



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

SALVADOR – BA

2019

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

**USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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. Antonio Ricardo Khouri
Cunha

SALVADOR – BA

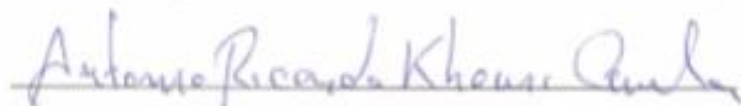
2019

THALINE MABEL SOUSA SANTOS

USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO TRATAMENTO
DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

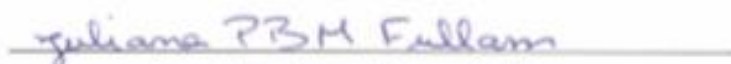
Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovado em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 9 de novembro de 2019.



Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha

IGM – FIOCRUZ



Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes

IGM – FIOCRUZ



Prof. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

*Aos meu pais, que são a razão de tudo isso acontecer.
Aos meus irmãos, por serem a minha motivação. À
Matheus, que é o amor da minha vida e me dá forças
para continuar. Obrigada por tudo, amo vocês infinitamente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo incentivo e suporte emocional e financeiro. Mãe, obrigada por me incentivar e acreditar sempre no meu potencial, sem você nada disso seria possível. Pai, obrigada por acreditar em mim, você sempre me deu forças para continuar, mesmo de longe.

Agradeço aos meus avós, Neuza, Francisco, Tereza e José por existirem e por toda contribuição para que eu me formasse como pessoa e profissional.

Agradeço aos meus irmãos que mesmo que de forma indireta, sempre me incentivaram e me fizeram sonhar com tudo isso.

Agradeço a Matheus, por nascer e transformar a minha vida. Menininho, você é o meu combustível.

Agradeço a minha família, por me incentivar, por acreditar e por serem exatamente como são, vocês são essenciais.

Cris, Tia Mara, Tia Magali, Tio Tinho, Dinda, Meu Di, Helton, obrigada por tudo, eu amo vocês demais.

Agradeço aos meus amigos, que estavam sempre do meu lado, me apoiando e me ajudando. Obrigada por dividirem o peso, as matérias, os desesperos e as felicidades. Vocês tornaram tudo isso mais fácil e divertido.

Agradeço aos meus professores e mestres, por todo conhecimento passado.

Agradeço à Fiocruz e ao LEITV pela estrutura e por ter me apresentado pessoas incríveis.

Agradeço aos Khouriosos por tudo que me ensinaram, vocês são incríveis.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO06

2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO22

3 ANEXO.....27

1. ARTIGO CIENTÍFICO

USO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDROXILAMINA E DETC NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

USE OF THE ASSOCIATION BETWEEN HRIDROXYLAMINE AND DETC IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Thaline Mabel Sousa Santos^{1,2}; Antonio Ricardo Khouri Cunha²

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

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

RESUMO: Para o tratamento de leishmaniose tegumentar os fármacos mais utilizados atualmente são o glucantime e pentostan. Entretanto estas drogas possuem elevada toxicidade e efeitos colaterais desconfortáveis. Neste contexto, a busca de novos fármacos com alta ação leishmanicida e reduzida toxicidade faz-se necessária. Uma alternativa interessante tem sido o uso de fármacos que atuam em mecanismos da resposta imune, pois estes têm demonstrado resultados promissores. Dentre eles, foi demonstrado que o dietil-ditiocarbamato (DETC) aumenta a produção de superóxido e diminui a carga parasitária na leishmaniose tegumentar experimental. Outro fármaco, a hidroxilamina, reage com o superóxido e durante esse metabolismo promove o aumento de peróxido de nitrito, molécula capaz de destruir parasitos intracelulares. Por isto, o objetivo deste trabalho foi testar a ação combinada da hidroxilamina e do DETC contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* *in vitro*. Foram realizados testes de toxicidade com *Leishmania braziliensis* e em macrófagos murinos. De uma maneira geral, foi observado que a *Leishmania braziliensis* apresenta uma maior sensibilidade à ação da hidroxilamina e do DETC, em comparação com os macrófagos murinos que apresentaram efeitos citotóxicos apenas em concentrações mais elevadas dos fármacos. Esses resultados sugerem que a associação de hidroxilamina com DETC poderia ser um tratamento promissor para a leishmaniose tegumentar.

Palavras chaves: Leishmaniose Cutânea; *Leishmania braziliensis*; Ditiocarb; Hidroxilamina.

Thaline Mabel Sousa Santos (thalinesantos16.1@bahiana.edu.br)

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

tel.: (71)99215-8700

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.* que acometem cerca de 90 países. A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos (ALVAR et al., 2012). Dependendo da espécie do parasito, da resposta imune e do background genético dos indivíduos, a doença pode apresentar manifestações clínicas bem distintas. São classificadas em dois grandes grupos: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LV caracteriza-se por ser uma enfermidade crônica que atinge órgãos como fígado, baço e linfonodo. A LT é uma doença espectral que acomete a pele, podendo estender-se até as mucosas (ALVAR et al., 2012; LAINSON; RANGEL, 2005).

Existem diversas manifestações clínicas da LT, entre elas, as mais comumente encontradas são: leishmaniose cutânea mucosa (LCM), a cutânea difusa (LCD), a disseminada (LD) e a cutânea localizada (LCL). Não se sabe ao certo o que causa as grandes variações da apresentação clínica da LT, porém, acredita-se que essa variação ocorra devido as características relacionadas ao parasito e ao hospedeiro. A LCL é a forma mais frequentemente encontrada e é caracterizada pela presença de uma ou mais úlceras na pele, com centro necrótico, bordas elevadas e desenvolvimento de resposta inflamatória intensa (GUIMARÃES et al., 2008; COSTA et al., 2009). No Brasil, o principal agente etiológico da LT é a *Leishmania braziliensis*, a qual na maioria das vezes leva ao desenvolvimento da LCL (MACHADO et al., 2010).

O tratamento de indivíduos com LCL tem sido um desafio para médicos e pesquisadores. Os fármacos mais utilizados e com melhores resultados são os antimoniais pentavalentes (glucantime) e o estibogluconato de sódio (pentostan) (DEPS et al., 2000; SALDANHA et al., 2000). Apesar dos sucessos alcançados, estas drogas possuem alta toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis. Além disto, tem se observado um aumento preocupante de casos onde estes fármacos não levam à cura do paciente, permitindo o surgimento de cepas resistentes e aumento da frequência de casos de Leishmaniose Recidiva Cutis (LRC). Os indivíduos com LRC apresentam lesões nodulares ou pequenas pápulas ao redor de uma cicatriz anterior não curada (COSTA et al., 2009).

Atualmente, a maioria dos tratamentos utilizados agem diretamente na destruição dos parasitos ou limitando a sua multiplicação (BARBOSA et al., 2015). As taxas de cura do antimonial pentavalente em uma área endêmica de transmissão da *L. braziliensis* variam entre 50 e 90% (ESPADA et al., 2017; MACHADO et al., 2010). Neste contexto, a busca de novos fármacos faz-se necessária para o tratamento destes casos.

Uma alternativa interessante tem sido o uso de fármacos que atuam em mecanismos da resposta imune, pois estes têm demonstrado resultados promissores. Um dos principais mecanismos imunes de destruição de parasitos intracelulares, como a *Leishmania spp.*, é o aumento da concentração de radicais livres de oxigênio – superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peróxido de nitrito (GANTT et al., 2001).

Nesta temática, foi demonstrado que o dietilditiocarbamato (DECT) aumenta a produção de superóxido e, conseqüentemente, diminui a carga parasitária *in vivo* e *in vitro* na LT experimental (CELES et al., 2016; KHOURI et al., 2009, 2010). O DETC é um quelante de cobre que inibe a ação da superóxido dismutase 1 (SOD1) e por isso aumenta a produção de superóxido (KHOURI et al., 2010).

Outro fármaco, a hidroxilamina, tem demonstrado efeitos semelhantes sobre a diminuição da carga parasitária em macrófagos humanos infectados *in vitro* (dados não publicados do grupo). Acredita-se que o metabolismo da hidroxilamina promova o aumento de peróxido de nitrito, destruindo com mais eficácia parasitos intracelulares (CHEN et al., 2015). Além disto, resultados sobre a segurança da hidroxilamina têm demonstrado pouca toxicidade em células humanas e de camundongos (dados não publicados do grupo).

Deste modo, estas observações sugerem que a hidroxilamina e o DETC podem ser potenciais candidatos alternativos para o tratamento da LT. Com isso, o objetivo deste trabalho é testar a ação *in vitro* da hidroxilamina e do DETC contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

CEUA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 001/2018 e os animais foram mantidos em condições livres de patógenos e manipulados de acordo com as normas de ética do Instituto Oswaldo Cruz para experimentação animal.

Obtenção de macrófagos de camundongo BALB/c

Foram utilizados camundongos BALB/c (fêmeas entre 4 a 6 semanas de vida) oriundos do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ). Células precursoras de

macrófagos foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia dos camundongos BALB/c. Em seguida, as células foram cultivadas em placas de Petri contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone), 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – GIBCO) e 30% de sobrenadante de fibroblastos murinos L929. A cultura foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por sete dias para que ocorresse a diferenciação das células precursoras em macrófagos. Depois deste período, os macrófagos aderidos foram recuperados da placa utilizando tripsina (GIBCO), centrifugados e ressuspensos.

Ensaio de citotoxicidade por coloração com azul de trypan

Os macrófagos murinos foram distribuídos em tubos de polipropileno na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/tubo, com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – GIBCO) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM) (Figura 1). Os tubos foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e após 48 horas as células foram contadas considerando a coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

Ensaio de citotoxicidade por quantificação de ATP produzido

Os macrófagos murinos foram distribuídos em tubos de polipropileno na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/tubo, com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep – GIBCO) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM) (Figura 1). Os tubos foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e após 48 horas, 100 μ L da suspensão celular foi transferida para microplaca de 96 poços, preta com fundo transparente. Após 30 minutos, 100 μ L do reagente CellTiter-Glo (Promega) foi adicionado nos poços com uma concentração final de reagente de 2%, com um volume final de 200 μ L. A luminescência foi mensurada utilizando o leitor de placas FilterMax F3 (Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata.

Citologia

Os macrófagos murinos tratados com DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM) foram submetidos à citocentrifugação (Cytospin 4, ThermoFisher) em 500 rpm

por 5 minutos para preparação das lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas no microscópio ótico.

Cultivo axênico dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em meio Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF - Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep - GIBCO) em estufa BOD a 26°C, durante cinco dias, até o parasito atingir a fase estacionária.

Ação leishmanicida da hidroxilamina e do DETC em cultura axênica de *Leishmania braziliensis*

Os parasitos na fase estacionária foram cultivados em placas de 48 poços, na concentração de 5×10^5 /poço, com meio Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF - Hyclone) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Pen Strep - GIBCO) e tratados com diluições combinadas e seriadas de hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM) e de DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM) (Figura 1). As placas foram incubadas em estufa BOD a 26°C e após 48 horas foi realizada a contagem dos parasitos viáveis considerando a coloração com azul de trypan, o tamanho, a motilidade e a morfologia em câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em sextuplicata, em dias independentes.

Análise estatística

Os dados foram representados em gráficos e mapas de calor utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. A fração de inibição e o índice de combinação (CI) foram calculados utilizando o software CompuSyn. O escore de sinergia de Loewe foi realizado utilizando o software online SynergyFinder (<https://synergyfinder.fimm.fi/>).

RESULTADOS

Ação leishmanicida dos fármacos na forma promastigota da *Leishmania (L.) braziliensis*

Com o intuito de determinar a ação leishmanicida do DETC e hidroxilamina contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, foram conduzidos ensaios *in vitro*, utilizando diversas concentrações combinadas da hidroxilamina (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM)

com o DETC (0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM). A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade e crescimento de *L. braziliensis*, observou-se um índice de inibição de 50% de 33,03 μ M para Hidroxilamina, 0,247 μ M para DETC e 1,676 μ M para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5) (Figura 2).

Ação citotóxica dos fármacos nos macrófagos murinos através da contagem por azul de trypan

Para determinar a citotoxicidade dos fármacos em macrófagos murinos, foram conduzidos ensaios *in vitro*, utilizando diversas concentrações combinadas da hidroxilamina (5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM) com o DETC (2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM). A partir da avaliação da ação dos fármacos na viabilidade dos macrófagos murinos por azul de trypan, observou-se que havia células viáveis até a concentração de 20000 μ M de DETC, com uma redução marcante da viabilidade das células na concentração de 200 μ M de DETC (Figura 3). A identificação dessa variação na sobrevivência das células sugeriu uma possibilidade de baixa especificidade da contagem por azul de trypan, determinando a necessidade da avaliação morfológica das células por análises de citologia. No que se refere ao aspecto morfológico das células (Figura 4), foi observado uma perda significativa da integridade morfológica a partir da concentração de 200 μ M de DETC (Figura 4D) com a presença de células com núcleos picnóticos e muitos debris celulares.

Ação citotóxica dos fármacos nos macrófagos murinos através da quantificação de ATP

Ensaio *in vitro*, utilizando diversas concentrações da hidroxilamina (5 μ M, 50 μ M, 500 μ M, 5mM) combinadas com o DETC (2 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 2mM, 20mM) foram conduzidos para determinar a citotoxicidade dos fármacos em macrófagos murinos. A viabilidade celular foi mensurada utilizando o CellTiter-Glo (Promega), um ensaio que se baseia na identificação do metabolismo ativo das células a partir da quantificação de ATP. A avaliação da ação dos fármacos na viabilidade dos macrófagos murinos, observou-se um índice de inibição de 50% de 237,0 μ M para Hidroxilamina, 11,47 μ M para DETC e 67,16 μ M para combinação das drogas (DETC/Hidroxilamina=1:2,5) (Figura 5).

Índice de seletividade combinada dos fármacos contra *L. braziliensis*

Para avaliar a significância dos medicamentos combinados, foi analisado o índice de combinação (CI) (Figura 6A) e o escore de sinergia de Loewe (Figura 6B e 6C). A questão que está sendo abordada é se os dois medicamentos, atuando juntos produzem um efeito

combinado que é consistente com suas potências individuais, denominado aditivo, um efeito maior que o aditivo, denominado sinérgico ou um efeito que é menos aditivo, denominado antagonista. Isso permite a seleção de concentrações apropriadas para a combinação dos dois agentes. Foi observado uma ação antagonista em macrófagos murinos usando a concentração de 20uM de DETC e 500uM de Hidroxilamina. Por outro lado, esta concentração combinada foi altamente sinérgica para *L. braziliensis* (Figura 6).

DISCUSSÃO

Atualmente, o tratamento da leishmaniose cutânea tem sido um desafio para médicos e pesquisadores, além de que os fármacos mais utilizados e com os melhores resultados possuem elevada toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis (DEPS et al., 2000; SALDANHA et al., 2000). Nesta perspectiva, o presente estudo demonstrou que a associação de DETC e hidroxilamina induz a morte de *Leishmania braziliensis* em baixas concentrações e apresenta baixa toxicidade em concentrações mais elevadas para ambos os fármacos em macrófagos murinos *in vitro*.

A associação da hidroxilamina com o DETC demonstrou atividade potente *in vitro* contra *Leishmania braziliensis*. Estudos anteriores demonstraram o efeito do DETC como adjuvante do sistema imunológico em pacientes infectados pelo HIV-1, e contra *Mycobacterium tuberculosis*. Nos pacientes infectados pelo HIV, o DETC foi capaz de atrasar a progressão para AIDS, além disso, foi capaz de aumentar a atividade microbicida *in vitro* de monócitos estimulados com DETC, contra *Mycobacterium tuberculosis* (HÜBNER et al., 1991; REISINGER et al., 1990). KHOURI et al., 2010 demonstrou que o DETC diminui a carga parasitária em macrófagos murinos e humanos por *L. braziliensis in vitro*, como consequência do aumento da produção de superóxido, além de diminuir significativamente as lesões em camundongos infectados com *L. braziliensis*.

A hidroxilamina é um composto químico utilizado, dentre outras coisas, para quantificar superóxido através da formação de nitrato e nitrito. Já foi descrito que no metabolismo celular normal, a hidroxilamina é produto intermediário em reações de redução enzimática de nitratos ou nitritos e pela oxidação de amônia (GROSS; SMITH, 1985). A hidroxilamina apresenta na sua fórmula um átomo de nitrogênio (H_3NO), e acredita-se que quando este reage com oxigênio há a formação de peróxido de nitrito, molécula capaz de destruir parasitos intracelulares, como a *Leishmania* (CHEN et al., 2015). Por isso, este

estudo teve o intuito de avaliar a possível atividade leishmanicida deste composto. Nossos resultados são pioneiros, pois não foi reportado na literatura estudos da hidroxilamina na terapia da leishmaniose.

Testes de toxicidade foram realizados utilizando as mesmas concentrações das drogas em macrófagos murinos com duas metodologias diferentes. Na primeira, a viabilidade celular foi avaliada através de contagem das células após coloração com azul de trypan, entretanto, observou-se um padrão de viabilidade nas células que foram tratadas com 2mM e 20mM de DETC e uma maior quantidade de células mortas quando tratadas com uma concentração mais baixa (200µM de DETC). Por este motivo, lâminas com a suspensão celular foram preparadas por citocentrifugação, e quando avaliadas em microscopia ótica, foi identificado que na concentração de 200µM de DETC as células apresentavam alteração na morfologia, sugerindo um aspecto de morte celular. Um estudo conduzido por KRAUSE; CARLEY; WEBB, 1984, demonstrou que apenas 60% de células que foram previamente expostas a tratamentos letais, apresentaram-se coradas com azul de trypan. Outros estudos demonstraram que o azul de trypan não é um corante confiável para avaliação da viabilidade de células de mamífero em suspensão (FRASER et al., 1976; TENNANT, 1964). Por este motivo, os experimentos foram repetidos utilizando outra metodologia, na qual viabilidade celular é medida através de um ensaio baseado na quantificação de ATP, indicador de células metabolicamente ativas. Neste ensaio, foi possível perceber que a partir da concentração de 200µM de DETC, ocorreu morte celular.

Estes resultados corroboram com a microscopia ótica, indicando que o padrão de viabilidade encontrado nas contagens diretas com azul de trypan não condizem com a viabilidade celular observada no ensaio de luminescência. Com isso, podemos perceber que a contagem de células com azul de trypan não é a melhor metodologia para avaliação da viabilidade celular de macrófagos.

Ao avaliar a ação dos fármacos, pode-se perceber que o índice de inibição de 50% encontrado para *L. braziliensis* é menor (33,03 µM para Hidroxilamina, 0,247 µM para DETC e 1,676 µM para combinação das drogas) do que os valores encontrados para macrófagos murinos (237,0 µM para Hidroxilamina, 11,47 µM para DETC e 67,16 µM para combinação das drogas). Sendo assim, a *L. braziliensis* apresenta uma maior sensibilidade à ação da hidroxilamina e do DETC, em comparação com os macrófagos murinos, os quais apresentaram efeitos citotóxicos apenas em concentrações mais elevadas dos fármacos. De forma geral, o efeito sinérgico entre as duas drogas abre caminho para um possível novo tratamento para a leishmaniose tegumentar, já que a combinação das drogas mostrou

um efeito leishmanicida em *L. braziliensis*, e baixa citotoxicidade em macrófagos murinos. Novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito da combinação da hidroxilamina com o DETC em modelos *in vivo*, e a partir dos resultados discutidos aqui, a combinação de 20µM de DETC com 500µM de hidroxilamina pode apresentar um potencial efeito em modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar experimental.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a associação de hidroxilamina com DETC tem efeitos antiproliferativos potentes em promastigotas de *L. braziliensis* e apresenta baixa toxicidade em macrófagos murinos. Juntos, esses resultados indicam que a associação de hidroxilamina com DETC poderia ser um tratamento promissor para a leishmaniose tegumentar, e apoiar futuros estudos *in vivo* em modelos murinos infectados com *L. braziliensis*.

FIGURAS

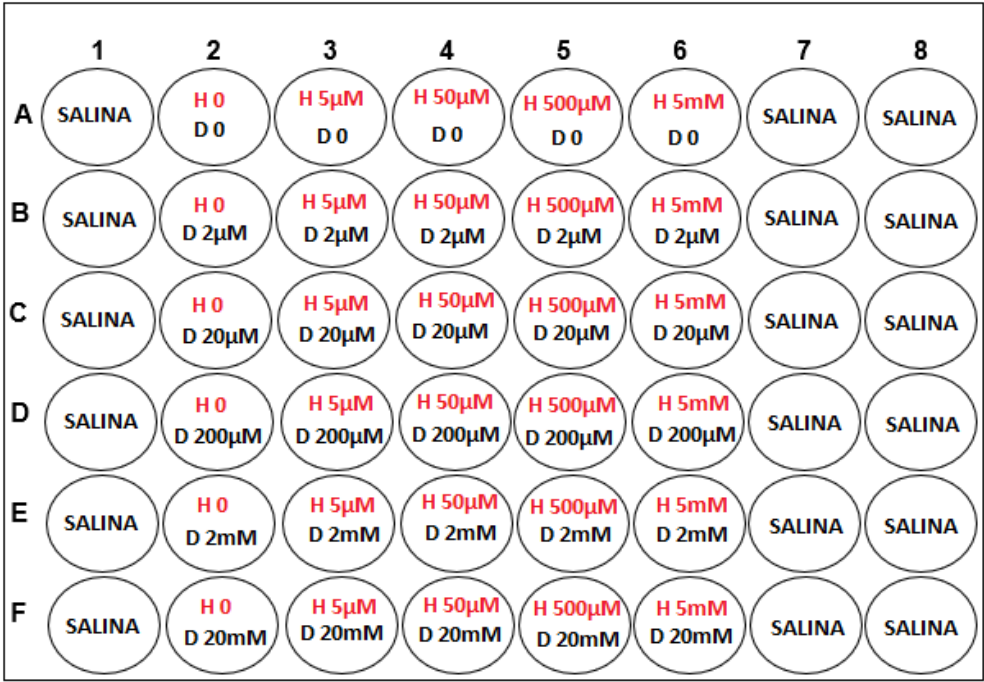


Figura 1: Desenho do experimento. Representação do ensaio de ação leishmanicida da hidroxilamina e dietilditiocarbamato para *L. braziliensis*. H representa a hidroxilamina e D representa o dietilditiocarbamato.

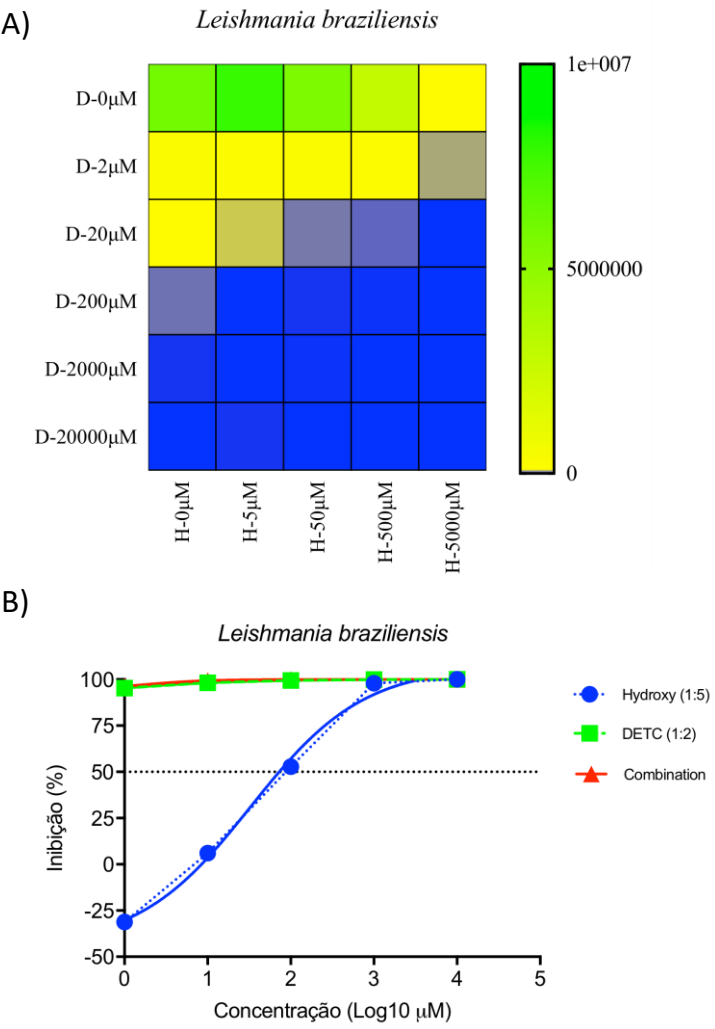


Figura 2: Ação microbicida da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na *Leishmania braziliensis*. A) Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato no crescimento da *Leishmania braziliensis*. Os resultados estão representados pela média do valor absoluto de promastigotas viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 1×10^7 de parasitos viáveis (verde). No eixo x é apresentado as diluições de Hidroxilamina (H) e no eixo y as diluições de DETC (D). B) Curva de % de inibição do DETC e da Hidroxilamina combinada (Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)). Foi realizado um experimento em triplicata.

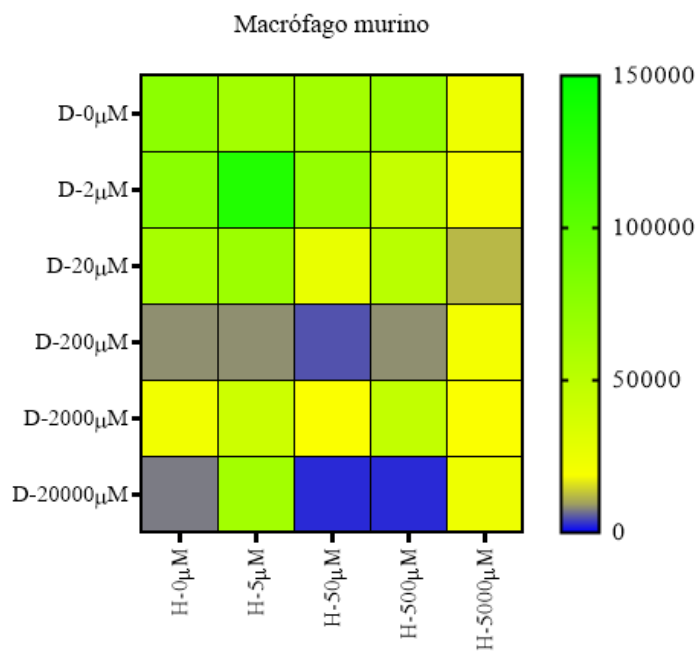


Figura 3: Ação citotóxica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos. Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato no crescimento e viabilidade de macrófagos murinos. Os resultados estão representados pela média do valor absoluto de macrófagos viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 150000 de células viáveis (verde). No eixo x é apresentado as diluições de Hidroxilamina (H) e no eixo y as diluições de DETC (D). Foram realizados seis experimentos independentes.

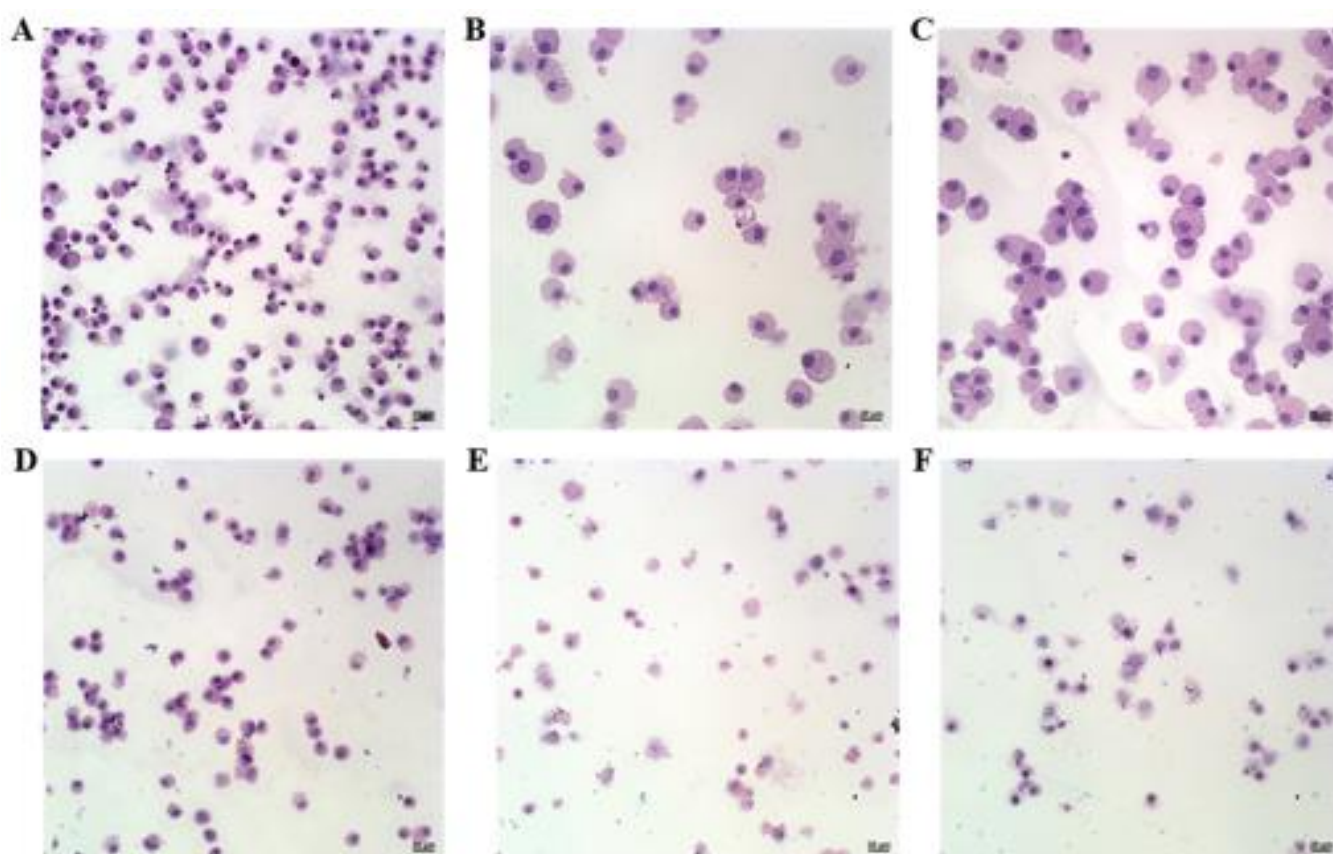


Figura 4: Citologia da ação citotóxica do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos. A-F) Microscopia ótica com aumento de 400x, das lâminas nas concentrações de 0 hidroxilamina e 0 DETC, 0 hidroxilamina e 2 μ M DETC, 0 hidroxilamina e 20 μ M DETC, 0 hidroxilamina e 200 μ M DETC, 0 hidroxilamina e 2mM DETC, 0 hidroxilamina e 20mM DETC respectivamente.

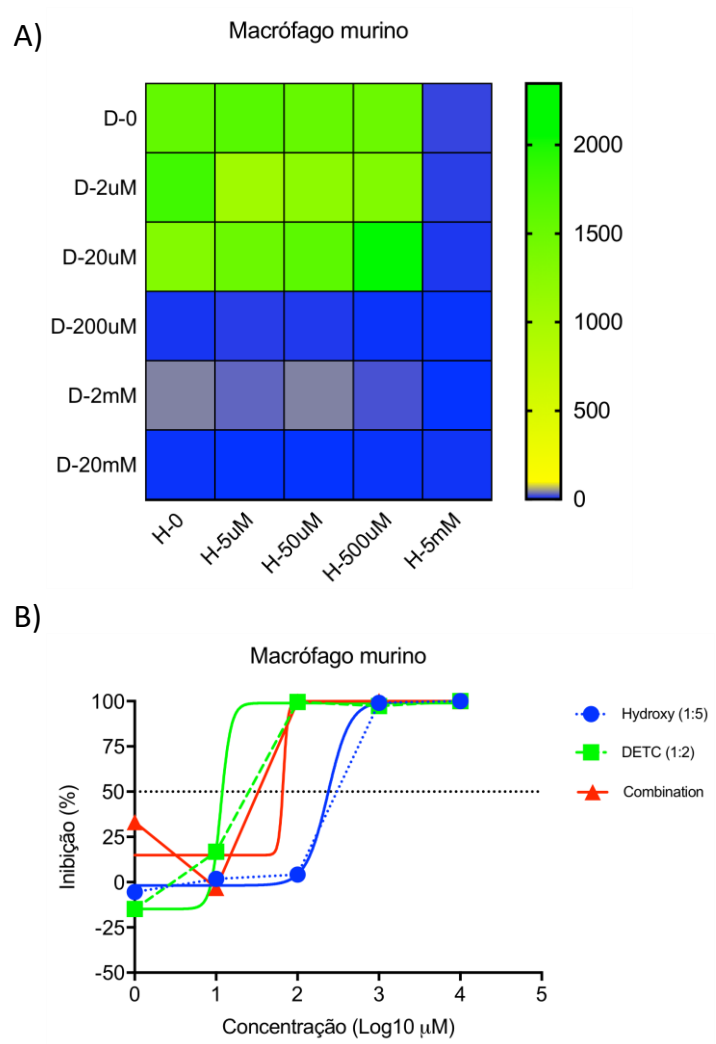


Figura 5: Avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos através do ensaio de luminescência. A) Mapa de calor representando a avaliação da ação direta da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato no crescimento e viabilidade de macrófagos murinos. Os resultados estão representados pela média do valor absoluto de macrófagos viáveis, numa escala variando de zero (azul) até 2000 de densidade óptica de células viáveis (verde). B) Curva de % de inibição do DETC e da Hidroxilamina combinada (Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)).

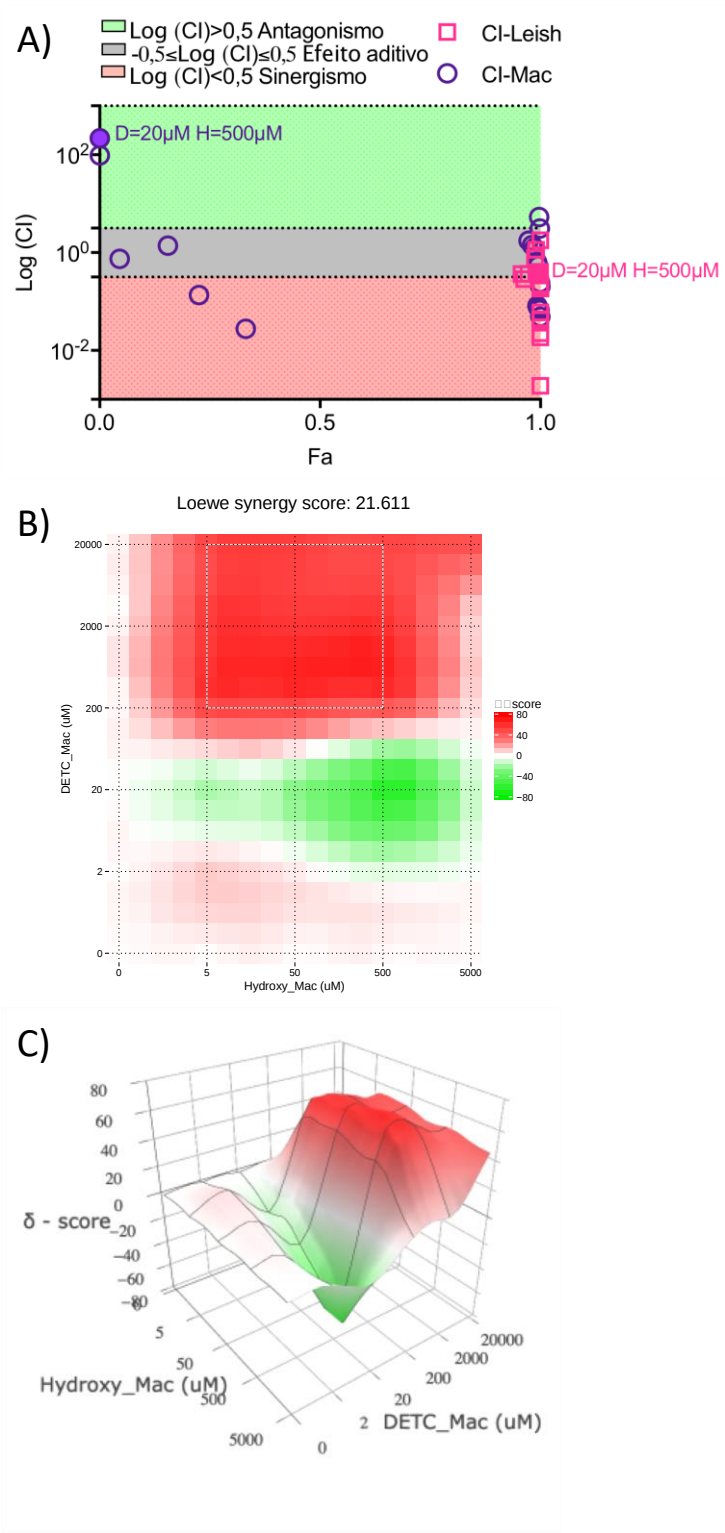


Figura 6: Avaliação da ação sinérgica da hidroxilamina e do dietilditiocarbamato na viabilidade de macrófagos murinos e *Leishmania braziliensis*. A) Log do índice de combinação (Log CI) das drogas DETC e Hidroxilamina versus Fração de inibição (Fa). A equação do índice de combinação derivada para dois medicamentos é: $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$. B) A pontuação de sinergia de Loewe para uma combinação de drogas na inibição da viabilidade dos macrófagos murinos é calculada em todas as células da

combinação de doses. Os mapas de sinergia 2D e 3D destacam regiões de dose sinérgica e antagônica nas cores vermelho e verde, respectivamente, para o ensaio de viabilidade nos macrófagos murinos.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery**, 2015.
- CELES, F. S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. iii, p. 1–11, 2016.
- CHEN, L. et al. Production of Hydroxyl Radical via the Activation of Hydrogen Peroxide by Hydroxylamine. **Environmental Science and Technology**, 2015.
- COSTA, J. M. L. Modalidades Clínicas, Diagnóstico E Abordagem Terapêutica Da Leishmaniose Tegumentar No Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 143, n. 79, p. 70–83, 2009.
- DEPS, P. D. et al. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 535–543, 2000.
- ESPADA, C. R. et al. Susceptibility to miltefosine in Brazilian clinical isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 656–659, 2017.
- FRASER, T. J. et al. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. **Experimental Cell Research**, v. 97, n. 2, p. 275–280, 1976.
- GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 2001.
- GROSS, P.; SMITH, R. P. Biologic activity of hydroxylamine: A review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 87–99, 1985.
- GUIMARÃES, L. et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta**

Médica da Bahia, v. 74, n. 1, p. 66–74, 2008.

HÜBNER, L. et al. Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by diethyldithiocarbamate (DTC). **International Journal of Immunopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 1067–1072, 1991.

KHOURI, R. et al. IFN- γ Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2525–2531, 2009.

KHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasisKHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising the. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 8–9, 2010.

KRAUSE, A. W.; CARLEY, W. W.; WEBB, W. W. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 32, n. 10, p. 1084–1090, 1984.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.

REISINGER, E. C. et al. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. **The Lancet**, v. 335, n. 8691, p. 679–682, 1990.

SALDANHA, A. C. R. et al. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 383–388, 2000.

TENNANT, J. R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viabilityTransplantation, v. 2, n. 6, p. 685-694, 1964.

2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

2.1 Revista: Revista e 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

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).

ANEXOS

ANEXO A – Declaração de responsabilidade

Certificamos 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.

Salvador, 01 de novembro de 2019

Thaline Mabel Sousa Santos

Antonio Ricardo Khouri Cunha