

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Infecção assintomática por *Leishmania* em humanos e atividades
biológicas de alcaloides β -carbólicos**

MILENA MENEZES CORRÊA PEDERIVA

Dourados – MS

2023

MILENA MENEZES CORRÊA PEDERIVA

Infecção assintomática por *Leishmania* em humanos e atividades biológicas
de alcaloides β -carbolinas

Área do CNPq: 4.01.01.09-6 - Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Tese de Exame de Defesa apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção
do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-
Parasitárias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Herintha Coeto Neitzke Abreu

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Anelise Samara Nazari
Formagio

Dourados – MS

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P371i Pederiva, Milena Menezes Correa

Infecção assintomática por Leishmania em humanos e atividades biológicas de alcaloides β -carbolinas [recurso eletrônico] / Milena Menezes Correa Pederiva. -- 2023.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Herintha Coeto Neitzke Abreu.

Coorientadora: Anelise Samara Nazari Formagio.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Leishmanioses. 2. β -Carbolinas. 3. citotoxicidade. 4. antioxidante. I. Abreu, Herintha Coeto Neitzke. II. Formagio, Anelise Samara Nazari. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida que ele me concedeu e por toda sabedoria e discernimento no decorrer da minha caminhada e pela interseção de Nossa Senhora Aparecida; são minha rocha e fortaleza.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Profa. Dra. Herintha Coeto Neitzke Abreu por toda ajuda, companheirismo, conhecimento compartilhado em minha pesquisa e por me manter motivada durante todo o processo. Gostaria de agradecer também à minha coorientadora Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio pela disponibilidade em ajudar e por todo carinho para comigo.

Agradeço de todo coração à Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), por ter me auxiliado desde o início, mesmo com as mais simples dúvidas e sempre se mostrando disponível para compartilhar todo seu conhecimento na área. Fernanda e Amarith muito obrigada por toda ajuda, esclarecimento e conhecimento compartilhado.

À toda minha família, em especial meu esposo Thiago, pais, irmão e sogros por tudo que fizeram por mim durante esse período desde as simples palavras de apoio. Agradeço a vida da minha filha Serena, que não me deixou desistir, mesmo ali dentro da minha barriga já me dava uma imensa força na certeza de que tudo iria dar certo.

Muito obrigada a todos os colegas de laboratório especialmente Kamily e Matheus, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido. Também agradeço imensamente meu querido colega Sidney, sou muita grata pela sua vida e por tudo que já fez por mim.

Por último gostaria de agradecer a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e todo corpo docente.

Desta forma, desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Taxonomia das espécies de <i>Leishmania</i>	21
Figura 2 – Forma cutânea (à esquerda), com lesão inicial, papulosa, eritematosa, com vértice ulcerado; e forma cutânea localizada (à direita), com lesão ulcerada única, arredondada, de formato regular, localizada no dorso da mão, apresentando bordas elevadas, eritematosas e fundo granuloso limpo	23
Figura 3 – Forma mucocutânea: lesão úlcero-vegetante no lábio inferior e mucosa labial (à esquerda) e lesão ulcerosa da mucosa do septo nasal e do introito das narinas (à direita)	23
Figura 4 – A forma cutânea disseminada pode apresentar múltiplas lesões papulares (foto à esquerda) e lesões com aspecto de nódulo verrucoide (foto à direita)	24
Figura 5 – Paciente com LCD com lesões nodulares não ulceradas pelo corpo	24
Figura 6 – Paciente com LV apresentando hepatoesplenomegalia	25
Figura 7 – Fêmea de flebotomíneo adulto, <i>Lutzomyia longipalpis</i>	27
Figura 8 – Formas promastigotas (A) e amastigotas internalizadas em macrófagos (B)	27
Figura 9 – Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	29
Figura 10 – Estrutura química do Estibogluconato de sódio	31
Figura 11 – Estrutura química do Antimoniato de meglumina	31
Figura 12 – Estrutura química Anfotericina B	32
Figura 13 – Estrutura química da Pentamidina	32
Figura 14 – Reação do radical DPPH com molécula antioxidante formando o DPPH-H	36
Figura 15 – Mudança de coloração observada após reação entre o radical DPPH (violeta) e molécula antioxidante gerando DPPH-H (amarelo)	36

Figura 16 – Reação de geração do radical ABTS ⁺ com persulfato de potássio	37
Figura 17 – Estrutura dos alcaloides β -carbolínicos	38
Figura 18 – Estruturas químicas dos medicamentos β -carbolínicos comercializados atualmente, com o núcleo β C em destaque	39

ARTIGO 1

Figure 1 - Flow diagram of selection of articles used for the systematic review 56

ARTIGO 2

Fig. 1. Molecular structures of β -carboline derivatives 68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Characteristics of the studies of cases of asymptomatic *Leishmania* infection and their groups of detection techniques and *Leishmania* species. 57

ARTIGO 2

Table 1. Drug-likeness and toxicity prediction of alkaloids β -carbolines 73

Table 2. *In vitro* activity of β -Carbolines against promastigotes of *L. amazonensis* 75

Table 3. The antioxidant effects of derived β -CA alkaloids in DPPH and ABTS assays. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

REVISÃO DE LITERATURA

βC	β-Carbolina
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
RL	Radicais Livres
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
ABTS	2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino6-sulfônico)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
DPPH-H	difenil-picril-hidrazina
B-PE	B-ficoeritrina
R-PE	R-ficoeritrina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

WB	Western Blotting
RIFI	Imunofluorescência Indireta
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Ensaio imunoenzimático
RDTs	Testes de diagnóstico rápido
DH β C	Di-hidro β -carbolina
TH β C	Tetra-hidro β -carbolina

ARTIGO 1

CL	<i>Cutaneous leishmaniasis</i> (Leishmaniose cutânea)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DAT	<i>Direct Agglutination test</i> (Teste de Aglutinação Direta)
DTH	<i>Delayed-Type Hypersensitivity</i> (Hipersensibilidade do tipo retardado)
ELISA	<i>Enzyme Immunoabsorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
FAST	<i>Fast Agglutination Screening Test</i> (Teste de Triagem de Aglutinação Rápida)
FML	<i>Fucose Mannose Ligand</i> (Ligante de Fucose Manose)
FUNDECT	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/ Síndrome da imunodeficiência adquirida
ICT	<i>Immunochromathographic test</i> (Teste Imunocromatográfico)

IFAT	<i>Antibody Immunofluorescence Test</i> (Teste de imunofluorescência de anticorpos)
IGRA	<i>Interferon Gama Release Assay</i> (Ensaio de Liberação de Interferon Gama)
MCM	<i>Microcapillary culture method</i> (Método de cultura microcapilar)
MST	<i>Montenegro Skin Test</i> (Teste de Montenegro)
NTDs	<i>Neglected tropical diseases</i> (Doenças tropicais negligenciadas)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	<i>Real Time PCR</i> (PCR em Tempo Real)
rK26	<i>Chromatographic test of antibodies against rK26</i> (Teste cromatográfico de anticorpos contra rK26)
rK39	<i>Immunochromatographic test rK39</i> (Teste imunocromatográfico rK39)
SLA	<i>ELISA based on Soluble Leishmania Antigens</i> (ELISA baseado em Antígenos Solúveis de <i>Leishmania</i>)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
VL	<i>Visceral leishmaniasis</i> (Leishmaniose visceral)
WB	<i>Western blot</i> (Western blotting)

ARTIGO 2

β -CA	<i>β-carboline</i> (β -carbolina)
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (Demanda bioquímica de oxigênio)
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
IFLA/BR/1967/pH8	Cepa de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i>
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

RPMI 1640	Meio de crescimento celular
DPPH	1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl
BHT	Butylhydroxytoluene
ABTS	azinobis (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
logP	Lipophilicity

Infecção assintomática por *Leishmania* em humanos e atividades biológicas de alcaloides β -carbolinas

RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias tropicais negligenciadas, não contagiosas, causadas por espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que afetam milhares de pessoas em todo o mundo. O desenvolvimento das formas clínicas pode levar o aparecimento de lesões na pele, até mesmo desfigurantes, acometimento de órgãos linfoides ou ainda casos de infecção assintomática. Considerando a problemática no tratamento da doença devido a toxicidade medicamentosa e resistência parasitária, é necessário que novas moléculas sejam estudadas e avaliadas quanto aos seus efeitos anti-*Leishmania*, na tentativa do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma revisão sistemática sobre infecção assintomática em humanos, e investigar as características químicas e toxicidade *in silico*, bem como o potencial hemolítico, atividade anti-*Leishmania* e antioxidante de onze alcaloides sintéticos da classe das β -carbolinas. O estudo de revisão sistemática após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão incluiu 82 artigos. Foi demonstrado que o maior número de estudos com casos assintomáticos foi realizado no Brasil (n= 27) e Índia (n= 15); com os artigos analisados foi possível identificar as espécies de *Leishmania* relatadas nos estudos, bem como técnicas usadas para diagnóstico, população analisada, faixa etária e histórico de doenças pré-existentes. Para o desenvolvimento do segundo estudo, os compostos β -carbolinas foram obtidos através de síntese química relatada em estudo anterior, e através de suas estruturas químicas com o auxílio de servidores foi possível analisar as características químicas e toxicidade *in silico* dessas moléculas. A atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi determinada pelo método colorimétrico utilizando MTT. A citotoxicidade foi avaliada utilizando eritrócitos humanos e a atividade antioxidante foi mensurada utilizando os ensaios de DPPH e ABTS. Os 11 derivados analisados demonstraram bons parâmetros frente a lipofilicidade e solubilidade, e não se mostraram mutagênicos e citotóxicos. O IC₅₀ para as formas promastigotas teve variação entre os compostos (IC₅₀ = 5.15 a 41.19 μ M), sendo que o derivado PNO₂-Anis (**8**) demonstrou melhor potencial anti-*Leishmania*. Nenhum dos compostos apresentou potencial hemolítico. Com relação a atividade antioxidante, destaca-se o derivado Cl-Oxa (**11**) (IC₅₀ = 0.0481 μ M) no ensaio de DPPH.

Quanto ao ensaio ABTS, todos os compostos demonstraram potencial antioxidante melhor que o controle BHT. Apesar dos resultados demonstrados são necessários estudos futuros desses protótipos na tentativa de utilização para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmanioses, β -Carbolinas, citotoxicidade, antioxidante.

Asymptomatic *Leishmania* infection in humans and biological activities of β -carboline alkaloids

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected, non-contagious tropical parasitic diseases caused by species of protozoa belonging to the genus *Leishmania* that affect thousands of people around the world. The development of clinical forms can lead to the appearance of skin lesions, even disfiguring ones, involvement of lymphoid organs or even cases of asymptomatic infection. Considering the problems in treating the disease due to drug toxicity and parasitic resistance, it is necessary that new molecules be studied and evaluated for their anti-*Leishmania* effects, in an attempt to develop new therapeutic alternatives. In this context, the objective of the work was to develop a systematic review on asymptomatic infection in humans, and to investigate the chemical characteristics and in silico toxicity, as well as the hemolytic potential, anti-*Leishmania* and antioxidant activity of eleven synthetic alkaloids from the β -carboline class. The systematic review study after applying inclusion and exclusion criteria included 82 articles. It was demonstrated that the largest number of studies with asymptomatic cases was carried out in Brazil (n= 27) and India (n= 15); With the articles analyzed, it was possible to identify the species of *Leishmania* reported in the studies, as well as techniques used for diagnosis, population analyzed, age range and history of pre-existing diseases. For the development of the second study, the β -carboline compounds were obtained through chemical synthesis reported in a previous study, and through their chemical structures, with the help of servers, it was possible to analyze the chemical characteristics and in silico toxicity of these molecules. The anti-*Leishmania* activity against promastigote forms of *Leishmania amazonensis* was determined by the colorimetric method using MTT. Cytotoxicity was evaluated using human erythrocytes and antioxidant activity was measured using DPPH and ABTS assays. The 11 derivatives analyzed demonstrated good lipophilicity and solubility parameters and were not mutagenic or cytotoxic. The IC₅₀ for the promastigote forms varied between compounds (IC₅₀ = 5.15 to 41.19 μ M), with the PNO₂-Anis derivative (**8**) demonstrating better anti-*Leishmania* potential. None of the compounds showed hemolytic potential. Regarding antioxidant activity, the Cl-Oxa derivative (**11**) stands out (IC₅₀ = 0.0481 μ M) in the DPPH assay. As for the ABTS assay, all compounds

demonstrated better antioxidant potential than the BHT control. Despite the results demonstrated, future studies of these prototypes are necessary in an attempt to use them for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, β -Carbolines, cytotoxicity, antioxidant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Leishmanioses.....	21
2.1.1 Aspectos clínicos das leishmanioses.....	22
2.1.2 Infecção assintomática.....	25
2.1.3 Mecanismos de transmissão.....	26
2.1.4 Diagnóstico.....	29
2.1.5 Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	30
2.2 Radicais livres e sistema antioxidante.....	33
2.2.1 Métodos para determinação de atividade antioxidante.....	35
2.3 Alcaloides β -carbolinas.....	37
2.4 Atividades biológicas de alcaloides β -carbolinas.....	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
5 APÊNDICES.....	53
5.1 Artigo 1: Asymptomatic <i>Leishmania</i> infection in humans: a systematic review.....	54
5.2 Artigo 2: Similarity to drugs, prediction of toxicity, cytotoxicity, anti- <i>Leishmania amazonensis</i> and antioxidant activity of β -carboline derivatives.....	63
6 CONCLUSÕES.....	86

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grande problema de saúde pública e são consideradas doenças infecto-parasitárias tropicais negligenciadas, não contagiosas, provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O principal mecanismo de transmissão ocorre por via vetorial através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas por *Leishmania* do gênero *Lutzomyia*. Cerca de 700.000 a 1 milhão de pessoas são infectadas anualmente, e destes 26 a 65 mil morrem. A doença pode se manifestar na forma cutânea, mucocutânea e visceral, dependendo principalmente da espécie infectante, capazes de acometer a pele, mucosas e órgãos internos (Da Silva *et al.*, 2020; Matos *et al.*, 2020; Figueiredo *et al.*, 2023).

Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão distribuídas em 98 países e aproximadamente um bilhão de pessoas moram em regiões endêmicas, sendo o Brasil incluído dentre os países que abrangem 91% dos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) relatados em todo o mundo e juntamente com Somália, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Eritreia e Quênia concentram 90% dos casos globais de Leishmaniose Visceral (LV). Em 2019, o Brasil foi responsável por 15.848 casos de LC e 2.529 de LV (WHO, 2021).

A forma mais comum da doença é a LC capaz de provocar lesões na pele. A doença possui alta incidência e surgem anualmente em torno de 600.000 a 1 milhão de novos casos. Já a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) pode provocar lesões destrutivas parcial e/ou total das mucosas da boca, nariz e garganta, gerando deformidades que podem afetar psicologicamente o paciente. A LV é também denominada de calazar, podendo causar a morte em 95% dos casos, se não tratada. É considerada uma das mais relevantes doenças parasitárias relacionadas a surtos e mortalidade potencial (El Mazini *et al.*, 2022; WHO, 2023).

Além dos casos sintomáticos da doença, deve-se ressaltar os quadros de infecção assintomática ou inaparente onde não há evidências de manifestações clínicas, porém há confirmação diagnóstica laboratorial. A maioria dos casos são procedentes de áreas endêmicas, sendo que aproximadamente 30% dos pacientes com LV desenvolvem o quadro assintomático e não evoluem para a forma sintomática. Os pacientes que se encontram nessa situação podem servir de veículo de transmissão da doença, por este motivo há necessidade de avaliação, monitoramento e tratamento dos mesmos com intuito

de evitar propagação da infecção (Ministério da Saúde, 2006; Van Griensven; Diro, 2012).

Durante a evolução clínica da doença ocorre elevado estresse oxidativo, gerado pelo desequilíbrio entre radicais livres e moléculas antioxidantes, o que gera danos teciduais e celulares. Além disso, os antimoniais pentavalentes usados para o tratamento da infecção induzem a produção de moléculas oxidantes em macrófagos infectados por *Leishmania*. É sabido que o estresse oxidativo associado a outros fatores como a peroxidação lipídica levam a quadros de hemólise, relacionada aos quadros de anemia nos pacientes infectados (Basu *et al.*, 2008; Samanta *et al.*, 2012).

O tratamento de primeira escolha para as leishmanioses é baseado no uso de antimoniais pentavalentes (estiboglucanato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos para uso desde década de 1940. Atualmente existem também medicamentos de segunda escolha como a anfotericina B e suas formulações, pentamidinas, miltefosina e outros. As limitações no tratamento continuam sendo desafiadoras incluem a via de administração, efeitos tóxicos, resistência parasitária, tempo de tratamento prolongado, e dificuldades de seguimento da terapêutica medicamentosa (Abpeikar *et al.*, 2023; Guerin *et al.*, 2002; Chappuis *et al.*, 2007). Diante deste cenário, substâncias de origem natural e/ou sintetizadas em laboratório se apresentam como uma alternativa na descoberta de adjuvantes ou substitutos às terapias existentes, com melhor eficácia e menores efeitos adversos.

Os alcaloides β -carbolinas (β C) pertencem a família dos alcaloides indólicos por possuírem um anel de piridina ligado a uma molécula de indol. Essa classe de compostos possui imensa ocorrência na natureza como em vegetais e invertebrados marinhos (Cao *et al.*, 2007), além efeitos de farmacológicas descritos, tais como anticâncer (Ayipo *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2019), anti-HIV (Ashok *et al.*, 2015), antimalárico (Brokamp *et al.*, 2014; Pierrot *et al.*, 2018) e antimicrobiano (Buaban *et al.*, 2021). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram atividade anti-*Leishmania* de diferentes alcaloides β C em diversas espécies de *Leishmania*. A avaliação *in vitro* e *in vivo* de derivados de 2,3,4,9-tetrahydro- β -carbolina tetrazol sintéticos frente à espécie *L. donovani*, demonstrou que a maioria dos compostos exibiram atividade contra promastigotas *in vitro*, com ênfase para o 14t (R=3,4,5 tri-OMe) que por se mostrar mais ativo foi testado *in vivo* e promoveu redução da carga parasitária esplênica em modelos de hamsters dourado (Purohit *et al.*, 2017).

Considerando o panorama atual dos casos de infecção assintomática, da terapia medicamentosa onerosa dos quadros de leishmaniose, e o potencial valor terapêutico dos alcaloides β C, este trabalho tem por objetivo analisar por intermédio de uma revisão sistemática de literatura os casos de infecção assintomática e avaliar as características químicas e tóxicas *in silico*, citotoxicidade, atividade anti-*Leishmania* e antioxidante de alcaloides β C sintetizados frente a *L. amazonensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses, consideradas doenças tropicais negligenciadas causadas por mais de 20 espécies de protozoários intracelulares obrigatório pertencentes ao gênero *Leishmania*, subdivididos em dois subgêneros da família Trypanosomatidae: *Leishmania* e *Viannia*, como mostrados na **Figura 1**. São considerados parasitas digenéticos, ou seja, só completam o seu ciclo evolutivo passando pelo menos em dois hospedeiros (Mishra *et al.*, 2009).

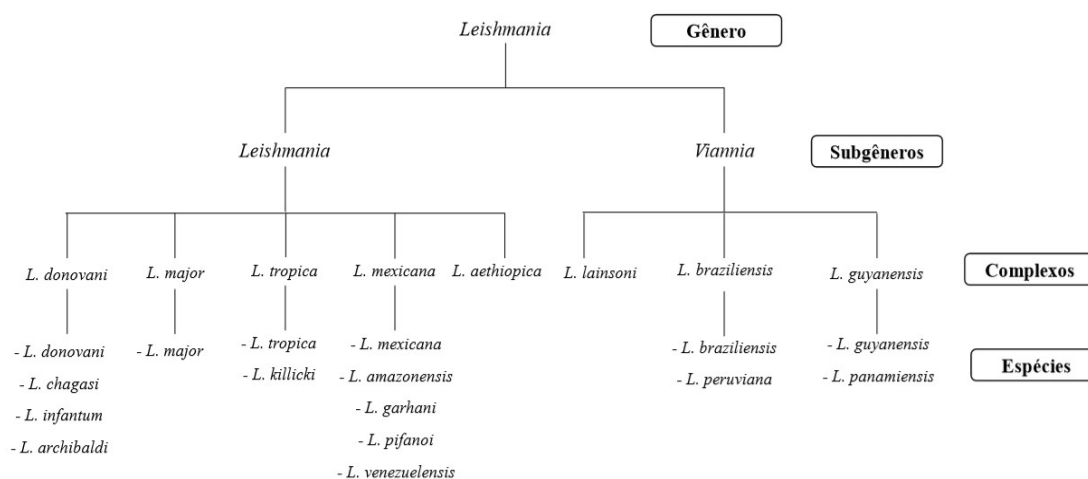


Figura 1 - Taxonomia das espécies de *Leishmania*

Fonte: Mishra *et al.* (2009).

A leishmaniose é endêmica em mais de 90 países e estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas correm o risco de serem infectadas, em muito pela conexão com fatores de risco como a desnutrição, pobreza, imunocomprometimento e migração populacional. Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos da doença, e animais selvagens, como roedores, atuam como reservatórios silvestres

(Garrido-Jareño *et al.*, 2020; Abadías-Granado *et al.*, 2021; Saini; Joshi; Kaur *et al.*, 2022).

Em ambientes domésticos e peridomésticos tem ocorrido um aumento na transmissão da doença, concedido substancialmente pela adaptação dos vetores a novos habitats através do descobrimento de novas fontes de sangue humano e não humano nessas áreas, além da rápida e elevada urbanização de áreas rurais e aptidão das espécies de *Leishmania* a adaptação a outras espécies de flebotomíneos (Moreno *et al.*, 2020).

2.1.1 Aspectos clínicos das leishmanioses

O desenvolvimento das formas clínicas na leishmaniose depende de fatores como resposta imunológica do hospedeiro, fatores genéticos e espécie de *Leishmania* envolvida. As manifestações clínicas variam desde infecção assintomática, formas cutâneas, mucocutânea e visceral. A LC e LMC podem gerar lesões desfigurantes na pele e mucosas. A LV atinge órgãos hematopoiéticos como fígado, baço e medula óssea, com altas taxas de letalidade caso não tratada (Damianou *et al.*, 2020).

A Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) é caracterizada pelo surgimento inicial de uma pápula inflamatória enrijecida no local da picada, geralmente em locais expostos do corpo, que aumenta gradualmente com o passar das semanas gerando uma ulceração de fundo irregular, bordas elevadas e indolor, podendo ser única ou múltipla (**Figura 2**). A resolução pode se estender de 3 a 18 meses dependendo dos aspectos imunológicos do paciente, porém em uma pequena parcela as lesões persistem, não adquirindo melhora no tempo esperado, demonstrando características clínicas mais graves. Em decorrência da variedade de espécies, existe variabilidade nas manifestações clínicas, sendo que as principais espécies responsáveis pela LCL são *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, nas Américas; e *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* no restante do mundo (Gurel; Tekin; Uzun, 2019; Mokni, 2019; Panahi *et al.*, 2022).



Figura 2 – Forma cutânea (à esquerda), com lesão inicial, papulosa, eritematosa, com vértice ulcerado; e forma cutânea localizada (à direita), com lesão ulcerada única, arredondada, de formato regular, localizada no dorso da mão, apresentando bordas elevadas, eritematosas e fundo granuloso limpo
Fonte: Folster *et al.* (2021).

Na LMC ocorre propagação da *Leishmania* através dos vasos linfáticos e sanguíneos da pele para a região de mucosa nasal e orofaríngea (**Figura 3**), comumente observada em pacientes acometidos com LCL nos últimos dois anos. Se caracteriza pela presença de lesões inflamatórias e destrutivas. As principais espécies responsáveis pela LMC são *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* nas Américas; e *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum* no restante do mundo (Crovetto-Martínez *et al.*, 2015; Pinart *et al.*, 2020).



Figura 3 – Forma mucocutânea: lesão úlcero-vegetante no lábio inferior e mucosa labial (à esquerda) e lesão ulcerosa da mucosa do septo nasal e do introito das narinas (à direita)

Fonte: Mattos (2017).

A Leishmaniose Disseminada (LD) trata-se de uma condição rara e se caracteriza pela formação de numerosas lesões papulares que acometem toda a superfície da pele, frequentemente na região facial e tronco (**Figura 4**). São reconhecidas duas espécies causadoras: *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Brasil, 2017).



Figura 4 – A forma cutânea disseminada pode apresentar múltiplas lesões papulares (foto à esquerda) e lesões com aspecto de nódulo verrucoide (foto à direita)

Fonte: Brasil (2017).

Pacientes imunocomprometidos podem desenvolver a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), situação rara que se associa a resposta imune prejudicada e resistência ao tratamento, o que a torna um desafio. As espécies *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *L. major* e *L. amazonensis* estão implicadas no desenvolvimento dessa condição. No Brasil *L. amazonensis* é a responsável por esse tipo de acometimento por se multiplicar descontroladamente devido a falha na resposta celular do hospedeiro, o que contribui para a gravidade da doença. Caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos e placas não ulceradas que podem cobrir grande parte do corpo (**Figura 5**) (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007; Barral; Barral-Neto, 2009; Sampaio *et al.*, 2021).



Figura 5 – Paciente com LCD com lesões nodulares não ulceradas pelo corpo

Fonte: Brasil (2006a).

A LV, também conhecida como calazar possui acometimento sistêmico, principalmente em órgãos hematopoiéticos como medula óssea, fígado e baço, pois os parasitos têm preferência por infectar macrófagos dessas localidades. Trata-se da forma clínica mais grave da doença e os sinais e sintomas abrangem hepatoesplenomegalia, palidez cutaneomucosa, perda de peso, linfadenopatia e anemia (**Figura 6**). É causada por *L. infantum* e *L. chagasi* nas Américas; e *L. donovani* e *L. infantum* no restante do mundo. O cão é considerado o principal reservatório doméstico quando se trata de LV, já que mesmo os assintomáticos podem apresentar alta carga parasitária (Griensven; Diro, 2019; Akbari; Oryan; Hatam, 2021; Luz *et al.*, 2021).



Figura 6 – Paciente com LV apresentando hepatoesplenomegalia

Fonte: Brasil (2014).

O primeiro relato de LV nas Américas foi feito em 1911 na Bacia Amazônica por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. Até meados dos anos 1990, a infecção era considerada uma doença rural, porém devido ao crescimento populacional atingiu zonas urbanas. Este crescimento foi uma das causas do aumento substancial no número de casos, influenciado por falhas no tratamento e dificuldade da população em acatar medidas preventivas (Shimozako *et al.*, 2017).

2.1.2 Infecção assintomática

O primeiro relato mundial de infecção assintomática de leishmaniose ocorreu em 1974 após um surto da doença no norte da Itália e dez anos mais tarde no Brasil. O termo “assintomático” refere-se a pacientes que tiveram diagnóstico para leishmaniose, porém não apresentam sinais e/ou sintomas da doença (Pampiglione *et al.*, 1974; Badaró *et al.*, 1984). Os casos assintomáticos, podem servir como meio de transmissão, já que

indivíduos infectados agem como reservatórios do parasito, tornando a forma assintomática um fator crucial para o aumento do número de casos (Sudarshan; Sudar, 2014).

Em áreas endêmicas são comuns os casos de infecção assintomática e devemos ressaltar que inúmeras variáveis estão envolvidas no desenvolvimento e na progressão para a forma sintomática, incluindo fatores nutricionais, imunogênicos, fisiológicos e genéticos. Casos de progressão podem acontecer entre três meses e um ano após a infecção. Sendo assim, medidas de controle como diagnóstico precoce, tratamento, controle de vetores e detecção dos casos assintomáticos precisam de atenção para diminuir a transmissibilidade (Stauch *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Moreno et al (2006), avaliaram por meio de técnicas moleculares e imunológicas casos de infecção assintomática por *Leishmania*, demonstrando que é possível detectar a doença nos pacientes quando utilizados ensaios diagnósticos diferentes com o intuito de aumentar o limiar de detecção. Além disso foi relatado a relevância de descrever os fatores que levam a progressão da doença, estudar esses casos com o intuito de tratar esses pacientes para que os mesmos não sirvam de reservatório para avanço da doença.

2.1.3 Mecanismos de transmissão

O principal mecanismo de transmissão ocorre via vetorial, porém existem outras vias de transmissibilidade que incluem transfusão de sangue, congênita, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais. A transmissão vetorial ocorre através da picada de vetores hematófagos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, pertencentes a família Psychodidae. Estes insetos apresentam coloração amarelada e são conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, tatuquira e/ou cangalhinha, dependendo da região do Brasil. Nos países do Velho Mundo (Europa, Ásia e África), os vetores comumente pertencem ao gênero *Phlebotomus*, ao passo que no Novo Mundo (Américas) englobam o gênero *Lutzomyia*. Existem cerca de 950 espécies de flebotomíneos em todo o mundo, das quais cerca de 50 espécies possuem relevância médica e são caracterizadas como vetores da doença. Os insetos flebotomíneos fêmeas (**Figura 7**) apresentam hábitos noturnos, são pequenos (2 – 3 mm de comprimento) e não são ouvidos por seus hospedeiros por voarem de forma silenciosa, além disso os vetores infectados tendem a rondar inúmeras vezes o mesmo hospedeiro. As espécies de regiões subtropicais completam seu ciclo de vida ao longo dos meses mais quentes, enquanto as de regiões

tropicais o fazem ao longo de um ano (Xiong *et al.*, 2012; Okwor *et al.*, 2016; Jimenez-Marco *et al.*, 2016; Gajurel *et al.*, 2017; Argy *et al.*, 2020; Mann *et al.*, 2021; Wijerathna *et al.*, 2022).



Figura 7 – Fêmea de flebotomíneo adulto, *Lutzomyia longipalpis*

Fonte: Brasil (2006b).

A sobrevivência do parasito sujeita-se ao sucesso da transmissão entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado. A *Leishmania* apresenta duas fases distintas em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. As formas promastigotas são formas alongadas e extracelulares que se reproduzem no tubo digestivo do vetor, possui flagelo externalizado permitindo assim sua motilidade. Já as amastigotas são formas intracelulares, com formato arredondado e sem flagelo aparente (**Figura 8**). A mudança de formas promastigotas para amastigotas acontece no interior de células fagocíticas mononucleares no hospedeiro vertebrado (Pace, 2014).

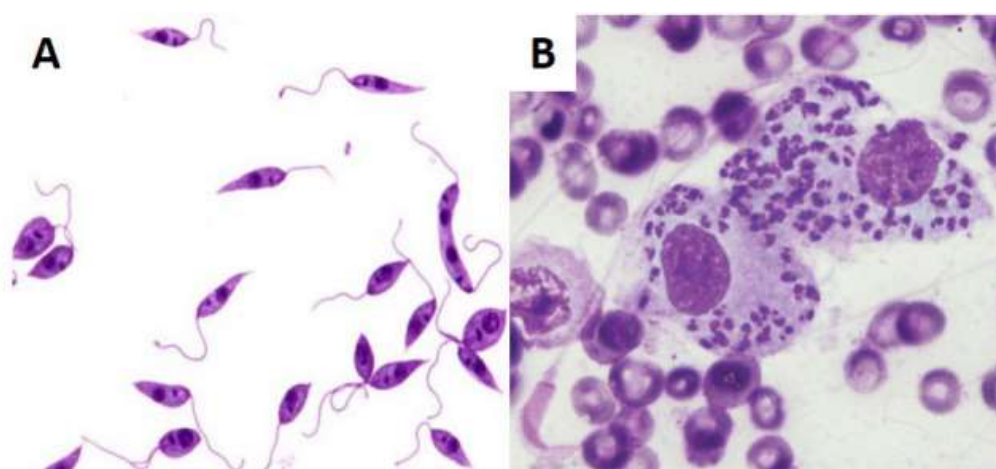


Figura 8 – Formas promastigotas (A) e amastigotas internalizadas em macrófagos (B)

Fonte: Martins (2016).

A fêmea do flebotomíneo se contamina com a *Leishmania* ao se alimentar de sangue de um hospedeiro infectado, alimento necessário para maturação de seus ovos. Macrófagos repletos de amastigotas são carregados junto ao sangue e no intestino do vetor as amastigotas são liberadas das células transformando-se em promastigotas procíclicas (forma não infectante) que se proliferam rapidamente e realizam um processo denominado metaciclogênese, com mudanças morfológicas originando as promastigotas metacíclicas (formas infectantes) (**Figura 9**). Os parasitos migram para a probóscida do vetor e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado no repasto sanguíneo. O processo de desenvolvimento do protozoário no vetor que leva a uma infecção transmissível dura cerca de 7 a 14 dias (Assche *et al.*, 2011; Bates, 2018).

No momento do repasto sanguíneo, o vetor infectado injeta as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro que são englobadas por células do sistema mononuclear fagocitário como células dendríticas, neutrófilos e especialmente macrófagos, capazes de eliminar muitos dos parasitos através de ações leishmanicida. Todavia, alguns destes conseguem burlar o sistema imune através de mecanismos de escape. As promastigotas fagocitadas sofrem diferenciação em amastigotas e iniciam seu processo de multiplicação através de divisão binária gerando o rompimento da membrana celular, onde os parasitos são liberados e englobados por novas células dando continuidade ao ciclo e propagação (Franco; Beverley; Zamboni, 2012; Mann *et al.*, 2021).

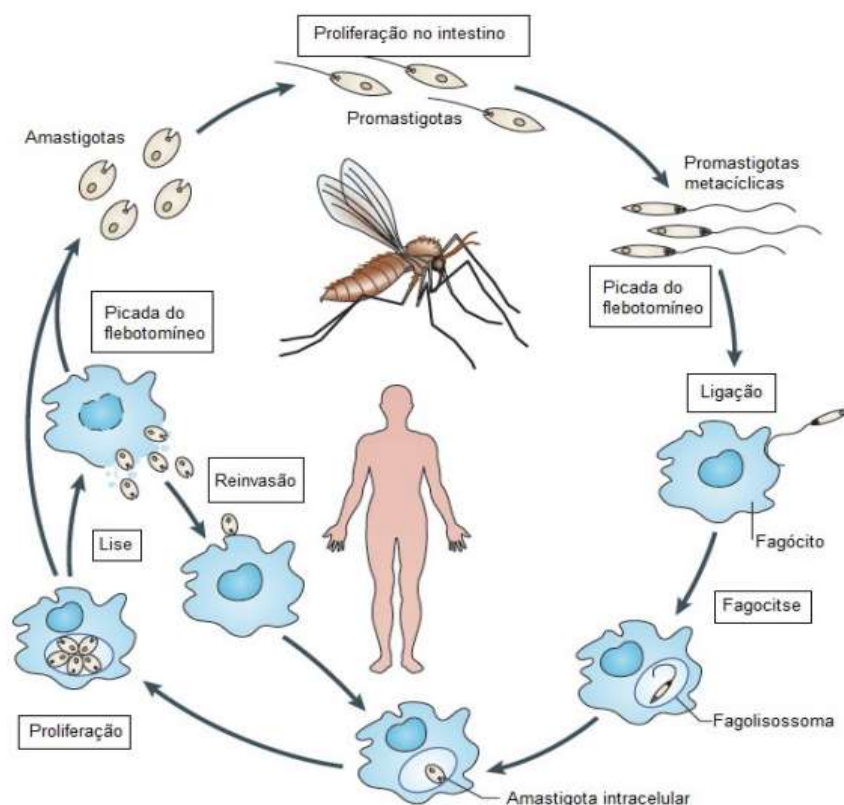


Figura 9 – Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*

Fonte: Espuri (2017).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses é baseado em características clínicas de acordo com estudos epidemiológicos, ensaios clínicos e laboratoriais, com ampliação do limiar de detecção quando há associação de técnicas diagnósticas. Como a LC possui um amplo espectro de lesões, o diagnóstico clínico torna-se limitado devido à similaridade das lesões com outras doenças existentes. De maneira geral, as técnicas de diagnóstico utilizadas comumente compreendem a quantificação e a identificação de parasitas, porém a sensibilidade, especificidade e viabilidade de uso podem limitar a utilização na prática clínica (Gontijo; De Carvalho, 2003; Vega *et al.*, 2023). Na LV, o parasito pode ser identificado de forma direta em aspirados de medula óssea e outros tecidos, ou por meios menos invasivos como amostras de sangue, soro e/ou plasma, com o auxílio de técnicas moleculares e imunológicas (Asfaram *et al.*, 2018).

Os métodos parasitológicos direto ainda são apontados como padrão ouro para diagnóstico da doença, devido à alta especificidade e custo-efetividade. A análise microscópica permite visualizar e detectar as formas amastigotas no interior de células do sistema mononuclear fagocitário através de esfregaços corados de material obtido de

biópsias, raspados e/ou punção aspirativa de linfonodos, fígado, baço e/ou medula óssea. (Pérez-Cordero *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2023).

Já os ensaios imunológicos como ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (RIFI), western blotting (WB) e aglutinação direta, apesar de serem menos invasivos para obtenção de amostras em comparação aos parasitológicos possuem especificidade e/ou sensibilidade variável dependendo de fatores como estado clínico do paciente, doenças pré-existentes e antígeno usado. Para LV, existem testes de diagnóstico rápido (RDTs) como o rK39 que possuem sensibilidade variável e detecta anticorpos contra o antígeno recombinante derivado de *L. chagasi* em amostras de sangue e/ou soro. Em casos sintomáticos, os métodos possuem melhor sensibilidade e especificidade quando comparados aos assintomáticos, cujo detecção é desafiadora (Albuquerque *et al.*, 2023; Kammona; Tsanaksidou, 2021).

As técnicas moleculares são caracterizadas por alta sensibilidade e/ou especificidade, porém são mais demoradas, alto custo e requerem laboratórios altamente equipados, geralmente disponíveis em países subdesenvolvidos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real são as comumente usadas, fornecendo resultados quantitativos confiáveis. O diagnóstico laboratorial precoce principalmente em pacientes assintomáticos é de extrema importância para o tratamento adequado das leishmanioses, dessa maneira são necessários o desenvolvimento de novos meios de detecção de fácil acesso que sejam altamente sensíveis e específicos (Farschi; Saadati; Hasanzadeh, 2020; Kammona; Tsanaksidou, 2021).

2.1.5 Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses

Os medicamentos de primeira escolha utilizados para o tratamento das leishmanioses estão incluídos em um arsenal limitado de drogas mal toleradas e tóxicas que incluem os antomoniais, pentamidina, anfotericina B e paramomicina. Os antomoniais pentavalentes foram produzidos em 1945 e desde então continuam sendo usados como primeira escolha para o tratamento da doença, havendo duas formulações principais: estibogluconato de sódio (Pentostam®) (**Figura 10**) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) (**Figura 11**), sendo este último usado para o tratamento no Brasil. As hipóteses de mecanismo de ação estão relacionadas à indução do estresse oxidativo, obstrução de vias metabólicas, quebra do DNA e morte por via apoptótica. Ainda que eficazes, os efeitos tóxicos graves como cardiotoxicidade e toxicidade pancreática, a via de administração parenteral e os mecanismos de resistência do parasito dificultam o

tratamento, além de serem contraindicados na presença de doenças crônicas graves (Roatt *et al.*, 2020; De Carvalho *et al.*, 2020; Kumari *et al.*, 2021).

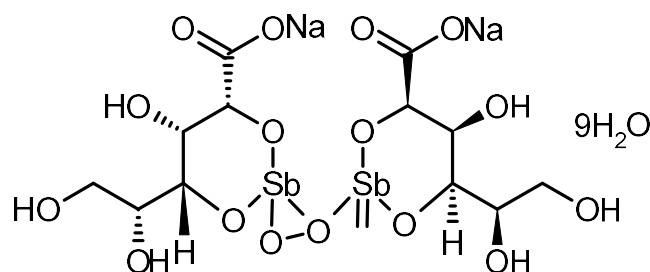


Figura 10 – Estrutura química do Estibogluconato de sódio

Fonte: Mathew e Negi (2019).

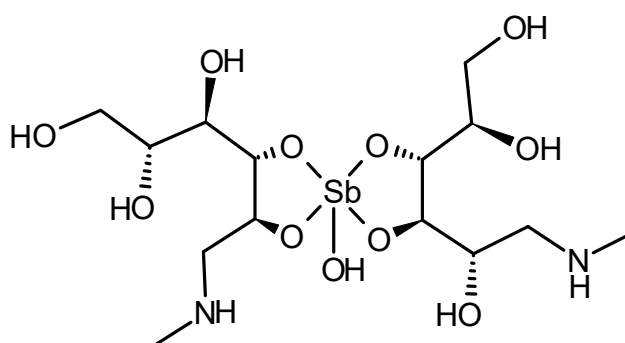


Figura 11 – Estrutura química do Antimoniato de meglumina

Fonte: Mathew e Negi (2019).

O Glucantime® (**Figura 11**) é obtido de forma sintética a partir do ácido antimônico do Nmetil-glucamina, sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses e no Brasil é fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Sua posologia é calculada em mg de SbV/kg para igualar o tratamento. O medicamento é eficaz para o tratamento de todas as formas clínicas, gerando rápida regressão dos sinais e/ou sintomas, eliminando o parasito (RATH *et al.*, 2003). Apesar de sua eficácia, o paciente pode apresentar efeitos colaterais como: artralgia, anemia, mialgia e náusea, além de hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e pancreatite, podendo levar a óbito (Lima *et al.*, 2017; Lawn *et al.*, 2006).

Posteriormente surgiram os medicamentos considerados de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina. Apesar da sua eficácia, efeitos adversos como nefrotoxicidade, miocardite, hepatotoxicidade, hipocalemia e teratogenicidade são observadas e podem demandar hospitalização. Com o intuito de evitar a resistência do

parasito, reduzir o tempo de tratamento, custos e baixa adesão do paciente foram criadas as terapias combinadas (Pradhan *et al.*, 2022).

A Anfotericina B (**Figura 12**) é um antifúngico produzido através de culturas bacterianas de *Streptomyces nodosus*, cuja atividade anti-*Leishmania* foi relatada em 1960. Seu mecanismo de ação está relacionado com a ligação ao ergosterol (principal constituinte da membrana plasmática da *Leishmania*) gerando modificação de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito. O medicamento é uma opção para pacientes que adquirem resistência aos antimoniais e suas variações lipossomais (anfotericina B lipossomal, dispersão coloidal de anfotericina B e complexo lipídico de anfotericina B) tem sido sintetizada na tentativa de diminuir seus efeitos de tóxicos (Monzete, 2011).

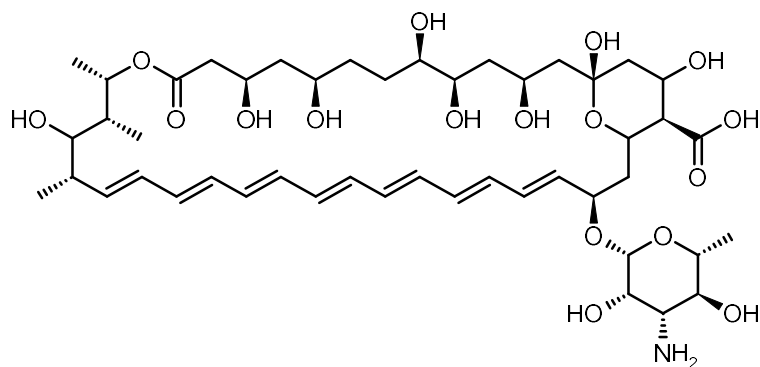


Figura 12 – Estrutura química Anfotericina B

Fonte: O autor (2023).

Em 1939 foi descrito a ação anti-*Leishmania* da Pentamidina (**Figura 13**), derivado aromático das diaminas que abrange outras atividades biológicas como antifúngica e antibacteriana. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da produção de moléculas importantes para manutenção da vida do parasito através de inibição enzimática (Valle *et al.*, 2019).

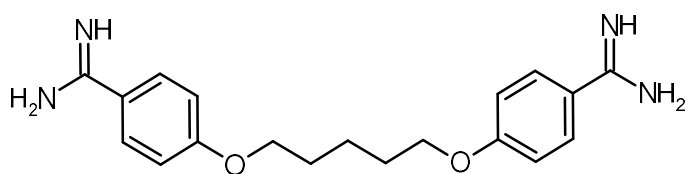


Figura 13 – Estrutura química da Pentamidina

Fonte: O autor (2023).

O esquema terapêutico para tratamento da doença compreende um longo período e via de administração intravenosa e/ou intramuscular, sendo um fator impactante para a desistência do paciente e indução de resistência parasitária. O tratamento é indicado de acordo com a forma clínica, para LC na dosagem de 10 a 20mg Sb5+/kg/dia por 20 dias, enquanto na LMC é usado 20mg Sb5+/kg/dia por 30 dias associado a Pentoxifilina 400mg via oral 3x ao dia por 30 dias, até no máximo 3 ampolas. O uso é contraindicado para pacientes que possuem doença hepática, insuficiência renal, cardiopatias e gestantes. Nesses casos, como alternativa pode ser utilizada a anfotericina B lipossomal (Ministério da Saúde, 2017; Pelissari *et al.*, 2011).

Para LV, recomenda-se o tratamento com a dose de 20mg de Sb+5 kg/dia por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, com limite máximo de 2 a 3 ampolas/dia do produto, demonstrando bons índices de cura, já em casos avançados o tempo mínimo de tratamento deve ser de 30 dias. Antes do início do tratamento, o paciente deve ser avaliado clinicamente. O eletrocardiograma (ECG) é um dos exames a fim de avaliar as funções cardíacas do paciente, em decorrência do principal efeito tóxico do medicamento estar associado ao sistema cardiovascular, e caso haja infecções concomitantes, a mesma deve ser tratada (Ministério da Saúde, 2006; Pelissari *et al.*, 2011).

Todos os medicamentos disponíveis para tratamento das leishmanioses possuem limitações que incluem alto custo, efeitos colaterais graves, via de administração e mecanismos de resistência do parasito. Até o momento não há vacinas licenciadas para uso em seres humanos e por isso há necessidade de desenvolver novas moléculas que tenham capacidade de exercer efeitos sob o parasito e que possuam mínima ou nenhuma toxicidade, baixo custo e fácil administração, sejam moléculas obtidas de fontes naturais e/ou sintetizadas em laboratório (Mishra *et al.*, 2009; Savar *et al.*, 2022).

2.2 Radicais livres e sistema antioxidante

Os radicais livres (RL) são átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, tornando-os altamente instáveis, reativos e com curto tempo de vida. Dessa forma, os RL atacam outras moléculas na tentativa de capturar e/ou ceder elétrons para se tornarem estáveis. Quando ocorre captura de elétron, eles operam como agentes oxidantes, situação que prejudica a estrutura celular. Em situações normais são essenciais para o funcionamento do organismo. Porém, quando ocorre excesso na quantidade dessas moléculas, elas se tornam prejudiciais podendo ser

responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras doenças (Mosca, Sanches e Comune, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2014).

Alguns RL embora atuem em reações de oxirredução, não apresentam elétrons não pareados. Desse modo, os termos *reactive oxygen species* (EROs – espécies reativas de oxigênio) e *reactive nitrogen species* (ERNs – espécies reativas de nitrogênio) são usados de forma mais apropriada para caracterizar essas moléculas. A presença dessas moléculas em funções biológicas foi relatada pela primeira vez em 1954 através de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica. Os EROs e os ERNs em concentrações baixas a moderadas possuem efeitos benéficos ao organismo, onde estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos e vias de sinalização celular (Propac *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2023).

Estes podem ser naturalmente sintetizados através de processos endógenos durante processos metabólicos ocorridos na mitocôndria, na membrana ou no citoplasma celular, como na fosforilação oxidativa, mecanismo responsável pela geração de ATP (adenosina trifosfato). Além da fonte endógena, os RL podem ser produzidos em resposta a estímulos externos (fonte exógena) através do tabagismo, poluição do ar, consumo de álcool, radiação ultravioleta, resíduos de pesticidas presentes em alimentos e estresse (Prevedello e Comachio, 2021).

O equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes são essenciais para manutenção do bom funcionamento do organismo. Os efeitos prejudiciais dessas moléculas ocorrem quando há um aumento em sua produção associada a deficiência de substâncias antioxidantes, gerando o estresse oxidativo, ou seja, esse desequilíbrio ocorre quando a quantidade de RL excede a de substâncias antioxidantes, gerando dano oxidativo contra células e tecidos. O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento de mais de 50 doenças como Alzheimer, glaucoma, câncer, Parkinson, aterosclerose e enfisema (Mosca, Sanches e Comune, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2014).

Os antioxidantes são moléculas responsáveis por reduzir e/ou inibir os danos gerados pelos RL, impedindo a formação destes, inibindo sua ação e/ou reparando estruturas biológicas. São classificados em enzimáticos e não enzimáticos, ou seja, produzidos via endógena ou exógena. Os não enzimáticos incluem substâncias de origem dietética como os compostos fenólicos distribuídos em legumes, frutas e cereais. Já os enzimáticos incluem enzimas como Catalase (CAT) e a Superóxido Dismutase (SOD), que atuam na prevenção e controle dos agentes oxidantes (Barbosa *et al.*, 2010; Fiorentini *et al.*, 2015).

2.2.1 Métodos para determinação de atividade antioxidante

O potencial antioxidante de uma substância pode ser mensurado com o auxílio de diferentes técnicas que possuem graus de sensibilidade e complexidade distintos. A avaliação é realizada por meio de reações químicas para estabelecer a capacidade da amostra em reagir com moléculas oxidantes. Os ensaios para análise de atividade antioxidante são divididos em dois grupos: aqueles que envolvem transferência de átomos de hidrogênio como os ensaios de peroxidação lipídica e os que envolvem transferência de elétrons como o ensaio da capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Huang *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008).

Existem inúmeras técnicas disponíveis para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de uma molécula que se diferem de acordo com seu mecanismo de ação. Dentre as mais utilizadas estão DPPH, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino6-sulfônico), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e o método de branqueamento de β -caroteno. Devido a diferença entre as técnicas e as características isoladas de cada substância em estudo, recomenda-se o uso de dois ou mais ensaios para mensurar a capacidade antioxidante de uma determinada amostra (Maciel *et al.*, 2013; Sucupira *et al.*, 2012).

A técnica de DPPH foi a primeira técnica descrita (1958) para determinar capacidade antioxidante e é baseada na reação de transferência de elétrons, trata-se de um método simples e rápido que permite mensurar a capacidade de substâncias em reduzir o radical DPPH. Esse radical é estável e possui coloração púrpura, ao reagir com moléculas antioxidantes é convertido em difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (**Figura 14**), de coloração amarelada, ou seja, ocorre descoloração do meio (**Figura 15**). A mudança de coloração é visualizada macroscopicamente e medida em espectrofotômetro, devido a sua acentuada absorção na região visível (Gülçin, 2012; Sousa *et al.*, 2007).

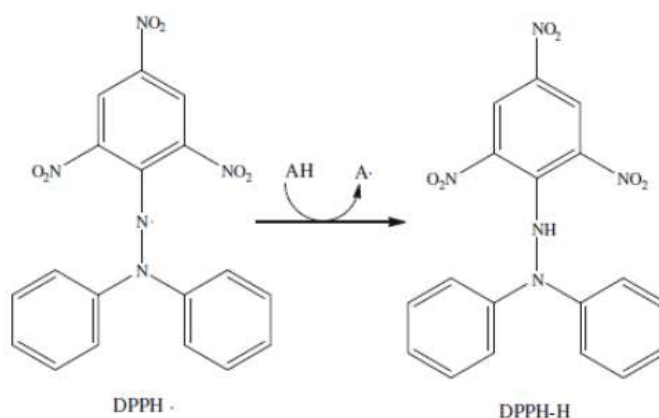


Figura 14 – Reação do radical DPPH com molécula antioxidante formando o DPPH-H

Fonte: Gülçin (2012).

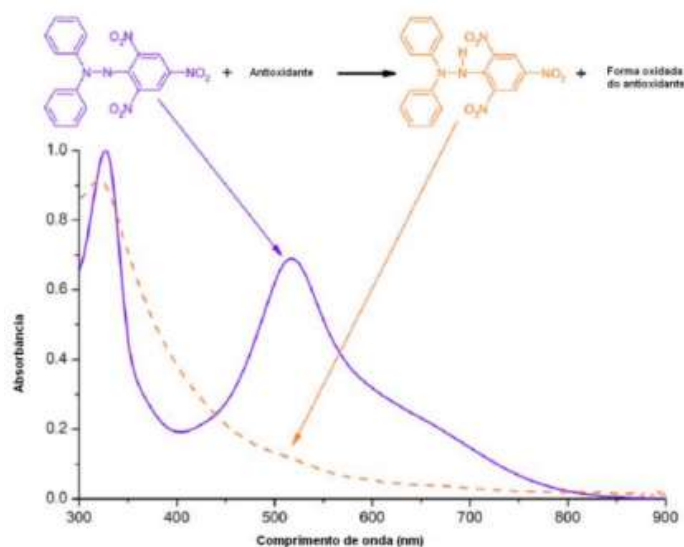


Figura 15 – Mudança de coloração observada após reação entre o radical DPPH (violeta) e molécula antioxidante gerando DPPH-H (amarelo)

Fonte: Fortes (2006).

O ensaio de ABTS baseia-se na capacidade da molécula antioxidante capturar o cátion ABTS com descoloração da solução e consequente diminuição da absorbância. Esse radical é gerado através de reações químicas ou enzimáticas, como por exemplo a reação com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (**Figura 16**). Tem característica de solubilidade em solventes polares e apolares caracterizada como uma de suas vantagens,

pois permite seu uso tanto para substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas (Magalhães *et al.*, 2008; Gülçin, 2012).

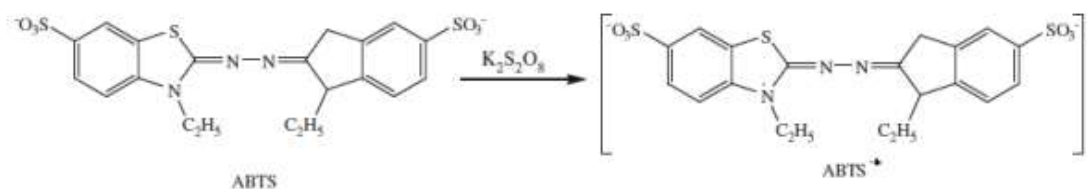


Figura 16 – Reação de geração do radical ABTS^+ com persulfato de potássio

Fonte: Gülçin (2012).

A técnica de FRAP utiliza o complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{III} -TPZ) que é reduzido a complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ) em meio ácido na presença de substância antioxidante. Já o ensaio o ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) é baseado na inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil, compreendendo a capacidade de fluorescência das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE), utilizadas como indicadores fluorescentes. O método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia o potencial de uma substância prevenir a oxidação do β -caroteno durante a peroxidação do ácido linoleico (Sucupira *et al.*, 2012; Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

O método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico permite analisar a capacidade da amostra em prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo o mesmo dos RL produzidos durante a auto-oxidação do ácido linoleico. Essa reação é monitorada via espectrofotômetro através da leitura imediata e em intervalos de 15 minutos durante 2h, visto que, amostras com capacidade antioxidante irão gerar o decaimento da absorbância. Trata-se de um ensaio simples e de alta sensibilidade e o não uso de altas temperaturas na realização da técnica, permite a análise de moléculas termossensíveis (Alves *et al.*, 2010).

2.3 Alcaloides β -carbolinas

Os alcaloides são estruturas de baixo peso molecular de ocorrência natural, constituindo cerca de 20% dos metabólitos secundários de origem vegetal. Possuem em sua composição um ou mais átomos de nitrogênio que integra um par de elétrons não ligante, conferindo uma característica singular a essa classe de compostos orgânicos. Também podem se apresentar como compostos levemente ácidos ou neutros e raramente conter na molécula cloro, bromo ou fósforo. Inúmeros compostos pertencentes a essa

classe foram relatados com atividade anti-*Leishmania* (Mishra *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2020).

As β -carbolinas pertencem a classe dos alcaloides indólicos e possuem um anel tricíclico pirido [3,4- β] indol tricíclico em sua estrutura e são classificadas como β -carbolina (β C), di-hidro β -carbolina (DH β C) e tetra-hidro β -carbolina (TH β C) (**Figura 17**) baseados no nível de instauração do anel de piridina, onde carbolinas totalmente aromáticas são denominadas β -carbolinas, enquanto que as completamente saturadas correspondem a DH β C e TH β C. Fazem parte de um grandioso grupo de aminas heterocíclicas sintéticas e naturais provenientes do triptofano (Aaghaz *et al.*, 2021; Kamboj *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

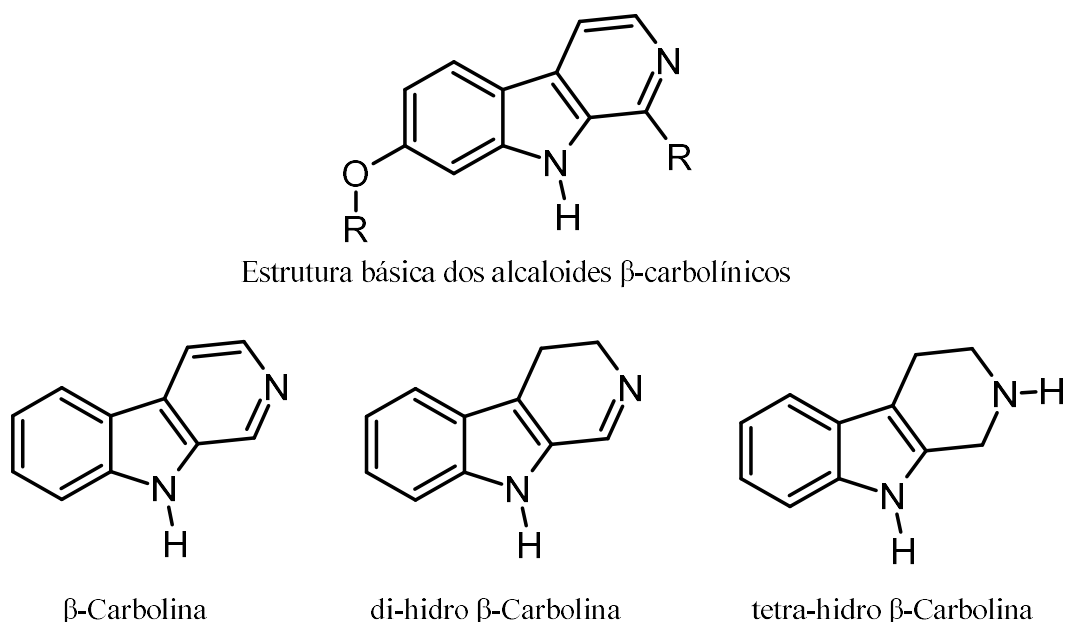


Figura 17 – Estrutura dos alcaloides β -carbólicos

Fonte: Adaptado de Laine, Lood e Koskinen (2014).

Em 1841 no Oriente Médio foi isolado o primeiro alcaloide β C denominado harmalina das sementes da espécie *Peganum harmala* conhecida popularmente como arruda selvagem. Após isso, inúmeros derivados β C foram obtidos de diversas famílias do reino vegetal, microrganismos, frutas, bebidas, alimentos e espécies marinhas em todo o mundo. Além do isolamento em fontes naturais, a modificação do núcleo β C e síntese destes pode ser realizada através de inúmeras metodologias, e posteriormente aplicados na avaliação biológica e desenvolvimento de novos fármacos. Até o presente momento, nove medicamentos β C são comercializados (**Figura 18**) (Banoth *et al.*, 2020; Ayipo *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Abinaya *et al.*, 2022).

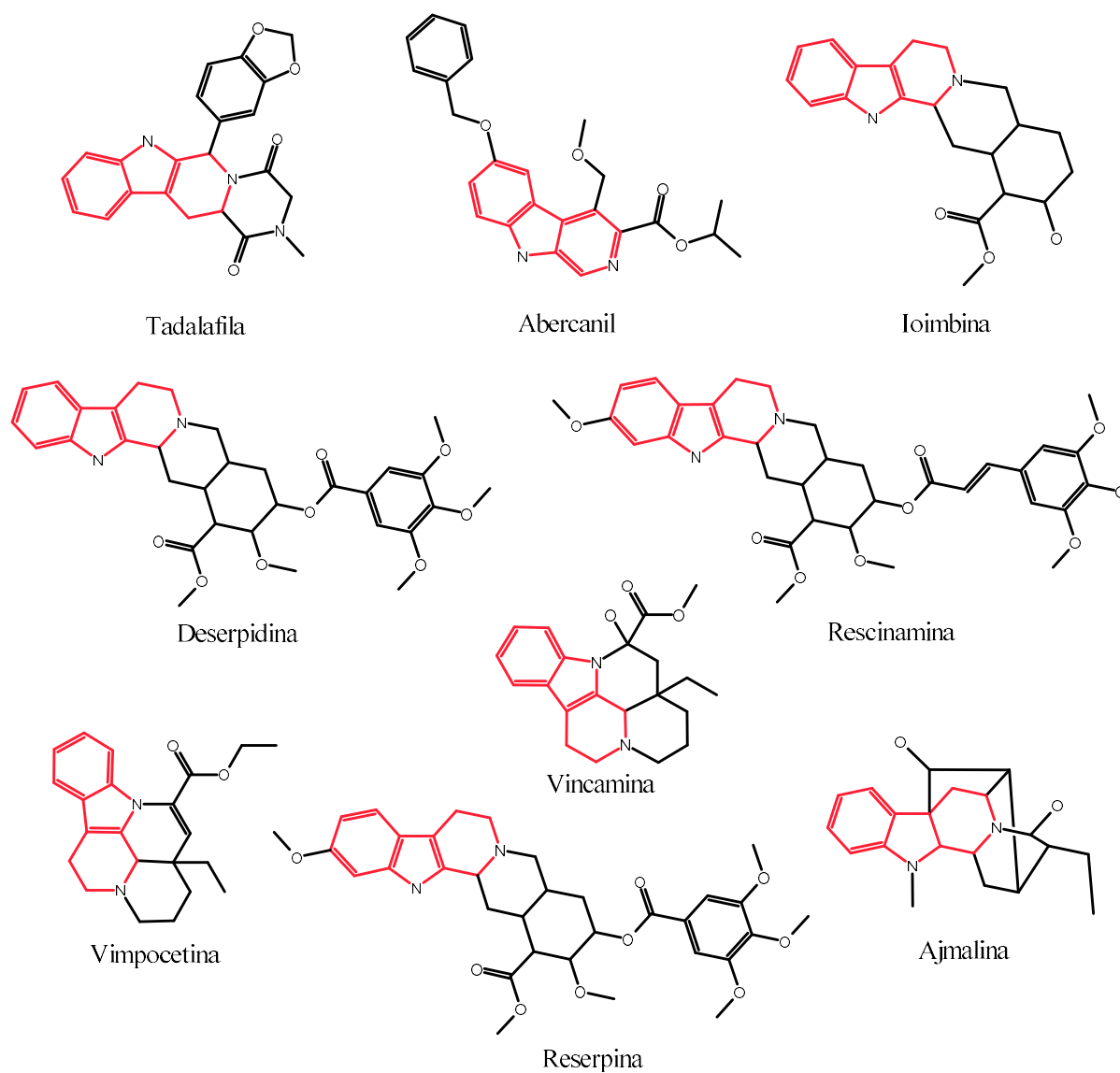


Figura 18 – Estruturas químicas dos medicamentos β -carbólicos comercializados atualmente, com o núcleo β C em destaque

Fonte: O autor (2023).

Inúmeras atividades farmacológicas são atribuídas aos alcaloides β C, tais como antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antimalárica, anticancerígena, antibacteriana, antitrombótica e anti-*Leishmania* (Dai *et al.*, 2018; Gonzalez *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2018; Baréa *et al.*, 2018; Luo; Song, 2021).

2.4 Atividades biológicas de alcaloides β -carbolinas

Em estudo realizado por Kontham et al (2021), os derivados 7d, 7g e 7h (híbridos de β -carbolina sintetizados pela união da cadeia do álcool 10-undecenílico) exibiram atividade antioxidante em ensaio de DPPH, com destaque para o composto 7d, demonstrando que os compostos com grupos funcionais hidroxila fenólicos foram os ativos. Goh et al (2015), avaliou o potencial antioxidante de análogos 6-metoxitetrahydro- β -carbolina pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP, demonstrando que na técnica de DPPH o composto VAN (2-metoxi-4-(6-metoxi-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-yl)fenol) apresentou melhor atividade ($IC_{50} = 1,74 \pm 0,02$), enquanto nas demais técnicas os derivados demonstraram potencial antioxidante moderado.

O alcaloide ácido β -carbolina-1-propionico isolado das cascas do caule de *Quassia amara* foi investigado quanto a seu potencial anti-*Leishmania* através da técnica de microdiluição com resazurina, e demonstrou atividade contra *L. infantum* e *L. amazonensis* em formas promastigotas e amastigotas com concentração inibitória de 50% variando de $2,7 \pm 0,82$ a $9,4 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ e índices de seletividade >10 (Gabriel et al., 2019).

Inúmeros derivados de 2-(pirimidin-2-il)-1-fenil-2,3,4,9-tetrahydro-1H- β -carbolina foram sintetizados e avaliados quanto a seus efeitos citotóxicos e anti-*Leishmania* contra *L. donovani*. Dentre os compostos analisados, doze destes mostraram mais de 80% de inibição contra promastigotas na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e outros acima de 90% de inibição, ainda que a baixa atividade em amastigotas tenha sido observada. O derivado contendo grupo 3,4-dimetoxifenil no C-1 do sistema de anel tetrahydro- β -carbolina demonstrou melhor atividade anti-*Leishmania* em amastigotas com IC_{50} de 1,93 $\mu\text{g/ml}$, sendo mais ativo que a pentamidina e o estibogluconato de sódio (Kumar et al., 2010).

Dois compostos β -carbolinas: 1-(4-(dimetilamino)fenil)-3-(4,5-di-hidro-1,3-oxazol-2-il)-9H- β -carbolina e N-(2-cloroetil)-1-(2-clorofenil)-9H- β -carbolina-3-carboxamida foram sintetizados e avaliados frente a cepa de *L. amazonensis*, demonstrando atividade semelhante a miltefosina frente a promastigotas. Através de análise de membrana em microscopia eletrônica foram confirmadas alterações nas duas formas do parasito, além da redução do número de amastigotas nos macrófagos infectados, aumento na produção de radicais livres e modificações no ciclo celular (Alonso et al., 2021).

Moléculas tetrahydro- β -carbolinas sintetizadas foram analisadas frente as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. donovani*, onde os análogos tiofen-2-il e naftil

demonstraram eficácia contra ambas as formas do parasito, e sem citotoxicidade para as seguintes linhagens celulares: macrófagos humanos, células de hepatoma humano, fibroblastos de rim de macaco e células epiteliais de rim de porco. Os alcaloides também demonstraram atividade antitripanossoma contra *Trypanossoma brucei*, espécie causadora de tripanossomíase humana africana que pertence à mesma família da *Leishmania* (Manda *et al.*, 2014).

Os β C harmano, harmina e harmalina apresentaram atividades anti-*Leishmania* e antiproliferativa em *L. infantum*. Os compostos harmano e harmina apresentaram fraca atividade em ambas as formas do parasito, enquanto harmalina exerceu efeito significativo contra as amastigotas, demonstrando capacidade de inibir a internalização do parasito dentro dos macrófagos (Giorgio *et al.*, 2004). Vários outros estudos publicaram os efeitos das moléculas β C em diferentes espécies de *Leishmania* (Tonin *et al.*, 2010; Gohil *et al.*, 2012; Gellis *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar uma revisão sistemática sobre casos de infecção assintomática em humanos e investigar o comportamento químico, toxicidade *in silico*, citotoxicidade, atividade anti-*Leishmania* e antioxidante de onze alcaloides β -carbolinas sintéticos.

Objetivos específicos

- Revisar, de forma sistemática, a distribuição global de casos de infecção assintomática por *Leishmania* em humanos.
- Avaliar o comportamento químico e a toxicidade *in silico* de alcaloides β -carbolinas.
- Determinar a atividade anti-*Leishmania* de alcaloides β -carbolinas sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Analisar a citotoxicidade em eritrócitos humanos de alcaloides β -carbolinas.
- Mensurar a capacidade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS de alcaloides β -carbolinas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGHAZ, S.; SHARMA, K.; JAIN, R.; KAMAL, A. β -Carbolines as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113321, 2021.
- ABADÍAS-GRANADO, I.; DIAGO, A.; CERRO, P.A.; PALMA-RUIZ, A.M.; GILABERTE, Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, p. 601-618, 2021.
- ABINAYA, R.; SRINATH, S.; SOUNDARYA, S.; SRIDHAR, R.; BALASUBRAMANIAN, K.K.; BASKAR, B. Recent developments on synthesis strategies, SAR studies and biological activities of β -carboline derivatives – An update. **Journal of Molecular Structure**, v. 1261, p. 132750, 2022.
- ABPEIKAR, Z.; SAFAEI, M.; ALIZADEH, A.A.; GOODARZI, A.; HATAM, G. The novel treatments based on tissue engineering, cell therapy and nanotechnology for cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 633, p. 122615, 2023.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80-86, 2021.
- ALBUQUERQUE, L.W.N.; FERREIRA, S.C.A.; VARJÃO, M.T.S.; DA SILVA, A.E.; DUARTE, A.W.F.; SILVA, G.T.; MOREIRA, M.S.A.; DE QUEIROZ, A.C. New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological prospecting. **Acta Tropica**, v. 242, p. 106903, 2023.
- ALONSO, L.; DE PAULA, J.C.; BARÉA, P.; SARRAGIOTTO, M.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALONSO A.; FERNANDES, N.S.; LANCHEROS, C.A.C.; VOLPATO, H.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; NAKAMURA, C.V. Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1863, p. 183473, 2021.
- ALVES, C.A.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ARGY, N.; LARIVEN, S.; RIDEAU, A.; LEMOINE, A.; MOINE, A.B.; ALLAL, L.; CHOUDAT, L.; RAVEL, C.; MICHARD, F.; BUFFET, P.; FAYE, A.; HOUZE, S.; YAZDANPANAH, Y. Congenital Leishmaniasis in a Newborn Infant Whose Mother was Coinfected With Leishmaniasis and HIV. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, p. 277–280, 2020.
- ASFARAM, S.; TESHNIZI, S.H.; FAKHAR, M.; BANIMOSTAFAVI, E.S.; SOOSARAEI, M. Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. **Parasitology International**, v. 67, p. 575-583, 2018.

ASHOK, P.; CHANDER, S.; BALZARINI, J.; PANNECOUQUE, C.; MURUGESAN, S. Design, synthesis of new β -carboline derivatives and their selective anti-HIV-2 activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1232–1235, 2015.

ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 337–351, 2011.

AYIPO, Y.O.; OSUNNIRAN, W.A.; MORDI, M.N. Metal complexes of β -carboline: Advances in anticancer therapeutics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 432, p. 1–23, 2021.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; PACHECO, R.S. VALETE-ROSALINO, C.M.; MENDONÇA, S.C.F. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 735–737, 2007.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 369–349, 1986.

BANOTH, K.K.; FAHEEM; CHANDRASEKHAR, K.V.G.; ADINARAYANA, N.; MURUGESAN, S. Recent evolution on synthesis strategies and anti-leishmanial activity of β -carboline derivatives - An update. **Heliyon**, v. 9, p. e04916, 2020.

BARÉA, P.; BARBOSA, V.A.; BIDÓIA, D.L.; DE PAULA, J.C.; STEFANELLO, T.F.; DA COSTA, W.F.; NAKAMURA, C.V.; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis, antileishmanial activity and mechanism of action studies of novel β -carboline-1,3,5-triazine hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 579–590, 2018.

BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 35–39, 2009.

BASU, J.M.; MOOKERJEE, A.; BANERJEE, R.; SAHA, M.; SINGH, S.; NASKAR, K.; TRIPATHY, G.; ROY, S. Inhibition of ABC Transporters Abolishes Antimony Resistance in *Leishmania* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, 2008.

BATES, P.A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 529–230, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 136 p. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf>. Acesso em 05 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 120 p. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar.pdf>. Acesso em 05 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar_1edicao.pdf>. Acesso em 05 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em 05 jan. 2023.

BROKAMP, R.; BERGMANN, B.; MÜLLER, I.B.; BIENZ, S. Stereoselective preparation of pyridoxal 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline derivatives and the influence of their absolute and relative configuration on the proliferation of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 1832–1837, 2014.

BUABAN, K.; PHUTDHAWONG, W.; TAECHOWISAN, T.; PHUTDHAWONG, W. S. Synthesis and Investigation of Tetrahydro- β -carboline Derivatives as Inhibitors of Plant Pathogenic Fungi. **Molecules**, v. 26, p. 207, 2021.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. β -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 479–500, 2007.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873–882, 2007.

CROVETTO-MARTÍNEZ, R.; AGUIRRE-URIZAR, J.M.; ORTE-ALDEA, C.; ARALUCE-ITURBE, I.; WHYTE-OROZCO, J.; DE LA TORRE, M.A.C. Mucocutaneous leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of midline destructive disease: two case reports. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 119, p. e20-e26, 2015.

DAI, J.; DAN, W.; SCHNEIDER, U.; WANG, J. β -Carboline alkaloid monomers and dimers: Occurrence, structural diversity, and biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 622–656, 2018.

DAMIANOU, A.; BURGE, R.J.; CATTAPRETA, C.M.C.; GEOGHEGAN, V.; NIEVAS, Y.R.; NEWLING, K.; BROWN, E.; BURCHMORE, R.; RODENKO, B.; MOTTRAM, J.C. Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. **Plos Pathogens**, v. 16, p. 1–30, 2020.

DAS, V.N.R.; SIDDIQUI, N.A.; VERMA, R.B.; TOPNO, R.K.; SINGH, D.; DAS, S.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; KUMAR, N.; DAS, P. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 661-666, 2011.

DA SILVA, C.M.; GUIMARÃES, E.L.; SILVA-SILVA, J.V.; CORREA-BARBOSA, J.; COELHO-FERREIRA, M.; SILVEIRA, F.T.; MARINHO, A.M.R.; ALMEIDA, M.G.C.; BRÍDIGO, H.P.C.; DOLABELA, M.F. *In vitro* antileishmanial activity and phytochemical analysis of *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae). **Revista Fitos**, v. 14, p. 528-537, 2020.

DE CARVALHO, Y.M.B.G.; SHANMUGAM, S.; BATISTA, M.S.; SERAFINI, M.R.; ARAUJO, A.A.S.; QUINTANS JUNIOR, L.J. Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, p. 633-641, 2020.

DEY, P.; KUNDU, A.; KUMAR, A.; GUPTA, M.; LEE, B.M.; BHAKTA, T.; DASH, S.; KIM, H.S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). **Recent Advances in Natural Products Analysis**, p. 505-567, 2020.

EL MAZINI, S.; EJGHAL, R.; BEKHTI, K.; LEMRANI, M. The Sporadic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Morocco: A presumably trend towards endemicity. **Acta Tropica**, v. 227, p. 106288, 2022.

ESPURI, P.F. **Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.

FARSHCHI, F.; SAADATI, A.; HASANZADEH, M. Optimized DNA-based biosensor for monitoring *Leishmania infantum* in human plasma samples using biomacromolecular interaction: a novel platform for infectious disease diagnosis. **Royal Society of Chemistry**, v. 39, 2020.

FIORENTINI, D.; ZAMBONIN, L.; SEGA, F.V.D.; HRELIA, S. Polyphenols as Modulators of Aquaporin Family in Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Hindawi Publishing Corporation, 2015.

FIGUEIREDO, L.P.; CERQUEIRA-SILVA, T.; MAGALHÃES, A.; LAGO, E.L.; LESSA, M.M. Brief communication: Vitamin D serum levels in American tegumentary leishmaniasis from an endemic area in Northeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 102720, 2023.

FOLSTER, I. C., FUCK, J. A. B., MATTOS, M. S., GATTI, R. R., SANTOS, V. N. C. **Guia de orientação: vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 7. ed. Santa Catarina: Secretaria de Estado da Saúde, 2021. Disponível em: encurtador.com.br/cdpzT. Acesso em 05 jan. 2023.

FRANCO, L.H.; BEVERLEY, S.M.; ZAMBONI, D.S. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

GABRIEL, R.S.; AMARAL, A.C.F.; LIMA, I.C.; CRUZ, J.D.; GARCIA, A.R.; SOUZA, H.A.S.; ADADE, C.M.; VERMELHO, A.B.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; RODRIGUES, I.A. β -Carboline-1-propionic acid alkaloid: antileishmanial and cytotoxic effects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 755-762, 2019.

GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; DERESINSKI, S. Leishmaniasis in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical transplantation**, v. 31, 2017.

GARRIDO-JAREÑO, M.; SAHUQUILLO-TORRALBA, A.; CHOUMAN-ARCAS, R.; CASTRO-HERNÁNDEZ, I.; MOLINA-MORENO, J.M., LLVADOR-ROS, M.; GÓMEZ-RUIZ, M.D.; LÓPEZ-HONTANGAS, J.L.; BOTELLA-ESTRADA, R.; SALAVERT-LLETÍ, M.; PEMÁN-GARCÍA, J. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-7, 2020.

GELLIS, A.; DUMETRE, A.; LANZADA, G.; HUTTER, S.; OLLIVIER, E.; VANELLE, P.; AZAS, N. Preparation and antiprotozoal evaluation of promising β -carboline alkaloids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 339-347, 2012.

GIORGIO, C.D.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* activity of the β -carboline alkaloids harmaline, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 106, p. 67-74, 2004.

GOH, T.B.; KOH, R.Y.; INHAME, M.F.; AZHAR, M.E.; MORDI, M.N.; SHARIF, M.; 5-Methoxytryptamine reacts with natural food flavour to produce 6-methoxy tetrahydro- β -carbolines: In vitro investigation of their antioxidant and cytotoxicity properties. **Food Chemistry**, v. 189, p. 208-216, 2015.

GOHIL, V.M.; BRAHMBHATT, K.G.; LOISEAU, P.M.; BHUTANI, K.K. Synthesis and anti-leishmanial activity of 1-aryl- β -carboline derivatives against *Leishmania donovani*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 3905-3907, 2012.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONZALEZ, M.M.; CABRERIZO, F.M.; BAIKER, A.; ERRA-BALSELLS, R.; OSTERMAN, A.; NITSCHKO, H.; VIZOSO-PINTO, M.G. β -Carboline derivatives as novel antivirals for herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, p. 459-468, 2018.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 494-501, 2002.

GUO, L.; MA, Q.; CHEN, W.; FAN, W.; ZHANG, J.; DAI, B. Synthesis and biological evaluation of novel N 9-heterobivalent β -carboline as angiogenesis inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 375–387, 2019.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, vol. 86, p. 345–391, 2012.

GUREL, M.S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 38, p. 140-151, 2020.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, p. 79-99, 2019.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays – review. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JIMENEZ-MARCO, T.; FISA, R.; GIRONA-LLOBERA, E.; CANCINO-FAURE, B.; TOMÁS-PÉREZ, M.; BERENGUER, D.; GUILLEN, C.; PUJOL, A.; INIESTA, L.; SERRA, T.; MASCARÓ, M.; GASCÓ, J.; RIERA, C. **Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. Transfusion**, v. 56, p. S45–S51, 2016.

KAMBOJ, A.; SIHAG, B.; BRAR, D. S.; KAUR, A.; SALUNKE, D. B. Structure activity relationship in β -carboline derived anti-malarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 221, p. 113536, 2021.

KAMMONA, O.; TSANAKSIDOU, E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, p. 120761, 2021.

KONTHAM, V.; IPPAKAYALA, B.; MADHU, D. Synthesis of β -carboline fatty alcohol hybrid molecules and characterization of their biological and antioxidant activities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, p. 1878–5352, 2021.

KUMAR, R.; KHAN, S.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; VISWAKARMA, P.; GUPTA, S.; MEENA, S.; SINGH, N.; SARKAR, J.; CHAUHAN, P.M.S. Synthesis of 2-(pyrimidin-2-yl)-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H- β -carbolines as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3274-3280, 2010.

KUMARI, D.; PERVEEN, S.; SHARMA, R.; SINGH, K. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, p. 1-22, 2021.

LAINE, A.E.; LOOD, C.; KOSKINEN, A.M.P. Pharmacological importance of optically active tetrahydro- β -carbolines and synthetic approaches to create the C1 stereocenter. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1544, 2014.

LAWN, S. D.; ARMSTRONG, M.; WHITTY, C. J. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and

mucosal leishmaniasis among returned travellers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 264-269, 2006.

LUO, B.; SONG, X. A comprehensive overview of β -carboline and its derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, p. 113688, 2021.

LUZ, J.G.G.; DIAS, J.V.L.; CARVALHO, A.G.; PIZA, P.A.; CHÁVEZ-PAVONI, J.H.; BULSTRA, C.; COFFENG, L.E.; FONTES, C.J.F. Human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil: Spatial patterns and its correlation with socioeconomic aspects, environmental indices and canine infection. **Acta Tropica**, v. 221, p. 105965, 2021.

LIMA, E. B. D.; PORTO, C.; DA MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 111-124, 2007.

MACIEL, L.R.; MOURA, R.S.; SEIFERT, M.; DA SILVA, D.O.; PARAGINSKI, R.; DE OLIVEIRA, R.P.; ROMBALDI, C.V. Avaliação de métodos para determinação da atividade antioxidante de cascas de frutas cítricas. v. 8, p. 02-05, 2013.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C.; Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, vol. 613, p. 1-19, 2008.

MANDA, S.; KHAN, S.I.; JAIN, S.K.; MOHAMMED, S.; TEKWANI, B.L.; KHAN, I.A.; VISHWAKARMA, R.A.; BHARATE, S.B. Synthesis, antileishmanial and antitrypanosomal activities of N-substituted tetrahydro- β -carboline. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3247-3250, 2014.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A.F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J.A. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, p. 121-132, 2021.

MARTINS, L.F. **Avaliação *in vitro* do potencial anti-*Leishmania infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos sintéticos marinhos**. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2016.

MATOS, A.P.S.; VIÇOSA, A.L.; RÉ, M.I.; RICCI-JÚNIOR, E.; HOLANDINO, C. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 01-50, 2020.

MATTOS, M.S. **Abordagem e tratamento da leishmaniose tegumentar americana na atenção básica**. 2 ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017. Disponível em: https://ares.unasus.gov.br/acervo/html/ARES/14869/1/Apostila_Leishmaniose%20Teg%20Amer_N%C3%BAcleo%20Telessa%C3%BAde%20SC%20UFSC.pdf. Acesso em 25 de out. 2023.

MATHEW, N.S.; NEGI, P.S. Plant-derived compounds against protozoan neglected diseases: toward sustainable drug development. **Discovery and Development of**

Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases, p. 241-292, 2019.

MISHRA, B.B.; KALE, R.R.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 146, p. 232-246, 2019.

MONZOTE, L. Antileishmanial patents antileishmanial current drugs and relevant patents. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 6, p. 1-26, 2011.

MORENO, M. GUZMÁN-RODRÍGUEZ, L.; VALDERRAMA-ARDILA, C.; ALEXANDER, M.; OCAMPO, C.B. Land use in relation to composition and abundance of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in five foci of domiciliary transmission of cutaneous leishmaniasis in the Andean region of Colombia. **Acta Tropica**, v. 203, p. 1-34, 2020.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. The **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, p. 489–493, 2016.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10-S18, 2014.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR.; P.E.C.; GIUNGI, F.; GIUNTI, G.; PARENTI, A.; TROTTI, G.C. Studies on mediterranean leishmaniasis: 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 447-453, 1974.

PANAHI, E.; STANISIC, D.I.; SKINNER, E.B.; FADDY, H.M.; YOUNG, M.K.; HERRERO, L.J. Detection of *Leishmania (Mundinia) macropodum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and heterologous *Leishmania* species antibodies among blood donors in a region of Australia with marsupial *Leishmania* endemicity. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 545-548, 2022.

PÉREZ-CORDERO, J.J.; SUÁREZ-SÁNCHEZ, J., DELGADO, G. Use of a fluorescent stain for evaluating in vitro infection with *Leishmania panamensis*. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 31-35, 2011.

PIERROT, D.; SINOU, V.; BUN, S.S.; PARZY, D.; TAUDON, N.; RODRIGUEZ, J.; OLLIVIER, E.; BONNE, D. Design and synthesis of simplified speciophylline analogues and β -carboline as active molecules against *Plasmodium falciparum*. **Drug Development Research**, v. 80, p. 133–137, 2019.

PINART, M.; RUEDA, J.R.; ROMERO, G.A.; PINZÓN-FLÓREZ, C.E.; OSORIO-ARANGO, K.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; REVEIZ, L.; ELIAS, V.M.; TWEED, J.A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Library: Cochrane Reviews**, v. 8, p. 3-337, 2020.

PRADHAN, S.; SCHWARTZ, R.A.; PATIL, A.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, p. 516-521, 2022.

PUROHIT, P.; PANDEY, A.K.; SINGH, D.; CHOUHAN, P.S.; RAMALINGAM, K.; SHUKLA, M.; GOYAL, N.; LAL, J.; CHAUHAN, P.M.S. An insight into tetrahydro- β -carboline–tetrazole hybrids: synthesis and bioevaluation as potent antileishmanial agents. **MedChemComm**, v. 8, p. 1824–1834, 2017.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; DE JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

ROATT, B.M.; CARDOSO, J.M.O.; DE BRITO, R.C.F.; COURA-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, A.B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. **International Immunopharmacology**, v. 110, p. 109059, 2022.

SAMANTA, S.; GHSHAL, A.; BHATTACHARYA, K.; SAHA, B.; WALDEN, P.; MANDAL, C. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. **PloS one**, v. 7, p. e42361, 2012.

SAMPAIO, R.N.R.; FERREIRA, M.F.; MARTINS, S.S.; DA MOTTA, J.O.C. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, p. 602-604, 2021.

SAVAR, N.S.; SHENGJULER, D.; DOROUDIAN, F.; VALLET, T.; KAIN, A.M.; ARASHKIA, A.; KHAMESIPOUR, A.; LUNDSTROM, K.; VIGNUZZI, M.; NIKMAN, H.M. An alphavirus-derived self-amplifying mRNA encoding PpSP15-LmSTII fusion protein for the design of a vaccine against leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 89, p. 102577, 2022.

SHIMOZAKO, H.J.; WU, J.; MASSAD, E. The preventive control of zoonotic visceral leishmaniasis: Efficacy and economic evaluation. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 33, p. 79-99, 2017.

STAUCH, A.; SARKAR, R.R.; PICADO, A.; OSTYN, B.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C.; DUERR, H.P. Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent: Modelling Epidemiology and Control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1405, 2011.

SUCUPIRA, N.R.; DA SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; DA COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, p. 40–42, 2014.

SUZUKI, K.; NOMURA, I.; NINOMIYA, M.; TANAKA, K.; KOKETSU, M. Synthesis and antimicrobial activity of β -carboline derivatives with N2-alkyl modifications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 2976-2978, 2018.

TONIN, L.T.D.; PANICE, M.R.; NAKAMURA, C.V.; ROCHA, K.J.P.; DOS SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DA COSTA, W.F.; SARRAGIOTO, H. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carboline)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 386-389, 2010.

VALLE, I.V.; MACHADO, M.E.; ARAUJO, C.C.B.; CUNHA-JUNIOR, E.F.; PACHECO, J.S.; TORRES-SANTOS, E.C.; DA SILVA, L.C.R.P.; CABRAL, L.M.; CARMO, F.A.; SATHLER, P.C. Oral pentamidine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles: an alternative approach for leishmaniasis treatment. **Nanotechnology**, v. 30, p. 1-18, 2019.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309-322, 2012.

VEGA, D.M.; MEGLIO, M.D.; ALONSO, S.D.; ALVIRA, F.; MONTANARI, J. Nanomaterials for diagnosis, treatment, and prevention of human cutaneous leishmaniasis: A review. **OpenNano**, v. 12, p. 100158, 2023.

WANG, J.; GONG, F.; LIANG, T.; XIE, Z.; YANG, Y.; CAO, C.; GAO, J.; LU, T.; CHEN, X. A review of synthetic bioactive tetrahydro- β -carbolines: A medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 225, p. 113815, 2021.

WHO. **World Health Organization**. Leishmaniasis. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 05 jan. 2023.

WHO, **World Health Organization**. The Global Health Observatory: explore a world of health data: leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntdleishmaniasis>. Acesso em: 04 dez. 2023.

WIJERATHNA, T.; GUNATHILAKA, N.; GUNAWARDENA, K.; RODRIGO, W. Population dynamics of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in cutaneous leishmaniasis endemic areas of Kurunegala District, Sri Lanka. **Acta Tropica**, v. 230, p. 106406, 2022.

XIONG, Y. H.; GUAN, Y. Y.; CAO, J. P. Risk assessment on laboratory biosafety of Leishmania. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, v. 3, p. 342–344, 2012.

ZHANG, H.; ZHANG, R.H.; WANG, L.X.; LI, Y.J.; LIAO, S.G.; ZHOU, M. Synthesis Strategies for α -, β -, γ - and δ -Carbolines. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 429-452, 2021.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1: Asymptomatic *Leishmania* infection in humans: A systematic review

Aceito no periódico “*Journal of Infection and Public Health*”, Qualis A3 e FI 7.537.

Data de aceite: 28 de dezembro de 2022.

Endereço de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.12.021>.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-infection-and-public-health/1876-0341/guide-for-authors>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection and Public Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jiph

Review

Asymptomatic *Leishmania* infection in humans: A systematic review

Milena Menezes Corrêa Pederiva^{a,*,1}, Sidney Mariano dos Santos^a,
Liz Graciela Sanabria Rivarola^a, Victor Jorge Guerreiro^a, Katiana Simões Lopes^a,
Manoel Sebastião da Costa Lima Junior^b, Herintha Coeto Neitzke-Abreu^a

^a Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology, Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2022

Received in revised form 9 December 2022

Accepted 28 December 2022

Keywords:

Leishmania

Asymptomatic infection

Global incidence

Systematic review

ABSTRACT

Background: Leishmaniasis is a highly prevalent neglected tropical disease. It mainly presents as two forms: cutaneous and visceral leishmaniasis, the latter being the most severe form. However, asymptomatic cases of *Leishmania* infection result in an increase in the underreporting and transmission of the protozoan.

Objectives: In this study, articles on the incidence of asymptomatic *Leishmania* infection were systematically reviewed.

Methods: The publications identified in the Medline/PubMed and Science Direct databases included 4568 articles. Inclusion, exclusion, and eligibility criterion analysis resulted in 83 articles being retained. These studies were mostly performed in Brazil (n = 26) and India (n = 15).

Results: Several detection techniques have been used for diagnosis. Among the species found were *L. infantum* and *L. donovani*, which result in visceral leishmaniasis, and *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. panamensis*. The incidence rates varied between the analyzed locations, largely due to sampling and the presence or absence of endemism in the regions. The largest populations analyzed were in two studies performed in India and Nepal. One of these studies evaluated 32,529 people and the incidence rate was 8.3% (n = 2702), while the other study evaluated 21,267 people and the incidence rate was 1.76% (n = 375). Only 14.28% of the studies investigated leishmaniasis in blood donors. Preexisting diseases have also been reported.

Conclusion: The findings of this systematic review present the incidence of cases of asymptomatic *Leishmania* infection worldwide, in addition to detailing the studies and offering information for researchers and health authorities to seek alternatives to reduce the number of leishmaniasis cases.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Contents

Introduction	287
Methods	287
Search strategy	287
Inclusion criteria	287
Exclusion criteria	287
Obtaining and analyzing data	287
Results	287

* Corresponding author.

E-mail addresses: mimenezesbiomed@gmail.com (M.M.C. Pederiva), sidneysmariano@gmail.com (S.M.d. Santos), liz.graciela.sanabria@gmail.com (L.G.S. Rivarola), victorjorgeguerreiro@hotmail.com (V.J. Guerreiro), kaatiana.simoess@gmail.com (K.S. Lopes), manoel.lima@fiocruz.br (M.S.d.C. Lima Junior), herinthaabreu@ufgd.edu.br (H.C. Neitzke-Abreu).

¹ Present/permanent address: Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados-Itahum Highway, Zip Code: 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.12.021>

1876-0341/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Literature revision.	287
Studies with asymptomatic <i>Leishmania</i> infection.	287
Diagnostic techniques and <i>Leishmania</i> species.	287
Number of people tested and incidence, pre-existing diseases, and age groups.	288
Discussion.	288
Conclusions.	291
Ethics approval.	291
Funding.	291
Consent for publication.	291
Author contributions.	291
Conflict of interest.	292
Acknowledgements.	292
References.	292

Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by more than 20 different *Leishmania* species. It belongs to what are referred to as neglected tropical diseases (NTDs), infecting 700,000–1 million people annually, especially in underdeveloped countries [1]. The disease is transmitted through the bite of sandflies and affects several animal species, including humans, who are a natural reservoir for these protozoa [2]. In addition to vector transmission, other transmission routes include congenital transmission [3], blood transfusion [4], organ transplantation [5], and accidental laboratory exposure [6].

When infecting humans, the disease manifests itself as two main forms: visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, caused by the species *Leishmania (Leishmania) donovani* in the Old World and *Leishmania (Leishmania) infantum* in the New World and also in the vast majority of endemic countries of the Old World, including developed countries characterized by irregular episodes of fever, weight loss, enlarged spleen and liver, and anemia [7], which is fatal in more than 95% of untreated cases [8]; and cutaneous leishmaniasis (CL), which is the most common form, caused by several species belonging to the *Viannia* and *Leishmania* subgenera, causing ulcers and scarring of the skin, in addition to disability [9].

Some infections result in asymptomatic cases and are clinically unnoticeable. Asymptomatic *Leishmania* infection is common in endemic areas and may be more common than symptomatic cases [10]. However, asymptomatic carriers can transmit the infection [11]. Considering the capacity of humans to be a reservoir of *Leishmania*, the objective here is to carry out a systematic review of asymptomatic cases in the world to document the frequency and distribution of these cases and reinforce the importance of monitoring asymptomatic individuals in endemic regions.

Methods

Search strategy

A systematic review of asymptomatic *Leishmania* infection in humans was carried out in the Medline/PubMed and Science Direct (Elsevier) databases with the descriptors “Asymptomatic leishmaniasis”. The search was conducted from August to September of 2020. This review was conducted according to the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions [12] described in Fig. 1.

Inclusion criteria

For the selection of articles, studies had to be on asymptomatic *Leishmania* infection in humans, published in English and in peer-reviewed scientific journals. In the first phase of the search, duplicates were manually removed. The remaining titles and abstracts

were then examined to remove any articles that were unrelated to the inclusion criteria.

Exclusion criteria

Articles published in a language other than English, bibliographic reviews, articles without access to the full text, studies of molecular markers, pharmacology, diagnostic and treatment techniques, *in vitro* and *ex vivo* studies, book chapters, comments, and letters to the editor were excluded.

Obtaining and analyzing data

At this stage, the studies included in the systematic review were analyzed to ensure the complete collection of data to be included in Table 1. The analyzed data included the study location, type of detection technique, *Leishmania* species found, total population analyzed, number of positive samples, pre-existing diseases, and age group.

Results

Literature revision

The search resulted in 4568 studies: 834 from Medline/PubMed and 3734 from Science Direct. Only 157 articles remained after removing duplicates among the platforms and applying the exclusion criteria. After the eligibility analysis, 84 articles were retained (Fig. 1).

Studies with asymptomatic *Leishmania* infection

The reviewed studies reported the global incidence of asymptomatic infection, with the majority of studies conducted in Brazil ($n = 27$), including the states of Mato Grosso do Sul, São Paulo, Maranhão, Rio de Janeiro, Piauí, Rio Grande do Norte, and Minas Gerais. Other studies were carried out in India ($n = 15$), Spain ($n = 9$), Ethiopia ($n = 7$), Iran ($n = 5$), Italy ($n = 4$), Turkey ($n = 3$), Nepal ($n = 2$), Israel ($n = 2$), Croatia, Sri Lanka, Thailand, Austria, France, Tunisia, Morocco, Sudan, the United States, and Argentina ($n = 1$ each) (Table 1).

Diagnostic techniques and *Leishmania* species

The detection techniques used to diagnose the disease were different between the studies. Included parasitological (culture and microscopy), serological tests, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fast agglutination screening test (FAST), soluble leishmania antigen (SLA), immunochromatographic test (ICT); immunochromatographic test (rK39), immunofluorescence antibody

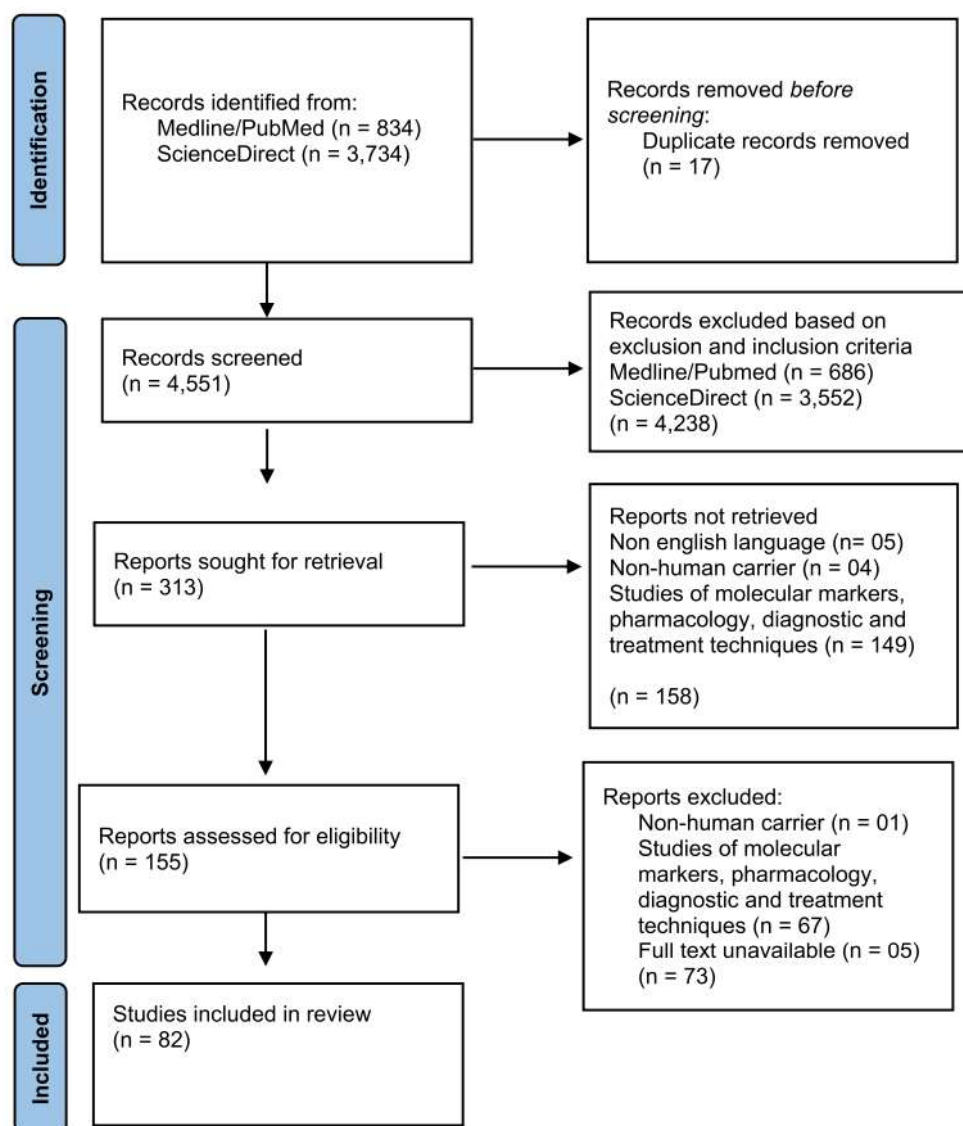


Fig. 1. Flow diagram of selection of articles used for the systematic review.

test (IFAT), western blot (WB), direct agglutination test (DAT), latex agglutination test (KAtex), montenegro skin test (MST), and fucose mannose ligand (FML); molecular test, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (qPCR) and single nucleotide polymorphism (SNP); cellular test Leishmanin skin test (LST), delayed-type hypersensitivity (DTH), microcapillary culture method (MCM), interferon gamma release assay (IGRA); Among the species analyzed were the *L. infantum* and *L. donovani* etiological agents of VL, and *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. panamensis* responsible for CL (Table 1).

Number of people tested and incidence, pre-existing diseases, and age groups

The studies with the highest number of people tested were carried out in India and Nepal, one of which involved 32,529 people and reported an incidence of 8.3% (n=2702), and the other involved 21,267 people and reported an incidence of 1.76% (n=375). The study with the smallest number of tested individuals (n=20) was carried out in Spain, with 100% asymptomatic cases. The locations with the highest positivity were the Balearic Islands (Spain), Pará (Brazil), and Minas Gerais (Brazil), with positivity rates of 100%,

73.2%, and 71.3%, respectively. Only 14.28% of the studies investigated leishmaniasis in blood donors (Table 1).

The vast majority of authors did not report the presence of pre-existing diseases in the participants, but studies carried out in Minas Gerais and Mato Grosso do Sul (Brazil) analyzed liver transplant donor and recipient populations as well as patients with chronic kidney failure. Other analyses carried out in countries such as Thailand, Spain, Iran, Morocco, and Ethiopia determined pre-existing diseases such as HIV, malaria, multiple myeloma, and candidates for kidney transplantation (Table 1).

The age group of the studied population ranged from zero to 94 years of age, and some authors did not describe data regarding the age selected for the study (Table 1).

Discussion

The nature of the articles selected for the systematic review shows that there were only a limited number of studies involving asymptomatic infection in humans, compared to articles involving animals or studies not related to the pathology. Although only 19 countries were the targets of asymptomatic case studies, leishmaniasis is a major public health problem and has a wide geographic distribution, with more than 1 billion people living in endemic areas

Table 1
Characteristics of the studies of cases of asymptomatic *Leishmania* infection and their groups of detection techniques and *Leishmania* species.

Study location	Detection technique	<i>Leishmania</i> species	Total population number (n)	Number of positive (% of asymptomatic)	Preexisting disease	Age groups	Source
Argentina (Salta)	MST	<i>L. panamensis</i> , <i>L. amazonensis</i>	7336	134 (1.8%)	N/I	30–59 years	Sosa-Estani 2000[13]
Austria	ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	1048	47 (4.5%)	N/I	18 and 60 years	Poepl 2013[14]
Brazil (Bahia)	ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	86	20 (23.2%)	N/I	Average 8.1 years	Badaro 1986[15]
Brazil (Bahia)	ELISA, MST	<i>L. infantum</i>	135	44 (32.59%)	N/I	N/I	D'Oliveira 1997[16]
Brazil (Bahia)	ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	700	38 (5.4%)	N/I	Average 42 years	Fukutani 2014[17]
Brazil (Ceará, Piauí and Minas Gerais)	ELISA, WB, PCR	<i>L. infantum</i>	608	37 (6%)	N/I	18–30 years	Ferreira-Silva 2018[18]
Brazil (Federal District)	MST, rK39	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i>	700	233 (33.28%)	N/I	2–14 years	Carranza-Tamayo 2016[19]
Brazil (Fortaleza)	ELISA	<i>L. infantum</i>	431	57 (13.2%)	N/I	N/I	Monteiro 2016[20]
Brazil (Maranhão)	DTH, ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	638 and 572	56%/41% and 58%/98%	N/I	0–5 years	Caldas 2002[21]
Brazil (Maranhão)	ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	905	144 (18.3%)	N/I	0–5 years	Gama 2004[22]
Brazil (Maranhão)	ELISA	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i>	1100	91 (8.2%)	N/I	N/I	Mendes 2007[23]
Brazil (Maranhão)	MST, ELISA	<i>L. infantum</i>	361	35 (9.7%)	N/I	< 16 years	Moura 2012[24]
Brazil (Mato Grosso do Sul)	IFAT, ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	220	80 (36.3%)	N/I	4 ≤ - ≥ 60 years	De Oliveira 2008[25]
Brazil (Mato Grosso do Sul)	IFAT	<i>L. major</i>	430	67 (15.6%)	N/I	18–68 years	França 2013[26]
Brazil (Mato Grosso do Sul)	IFAT, rK39	<i>Leishmania</i> sp.	50	16 (32%)	chronic renal failure	20–77 years	França 2020[27]
Brazil (Minas Gerais)	IFAT, ELISA, rK39, PCR	<i>L. infantum</i>	226	102 (45.1%)	N/I	13–38 years	Moreno 2006[28]
Brazil (Minas Gerais)	PCR, ELISA, rK39	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i>	136	97 (71.3%)	N/I	14–51 years	Moreno 2009[29]
Brazil (Minas Gerais)	IFAT, rK39, rK26, MST	<i>L. amazonensis</i>	246	156 (63.4%)	N/I	N/I	Silva 2011[30]
Brazil (Minas Gerais)	PCR	<i>Leishmania</i> sp.	67	5 (7.5%)	Liver transplant*	5–70 years	Clemente 2014[31]
Brazil (Minas Gerais)	SIA, rK39	<i>L. infantum</i>	935	304 (32.5%)	N/I	3 months - 10 years	Marques 2017[32]
Brazil (Minas Gerais)	rK39	<i>L. infantum</i>	1875	6 (0.32%)	N/I	2 months - 7 years	Da Rocha 2018[33]
Brazil (Minas Gerais)	rK39, ELISA, qPCR	<i>L. infantum</i>	179	81 (45.2%)	N/I	1–10 years	Da Cunha 2020[34]
Brazil (Pará)	DTH, IFAT	<i>Leishmania</i> sp.	231	169 (73.2%)	N/I	1–89 years	Silveira 2010[35]
Brazil (Piauí)	PCR	<i>L. infantum</i>	108	8 (7.4%)	N/I	4–28 years	Costa 2002[36]
Brazil (Rio de Janeiro)	MST	<i>L. braziliensis</i>	28	11 (39.28%)	N/I	Average 37 years	Bittar 2007[37]
Brazil (Rio Grande do Norte)	FML ELISA, PCR	<i>L. donovani</i>	21	14 (66.66%)	N/I	N/I	Otero 2000[38]
Brazil (Rio Grande do Norte)	ELISA	<i>L. infantum</i>	345	85 (24.6%)	N/I	N/I	De Lima 2012[39]
Brazil (Rio Grande do Norte)	MST	<i>L. amazonensis</i>	151	60 (39.7%)	N/I	N/I	Fagundes 2007[40]
Brazil (Rio Grande do Sul)	rK39	<i>L. infantum</i>	250	29 (11.6%)	N/I	> 31.5 years	Barão 2007[41]
Brazil (São Paulo)	ELISA	<i>L. infantum</i>	2035	231 (11.4%)	N/I	6 months - 88 years	Šiško-Kraljević 2013[42]
Croatia							
Ethiopia	FAST	<i>L. donovani</i>	1390	45 (3.2%)	N/I	0 - > 60 years	Hailu 2002[43]
Ethiopia	DAT, rK39, PCR, KAtex	<i>L. donovani</i>	534	36 (6.7%)	HIV	18 - > 48 years	Griensven 2019[44]
Ethiopia	LST, DAT	<i>L. donovani</i>	650 and 1040	59 (9.08%) and 9 (0.87%)	N/I	> 2 years	Tadesse 2019[45]
Ethiopia (Amhara)	rK39, DAT, DTH	<i>L. donovani</i>	605	61 (10%)	Malaria and HIV	5 < - 15 years	Gadisa 2012[46]
Ethiopia (Amhara)	rK39, DAT	<i>L. major</i>	565	56 (9.9%)	N/I	4–15 years	Custodio 2012[47]
Ethiopia (Amhara)	rK39	<i>L. donovani</i>	185	14 (7.5%)	N/I	20–30 years	Ayehu 2018[48]
Ethiopia (Armachiho)	MST, DAT, rK39	<i>Leishmania</i> sp.	1682	30 (1.8%)	N/I	> 18 months	Bekele 2018[49]
Ethiopia (Omo)	WB	<i>L. infantum</i>	565	76 (13.4%)	N/I	N/I	Le Fichoux 1999[50]
France (Monaco)	Microscopy	<i>L. donovani</i>	450	6 (1.3%)	N/I	N/I	Sosa 2000
India (Bihar)	rK39, ELISA	<i>L. infantum</i>	150	50 (33.3%)	N/I	N/I	Singh 2002[51]
India (Bihar)	rK39, PCR	<i>L. donovani</i>	997	21 (2.1%)	N/I	17–25 years	Das 2011[52]
India (Bihar)	rK39, DAT	<i>Leishmania</i> sp.	870	287 (32.98%)	N/I	5 - > 15 years	Gidwani 2011[53]
India (Bihar)	rK39, DAT, PCR	<i>L. donovani</i>	355	50 (14%)	N/I	0 - ≥ 60 years	Topno 2010[54]
India (Bihar)	qPCR	<i>Leishmania</i> sp.	210	40 (19.04%)	N/I	6–55 years	Sudarshan 2014[55]
India (Bihar)	rK39	<i>L. donovani</i>	5144	116 (2.2%)	N/I	1 - ≥ 46 years	Das 2020[56]
India (Bihar)	DAT, rK39, qPCR	<i>L. donovani</i>	5794	120 (2.07%)	N/I	≥ 6 years	Das 2017[57]
India (Malda)	rK39	<i>Leishmania</i> sp.	2890	79 (2.7%)	N/I	N/I	Saha 2017[58]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Study location	Detection technique	Leishmania species	Total population number (n)	Number of positive (% of asymptomatic)	Preexisting disease	Age groups	Source
India (Muzaffarpur)	qPCR, DAT, rK39	<i>L. donovani</i>	1469	511 (34.7%)	N/I	≥ 18 years	Sudarshan 2014[59]
India and Nepal	DAT	<i>L. donovani</i>	21,267	375 (1.76%)	N/I	N/I	Ostyn 2011[60]
India and Nepal	DAT	<i>L. donovani</i>	7538	510 (6.7%)	N/I	> 2 years	Picado 2014[61]
India (West Bengal)	qPCR, rK39, ELISA	<i>L. donovani</i>	246	27 (10.9%)	N/I	≤ 18 - ≥ 45 years	Kaushal 2017[62]
Iran	PCR-ELISA	<i>Leishmania</i> sp.	388	95 (24.5%)	N/I	1–35 years	Alborzi 2008[63]
Iran (Ardabil)	DAT, PCR	<i>L. infantum</i>	600	23 (3.8%)	N/I	20–61 years	Asfaram 2017[64]
Iran (Fars)	DAT, PCR	<i>L. infantum</i>	426	68 (15.96%)	N/I	5–10 years	Fakhar 2008[65]
Iran (Fars)	ELISA, PCR	<i>L. infantum</i>	617	17 (2.7%)	N/I	5–8 years	Gigloo 2018[66]
Iran (Fars)	ELISA, PCR	<i>L. infantum</i>	251	19 (7.5%)	HIV	14–83 years	Rezaei 2018[67]
Israel	ELISA	<i>L. donovani</i>	2580	67 (2.59%)	N/I	18–45 years	Adini 2003[68]
Israel (Kafr Yarka)	ELISA	<i>L. donovani</i>	648	67 (10%)	N/I	N/I	Adini 1994
Italy (Bologna)	WB, PCR	<i>L. infantum</i>	119	19 (15.9%)	renal transplant candidates	20–94 years	Comai 2020[69]
Italy (Ferrara)	qPCR	<i>Leishmania</i> sp.	150	22 (14.6%)	CIRDS	31–72 years	Maritati 2018[70]
Italy (Sicily)	ELISA	<i>L. infantum</i>	500	0 (0%)	N/I	N/I	Colomba 2005[71]
Italy (Valsamoggia)	WB, qPCR	<i>L. infantum</i>	240	30 (12.5%)	N/I	22–70 years	Ortali 2020[72]
Morocco	PCR, IFAT	<i>L. infantum</i>	200	10 (5%)	HIV	22–68 years	Echchakery 2018[73]
Nepal	PCR	<i>L. donovani</i>	418	40 (9.6%)	N/I	2 - > 46 years	Ostyn 2015[74]
Nepal (Dharan)	DAT	<i>L. donovani</i>	507	5 (0.9%)	N/I	18–45 years	Timilsina 2016[75]
Spain	IFAT	<i>L. donovani</i>	179	6 (3.3%)	HIV	29–33 years	Ena 2014[76]
Spain	IFAT	<i>L. infantum</i>	625	30 (4.8%)	N/I	11–81 years	Elmhallaawy 2015[77]
Spain	rK39, PCR, qPCR	<i>L. infantum</i>	50	29 (58%)	HIV, Myeloma	> 18 years	Molina 2020[78]
Spain (Balearic Islands)	ELISA, PCR, WB	<i>L. infantum</i>	122	36 (29.5%)	N/I	N/I	Riera 2004[79]
Spain (Balearic Islands)	WB	<i>L. infantum</i>	1437	44 (3.1%)	N/I	N/I	Riera 2008[80]
Spain (Balearic Islands)	WB, qPCR	<i>L. infantum</i>	20	20 (100%)	N/I	40–60 years	Jimenez-Marco 2018[81]
Spain (Madrid)	PCR	<i>L. infantum</i>	330	47 (14.24%)	N/I	N/I	Ibarra-Meneses 2016[82]
Spain (Murcia)	ELISA, PCR	<i>L. infantum</i>	657 and 618	13 (2%) and 49 (8%)	N/I	18–65 years	Pérez-Cutillas 2015[83]
Spain (Province of Grenada)	IFAT, qPCR, PCR-ELISA	<i>L. infantum</i>	1260	129 (10.2%)	N/I	18–65 years	Aliaga 2019[84]
Sri Lanka (Anuradhapura)	rK39, MST	<i>L. donovani</i>	955	31 (3.2%)	N/I	1 - > 65 years	Ranasinghe 2013[85]
Sudan (Gedaref)	DAT, PCR	<i>L. donovani</i>	95	31 (32%)	N/I	≤ 40 and ≥ 40 years	Mohamed 2019[86]
Thailand (Trang)	DAT	<i>Leishmania</i> sp.	724	180 (24.9%)	HIV/AIDS	> 18 years	Manomat 2017[87]
Tunisia	WB	<i>Leishmania</i> sp.	94	38 (40.4%)	N/I	8 months - 75 years	Saghrouni 2012[88]
Turkey	WB, IFAT, ELISA	<i>L. infantum</i>	82	5 (6%)	N/I	1–72 years	Sakru 2007[89]
Turkey (Istanbul)	IFAT	<i>L. infantum</i>	188	12 (6.4%)	N/I	19–64 years	Ates 2012[90]
Turkey (Istanbul)	PCR, MCM, ELISA, IFAT ICT	<i>L. infantum</i>	343	21 (6.1%)	N/I	18–65 years	Ates 2013[91]
United States (Washington)	ELISA, PCR, IGRA rK39	<i>L. infantum</i>	200	39 (19.5%)	N/I	24–60 years	Mody 2019[92]

N/I, Uninformed; DAT, Direct Agglutination test; DTH, Delayed-Type Hypersensitivity; ELISA, Enzyme Immunoassay; ELISA and chromatographic test of antibodies against rK26; ELISA and chromatographic test of antibodies against rK39; FAST, Fast Agglutination Screening Test; FML, Fucose Mannose Ligand; IFAT, Antibody Immunofluorescence Test; IGRA, Interferon Gamma Release Assay; ICT, immunochromatographic test; MCM, microcapillary culture method; MST, Montenegro Skin Test; PCR, Polymerase Chain Reaction; qPCR, real time PCR; rK39, Immunochromatographic test rK39; SLA, ELISA based on Soluble *Leishmania* Antigens; SNP, Single nucleotide polymorphism; WB, Western blot; *Liver transplant donor.

and at risk of contracting the parasite, which is the second most prevalent pathogen of parasitic diseases [1]. The selected studies demonstrated that the occurrence of asymptomatic infection by *Leishmania* is common in endemic regions, especially in developing countries such as Brazil and India.

Asymptomatic infection refers to an individual who has had a confirmed diagnosis of Leishmaniasis, without showing signs or symptoms of the disease, common in endemic regions. Sandflies are the main vectors of *Leishmania* and their evolution with mammals are well documented in the literature. Its transmission can follow an anthroponotic or zoonotic cycle. Domestic dogs are the main reservoirs of *L. infantum*, although other mammals are reservoirs of the parasite. A cohort study in Brazil demonstrated, through PCR tests, infection for asymptomatic leishmaniasis in up to 80% of the analyzed dogs. Despite the amount of clinical research, the nature of asymptomatic infection remains poorly understood [10,93–95].

A variety of diagnostic techniques were used across the different study areas. Most studies used combined immunological methods, while others plot molecular and parasitological tests. Immunological assays, although appropriate for regions with a high infection rate, cannot distinguish whether it is an active infection. Molecular methods, on the other hand, have high sensitivity and specificity, but do not indicate whether the infection is active. Parasitological techniques are time consuming, require trained personnel to visualize the parasite and, in asymptomatic cases, parasite identification is limited. It is difficult to diagnose asymptomatic cases due to the low parasite load and low levels of antibodies. The combination of methods raises the threshold for detecting asymptomatic infections in endemic regions [96].

In Brazil, the leishmaniasis control program involves rapid diagnosis and treatment of human cases [97]. Many asymptomatic infection detection techniques are used for the symptomatic form and have already allowed cross-reactions to be avoided. Owing to the low parasite load, combining tests improves performance and provides greater diagnostic certainty. Once asymptomatic infection in humans is identified, its monitoring is essential for the adoption of adequate therapy upon the onset of the first symptoms.

Four *Leishmania* species that cause CL (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, and *L. panamensis*) and two species that cause CL (*L. infantum* and *L. donovani*) were identified. *L. braziliensis* has a high prevalence in South America and is associated with mucosal forms. In contrast, *L. amazonensis* is responsible for disseminated forms [98].

The main risk factors for leishmaniasis are climate and environmental changes, socioeconomic conditions, malnutrition, and population mobility [99]. These are common factors in developing countries such as Brazil and India, which are the main countries with a high incidence of CL. In the case of asymptomatic infection by *Leishmania*, because it is “silent,” its incidence is underestimated, although epidemiological surveillance of asymptomatic infection allows for subsidization of prevention measures. The determinants of asymptomatic conditions have not yet been elucidated, but factors such as a high albumin concentration, high levels of vitamin A, high birth weight, and high consumption of red meat can favor asymptomatic infection [100].

In the research on asymptomatic infection by *Leishmania*, the presence of comorbidities such as HIV, malaria, multiple myeloma, and chronic renal failure was also described. In the case of infectious diseases, further studies are needed to verify whether the treatment of these diseases could inhibit the activity of *Leishmania*.

Some patients with immunosuppressive diseases such as HIV/AIDS undergoing antiretroviral treatment have asymptomatic *Leishmania* infection even with an increase in the parasite load, which enhances the infectivity of the vector and consequently transmission of the parasite [52,78]. The condition of individuals with asymptomatic *Leishmania* infection in HIV patients needs

further studies to elucidate the immune status that allows this condition.

Asymptomatic *Leishmania* infection has been reported in organ donors [27,31,69] and in blood donors [17,101], thus reinforcing the need for screening in donors in countries that have not yet adopted such screening, especially if they come from endemic areas. To avoid discarding a large number of blood bags from suitable donors with only asymptomatic *Leishmania* infection, leuko-depletion can be adopted, which, in addition to preventing transfusion transmission, improves the quality of blood products [64].

Most of the studies evaluated covered a wide age range, showing that asymptomatic cases can occur from children to the elderly, thus proving that age is not a determining factor for asymptomatic infection. The investigation of asymptomatic *Leishmania* infection is considered a priority to eliminate and reduce the transmissibility of the disease, since transmission remains in these hosts. More studies should be carried out in an attempt to investigate the percentage of individuals who can progress to clinical disease.

The determining factors (such as genetic background, nutritional aspects, and co-infections) for the asymptomatic condition caused by *Leishmania* have not yet been elucidated. Asymptomatic cases are a source of infection and contribute to the endemicity of the disease. Therefore, the detection of asymptomatic infection is important so that treatment can be started in a timely manner if the infection evolves into the symptomatic form, as this increases the chance of a therapeutic response. Studies performed in several endemic countries have highlighted the need to screen blood banks and organ donors, as this allows horizontal transmission through blood and organ donation to be avoided.

Conclusions

Our review demonstrates the worldwide incidence of asymptomatic *Leishmania* infection cases, describing the relevance of the search for alternatives in order to increase the detection rate and reduce the number of cases.

Ethics approval

Not applicable.

Funding

Authors MMCP, VJG, MSCLJ and HCNA declare they have no funding. The authors LGSR and KSL are financed in part by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Brasil (FUNDECT) – Finance Code 17/2019; and SMS is financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. FUNDECT and CAPES played no role in the conduct of the study, selection of articles, management, analysis and data interpretation, preparation, review, and approval of the manuscript. The opinions expressed are those of the authors and do not express the position of FUNDECT and CAPES. The English revision was funded by the Federal University of Grande Dourados (UFGD).

Consent for publication

Not applicable.

Author contributions

Conceptualization, supervision and critical review: MSCLJ and HCNA; Literature search, data analysis, writing – original draft

preparation: MMCP, SMS, LGSR, VJG and KSL. All authors viewed and agreed with the final version.

Data Availability

The authors declare that data supporting the findings of this study are available in the article in the References topic.

Conflict of interest

The authors declare they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Federal University of Grande Dourados (UFGD) for financial support in the English-language review. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) and the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Brasil (FUNDECT) for the scholarships.

References

- [1] WHO. World Health Organization. Leishmaniasis, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> [accessed 11 September 2020].
- [2] Okwor I, Uzonna J. Social and economic burden of human Leishmaniasis. 489–483 Am J Trop Med Hyg 2016;94(3). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>
- [3] Argy N, Lariven S, Rideau A, et al. Congenital Leishmaniasis in a newborn infant whose mother was infected with Leishmaniasis and HIV. J Pediatr Infect Dis Soc 2020;9(2):277–80. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz055>
- [4] Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, et al. Transfusion-transmitted Leishmaniasis: a practical review. Transfusion 2016;56:45–51. <https://doi.org/10.1111/trf.13344>
- [5] Gajurel K, Dhakal R, Deresinski S. Leishmaniasis in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Transpl 2017;31(1):1–12. <https://doi.org/10.1111/ctr.12867>
- [6] Xiong YH, Guan YY, Cao JP. Risk assessment on laboratory biosafety of Leishmania. Chinese J Schistosomiasis. Control 2012;24(3):342–4.
- [7] Gomila H., A. Vanzo C., Garner A, et al. Visceral Leishmaniasis. Pediatric case report. Arch Argent Pediatr. 2017; 115:251–254. <https://doi.org/10.5546/aap.2017.e251>.
- [8] Wilhelm T.J. Visceral Leishmaniasis Chirurg. 2019;90(10):833–837. <https://doi.org/10.1007/s00104-019-0994-1>.
- [9] Mokni, M. Cutaneous Leishmaniasis. Ann Dermatol Venereol. 2019;143(3):232–246. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>.
- [10] Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet 2018;392(10151):951–70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- [11] Andrade-Narvaez FJ, Loria-Cervera EN, Sosa-Bibiano EI, et al. Asymptomatic infection with American cutaneous Leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016;111(10):599–604. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276160160138>
- [12] Higgins, J.P.T.; Thomas, J.; Chandler, J.; Cumpston, M.; Li, T.; Page, M.J.; Welch, V.A. Eds. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.0 (updated July 2019). Cochrane, 2019. Available online: <http://www.training.cochrane.org/handbook> [accessed 10 August 2020].
- [13] Sosa-Estani S, Segura EL, Salomón OD, et al. Tegumentary leishmaniasis in Northern Argentina: distribution of infection and disease, in three municipalities of Salta, 1990–1992. Rev Soc Bras Med Trop 2000;33(6):573–82. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000600009>
- [14] Poepl W, Herkner S, Tobudic S, et al. Seroprevalence and asymptomatic carriage of Leishmania spp. in Austria, a non-endemic European country. Parasitology 2013;19(6):572–7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03960.x>
- [15] Badaro R, Jones TC, Lorenço R, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. J Infect Dis 1986;154(4):639–49. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.4.639>
- [16] D' Oliveira Junior A, Costa SRM, Barbosa AB, et al. Asymptomatic Leishmania chagasi Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997;92(1):15–20. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000100003>
- [17] Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS, et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. BMC Infect Dis 2014;14:1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-422>
- [18] Ferreira-Silva MM, Teixeira LAS, Tibúrcio MS, et al. Socio-epidemiological characterisation of blood donors with asymptomatic Leishmania infantum infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral Leishmaniasis. J Br Blood Transf Soc 2018;28(6):1–7. <https://doi.org/10.1111/tmc.12553>
- [19] Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic Leishmania infection in the outskirts of the largest Brazilian cities. Braz J Infect Dis 2016;20(2):119–26. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.11.013>
- [20] Monteiro DCS, Sousa AQ, Lima DM, et al. Leishmania infantum Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. Emerg Infect Dis 2016;22(4):739–40. <https://doi.org/10.3201/eid2204.150065>
- [21] Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by Leishmania chagasi in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;96(1):21–8. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90227-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90227-0)
- [22] Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, et al. Subclinical form of the American visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99(8):889–93. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800018>
- [23] Mendes DG, Lauria-Pires L, Nitz N, et al. Exposure to mixed asymptomatic infections with Trypanosoma cruzi, Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi in the human population of the greater Amazon. Trop Med Int Health 2007;12(5):629–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01831.x>
- [24] Moura GS, Santos AM, Aquino DMC, et al. Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral Leishmaniasis. Cad Saúde Pública Rio De Jan 2012;28(12):2306–14. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012001400009>
- [25] De Oliveira ALL, Paniago AMM, Sanches MA, et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral Leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Cad Saúde Pública 2008;24(12):2827–33. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200011>
- [26] França AO, De Castro VL, Lima Junior MS, et al. Anti-Leishmania antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. Transfus Apher Sci 2013;49(3):627–30. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2013.07.009>
- [27] França AO, Da Cunha GMR, Oliveira LP, et al. Presence of anti-Leishmania antibodies in candidates for kidney transplantation. Int J Infect Dis 2020;98:470–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.006>
- [28] Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral Leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. Med Trop 2006;39(5):421–7. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000500001>
- [29] Moreno EC, Gonçalves AV, Chaves AV, et al. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by Leishmania infantum. PLoS Negl Trop Dis 2009;3(10):536. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000536>
- [30] Silva LA, Romero HD, Nascentes GAN, et al. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a Visceral Leishmaniasis-Endemic Area in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2011;84(2):261–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0092>
- [31] Clemente WT, Rabello A, Faria LC, et al. High prevalence of asymptomatic Leishmania spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. Am J Transpl 2014;14:96–101. <https://doi.org/10.1111/ajt.12521>
- [32] Marques LHS, Da Rocha ICM, Reis IA, et al. Leishmania infantum: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. Parasitology 2017;144(4):546–56. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002134>
- [33] Da Rocha IC, Dos Santos LHM, Coura-Vital W, et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of Leishmania infantum infection. Parasit Vectors 2018;11(1):586. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3166-0>
- [34] Da Cunha GMR, Carneiro M, Xavier MAP, et al. Prospection of immunological biomarkers for characterization and monitoring of asymptomatic Leishmania (Leishmania) infantum infection. Parasitology 2020;147(10):1–34. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000852>
- [35] Silveira FT, Laison R, Crescente JA, et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg 2010;104(8):529–35. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.05.002>
- [36] Costa CHN, Stewart JM, Gomes RBB, et al. Asymptomatic human carriers of Leishmania chagasi. Am J Trop Med Hyg 2002;66(4):334–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.334>
- [37] Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, et al. T-cell responses associated with resistance to Leishmania infection in individuals from endemic areas for Leishmania (Viannia) braziliensis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(5):625–30. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000069>
- [38] Otero AC, Da Silva VO, Luz KG, et al. Short report: occurrence of Leishmania donovani DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. Am J Trop Med Hyg 2000;62(1):128–31. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.128>
- [39] De Lima I, Queiroz JW, Lacerda HG, et al. Leishmania infantum chagasi in Northeastern Brazil: asymptomatic infection at the Urban Perimeter. Am J Trop Med Hyg 2012;86(1):99–107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.10-0492>
- [40] Fagundes A, Marzochi MCA, Fernandes O, et al. First encounter of subclinical human Leishmania (Viannia) infection in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(8):1003–5. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007008000018>
- [41] Barão SC, Camargo-Neves VLF, Resende MR, et al. Human asymptomatic infection in visceral Leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Am J Trop Med Hyg 2007;77(6):1051–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.1051>
- [42] Šiško-Kraljević N, Jerončić A, Mohar B, et al. Asymptomatic Leishmania infantum infections in humans living in endemic and non-endemic areas of

- Croatia, 2007 to 2009. *Eur Surveill* 2013;18(29):1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20533>
- [43] Hailu A, Kroon CCM, Schoone GJ, et al. Sero-epidemiological assessment and diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic locality using Fast Agglutination Screening Test (FAST). *Acta Trop* 2002;83(2):93–101. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00063-3)
- [44] Griensven JV, Henten SV, Mengesha B, et al. Longitudinal evaluation of asymptomatic Leishmania infection in HIV-infected individuals in North-West Ethiopia: a pilot study. *PLOS Negl Trop Dis* 2019;13(10):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007765>
- [45] Tadese D, Hailu A, Bekele F, et al. An epidemiological study of visceral leishmaniasis in North East Ethiopia using serological and leishmanin skin tests. *PLOS ONE* 2019;14(12):1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225083>
- [46] Gadisa E, Custodio E, Cañavate C, et al. Usefulness of the rK39-immunochromatographic test, direct agglutination test, and leishmanin skin test for detecting asymptomatic leishmania infection in children in a new Visceral Leishmaniasis focus in Amhara State, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86(5):792–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0196>
- [47] Custodio E, Gadisa E, Sordo L, et al. Factors associated with leishmania asymptomatic infection: results from a cross-sectional survey in highland Northern Ethiopia. *PLOS Negl Trop Dis* 2012;6(9):1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001813>
- [48] Ayehu A, Aschale Y, Lemma W, et al. Seroprevalence of asymptomatic leishmania donovani among laborers and associated risk factors in agricultural camps of West Armachiho District, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *J Parasitol Res* 2018;1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/5751743>
- [49] Bekele F, Belay T, Zeynudin A, et al. Visceral Leishmaniasis in selected communities of Hamar and Banna-Tsamai districts in Lower Omo Valley, South West Ethiopia: Sero-epidemiological and Leishmanin Skin Test Surveys. *PLoS One* 2018;13(5):1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197430>
- [50] Le Fichoux YI, Quaranta JF, Aufeuve JP, et al. Occurrence of leishmania infantum parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1953–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1953-1957.1999>
- [51] Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in symptomatic patients with latent Leishmania donovani infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(3):568–72. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.3.568-572.2002>
- [52] Das VNR, Siddiqui NA, Verma RB, et al. Asymptomatic infection of visceral Leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105(11):661–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.005>
- [53] Gidwani K, Ostyn B, Picado A, et al. Persistence of human Leishmania antibodies in past kala azar cases in the Indian subcontinent. *Trop Med Int Health* 2011;18(2):346–8. <https://doi.org/10.1128/CVI.00473-10>
- [54] Topno RK, Das VNR, Ranjan A, et al. Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83(3):502–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0345>
- [55] Sudarshan M, Sudar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2014;80(1):40–2. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.031>
- [56] Das VNR, Pandey RN, Siddiqui NA, et al. Longitudinal study of transmission in households with visceral leishmaniasis, asymptomatic infections and PKDL in highly endemic villages in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(12):1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005196>
- [57] Das VNR, Bimal S, Siddiqui NA, et al. Conversion of asymptomatic infection to symptomatic visceral Leishmaniasis: a study of possible immunological markers. *PLOS Negl Trop Dis* 2020;14(6):1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008272>
- [58] Saha P, Ganguly S, Chatterjee M, et al. Asymptomatic Leishmaniasis in kala-azar endemic areas of Malda district, West Bengal, India. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(2):1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005391>
- [59] Sudarshan M, Singh T, Singh AK, et al. Quantitative PCR in epidemiology for early detection of Visceral Leishmaniasis cases in India. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(12):1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003366>
- [60] Ostyn B, Gidwani K, Khanal B, et al. Incidence of symptomatic and asymptomatic leishmania donovani infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(10):1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001284>
- [61] Picado A, Ostyn B, Singh SP, et al. Risk factors for visceral leishmaniasis and asymptomatic Leishmania donovani infection in India and Nepal. *PLoS One* 2014;9(1):1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087641>
- [62] Kaushal H, Bhattacharya SK, Verma S, et al. Serological and molecular analysis of leishmania infection in healthy individuals from two districts of West Bengal, India, Endemic for Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2017;96(6):1448–55. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0592>
- [63] Alborzi A, Pourabbas B, Shahian F, et al. Detection of Leishmania infantum Kinoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in Endemic Areas, Southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79(6):839–42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.839>
- [64] Asfaram S, Fakhar M, Mohebbi M, et al. Asymptomatic human blood donors carriers of Leishmania infantum: potential reservoirs for visceral leishmaniasis in northwestern Iran. *Transfus Apher Sci* 2017;56(3):474–9. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.06.001>
- [65] Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, et al. Asymptomatic human carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs for Mediterranean visceral Leishmaniasis in southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2008;102(7):577–83. <https://doi.org/10.1179/136485908X337526>
- [66] Gigloo AL, Sarkari B, Rezaei Z, et al. Asymptomatic Leishmania Infected Children: a Seroprevalence and Molecular Survey in a Rural Area of Fars Province, Southern Iran. *J Trop Med* 2018;15:1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/8167247>
- [67] Rezaei Z, Sarkari B, Dehghani M, et al. High frequency of subclinical Leishmania infection among HIV-infected patients living in the endemic areas of visceral Leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Parasitol Res* 2018;117(8):2591–5. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5949-9>
- [68] Adini I, Ephros M, Chen J, Jaffe CL. Asymptomatic Visceral Leishmaniasis, Northern Israel. *Emerg Infect Dis* 2003;9(3):397–8. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020297>
- [69] Comai G, De Pascali AM, Busutti M, et al. Screening strategies for the diagnosis of asymptomatic Leishmania infection in dialysis patients as a model for kidney transplant candidates. *J Nephrol* 2020;34(1):191–5. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00705-4>
- [70] Maritati M, Trentini A, Michel G, et al. Subclinical Leishmania infection in patients with rheumatic diseases under biological drugs. *Infection* 2018;46(6):401–9. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1189-2>
- [71] Colomba C, Saporito L, Polara FV, et al. Serological screening for Leishmania infantum in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). *Transfus Apher Sci* 2005;33(3):311–4. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2005.07.009>
- [72] Ortalli M, De Pascali AM, Longo S, et al. Asymptomatic Leishmania infantum infection in blood donors living in an endemic area, northeastern Italy. *J Infect* 2020;80(1):116–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.09.019>
- [73] Echchakery M, Nieto J, Boussaa S, et al. Asymptomatic carriers of Leishmania infantum in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) in Morocco. *Parasitol Res* 2018;117(4):1237–44. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5805-y>
- [74] Ostyn B, Urwan S, Bhattarai NR, et al. Transmission of Leishmania donovani in the Hills of Eastern Nepal, an Outbreak Investigation in Okhaldhunga and Bhojpur Districts. *PLOS Negl Trop Dis* 2015;9(8):1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003966>
- [75] Timilsina S, Bhattarai NR, Khanal B, et al. Serological assessment for leishmania donovani infection in blood donors of Sunsari District, Dharan, Nepal. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016;32(1):95–9. <https://doi.org/10.1007/s12288-015-0505-6>
- [76] Ena J, Pasquau F, López-Perezagua MM, et al. Screening for subclinical Leishmania infection in HIV-infected patients living in eastern Spain. *Pathog Glob Health* 2014;108(8):356–61. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000164>
- [77] Elmahallawy EK, Cuadros-Moronta E, Liébana-Martos MC, et al. Seroprevalence of Leishmania infection among asymptomatic renal transplant recipients from southern Spain. *Transpl Infect Dis* 2015;17(6):795–9. <https://doi.org/10.1111/tid.12444>
- [78] Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(4):1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008253>
- [79] Riera C, Fisa R, Udina M, et al. Detection of Leishmania infantum cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98(2):102–10. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00015-4)
- [80] Riera C, Fisa R, López-Chejade P, et al. Asymptomatic infection by Leishmania infantum in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *J Transf* 2008;48(7):1383–9. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01708.x>
- [81] Jimenez-Marco T, Riera C, Girona-Llobera E, et al. Strategies for reducing the risk of transfusion-transmitted leishmaniasis in an area endemic for Leishmania infantum: a patient- and donor-targeted approach. *Blood Transfus* 2018;16(2):130–6. <https://doi.org/10.2450/2017.0201-16>
- [82] Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Sanchez C, et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where Leishmania infantum is endemic. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(8):1–739. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.021>
- [83] Pérez-Cutillas P, Goyena E, Chitimia L, et al. Spatial distribution of human asymptomatic Leishmania infantum infection in southeast Spain: a study of environmental, demographic and social risk factors. *Acta Trop* 2015;146:127–34. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.017>
- [84] Aliaga I, Ceballos J, Sampedro A, et al. Asymptomatic Leishmania infection in blood donors from the Southern of Spain. *J Infect Dis* 2019;47(5):739–47. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01297-3>
- [85] Ranasinghe S, Wickremasinghe R, Munasinghe A, et al. Cross-sectional study to assess risk factors for leishmaniasis in an endemic Region in Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg* 2013;89(4):742–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0640>
- [86] Mohamed NS, Osman HA, Muneer MS, et al. Identifying asymptomatic Leishmania infections in non-endemic regions in Gedaref state, Sudan. *BMC Res* 2019;12:1–7. <https://doi.org/10.21203/rs.2.11134/v2>
- [87] Manomat J, Leelayoova S, Bualert L, et al. Prevalence and risk factors associated with Leishmania infection in Trang Province, southern Thailand. *PLOS Negl Trop Dis* 2017;11(11):1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006095>

- [88] Saghrouni F, Khammari I, Kaabia N, et al. Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia. *Pathol Biol* 2012;60(5):55–8. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2011.11.001>
- [89] Sakru N, Korkmaz M, Ozbel Y, et al. Investigation of asymptomatic visceral *Leishmaniasis* cases using western blot in an endemic area in Turkey. *N Microbiol* 2007;30(1):13–8.
- [90] Ates SC, Bagirova M, Allahverdiyev AM, et al. Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul. *Future Microbiol* 2012;7(6):773–9. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.46>
- [91] Ates SC, Bagirova M, Allahverdiyev AM, et al. Utility of the microculture method for *Leishmania* detection in non-invasive samples obtained from a blood bank. *Acta Trop* 2013;128(1):54–60. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.009>
- [92] Mody RM, Lakhal-Naouar I, Sherwood JE, et al. Asymptomatic Visceral *Leishmania infantum* Infection in US Soldiers Deployed to Iraq. *Clin Infect Dis* 2019;68(12):2036–44. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy811>
- [93] Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002;186(9):1314–20. <https://doi.org/10.1086/344312>
- [94] Singh OP, Hasker E, Sacks D, et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis* 2014;58(10):1424–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu102>
- [95] Pace D. *Leishmaniasis*. *J Infect* 2014;69:01–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- [96] Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, et al. Detection of DNA from *Leishmania* (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of Cutaneous *Leishmaniasis*. *PLoS One* 2013;5(8):1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062473>
- [97] Urias EVR, Carvalho SFG, Oliveira CL, et al. Prevalence of adults infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* among blood donors of the Hemominas Foundation in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009;31:348–54. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000073>
- [98] P.A.H.O. Pan American Health Organization. *Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas*. Number 9, December 2020. Washington, D.C. 2020. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>.
- [99] Kammona O, Tsanaktisidou E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. *Int J Pharm* 2021;605:120761. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120761>
- [100] Michel G, Pomares C, Ferrua B, et al. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop* 2011;119(2–3):69–75. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.012>
- [101] Silva LP, Werkauser SMR, Silva KG, et al. Asymptomatic *Leishmania* infection in blood donors from a major blood bank in Northeastern Brazil: a cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop* 2020;62:1–7. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062092>

5.2 Artigo 2: Similarity to drugs, prediction of toxicity, cytotoxicity, anti-*Leishmania amazonensis* and antioxidant activity of β -carboline derivatives

Periódico “*Parasitology Research*”, Qualis A1 e FI 2.

Link com as normas da revista: <https://www.springer.com/journal/436/submission-guidelines>

Similarity to drugs, prediction of toxicity, cytotoxicity, anti-*Leishmania amazonensis* and antioxidant activity of β -carboline derivatives

Milena Menezes Corrêa Pederiva^a, Kamily Fagundes Pussi^a, Amarith Rodrigues das Neves^b, Sidney Mariano dos Santos^a, Fernanda da Silva^b, Matheus Simplicio Sena^c, Carla Cardozo Pinto de Arruda^b, Anelise Samara Nazari Formagio^a, Herintha Coeto Neitzke-Abreu^{a*}

^aPostgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^bLaboratory Human Parasitology of INBIO, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^cFaculty of Biological and Environmental Sciences, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^dLaboratory of Immunopathology and Molecular Biology, Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brazil

*Correspondence to: Faculty of Health Sciences, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Zip Code: 79804-970. Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Email addresses:* mimenezesbiomed@gmail.com (MMC Pederiva); kamilyfagundespuissi@gmail.com (KF Pussi); amardasneves@gmail.com (AR das Neves); sidneysmariano@gmail.com (SM dos Santos); silva2.fernanda@gmail.com (F da Silva); maths999br@hotmail.com (MS Sena); carla.arruda@ufms.br (CCP Arruda); aneliseformagio@ufgd.edu.br (ASN Formagio); herinthaabreu@ufgd.edu.br (HC Neitzke-Abreu).

ABSTRACT

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by numerous species belonging to the genus *Leishmania*, including *Leishmania amazonensis*. The infection generates intense oxidative stress capable of generating tissue damage. In this study, we investigated in silico the drug similarity and toxicity, anti-*Leishmania* activity, hemolytic potential and antioxidant activity of eleven β -carboline derivatives, a highly promising group of alkaloids against *L. amazonensis*. In silico toxicity demonstrated different biological toxicities and chemical parameters, good permeability and solubility values of these compounds. Activity against promastigotes was evaluated after 72 hours, with an IC_{50} variation between 5.15 and 41.19 μ M, with emphasis on the PNO₂-Anis (**8**) and Cl-Hi (**5**) derivatives. Cytotoxicity was performed with human erythrocytes and all derivatives did not demonstrate hemolytic potential. Antioxidant activity was measured by DPPH and ABTS assays, where in general the compounds demonstrated potential in combating free radicals, with emphasis on Cl-Oxa (**11**) in the DPPH technique. In the ABTS test, all derivatives were better than the control. The results demonstrated are pioneering and from this study new substances with anti-*Leishmania*, antioxidant properties and low hemolysis potential were identified, in addition to in silico analyzes that demonstrate the chemical characteristics and possible useful toxic effects of the derivatives, useful for future studies and analysis of molecular docking.

Keywords: Alkaloids, *Leishmania*, free radicals, oxidative stress

1 Introduction

Although efforts are made to combat leishmaniasis, the disease is considered a major public health problem worldwide, due to the wide variety of hosts and reservoirs, as well as the difficulty in treating the infection. According to the World Health Organization (WHO), the disease is endemic in 97 countries, and it is estimated that approximately 200.000 people are affected annually. Leishmaniasis is caused by species belonging to the genus *Leishmania* and is transmitted through the bite of infected female sandflies. The disease comprises two clinical forms: tegumentary and visceral, with the cutaneous being the most common form of infection, where numerous species of *Leishmania* are involved in the development, including *Leishmania amazonensis* (Alonso et al. 2021; Sreedharan and Rao 2023).

The treatment of leishmaniasis is based on chemotherapy since there are still no vaccines available for humans. The main drugs used are pentavalent antimonials such as N-methylglucamine antimoniate and sodium stibogluconate. However, the problem in the treatment of the disease involves drug toxicity such as cardiotoxicity and hepatotoxicity, in addition to the parenteral route of administration, which often causes the patient to abandon treatment. Despite the various surveys conducted worldwide, there are still gaps to be filled in relation to the treatment for the disease (Assolini et al. 2022; Gabriel et al. 2019).

Synthetic and naturally β -carboline (β -CA) derivatives exhibit a large spectrum of important pharmacological properties, including potent antileishmanial activity. A variety of synthetic β -carboline derivatives have demonstrated that the introduction of appropriated substituents into position-1, -2, -3 and -9 of the β -carboline skeleton resulted in more potent derivatives (Paula et al. 2022; Alonso et al. 2021; Aquino et al. 2022; Ueda-Nakamura et al. 2014; Silva et al. 2012). In this work, 11 1-substituted-phenyl β -

carboline derivatives, bearing the substituted-carbohydrazide/or 1,3,4-oxadiazol moiety at C-3 were selected.

Several naturally occurring and synthetic β -CA were evaluated for their anti-*Leishmania* action and reported in the literature, demonstrating that they are prototypes against different *Leishmania* species. In the present study, 11 synthetic β -CA were evaluated for their chemical behavior and in silico toxicity, cytotoxicity, anti-*Leishmania* and antioxidant activity. To our knowledge, these compounds have never been reported in the literature regarding these activities and against *Leishmania amazonensis*.

2 Material and methods

2.1 Compounds

The compounds 1-(Phenyl)- 9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**1**), 1-(4-Methoxyphenyl)-9H-pyrido [3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**2**), 1-(3-Nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**3**), 1-(4-Nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**4**), 1-(2-chlorophenyl)- 9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**5**), 1-(Phenyl)-N'-(2-chlorobenzylidene)-9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**6**), 1-(4-Methoxyphenyl)-N'-(benzylidene)-9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**7**), 1-(2-chlorophenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene)-9H-pyrido[3,4- β]-indole-3-carbohydrazide (**8**), 1-Phenyl-3-(2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) - β -carboline (**9**), 1-(4- Methoxyphenyl)-3-(2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carboline (**10**), 1-(2-chlorophenyl)-3-(2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carboline (**11**) (Figure 1) as described by Formagio et al. (2008, 2009).

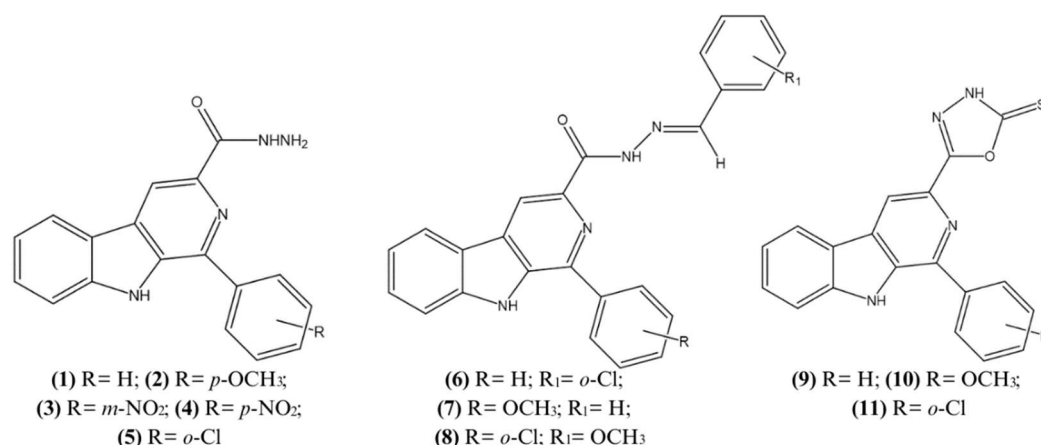


Fig. 1 Molecular structures of β -carboline derivatives.

2.2 Drug-likeness and toxicity prediction

Drug likeness prediction of β -CA was done by using Molinspiration online server, where drug likeness is based on the Lipinkies rule of five (Lipinski et al. 1997). Toxicity was calculated using Protox II servers, a server used to determine LD₅₀ and classify potentially toxic substances for future animal testing. Toxicity was measured in LD₅₀ values ranging from Class I: fatal if swallowed (≤ 5 mg/kg); Class II: fatal if swallowed (between 5 and 50 mg/kg); Class III: toxic if swallowed (between 50 and 300 mg/kg); Class IV: harmful if ingested (between 300 and 2.000 mg/kg); Class V: may be harmful if ingested (between 2.000 and 5.000 mg/kg) and Class VI: non-toxic (> 5.000 mg/kg).

2.3 Antileishmanial Activity

2.3.1 Parasites and cell culture

The *L. amazonensis* strain IFLA/BR/1967/pH8 was used for anti-*Leishmania* assays. Promastigotes were grown in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at a temperature of 25°C in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil) and supplemented with 20% fetal bovine serum, (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil), 10,000 U/mL penicillin, and 10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil).

2.3.2 Promastigote assay

The promastigotes (2×10^5 parasites/mL) were distributed in 96-well plates together with β -CA (0.78 – 50.0 μ g/mL) and/or amphotericin B (AmB) (Sigma-Aldrich® SP/Brasil; 0,25–10 μ g/mL), used as a positive control and pure Schneider culture medium was used as a negative control. The plates were incubated for 72h at 25°C and 5% CO₂. Parasite viability was verified by the colorimetric method with tetrazolium bromide dye-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). After the incubation period, 10 μ L of MTT (5 mg/mL) was added to each well and the plates were incubated again for 4 h at 25°C with 5% CO₂. After this period, 80 μ L of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. The result was measured by absorbance at 540 nm using a spectrophotometer plate reader (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, UK). The minimum inhibitory concentration (IC₅₀) by a non-linear dose-response regression curve using the statistical program GraphPad Prism® 5.0 software (Rizk et al. 2022; Dutta et al. 2005). The experiment was carried out in duplicate.

2.4 Citotoxicity in erythrocytes

Hemolytic activity was determined according to Valdez et al. (2009), with modifications. The study was submitted to the Research Ethics Committee involving Human Beings (CEP/UFGD). Briefly, a 6% suspension of defibrinated fresh human blood was prepared with sterile saline and 1% glucose. β -CA were diluted (0.78 – 50.0 μ g/mL) in 96-well plates. An erythrocyte suspension plus 4% Triton X-100 was used as a positive control and the cell suspension was used as a negative control. The plates were incubated for 2h at 37°C and centrifuged at 300g for 5 min. The absorbance of the

supernatant was determined by reading on a microplate reader at 595 nm. The percentage of hemolysis was calculated using the equation $\text{hemolysis (\%)} = 100 - [(A_p - A_s)/(A_p - A_c) \times 100]$; where A_p represents the mean of the positive control, A_s absorbance of the test sample and A_c the mean of the negative control. The experiment was carried out in triplicate in two independent assays.

2.5 Measurement of Antioxidant Activity

The *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)* and *ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)* assays are widely used methods for the assessment of the antioxidant capacities of natural products, they both are spectrophotometric techniques based on quenching of stable colored radicals and show the radical scavenging ability of antioxidants.

2.5.1 Scavenging of 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)

Different concentrations (5–250 $\mu\text{g/mL}$) of the β -CA derivatives and the positive control butylhydroxytoluene (BHT) were evaluated for free radical scavenging activity by the DPPH assay (Blois 1958). DPPH produces violet/purple color in methanol solution and fades to shades of yellow color in the presence of antioxidants. Was added to the samples 2 mL of previously prepared methanolic DPPH solution (0.1 mM). The mixture was stirred and left to stand under light deprivation at room temperature for 30 min and absorbance was measured at 515 nm, in spectrophotometer (Bel Photonics, Monza, IT). The experiment was carried out in triplicate. The percentage of DPPH inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = (A_0 - A/A_0) \times 100$; where A_0 is the absorbance of the blank solution and A is the absorbance of the compound. Sample concentrations for 50% DPPH inhibition (IC_{50}) were obtained from the graph of I%

(percentage of inhibition) *versus* compound concentration in micromolar per milliliter ($\mu\text{M}/\text{mL}$). The experiment was carried out in duplicate.

2.5.2 ABTS (*ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) assay

Total antioxidant activity was assessed using the improved azinobis radical scavenging assay (ABTS) (Re et al. 1999). Potassium persulfate (12.25 mM) and ABTS reagent (7.0 mM) were mixed and left under protection from light at room temperature for 16h. For analysis, 1.980 mL of ABTS solution was added to 20 μL of different concentrations of the compounds (5–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). BHT was used as a positive control. After 6 min, absorbance was measured on a spectrophotometer (Bel Photonics, Monza, IT) at 734 nm. The ABTS radical scavenging activity was calculated using the equation: ABTS radical scavenging activity (%) = $(A_0 - A/A_0) \times 100$; where A_0 is the absorbance of the blank solution and A is the absorbance of the compounds. The experiment was carried out in duplicate.

3 Results and discussion

Leishmaniasis is considered a very common neglected disease in many countries around the world. The vast majority of medications currently available generate toxic effects for the patient, in addition to cases of parasitic resistance. So, there is an urgent need to discover new drugs to treat the disease that have minimal or no toxicity and an easier route of administration for the patient, in an attempt to ensure that they do not abandon treatment (Abamor et al. 2017). The discovery and development of a drug for the treatment of leishmaniasis entails several challenges that depend on many biological aspects, including cytotoxicity. In addition to having high anti-leishmanial activity against forms of the parasite, the compound must not be toxic against macrophages, since

part of the *Leishmania* cycle occurs within the host cell, nor must it generate hemolysis, as this would cause serious problems for the patient.

β -CA derivatives were evaluated for their chemical characteristics to estimate lipophilicity (logP) through in silico analysis, first postulated by Lipinski et al. 1997, through the publication of the rule of five, which encompasses the number of hydrogen bond donor atoms (sum of O-H and N-H atoms), number of hydrogen bond acceptor atoms (sum of O and N atoms) and the coefficient of Calculated octanol/water partition (logP). This rule assumes that poor absorption or permeation is expected when there are more than 5 H-bond donors. Through the characteristics of a variety of standard medications it has been determined that the ideal value is for the substance to have $\log P \leq 5$, number of hydrogen bond donor atoms ≤ 5 and number of hydrogen bond acceptor atoms ≤ 10 . Molecules that present two or more parameters outside the reference values have a high chance of being poorly permeable (Piccirillo and Amaral 2018).

Following Lipinski's rule, compounds (6), (7) and (8) violated one of the five rules by presenting $\log P > 5$. All compounds analyzed demonstrated good characteristics regarding intestinal absorption (TPSA) with values ≤ 140 and most of them did not present a number of violations (n violations), an important rule for interaction with receptors (Table 1). When predicting toxicity, all compounds were hepatotoxic in nature, but none of them showed characteristics of cytotoxicity and mutagenicity (Table 1).

Table 1. Drug-likeness and toxicity prediction of alkaloids β -carbolines

Compounds	Drug Likeness							Toxicity					
	Log P	TPSA	MW	nOH	NHn	n violations	Lipinski rule	Hep	Car	Imm	Mut	Cyt	LD ₅₀ (mg/kg)
Bz-Cl (1)	2.88	83.80	302.34	5	4	0	Yes	Active	Active	Inactive	Inactive	Inactive	200 (class III)
Anis-Hi (2)	2.92	93.04	332.36	6	4	0	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
MNO ₂ -Hi (3)	2.33	119.06	333.35	7	6	1	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
PNO ₂ -Hi (4)	2.30	119.06	333.35	7	6	1	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
Cl-Hi (5)	3.54	83.80	336.78	5	4	0	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
MNO ₂ -Cl (6)	6.32	70.14	424.89	5	2	1	Yes	Active	Inactive	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
MNO ₂ -Ome (7)	5.67	79.38	420.47	6	2	1	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	1120 (class IV)
PNO ₂ -Anis (8)	6.29	79.38	468.94	6	2	1	Yes	Active	Inactive	Active	Inactive	Inactive	200 (class III)
Van-Oxa (9)	3.80	70.51	344.40	5	2	0	Yes	Active	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	550 (class IV)
MNO ₂ -Oxa (10)	3.81	79.74	374.43	6	2	0	Yes	Active	Active	Active	Inactive	Inactive	550 (class IV)

Cl-Oxa (11)	4.45	70.51	378.84	5	2	0	Yes	Active	Inactive	Active	Inactive	Inactive	1000 (class IV)
----------------------	------	-------	--------	---	---	---	-----	--------	----------	--------	----------	----------	--------------------

LogP = lipophilicity (calculated octanol/water partition coefficient); TPSA = intestinal permeation; MW = molecular weight; nOH = number of hydrogen bond acceptor atoms; NHn = number of hydrogen bond donor atoms; n violations = number of violations; Hep = hepatotoxicity; Car = carcinogenicity; Imm = immunogenicity; Mut = mutagenicity; Cyt = cytotoxicity; LD₅₀ = lethal dose.

Synthetic compounds have advantages when compared to those isolated in nature due to the possibility of obtaining a greater quantity of the product and easy access for its reproduction. β -CA were tested against *L. amazonensis* promastigotes. The promastigote assay is considered a screening technique for large-scale compound analysis. To evaluate anti-*Leishmania* activity, the parasitic forms were incubated for 72 h in the presence of β -CA. Compounds with an IC_{50} greater than 10.5 μ M/mL were considered inactive. However, it is known that derivatives that presented IC_{50} values higher than the standardized ones should not be discarded as potential anti-leishmanial prototypes.

The results showed that the vast majority of derivatives were able to reduce the parasite load. Among the compounds evaluated, the derivatives PNO₂-Anis (**8**) and Cl-Hi (**5**) stood out, showing lower values (IC_{50} = 5.15 and 5.65 μ M, respectively). The drug control used AmB presented (IC_{50} = 0.16 μ M) (Table 2). In general, we can observe that each compound behaved differently, this difference in behavior seems to be related to the chemical structure of the compounds that have different functional groups in the molecule.

Table 2 *In vitro* activity of β -Carbolines against promastigotes of *L. amazonensis*.

Compounds	Promastigotes
Bz-Cl (1)	10.43 $\pm$ 2.22
Anis-Hi (2)	6.64 $\pm$ 1.75
MNO ₂ -Hi (3)	26.08 $\pm$ 6.46
PNO ₂ -Hi (4)	13.80 $\pm$ 2.83
Cl-Hi (5)	5.65 $\pm$ 1.35
MNO ₂ -Cl (6)	29.53 $\pm$ 10.24
MNO ₂ -Ome (7)	41.19 $\pm$ 11.45

PNO ₂ -Anis (8)	5.15 ± 1.43
Van-Oxa (9)	7.03 ± 1.96
MNO ₂ -Oxa (10)	8.04 ± 2.32
Cl-Oxa (11)	9.91 ± 3.04
AmB (control)	0.16 ± 0.11

IC₅₀ = inhibitory concentration for 50% of the promastigotes ± S.E.M. = standard error of the mean. Each experiment was performed independently, 3 times, and in duplicate.

β-CA alkaloids, whether synthetic and/or isolated from natural sources, are promising molecules with numerous reported pharmacological activities, including anti-*Leishmania*. Baréa et al (2018), reported the leishmanicidal activity against the *L. amazonensis* species of β-carboline-1,3,5-triazine hybrids, showing that among the evaluated compounds, the 9d (2-Cl-Ph), 9e (3-NO₂-Ph), 16a (Ph) and 16b (4-OCH₃-Ph) showed potent activity against promastigotes forms with IC₅₀ values of 7.6 ± 2.02 μM; 5.1 ± 0.1 μM; 35.0 ± 0.5 μM and 6.2 ± 1.4 μM, respectively. On the other hands, Giorgio et al (2004), investigated the leishmanicidal activity of the β-carbolines harmane, harmine and harmaline, and demonstrating that these compounds exerted weak antileishmanial activity for the promastigotes and amastigotes forms in *Leishmania infantum*.

In vitro hemolytic activity test has been reported as an alternative method in screening for the cytotoxicity of drugs. Erythrocytes are vulnerable to peroxidation, making it a good biological membrane model for analyzing the oxidative stress and lipid peroxidation of several xenobiotics (Farag and Alagawany 2018). No hemolytic potential was observed at the IC₅₀ concentration for the promastigote forms. All β-CA derivatives tested did not show significant cytotoxicity to human erythrocytes at concentrations of 0.78 – 50.0 μg/ml. De Mello et al. (2014), reported the hemolysis potential of AmB that obtained 100% and 84.07% hemolysis at 135.28 μM and 16.90 μM, respectively. The

results presented are consistent with literary reports for this class of alkaloids. Valdez et al. (2009), demonstrated that the compound N-butyl-1-(4-dimethylamino) phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide caused only 2.2% of hemolysis at the highest concentration tested (1282 μ M). Studies carried out by Stefanello et al. (2014) reported that N-butyl-[1-(4-methoxy) phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide did not present hemolytic activity.

Antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS assays, based on radical scavenging. DPPH is a stable free radical widely used to estimate the free radical scavenging capacity of substances, while ABTS is based on the molecule's ability to capture the ABTS radical (Gülçin 2012). Due to insufficient sample quantity, only eight of the eleven alkaloids were subjected to antioxidant analysis. The β -CA derivatives tested demonstrated excellent antioxidant potential, especially in the ABTS assay. In the DPPH assay, the derivative Cl-Oxa (**11**) ($IC_{50} = 0.0481 \pm 0.0042 \mu$ M) presented an IC_{50} value very close to the positive control (BHT) ($IC_{50} = 0.0444 \pm 0.0028 \mu$ M), while in the ABTS assay all compounds demonstrated better results than the reference drug, with emphasis on the derivative MNO₂-Hi (**3**) ($IC_{50} = 0.0017 \pm 4.9645 \mu$ M) and PNO₂-Hi (**4**) ($IC_{50} = 0.0028 \pm 7.0922 \mu$ M) (Table 3). The β -carboline nuclei are free radical inhibitors that react immediately with free radicals generated in tests, such as DPPH. The radical scavenging capacity is relatively due to its hydrogen donating capacity. It is also known that this class of alkaloids has a high capacity to quench ABTS free radicals (Herraiz and Galisteo 2009; Prakash et al. 2011).

Table 3 The antioxidant effects of derived β -CA alkaloids in DPPH and ABTS assays

Compounds	Test	
	DPPH	ABTS
Anis-Hi (2)	0.1469 ± 0.0007	0.0292 ± 2.1276
MNO ₂ -Hi (3)	0.0917 ± 7.0710	0.0017 ± 4.9645
PNO ₂ -Hi (4)	0.1871 ± 0.0070	0.0028 ± 7.0922
Cl-Hi (5)	0.1316 ± 0.0004	0.0036 ± 4.9645
PNO ₂ -Anis (8)	0.2897 ± 0.0049	0.0565 ± 0.0028
Van-Oxa (9)	0.0609 ± 0.0084	0.0057 ± 0.0001
MNO ₂ -Oxa (10)	0.0614 ± 0.0162	0.0088 ± 7.0922
Cl-Oxa (11)	0.0481 ± 0.0042	0.0104 ± 0.0001
BHT (standard)	0.0444 ± 0.0028	0.1167 ± 0.0028

IC₅₀ = corresponds to the concentration of 50% DPPH and ABTS inhibition and is calculated from the graph of I% (inhibition percentage) versus extract concentration in $\mu\text{M} \pm \text{S.E.M.}$ = standard error of the mean. Each experiment was performed independently, 3 times and in duplicate.

In cases of leishmaniasis, there is marked oxidative stress due to the imbalance between free radicals and antioxidant molecules, generating numerous tissue damages. Substances with antioxidant potential can improve the patient's clinical status, leading to a reduction in oxidative stress generated in this infectious condition. Furthermore, these substances can enhance the effect of pentavalent antimonials (Silva et al. 2015; Silva et al. 2016).

The discovery of new compounds that have anti-*Leishmania* activity and are less toxic to the patient, with a lower cost and an easier route of administration are of great value, bringing better comfort to the patient during the treatment period. The activities

mentioned in this study are unprecedented and although future studies against the amastigote form and *in vivo* toxicity are necessary, the *in silico* toxicity results, added to the biological potential against the promastigote forms, indicate that the β -CA derivatives studied can be considered promising prototypes for the treatment of leishmaniasis.

4. Conclusion

Our study investigated the anti-*Leishmania* potential against promastigote forms of β -CA derivatives, as well as the chemical characteristics and *in silico* toxicity, cytotoxicity and antioxidant potential. The results of this study are unprecedented and extremely relevant. All derivatives did not show cytotoxicity against human erythrocytes, an important factor for the safety of the medicine. Furthermore, they demonstrated important computational parameters regarding lipophilicity and solubility characteristics. This study identified new derivatives with anti-*Leishmania* and antioxidant activity, paving the way for further investigations into their mechanisms of action and potential use as therapeutic agents for the treatment of leishmaniasis. These findings represent a significant advance in the search for safe and effective treatments for this debilitating disease.

Acknowledgements This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Federal da Grande Dourados.

Declarations

Ethical approval The work was carried out under the authorization of the Ethics Committee of the Universidade Federal da Grande Dourados.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Abamor ES, Allahverdiyev AM, Bagirova M, Rafailovich M (2017) Meglumine antimoniate-TiO₂@Ag nanoparticle combinations reduce toxicity of the drug while enhancing its antileishmanial effect. *Acta Trop* 169:30–42. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2017.01.005>
- Alonso L, De Paula JC, Baréa P, Sarragiotto MH, Ueda-Nakamura T, Alonso A, Fernandes NS, Lancheros CAC, Volpato H, Lazarin-Bidóia D, Nakamura CV (2021) Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr* 1863:183473. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2020.183473>
- Aquino TM, França PHB, Rodrigues ÉEES, Nascimento IJS, Santos-Júnior PFS, Aquino PGV, Santos M, Queiroz AC, Araújo MV, Moreira MSA, Rodrigues RRL, Rodrigues KAF, Freitas JD, Bricard J, Meneghetti MR, Bourguignon JJ, Schmitt M, Silva-Júnior EF, Araújo-Júnior JX (2022) Synthesis, antileishmanial activity and *in silico* studies of aminoguanidine hydrazones (AGH) and thiosemicarbazones (TSC) against *Leishmania chagasi* amastigotes. *Med Chem* 18:151–169. <https://doi.org/10.2174/1573406417666210216154428>
- Assolini JP, Carloto ACM, Bortoleti BTS, Gonçalves MD, Pellissier FT, Feuser PE, Cordeiro AP, De Araujo PHH, Sayer C, Sapla MMM, Pavanelli WR (2022)

Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview. Eur J Pharmacol 923:174934. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2022.174934>

Baréa P, Barbosa VA, Bidóia DL, De Paula JC, Stefanello TF, Da Costa WF, Nakamura CV, Sarragiotto MH (2018) Synthesis, antileishmanial activity and mechanism of action studies of novel β -carboline-1,3,5-triazine hybrids. Eur J Med Chem 150:579–590. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.03.014>

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26:1199–1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>

De Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV (2014) Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Exp Parasitol 136:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.11.003>

Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M (2005) Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitol Int 54:119–122. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2005.01.001>

Farag MR, Alagawany M (2018) Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. Chem Biol Interact 5:279–283. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>

Formagio ASN, Tonin LTD, Foglio MA, Madjarof C, De Carvalho JE, Da Costa WF, Cardoso FP, Sarragiotto MH (2008) Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. *Bioorg Med Chem* 16: 9660–9667.
<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.10.008>

Formagio ASN, Santos PR, Zanolli K, Ueda-Nakamura T, Tonin LTD, Nakamura CV, Sarragiotto MH (2009) Synthesis and antiviral activity of β -carboline derivatives bearing a substituted carbohydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). *Eur J Med Chem* 44:4695–4701. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2009.07.005>

Gabriel RS, Amaral ACF, Lima IC, Cruz JD, Garcia AR, Souza HAS, Adade CM, Vermelho AB, Alviano CS, Alviano DS, Rodrigues IA (2019) β -Carboline-1-propionic acid alkaloid: antileishmanial and cytotoxic effects. *Rev Bras Farmacogn* 29:755–762.
<https://doi.org/10.1016/J.BJP.2019.08.002>

Giorgio CD, Delmas F, Ollivier E, Elias R, Balansard G, Timon-David P (2004) *In vitro* activity of the β -carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol* 106:67-74.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.002>

Gülçin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol* 86:345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>

Herraiz T, Galisteo J (2009) Endogenous and Dietary Indoles: A class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS Assay. *Free Radic Res* 38:323–331. <https://doi.org/10.1080/10611860310001648167>

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev* 23:3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)

Paula JC, Fernandes NS, Karam TK, Baréa P, Sarragiotto MH, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV (2022) β -carboline RCC and C5 induce the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *Future Microbiol* 17:99–110. <https://doi.org/10.2217/FMB-2020-0263>

Prakash D, Upadhyay G, Pushpangadan P, Gupta C (2011) Antioxidant and free radical scavenging activities of some fruits. *J Complement Integr Med* 8. <https://doi.org/10.2202/1553-3840.1513>

Rizk YS, Hardoim DJ, Santos KBA, Zaverucha-do-Valle T, Taniwaki NN, Almeida-Souza F, Carollo CA, Vannier-Santos MA, De Arruda CCP, Calabrese KS (2022) Amentoflavone isolated from *Selaginella sellowii* Hieron induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitol Int* 86: 102458. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2021.102458>

Silva SAA, Alexandre JB, Vieira LG, Rodrigues SP, Falcão MJP, De Moraes SM (2015) Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). Rev de Cienc Farm Basica e Apl 36:189–194.

Silva SAA, De Moraes SM, Martins CG, Vieira-Araújo FM (2016) Antileishmanial and antioxidant potential of the ethanol extract of *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. Eletronic Journal of Pharmacy 13:165–171. <https://doi.org/10.5216/ref.v13i3.35358>

Silva CMBL, Garcia FP, Silva Rodrigues JH, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Meyer E, Ruiz ALTG, Foglio MA, De Carvalho JE, Da Costa WF, Sarragiotto MH (2012) Synthesis, antitumor, antitrypanosomal and antileishmanial activities of benzo[4,5]canthin-6-ones bearing the N'-(Substituted benzyldene)-carbohydrazide and N-Alkylcarboxamide groups at C-2. Chem Pharm Bull (Tokyo) 60:1372–1379. <https://doi.org/10.1248/CPB.C12-00356>

Sreedharan V, Rao KVB (2023) Protease inhibitors as a potential agent against visceral Leishmaniasis: A review to inspire future study. Brazilian J Infect Dis 27:102739. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2022.102739>

Stefanello TF, Panice MR, Ueda-Nakamura T, Sarragiotto MH, Auzély-Velty R, Nakamura CV (2014) N-Butyl-[1-(4-Methoxy) Phenyl-9H-Carbolin]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents Chemother 58: 7112–7120. <https://doi.org/10.1128/AAC.03340-14>

Ueda-Nakamura T, Honda PM, Britta EA, Stefanello TF, Santos AO, Sarragiotto MH, Nakamura CV (2014) Effect of cis-tetrahydro-B-carboline-1(m-nitrophenyl)-3-carbomethoxy on *Leishmania amazonensis*. J Adv Biol 4:351–358.
<https://doi.org/10.24297/JAB.V4I2.5574>

Valdez RH, Tonin LTD, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Morgado-Diaz JA, Sarragiotto MH, Nakamura CV (2009) Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 110:7–14.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.008>

6 CONCLUSÕES

A partir da revisão sistemática foi possível concluir que a detecção de pacientes que não apresentem sinais e/ou sintomas da leishmaniose é de extrema relevância para que o tratamento seja iniciado em tempo hábil e se evite a propagação da doença. Com relação aos resultados obtidos nos ensaios biológicos com os derivados β -CA podemos concluir que cada derivado se comporta de maneira distinta quimicamente e por esse motivo apresentam sinais prévios de toxicidade diferentes, além disso demonstram bons parâmetros de lipofilicidade e solubilidade. A atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigota da espécie *L. amazonensis* demonstrou que a grande maioria dos compostos reduziu o crescimento do parasito, com destaque para os derivados PNO₂-Anis (**8**) e Cl-Hi (**5**). Os compostos não demonstraram potencial de hemólise, resultado de extrema importância quando falamos de tratamento para leishmanioses, visto que a terapia medicamentosa utilizada atualmente gera efeitos tóxicos ao paciente. Os ensaios antioxidantes demonstraram o potencial de eliminação dos radicais livres destes derivados, obtendo resultados promissores, visto o elevado estresse oxidativo presente na patogênese da doença. Até o momento, trata-se do primeiro relato envolvendo esses alcaloides com essas atividades.