime® por via intraperitoneal. A utilização de animais foi previamente aprovada pelo comitê de ética local (L-IGM-018/2015).

Análise estatística.

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em quadruplicata e os resultados expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por regressão não linear a partir da porcentagem de reposta biológica (atividade anti-*Leishmania*) ou redução no número de células (citotoxicidade). As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.01.

RESULTADOS

Validação do ensaio de análise de imagem automatizado.

Para os ensaios com amastigotas de *L. amazonensis*, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados. Inicialmente, a análise de imagem por método automatizado foi validada utilizando-se a anfotericina B em concentrações que variaram de 0,07 a 10 μM em um tratamento de 72 horas. Após o tratamento, as amostras foram submetidas à análise automatizada no *Operetta High Content System* (Figura 1A). As imagens adquiridas foram analisadas a partir da segmentação do núcleo e do citoplasma, e contagem automatizada de amastigotas (Figura 1B). O método de análise foi validado em células infectadas e tratadas com diferentes concentrações de anfotericina B. Este ensaio demonstrou que o método automatizado de análise de imagens foi capaz de quantificar a porcentagem de células infectadas e o número de parasitos intracelulares em função da concentração de anfotericina B (Figuras 2A e 2B). O valor de IC_{50} calculado com base no número de amastigotas foi de 0,23 μM (ROCHA et al., 2019) (Figura 2C), sendo compatível com dados previamente publicados na literatura, utilizando um método semelhante de contagem de parasitos (SIQUEIRA-NETO et al., 2012).

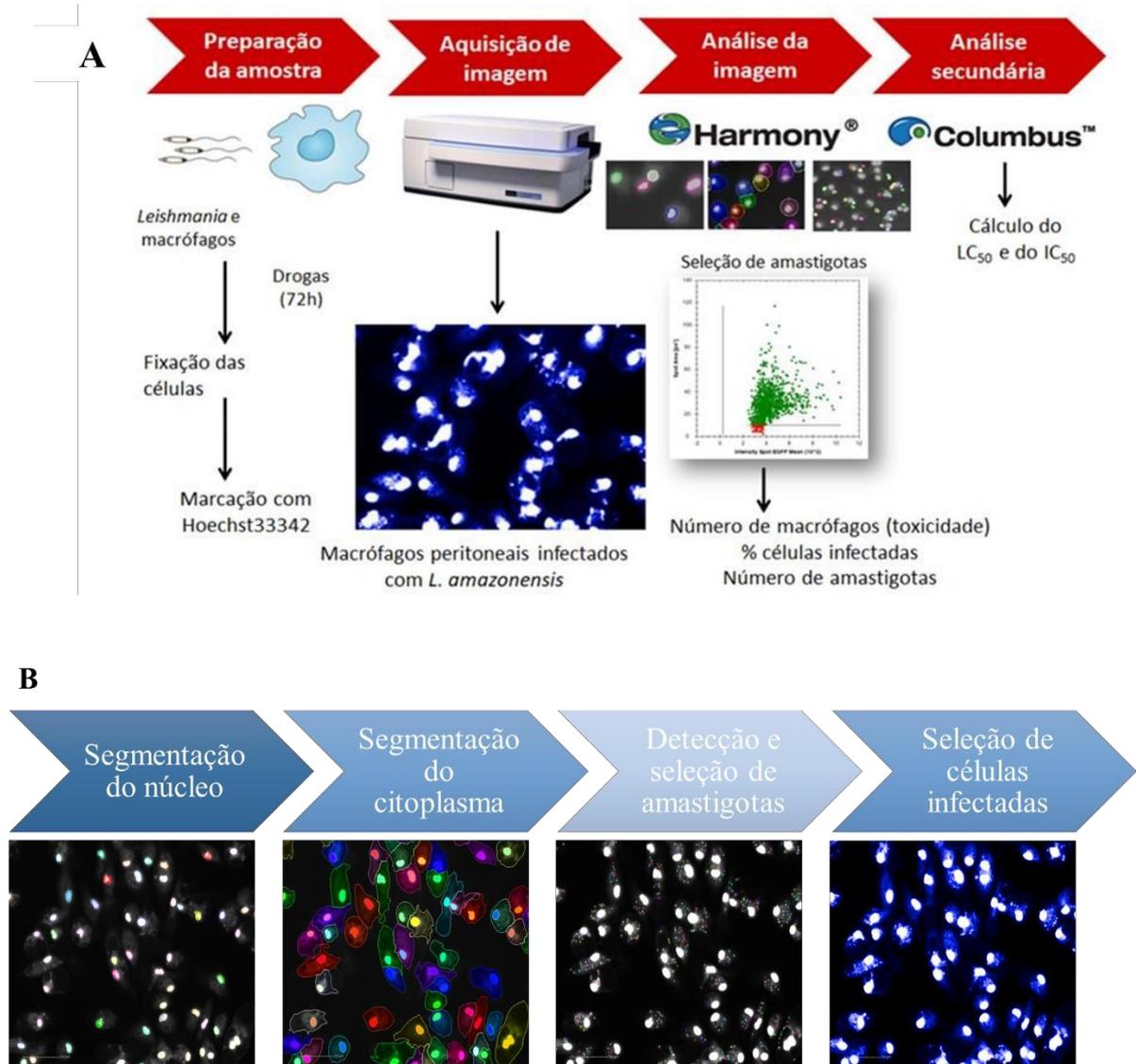


Figura 1: Fluxograma da análise de imagem automatizada. (A) Experimento de infecção *in vitro* e análise automatizada de dados no Operetta High Content System. (B) Segmentação sequencial das imagens de macrófagos e detecção das amastigotas no citoplasma da célula hospedeira, de forma automatizada, utilizando o programa Harmony versão 5.1.2.

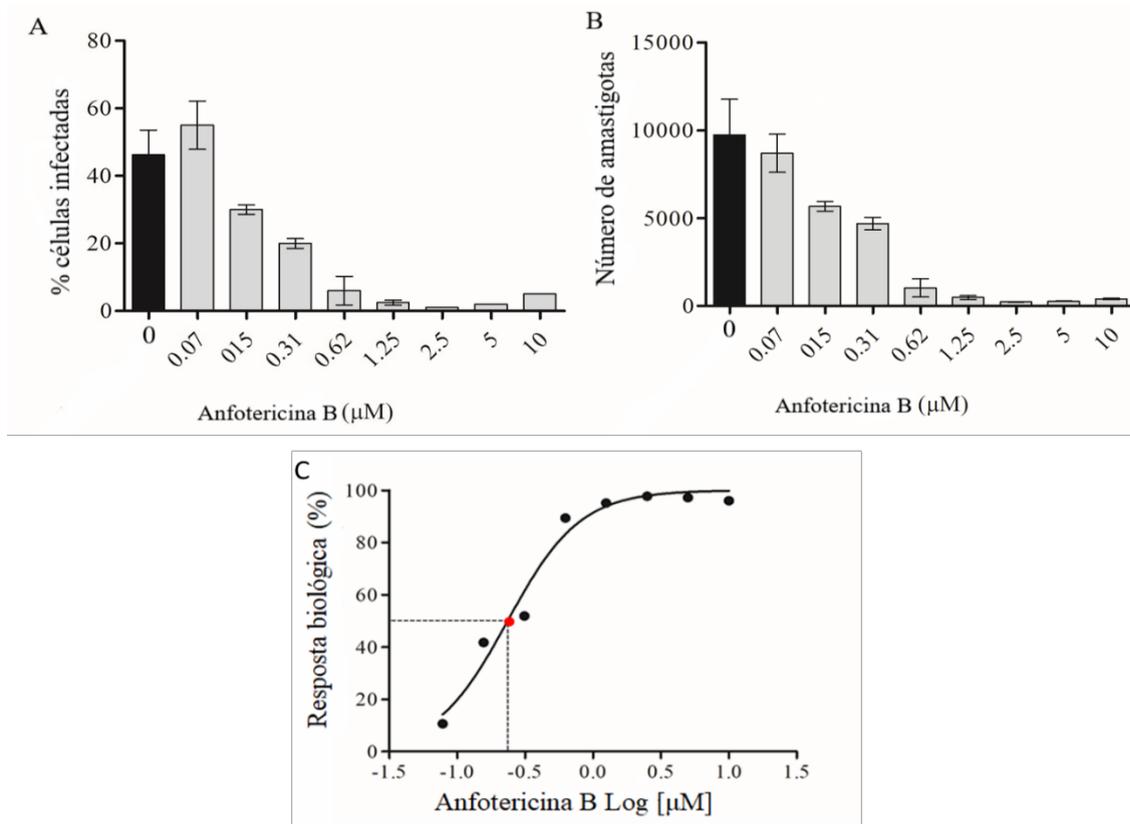


Figura 2: Atividade da anfotericina B em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados durante 24 horas com *L. amazonensis* e tratados durante 72 horas com diferentes concentrações de anfotericina B. As células foram marcadas com *Hoechst33342*, fotografadas no *Operetta High Content System* e analisadas com base no método descrito nas figuras (2A) Porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. (2B) Número de amastigotas. (2C) Resposta biológica do tratamento com anfotericina B.

A partir da validação do método automatizado de análise de imagem, o mesmo foi empregado na triagem de 109 moléculas puras de diferentes classes químicas.

Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de *N*-acil-hidrazonas.

A série de compostos com estrutura *N*-acil-hidrazona (série FC) foi testada em macrófagos infectados em concentração não tóxicas de 10 μM . Nenhum dos compostos testados apresentou inibição o número de amastigotas igual ou acima de 70%. Compostos como FC 60 e FC 47 reduziram em 62% e 65% o número de amastigotas, respectivamente. FC 34, FC 59, FC 38, FC 45, FC 62, FC 46 e FC 48 reduziram em aproximadamente 50% o número de amastigotas,

apresentando um valor de IC_{50} em torno de $10 \mu M$ (Figura 3). Em relação a série CAH, o CAH 28 apresentou 58% de resposta biológica. As demais moléculas deste grupo apresentaram atividade inferior a 37%.

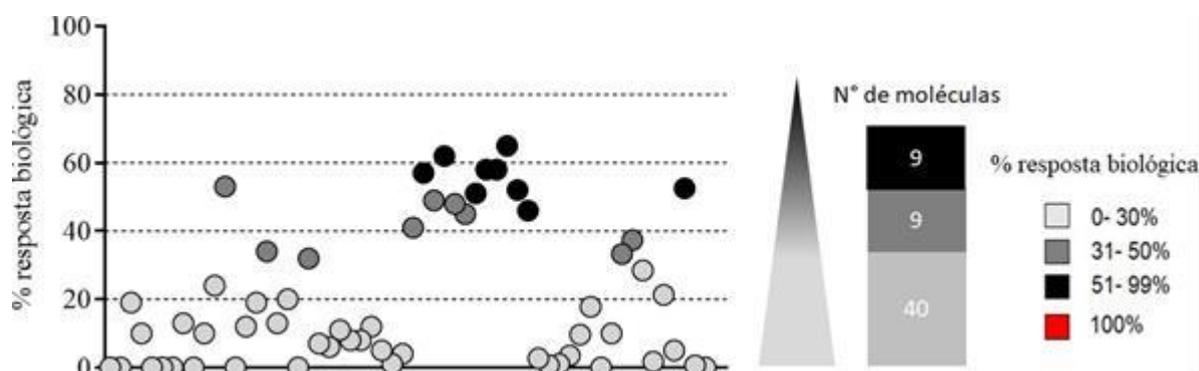


Figura 3: Porcentagem de resposta biológica de moléculas com estrutura *N-acil-hidrazona* (séries FC e CAH). Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados durante 24 horas com *L. amazonensis* e tratados durante 72 horas com $10 \mu M$ das diferentes *N-acil-hidrazona*. As células foram fixadas e marcadas com *Hoechst33342*, seguido da análise no *Operetta High Content System*. O gráfico representa um dos resultados de duas triagens independentes realizadas em quadruplicata. A barra de cores informa o número de moléculas agrupadas de acordo com a porcentagem de inibição do número de amastigotas, como descrito na legenda.

Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de derivados halogenados de flavonoides diméricos isolados de *Arrabidaea brachypoda*.

A aplicação do método de triagem fenotípica possibilitou a avaliação da atividade anti- *Leishmania* de flavonoides diméricos isolados de *A. brachypoda*. Três moléculas foram triadas contra promastigotas (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*) e amastigotas (*L. amazonensis*) de *Leishmania*. O flavonoide denominado brachydina B demonstrou a maior atividade *in vitro*. A combinação deste composto com a anfotericina B demonstrou não haver interações entre as duas moléculas. O tratamento de amastigotas intracelulares com brachydina B resultou em alterações estruturais no Golgi, na bolsa flagelar e o acúmulo de figuras de mielina no citoplasma do parasito. Apesar na atividade *in vitro*, a brachydina B não foi eficaz, pelas vias tópica e oral, em reduzir a lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis*. Este resultado sugere que a farmacocinética desta molécula requer estudos posteriores para o

desenvolvimento de novos tratamentos contra leishmaniose cutânea (ROCHA et al., 2019). Diante estes dados, foram produzidos compostos derivados halogenados de flavonoides diméricos, utilizando o iodo, bromo ou cloro em diferentes posições da estrutura molecular. A tabela 1 mostra os valores de IC₅₀ e CC₅₀ destes derivados. As moléculas mais potentes contra amastigotas foram, ABBr 5, ABBr 7 e ABCl 2, demonstrando que a halogenação em regiões específicas da brachydina B podem aumentar a potência antiparasitária deste produto natural. Além disso, as substituições com halogênios não alteraram a citotoxicidade contra a célula hospedeira, resultando em aumento da seletividade desses derivados contra o parasito.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ e CC₅₀ dos derivados halogenados de flavonoides diméricos.

Moléculas	IC ₅₀ amastigotas (μ M)	CC ₅₀ macrófagos (μ M)	Índice de Seletividade (CC ₅₀ / IC ₅₀)
ABI 1	7,8	>100	>13
ABI 3	>10	>100	NC
ABI 4	5,4 \pm 0,4	>100	>19
ABI 5	4,7 \pm 0,7	>100	>21
ABI 6	3,9 \pm 0,4	>100	>26
ABCl 1	>10	>100	NC
ABCl 2	1,2 \pm 0,4	>100	>83
ABCl 3	3,4 \pm 0,9	>100	>29
ABBr	2,5 \pm 0,8	>100	>40
ABBr 1	6,5 \pm 1,2	>100	>15
ABBr 2	3,3 \pm 0,8	>100	>30
ABBr 4	3,6 \pm 1	>100	>28
ABBr 5	1,7 \pm 0,2	>100	>59
ABBr 6	4,5 \pm 1	>100	>22
ABBr 7	1 \pm 0,3	>100	>100
Anfotericina B	0,23	>50	>217

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ demonstrados na tabela são média \pm EPM

Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de tiossemicarvazidas.

Moléculas puras com estrutura tiossemicarvazida também foram testadas na concentração de 10 μ M em células infectadas. Cinco compostos foram testados e nenhum deles apresentou atividade superior a 40%. Sendo assim, estas moléculas não tiveram seus valores de IC₅₀ calculados (Figura 4).

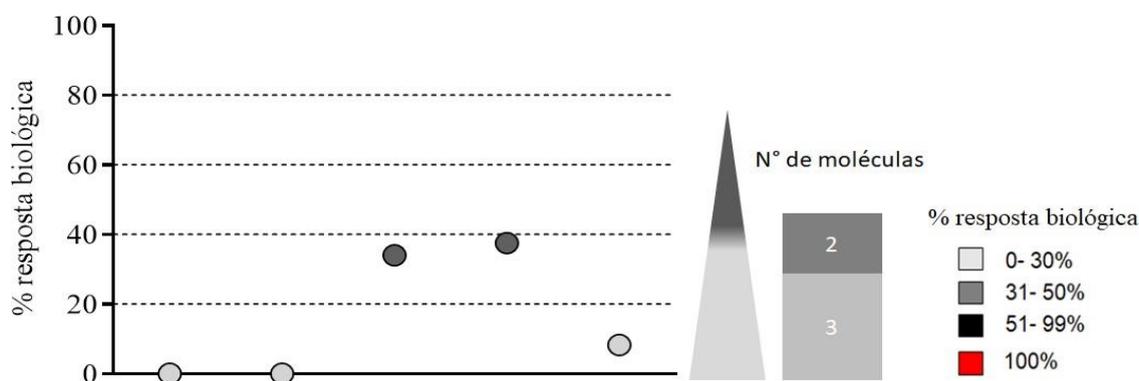


Figura 4: Porcentagem de resposta biológica de moléculas com estrutura tiossemicarvazida (série TSC). Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados durante 24 horas com *L. amazonensis* e tratados durante 72 horas com 10 μ M das diferentes tiossemicarvazidas. As células foram fixadas e marcadas com *Hoechst33342*, seguido da análise no *Operetta High Content System*. O gráfico representa um dos resultados de duas triagens independentes realizadas em quadruplicata. A barra de cores informa o número de moléculas agrupadas de acordo com a porcentagem de inibição do número de amastigotas, como descrito na legenda.

Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de tiazolidinonas.

Trinta moléculas da classe das tiazolidinonas tiveram sua atividade anti-*Leishmania* testadas através da aplicação do método de análise multiparamétrica. Vinte e três delas apresentaram atividade superior a 50%, sendo que 17 moléculas apresentaram 100% de resposta biológica (Figura 5). Das 23 moléculas com atividade superior a 50%, cinco também apresentaram citotoxicidade superior a 20%, sendo elas: BZ 2, BZ 3, BZ 4, BZ 6 e BZ 15 (Figura 6). Os resultados desta triagem mostram que a classe das tiazolidinonas é composta por moléculas com atividade antiparasitária significativa e não associada com toxicidade para a célula hospedeira.

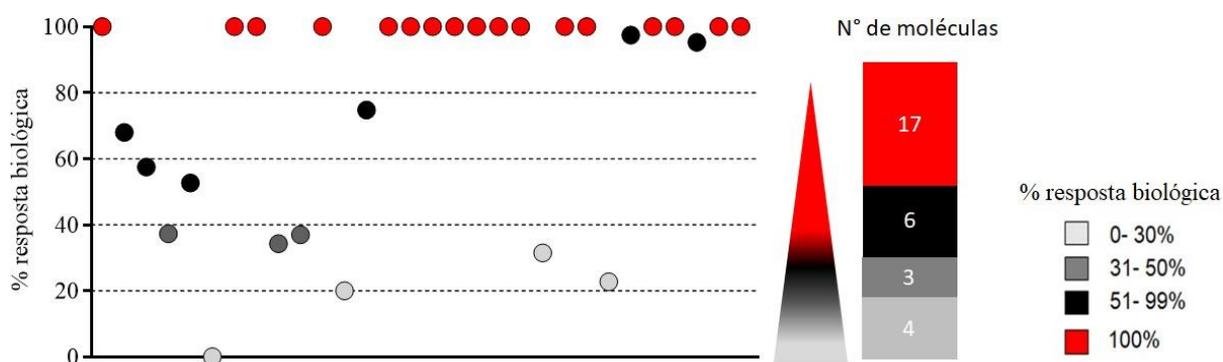


Figura 5: Porcentagem de resposta biológica de moléculas com estrutura tiazolidinonas (série BZ). Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados durante 24 horas com *L. amazonensis* e tratados durante 72 horas com 10 μ M das diferentes tiazolidinonas. As células foram fixadas e marcadas com *Hoechst33342*, seguido da análise no *Operetta High Content System*. O gráfico representa um dos resultados de duas triagens independentes realizadas em quadruplicata. A barra de cores informa o número de moléculas agrupadas de acordo com a porcentagem de inibição do número de amastigotas, como descrito na legenda.

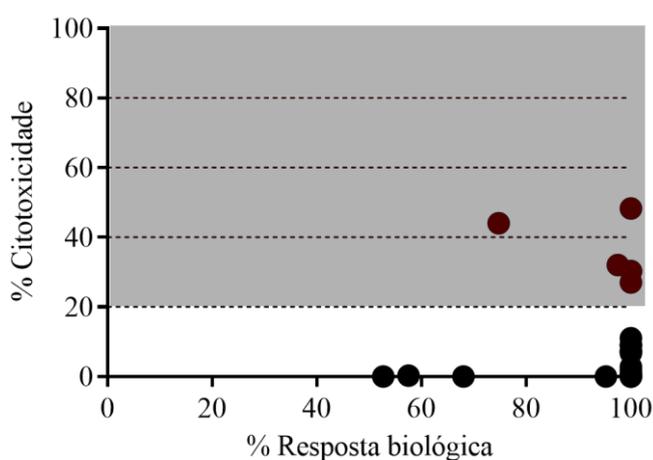


Figura 6: Relação entre a resposta biológica (atividade leishmanicida) e a citotoxicidade em macrófagos infectados. A porcentagem de resposta biológica foi determinada após o tratamento de macrófagos peritoneais infectados com 10 μ M de moléculas tiazolidinonas, como descrito acima. A porcentagem de redução do número de macrófagos foi determinada pela contagem automatizada de núcleos. O gráfico é representativo de um experimento, sendo que dois ensaios independentes foram realizados em quadruplicata. A área sombreada indica a porcentagem de citotoxicidade acima de 20%.

Diante este cenário, foram avaliados o IC₅₀ e o CC₅₀ destas moléculas com resposta biológica igual ou superior a 50%. Os macrófagos infectados foram tratados com concentrações entre 1,2 e 10 μ M (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de IC₅₀ e CC₅₀ de moléculas com estrutura tiazolidinonas.

Moléculas	IC ₅₀ amastigotas (μ M)	CC ₅₀ macrófagos (μ M)	Índice de Seletividade (CC ₅₀ / IC ₅₀)
BZ 1	NC	NC	NC
BZ 2	3,8 \pm 0,25	>10	>2,6
BZ 3	3,6 \pm 0,71	>10	>2,7
BZ 4	1,07 \pm 0,17	>10	>9,3
BZ 5	NC	>10	NC
BZ 6	4,90 \pm 0,50	>10	>2,0
BZ 7	1,16 \pm 0,18	>10	>8,6
BZ 8	7,61 \pm 0,71	>10	>1,3
BZ 9	7,72 \pm 0,42	>10	>1,3
BZ 11	7,71 \pm 0,70	>10	>1,3
BZ 12	3,0 \pm 0,40	>10	>3,3
BZ 13	5,56 \pm 0,38	>10	>1,8
BZ 14	5,60 \pm 1,15	>10	>1,8
BZ 15	1,85 \pm 0,35	>10	>5,4
BZ 16	1,80 \pm 0,64	>10	>5,5
BZ 17	7,80 \pm 1,82	>10	>1,3
BZ 18	NC	>10	NC
BZ 19	7,0 \pm 1,07	>10	>1,4
BZ 20	NC	>10	NC
BZ 21	NC	NC	NC
BZ 22	NC	NC	NC
BZ 23	6,15 \pm 0,53	>10	>1,5
BZ 24	10,43 \pm 2,48	>10	>0,1
BZ 25	NC	NC	NC
BZ 27	2 \pm 0,56	>10	>5,0
BZ 28	NC	NC	NC
BZ 29	1,67 \pm 0,34	>10	>6,0
BZ 31	7,71 \pm 0,96	>10	>1,30
BZ 33	NC	NC	NC
BZ 34	4,52 \pm 0,60	>10	>2,2
Anfotericina B	0,23	>10	>43,4

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ demonstrados na tabela são média \pm EPM

Ao analisar os resultados de IC₅₀, CC₅₀ e o índice de seletividade das tiazolidinonas, o composto BZ 4 foi escolhido para análises em microscopia eletrônica de transmissão a fim de verificar alterações ultraestruturais em amastigotas. A escolha do BZ 4 se deve ao fato deste compostos ser o mais ativo e seletivo da série triada. O experimento foi realizado nas concentrações de 5 e 1 μM por 24 e 48 horas. Foi observado alterações na membrana nuclear das amastigotas tratadas com BZ 4 na concentração de 1 μM durante 48 horas, representadas pelas setas vermelhas (Figura 7).

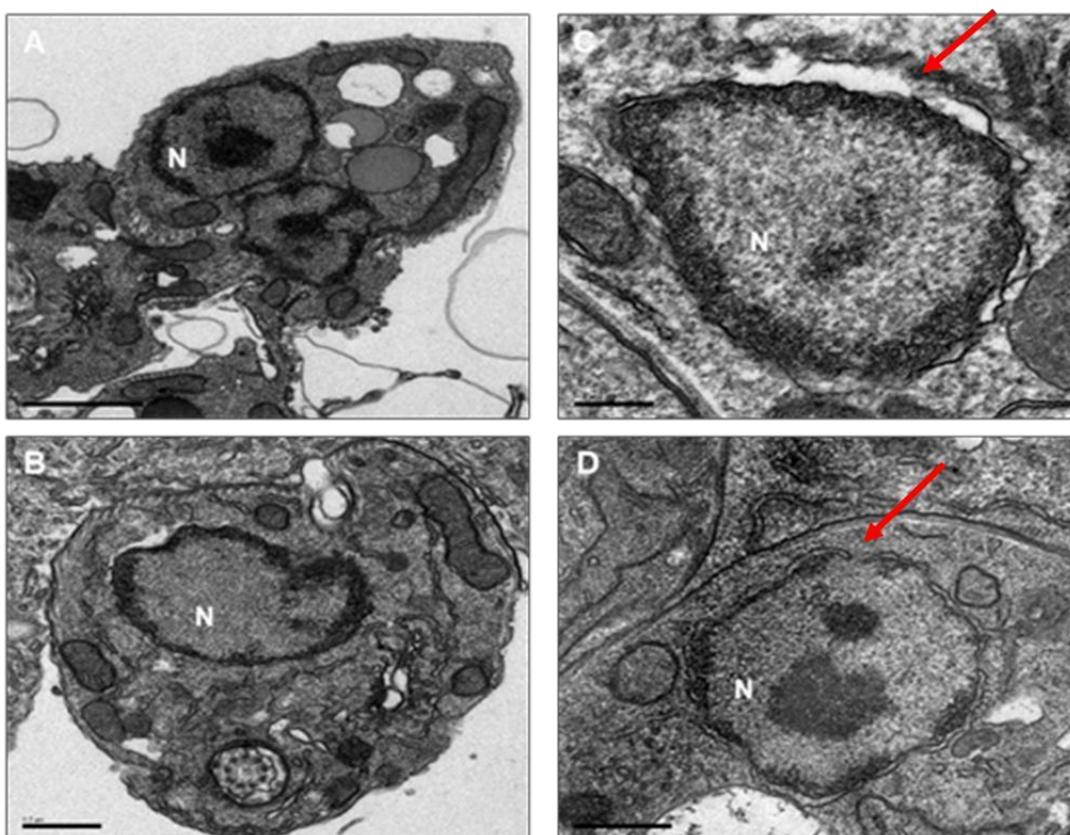


Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados durante 24 horas com *L. amazonensis* e tratados com a molécula BZ 4 na concentração de 1 μM durante 48 horas. (A e B) Controle negativo. (C e D) Células infectadas e tratadas com BZ4 a 1 μM durante 48 horas. N: núcleo. As barras indicam 0,2 (B) ou 0,5 μm (A, C e D).

A atividade *in vitro* do BZ 4 nos encorajou a avaliar a eficácia farmacológica desta molécula em modelo experimental de leishmaniose cutânea. Vinte e quatro camundongos BALB/c fêmeas foram infectados na orelha direita com *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento e foram divididos em quatro grupos de forma randomizada. Após três semanas de

infecção, foi iniciado o tratamento oral e diário durante quatro semanas com BZ 4 nas doses de 50 e 25 mg/kg. O Glucantime® foi utilizado como controle na dose de 100 mg/kg de Sb⁵⁺ via intraperitoneal, apresentando uma redução significativa da lesão. O tratamento com BZ 4 não causou redução da lesão na orelha em nenhuma das doses testadas (Figura 8).

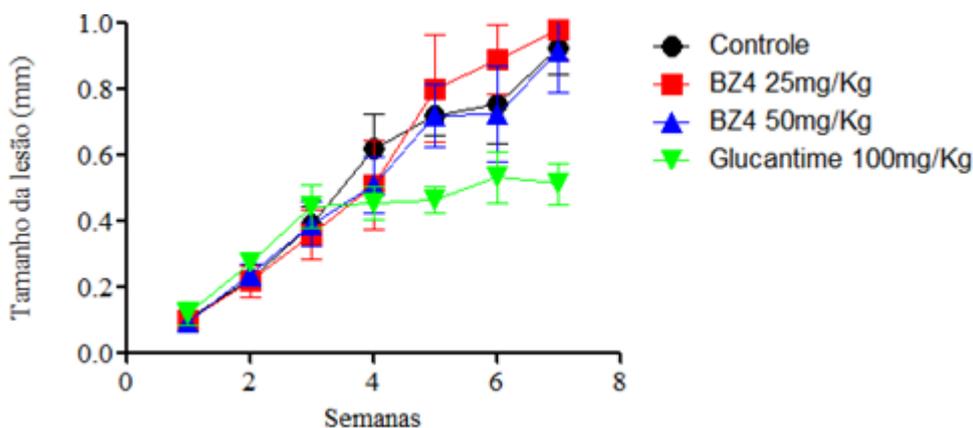


Figura 8: Experimento de infecção *in vivo* e tratamento com BZ 4. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com BZ 4. O gráfico mostra o tamanho da lesão na orelha direita dos animais, medida semanalmente. Este resultado representa um experimento *in vivo* realizado com 6 animais em cada grupo.

DISCUSSÃO

O uso do método de análise de imagem automatizado nos permite avaliar diferentes parâmetros úteis na quantificação do efeito biológico em estudo. Isso é possível através da intensidade de fluorescência, translocação de fluorescência, morfologia, movimento celular, além de combinações com diferentes parâmetros de acordo com o interesse do operador (ZANELLA; LORENS; LINK, 2010). No caso deste estudo, foi possível realizar análises quantitativas de amastigotas e dos macrófagos, permitindo avaliar a porcentagem da inibição parasitária e a toxicidade dos compostos em teste. Diante este cenário, o método automatizado nos possibilitou testar e triar diversas moléculas em menor escala de tempo, sendo uma tecnologia extremamente relevante para a pesquisa no âmbito do desenvolvimento de novos fármacos.

Estudos anteriores demonstraram que compostos com estrutura *N-acil-hidrazonas*, apresentaram atividade anti- *Trypanosoma cruzi* e anti- *Leishmania* com alta seletividade comparado com a droga de referência (CARVALHO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2013). A partir disso, testamos diferentes compostos com a estrutura das *N-acil-hidrazonas* e comprovamos que não há toxicidade em macrófagos peritoneais, porém não houve atividade anti- *Leishmania*.

Sabe-se que a halogenação em uma molécula é uma estratégia que melhora o perfil farmacológico de um composto. De fato, estima-se que 20% dos princípios ativos contidos em medicamentos são halogenados. A criação de uma ligação entre carbono e halogênio(s) pode, entre outros efeitos, aumentar a permeabilidade através da membrana celular e reduzir a suscetibilidade da molécula à oxidação (HERRERA-RODRIGUEZ et al., 2011). Através dos resultados demonstrados, a introdução dos halogênios aumentou a atividade biológica do produto natural original, sem associação com o aumento da toxicidade contra a célula de mamífero. Em outras palavras, a introdução do halogênio aumentou a seletividade, principalmente de ABBr 5, ABBr 7 e ABCI 2. Como perspectivas, realizaremos ensaios biológicos *in vivo* para avaliar a eficácia farmacológica dessas moléculas em modelo experimental de leishmaniose cutânea.

As moléculas da classe das tiazolidinonas apresentam diferentes atividades biológicas conhecidas, tais como anticâncer, antifúngica, hipoglicêmica, bactericida, anti- HIV e anti-

inflamatória (KAUR MANJAL et al., 2017). Sendo assim, esta classe representa uma importante fonte de moléculas bioativas. As tiazolidinonas são derivados das tiosemicarbazonas, que apresentam propriedades anti- *T. cruzi* previamente estudada (DU et al., 2002; MOREIRA et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que os compostos testados da classe das tiosemicarbazonas não apresentaram atividade leishmanicida significativa *in vitro*. Entretanto, moléculas da classe das tiazolidinonas apresentaram efeito anti- *Leishmania* considerável, associado a baixa citotoxicidade à célula hospedeira e alta seletividade contra o parasito. A partir dos resultados *in vitro*, foi realizado o experimento *in vivo* com o BZ 4, o qual não apresentou eficácia farmacológica a partir da administração por via oral. A via oral sofre grande influência do metabolismo de primeira passagem hepático, podendo reduzir significativamente a biodisponibilidade da molécula. Além disso, a molécula pode não ser absorvida no trato gastrintestinal do animal, reduzindo também a biodisponibilidade. Como carecemos de informações sobre a farmacocinética deste composto, ainda não podemos determinar o real motivo da baixa eficácia *in vivo*.

Diante disso, é necessário ressaltar a importância da prospecção de moléculas bioativas contra *Leishmania*, empregando metodologias rápidas e eficazes como o uso do *high content screening*. O método de análise de imagem automatizada validada pelo nosso grupo está em uso constante na triagem de moléculas contra diferentes parasitos intracelulares. Em relação à *Leishmania*, o objetivo final é selecionar compostos para experimentos *in vivo*, afim de determinar a eficácia farmacológica do composto em estudo.

CONCLUSÕES

Os compostos das classes *N-acil-hidrazona* e tiosemicarvazida apresentaram baixa atividade contra *L. amazonensis*. Derivados halogenados de flavonoides diméricos demonstraram alta seletividade contra *L. amazonensis*. As tiazolidinonas também apresentaram seletividade contra o parasito *in vitro*, entretanto o composto mais ativo, o BZ 4, não foi eficaz *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence** PLoS ONE, 31 maio 2012.
- AULNER, N. et al. High Content Analysis of Primary Macrophages Hosting Proliferating Leishmania Amastigotes: Application to Anti-leishmanial Drug Discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.
- BROTHERTON, M.-C. et al. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in Leishmania infantum. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 8, p. 3842–53, 6 ago. 2010.
- CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–521, 2012.
- Control of the leishmaniases**. Geneva: 22-26 March 2010, 2010.
- DE MUYLDER, G. et al. A screen against Leishmania intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 7, p. e1253, jul. 2011.
- DE SOUZA, V. L. et al. Immune and inflammatory responses to leishmania amazonensis isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 23–31, fev. 2011.
- DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 2002.
- FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 2, p. 11–9, dez. 2012.
- GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of Leishmania. **Microbes and infection**, v. 5, n. 4, p. 251–60, abr. 2003.

- HERNÁNDEZ, P. et al. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 64–74, 2013.
- HERRERA-RODRIGUEZ, L. et al. Perspectives on biotechnological halogenation. **chimica oggi/Chemistry Today**, v. 29, n. 6, 2011.
- HILGARD, P. et al. D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 33, n. 3, p. 442–6, mar. 1997. KAUR MANJAL, S. et al. **Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review** **Bioorganic Chemistry** Academic Press Inc., , 1 dez. 2017.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, 11 jul. 2011.
- MOREIRA, D. R. M. et al. Structural investigation of anti-trypanosoma cruzi 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10918–10936, 2012.
- ROCHA, V. P. C. et al. Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART7, p. 1001–1010, jun. 2013.
- ROCHA, V. P. C. et al. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from arrabidaea brachypoda. **Molecules**, 2019.
- SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular leishmania donovani amastigotes in human macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, jun. 2012.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. **Antimony toxicity** **International Journal of Environmental Research and Public Health**, dez. 2010.
- TEGAZZINI, D. et al. A Replicative In Vitro Assay for Drug Discovery against Leishmania donovani. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3524–32, 2016.
- XINGI, E. et al. 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1289–303, out. 2009.

ZANELLA, F.; LORENS, J. B.; LINK, W. High content screening: Seeing is believing. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 237–245, 2010.

2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO:

A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** é um periódico especializado que tem o objetivo de publicar, divulgar e propiciar o intercâmbio de informações científicas e tecnológicas nas áreas do conhecimento médico, bioético e biológico. Disponível para receber contribuições da comunidade científica nacional e internacional, a Revista amplia os seus objetivos, na medida em que acolhe os resultados decorrentes de experiências pedagógicas vivenciadas no ensino das ciências médicas e biológicas.

2.1 REVISTA: Ciências Médicas e Biológicas

2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO:

1 NORMAS EDITORIAIS

1.1 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação: **Editorial** – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial. **Artigos originais** – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e ideias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas. Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

- 1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A Revista de Ciências Médicas e Biológicas reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.
- 1.3 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.
- 1.4 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um Comitê de Ética e

Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório.

- 1.5 Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.
- 1.6 A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão um exemplar do número da Revista em que o trabalho for publicado.
- 1.7 Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação.
- 1.8 A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos:

“Certifico(amos) que o artigo enviado à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico”.

Data e assinatura

Os co-autores, quando for o caso, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

1.9 Submissão de artigos online

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da revista de Ciências Médicas e biológicas disponível em:
<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio>.

Outras formas de submissão não serão aceitas.

2 APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na NBR

6022/2003 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- 2.1** Os textos deverão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado e com número máximo de 20 laudas.
- 2.2** As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics, JPEG ou outro, inseridas no texto do arquivo submetido ou separadamente no formato digital. As figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte inferior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (ex: Figura 1-,Quadro 5) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, na fonte Times New Roman 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.
- 2.3** As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 - Título; Tabela 2 - Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).
- 2.4** Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.
- 2.5** As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.
- 2.6** Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.
- 2.7** No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1** a **2.7.3**, **na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais

- a) Cabeçalho**, em que deve figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) apenas da sua titulação mais importante e a instituição na qual está vinculado. Deverá ser inserido em nota de rodapé o nome do autor para correspondência, juntamente com o endereço profissional, telefone e email.

b) Resumo – apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, salientando: introdução, objetivo, metodologia, resultados e conclusão, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR – 6028 da ABNT e não exceder as 250 palavras recomendadas.

c) Palavras-chave – Palavras ou expressos que identificam o conteúdo do texto. Deverão ser utilizados descritores da Área de Saúde a partir da consulta ao DeCs ou MeSH R. Ci. med. biol., Salvador, v.12, n.1, p.131-136, jan./abr. 2013 Instruções aos Autores R. Ci. med. biol., Salvador, v.11, n.3, p.355-356, set./dez. 2012 133 Índices de Autores.

2.7.2 Texto

a) Introdução – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

- b) Materiais e métodos** – A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).
- c) Resultados** – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.
- d) Discussão** – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.
- e) Conclusões** – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

- a) Título do artigo** (e subtítulo, se houver) em língua estrangeira, precedendo o resumo: para textos em português essa língua será o inglês; para aqueles em outros idiomas (v.1.3), a língua será o português.
- b) Resumo em língua estrangeira** - inglês (Abstract) ou português (Resumo), conforme a alínea a.
- c) Keywords ou Palavras-chave**, conforme o caso.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da apresentação do Resumo em português, bem como do título do artigo e das palavras-chave neste idioma.

- d) Referências** – Devem ser elaboradas de acordo com a NBR 6023/2002 da ABNT. As referências podem ser **ordenadas alfabeticamente**, caso seja utilizado o **sistema autor-data** para as citações no texto, ou podem ser organizadas em **ordem numérica** crescente (algarismos arábicos), se for adotado o **sistema numérico** de citação (v. NBR 10520/2002, da ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com a NBR 6032/1989 da ABNT e/ou com os índices especializados. A exatidão das referências é

de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, não devem ultrapassar o número máximo de 20. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da aplicação das normas da ABNT, mas deverão indicar os **elementos essenciais** das referências, a saber:

- para **artigos de periódicos**: autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, cidade em que o periódico é publicado, numeração correspondente ao volume e/ou ano, número do fascículo, paginação inicial e final do artigo, data do fascículo (exs.: jan. 2001; jul./set. 2000; Summer 1998, etc.); quando o fascículo citado for um Suplemento, Edição especial, etc., isso também deverá ser mencionado no final da referência;
- para **livros**: autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), cidade em que foi publicado, editora e ano de publicação;
- para **trabalhos apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da palavra In:; nome do evento e respectivo número (se houver), ano e cidade onde foi realizado; título do documento onde o trabalho foi publicado (Anais, Atas, etc.), cidade de publicação, editora, ano de publicação; página inicial e final do trabalho citado.

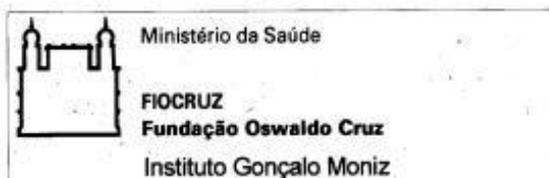
e) Agradecimentos (quando houver).

f) Data de entrega dos originais à redação da Revista.

g) Declaração de responsabilidade (v. 1.8).

3 ANEXOS

ANEXO 1 – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais – FIOCRUZ

CI. nº 002/2018

Para: Dra. Milena Soares
Pesquisadora Responsável pelo protocolo 018/2015

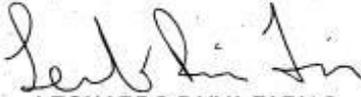
Assunto: Resposta ao pedido de acréscimo no protocolo 018/2015

Prezada Dra. Milena,

Em resposta ao seu pedido de acréscimo de animais e extensão de prazo do protocolo 018/2015 intitulado **"Avaliação da atividade imunomoduladora e antiinflamatória de extratos, óleos essenciais e substâncias puras derivados de produtos naturais"**, informamos que a CEUA analisou o referido pedido e o aprovou.

Desta forma, serão acrescentados mais **60 camundongos C57BL/6 IL-10 Ko** à quantidade já existente e a validade do referido protocolo será até **05/02/2020**.

Atenciosamente,



LEONARDO PAIVA FARIAS
Coordenador da CEUA
IGM/FIOCRUZ

ANEXO 2 – COVER LETTER

Gabriela Bittencourt Grimaldi (gabrielagrimaldi16.1@bahiana.edu.br)
Rua Silveira Martins, nº 3386, Cabula /CEP: 41150-100
tel.: (71) 99690-3933

Salvador, 09/11/2019

Prezado editor científico,

Através desta carta, gostaria de submeter à Revista de Ciências Médicas e Biológicas o manuscrito intitulado “Aplicação de um ensaio de análise de imagem automatizado para a triagem de moléculas contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*”. Este trabalho mostra o processo de validação e aplicação de um método de análise de imagem automatizado, útil na triagem de moléculas contra amastigotas de *L. amazonensis*. A aplicação deste método nos possibilitou a triagem de uma centena de compostos, de quatro classes químicas distintas, de forma rápida, pouco laboriosa e sem associação com vieses de observação, associados às contagens manuais. Julgamos que a aplicação deste método é uma ferramenta importante para a descoberta de novas moléculas com melhor perfil de eficácia e segurança, e que possa ser utilizada no tratamento das leishmanioses. Declaro ainda que este manuscrito é original, está em conformidade com as normas da revista e, caso o artigo não respeite estritamente as normas de citação e referência bibliográfica, o mesmo será devolvido, sem ser iniciado o processo de revisão pelos pares.

Atenciosamente,

Gabriela Bittencourt Grimaldi.

