

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Ciências Biológicas

Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DE QUINOLINAS: 4-  
AMINOQUINOLINAS COMPLEXADAS A ESTEROIDE E  
AMODIAQUINA**

Juiz de Fora

2013

Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

**Atividade leishmanicida de derivados de quinolinas: 4-aminoquinolinas complexadas a esteroide e amodiaquina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra

Co-Orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Antinarelli, Luciana Maria Ribeiro.

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DE QUINOLINAS: 4-AMINOQUINOLINAS COMPLEXADAS A ESTEROIDE E AMODIAQUINA / Luciana Maria Ribeiro Antinarelli. -- .

103 p. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David Da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, .

1. Leishmania. 2. Quimioterapia. 3. 4-aminoquinolinas. 4. Esteróide. 5. Amodiaquina. I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. Da Silva, Adilson David, coorient. III. Título.

*Aos meus pais, Maria Lucia e José Bento;  
Aos meus irmãos, Alexandre e Eduardo;  
A minha querida sobrinha, Maria Rita,  
A todos meus familiares e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu todas as oportunidades para chegar até aqui e por ter aberto todas as portas possíveis para que eu alcançasse mais esta etapa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro;

Ao programa de Pós-graduação e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de utilização dos recursos;

À minha orientadora, Elaine, por acreditar no meu trabalho, paciência, dedicação, por todos os ensinamentos que muito contribuíram para minha formação científica e, principalmente, pela oportunidade desta conquista;

Às professoras da Parasitologia: Clarice, Florence e Kézia pelas orientações, incentivo e oportunidade de aprendizado;

Aos amigos do Laboratório: Dani, Dayse, Ivone, José Márcio, Juliana, Mariana, Mayara, Patrícia, Roberta, Valdenir pela convivência e por todos os momentos de descontração. À Ayla pela ajuda nos intermináveis amastigotas e pela companhia nos experimentos de finais de semana. Aos amigos que já passaram pelo Laboratório: Flávia, com quem tive a oportunidade de trabalhar durante a iniciação científica. Nicolli, Liliane. Obrigada pelas experiências compartilhadas;

À Cristina, pela amizade, carinho, disponibilidade em ajudar e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis;

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Química Orgânica do NUPEQ /UFJF. Ao Prof. Adilson pela orientação e apoio na realização deste trabalho. À Arturene e ao Rafael Mafra pela parceria e valiosa contribuição na síntese dos compostos;

Ao grupo do Dr. Marcus Vinícius N. de Souza da Fiocruz do Rio de Janeiro pela colaboração e fornecimento dos compostos que fizeram parte desta dissertação;

Aos meus pais por respeitarem a minha escolha e entenderem a minha ausência, acreditarem nos meus sonhos e por serem os meus grandes incentivadores. Aos meus irmãos que sempre me entenderam nos momentos mais difíceis. Sem vocês nada disto valeria à pena!

À minha grande amiga Jerusa. Obrigada pela amizade, pela força e incentivo de sempre, pelas risadas, pelas conversas e companhia constante;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A quimioterapia atual para as leishmanioses está longe do ideal devido a uma série de problemas como alto custo e elevada toxicidade. Assim, existe uma necessidade imediata de obtenção de novos fármacos para o tratamento da doença. Neste contexto, derivados de quinolina têm demonstrado atividade leishmanicida promissora. Neste trabalho, foi avaliada a atividade leishmanicida de duas séries distintas de quinolinas: seis compostos derivados de 4-aminoquinolinas (4-AMQ) e seus híbridos com esteroide e nove derivados da amodiaquina (AQ). O efeito dos compostos foi testado em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp e em macrófagos peritoneais de camundongos. Os resultados mostraram que a conjugação de 4-AMQ ao esteroide resultou em aumento significativo da atividade principalmente para formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. O composto **6** foi o mais ativo em amastigota de *L. major* (CI<sub>50</sub> de 1,9 µM), sendo três vezes mais efetivo do que a miltefosina. Demonstrou-se neste trabalho que a conjugação de dois grupos de grande aplicação biológica, quinolina e esteroide, pode ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento racional de novos fármacos. Em relação aos derivados da AQ, observou-se que a grande maioria dos compostos foram ativos em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. Dentre os nove compostos avaliados, seis foram mais ativos em amastigotas de *L. braziliensis* do que o protótipo AQ e miltefosina. O composto **8** (CI<sub>50</sub> de 0,4 µM) foi cerca de quatorze vezes mais ativo em amastigota do que a miltefosina. A maioria dos derivados de 4-AMQ e AQ foram mais seletivos e específicos para amastigotas. A atividade em potencial dos compostos avaliados pode ser considerada um importante avanço no estudo desta classe de derivados, visando-se o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas mais eficazes, seletivos e não tóxicos para o hospedeiro humano.

Palavras-chave: *Leishmania*. Quimioterapia. 4-aminoquinolinas. Esteroide. Amodiaquina.

## ABSTRACT

Current chemotherapy for leishmaniasis is far from ideal due to a number of problems such as high cost and high toxicity. Thus, there is an immediate need to obtain new drugs for the treatment the disease. In this context, quinoline derivatives have shown promising antileishmanial activity. In this study, we evaluated the activity of two distinct series of quinolines, six 4-aminoquinolines (4-AMQ) derivatives and their hybrids with steroid and nine amodiaquine (AQ) derivatives in different *Leishmania* species. Effect of the compounds was assayed against *Leishmania* promastigotes and amastigotes and mouse peritoneal macrophages. Results showed that the combination of 4-AMQ to the steroid resulted in a significant increase in activity mainly for *L. major* promastigotes and amastigotes forms. Compound **6** was the most active against *L. major* amastigotes with IC<sub>50</sub> of 1.9 µM, being three times more effective than miltefosine. It was demonstrated in this work that the combination of two groups with large biological application as quinoline derivatives and steroids may be an interesting strategy for the rational development of new drugs. Regarding to the AQ derivatives, it was observed that all compounds were most active against *Leishmania* promastigote and amastigote forms. Among the nine compounds evaluated, six were more active against *L. braziliensis* amastigotes than the prototype AQ and miltefosine. Compound **8** with IC<sub>50</sub> of 0.4 µM was about fourteen times more active than miltefosine. In general, the majority of 4-AMQ and AQ derivatives are more selective and specific for amastigotes of *Leishmania* sp, forms clinically relevant. Potential activity of the compounds evaluated can be considered an important advance in the study of this class of derivatives in order to develop new leishmanicidal drugs more effective, selective and nontoxic to the human host.

Keywords: *Leishmania*. Chemotherapy. 4-aminoquinolines. Steroid. Amodiaquine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (esquerda) e leishmaniose visceral (direita). .....17
- Figura 2 Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de *Leishmania*. **(A)** promastigotas de *L. braziliensis*; **(B)** macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* e **(C)** macrófagos infectados com amastigotas de *L. braziliensis*. As setas em vermelho indicam as diferentes formas evolutivas do parasito. Aumento de 1000X.....20
- Figura 3 Fármacos atualmente empregados na terapia das leishmanioses.....23
- Figura 4 Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.....28
- Figura 5 Atividade dos derivados de 4-aminoquinolinas (compostos **1**, **2** e **3**) e híbridos com esteroides (compostos **4**, **5** e **6**) na redução do nº de amastigotas intracelulares de *L. major*/macrófago infectado. Resultados mostram a porcentagem de inibição em relação ao controle de macrófago infectado. Todos os resultados foram estatisticamente significativos (\*\*p<0,0001).....54
- Figura 6 Fotomicrografia ilustrativa da atividade anti-amastigota em *L. major* dos híbridos com esteróide após 72 horas de tratamento. (A) macrófagos infectados com *L. major* (controle), (B) macrófagos infectados e tratados com o composto **5** na concentração de 5 µM e (C) macrófagos infectados e tratados com o composto **6** na concentração de 5 µM. As setas em vermelho indicam as formas amastigotas de *L. major*. Aumento de 1000X.....55
- Figura 7 Atividades anti-promastigota e anti-amastigota comparativas em *L. major* entre os derivados de 4-aminoquinolinas (compostos **1**, **2** e **3**) e híbridos com esteróide (compostos **4**, **5** e **6**).....57
- Figura 8 Atividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina na redução do nº de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*/macrófago infectado. Resultados mostram a porcentagem de inibição em relação ao controle de macrófago infectado. Todos os resultados foram estatisticamente significativos (\*\*p<0,0001).....66 e 67
- Figura 9 Fotomicrografia ilustrativa da atividade anti-amastigota em *L. braziliensis* dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina após 72 horas de tratamento. **(A)** macrófagos infectados com *L. braziliensis* (controle), **(B)** macrófagos infectados e tratados com o composto **7** na concentração de 3 µM, **(C)** macrófagos infectados e tratados com o composto **8** na concentração de 3 µM e **(D)** macrófagos infectados e



tratados com o composto **10** na concentração de 3  $\mu$ M. As setas em vermelho indicam as formas amastigotas de *L. braziliensis*. Aumento de 1000X.....68

Figura 10 Atividades antipromastigota e anti-amastigota comparativas em *L. braziliensis* de alguns derivados heteroaromáticos da amodiaquina.....71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estruturas químicas dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide.....	37 e 38
Tabela 2	Estruturas químicas dos derivados da amodiaquina .....	39 e 40
Tabela 3	Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide em promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	49
Tabela 4	Citotoxicidade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide em macrófagos.....	50
Tabela 5	Seletividade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide para promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	51
Tabela 6	Atividade anti-amastigota em <i>L. major</i> dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide.....	52
Tabela 7	Seletividade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide para as formas evolutivas de <i>L. major</i> .....	56
Tabela 8	Especificidade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide para as formas evolutivas de <i>L. major</i> .....	57
Tabela 9	Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina em promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	59
Tabela 10	Citotoxicidade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina em macrófagos.....	61
Tabela 11	Seletividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	62
Tabela 12	Atividade anti-amastigota em <i>L. braziliensis</i> dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina.....	64
Tabela 13	Seletividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> .....	70

Tabela 14	Especificidade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para as formas evolutivas de <i>L.braziliensis</i> .....	71
-----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
AMQ	Aminoquinolina
AQ	Amodiaquina
BHI	“Brain Heart Infusion” Infusão de coração e cérebro
CC <sub>50</sub>	Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos
CI <sub>50</sub>	Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário
CYP	Citocromo P
DALY	“Disability-adjusted life year” Anos de vida saudáveis perdidos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
IE	Índice de especificidade
IFN- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	“inducible nitric oxide synthase” Óxido nítrico sintase induzível
IS	Índice de Seletividade
HIV	“Human Immunodeficiency virus” Vírus da Imunodeficiência Adquirida
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCL	Leishmaniose cutâneo localizada
LCM	Leishmaniose cutaneomucosa
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
MTDLs	“Multi-target-directed ligants” Ligante direcionado para múltiplos alvos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico

NO	“Nitric oxide” Óxido Nítrico
NUPEQ	Núcleo em Pesquisas Químicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline” Salina Tampão Fosfato
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” Instituto Parque Memorial Roswell
Sb	Antimônio
Sb <sup>3+</sup>	Antimonial trivalente
Sb <sup>5+</sup>	Antimonial pentavalente
SBF	Soro Bovino Fetal
TDR	“Tropical Diseases Research” Pesquisa em doenças tropicais
VP	Vacúolo Parasitóforo
WHO	“World Health Organization” Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 LEISHMANIOSES .....	16
1.2 O PARASITO .....	18
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	23
1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO .....	26
1.5 QUINOLINAS .....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	36
2.1 GERAL.....	36
2.1 ESPECÍFICOS.....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 COMPOSTOS UTILIZADOS.....	37
3.2 CULTIVO DOS PARASITOS.....	40
3.3 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c COM <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> E <i>L. major</i> .....	41
3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> .....	42
3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	43
3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>Leishmania</i> .....	44
3.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE E ÍNDICE DE ESPECIFICIDADE DOS COMPOSTOS.....	45
3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	46
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	47

4.1 COMPOSTOS SINTÉTICOS 4-AMINOQUINOLINAS E HÍBRIDOS COM ESTEROIDE.....	47
4.2 COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS HETEROAROMÁTICOS DA AMODIAQUINA (AQ) .....	58
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>80</b>
REFERÊNCIAS.....	82
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>101</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSES

Algumas doenças tropicais têm sido reconhecidas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), pois acarretam graves problemas de saúde pública em países em desenvolvimento localizados na África, Ásia e América Latina; onde estimativas apontam que 1,2 bilhões de pessoas vivam em extrema condição de vulnerabilidade econômica e causando a morte de cerca de 500 mil pessoas a cada ano (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009; HOTES; SAVIOLI; FENWICK, 2012). Apesar disto, dentre os mais de 1300 novos medicamentos desenvolvidos nos últimos 25 anos, menos de 1% foram destinados ao tratamento dessas doenças (KAPPAGODA; IOANNIDIS; 2012). Este desequilíbrio aponta para uma crise na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das doenças negligenciadas devido à falta de políticas públicas e incentivo econômico (TROUILLER, 2002; FEASEY et al., 2009).

As DTNs representam um grupo de 17 doenças infecciosas, as quais incluem onze parasitárias como causadas por protozoários (leishmanioses, doença de Chagas, tripanossomíase Africana) e helmintos (ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase, esquistossomose, cisticercose/teníase, oncocercose, filariose linfática, fasciolíase, equinococose, dracunculíase) (WHO, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) atualmente considera as leishmanioses como doenças tropicais negligenciadas de categoria 1 (reemergentes e fora de controle) (VARELLA-M et al., 2012). Constituem, atualmente, como uma das seis prioritárias pelo programa de “Pesquisa em Doenças Tropicais” (TDR- “Tropical Diseases Research”) da OMS (WHO, 2012); haja vista que, nas últimas décadas, os investimentos em pesquisa geralmente não reverteram em desenvolvimento e ampliação do acesso e novos medicamentos, testes para diagnóstico e vacinas para sua prevenção e controle (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008; COSTA, 2011).

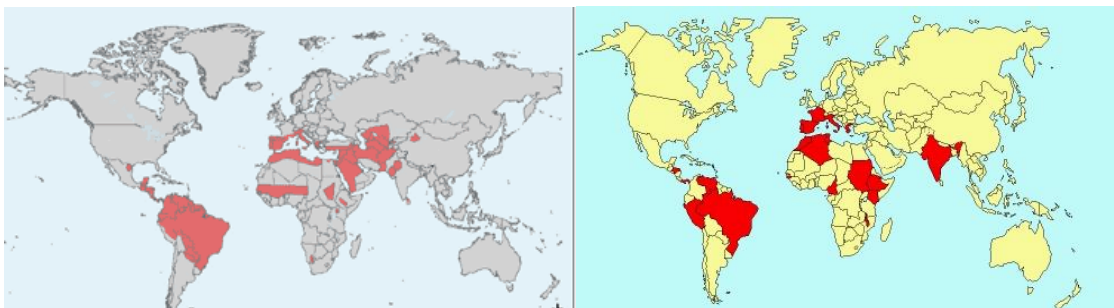
Segundo dados da OMS de 2010, as leishmanioses ocupam a terceira posição no ranking do “Disability-adjusted life year” (DALY) que avalia o número de



anos de vida saudáveis perdidos provocados por doenças tropicais negligenciadas. Estima-se a perda de cerca de 2,4 milhões de DALY em todo o mundo (VARELLA-M et al., 2012), sendo a segunda causa de morte por doenças relacionadas a protozoários, superada somente pela malária (REITHINGER, 2008).

As leishmanioses apresentam-se amplamente distribuídas geograficamente, sendo endêmicas em 98 países situados, em sua maioria, na África, Ásia e América, onde existem aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a infecção (ALVAR et al., 2012; BEATTIE; KAYE, 2011; DEN BOER et al., 2011). Estimativas recentes apontam para a existência de 14 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, com uma incidência anual de 2 milhões de novos casos e 50 mil mortes por ano relacionadas a leishmaniose visceral (WHO, 2012).

A figura 1 mostra a distribuição mundial da leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV). As áreas afetadas estão marcadas em vermelho de acordo com a OMS.



**Figura 1:** Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (esquerda) e leishmaniose visceral (direita) (OMS, 2010).

Aproximadamente 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A LC é mais amplamente distribuída, sendo mais prevalente em dez países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica, Peru, os quais respondem por 70% a 75% da incidência global (ALVAR et al., 2012).

O aumento significativo na incidência de casos globais de leishmanioses observado, principalmente, nas duas últimas décadas é resultante de uma série de

fatores como o crescimento urbano desordenado, desequilíbrio ambiental devido a mudanças climáticas e intervenções sistemáticas do homem, migração de pessoas para áreas endêmicas, associação com infecções oportunistas como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), controle inadequado de vetores, ausência de vacina efetiva e desenvolvimento de resistência parasitária à quimioterapia (READY, 2010; DEN BOER et al., 2011; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

Entretanto, como a notificação para as leishmanioses não é obrigatória em vários países e levando-se em conta que o diagnóstico da doença não é corretamente realizado em inúmeras situações, pode-se afirmar que o número de casos globais da doença ainda seja subestimado (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; REITHINGER, 2008).

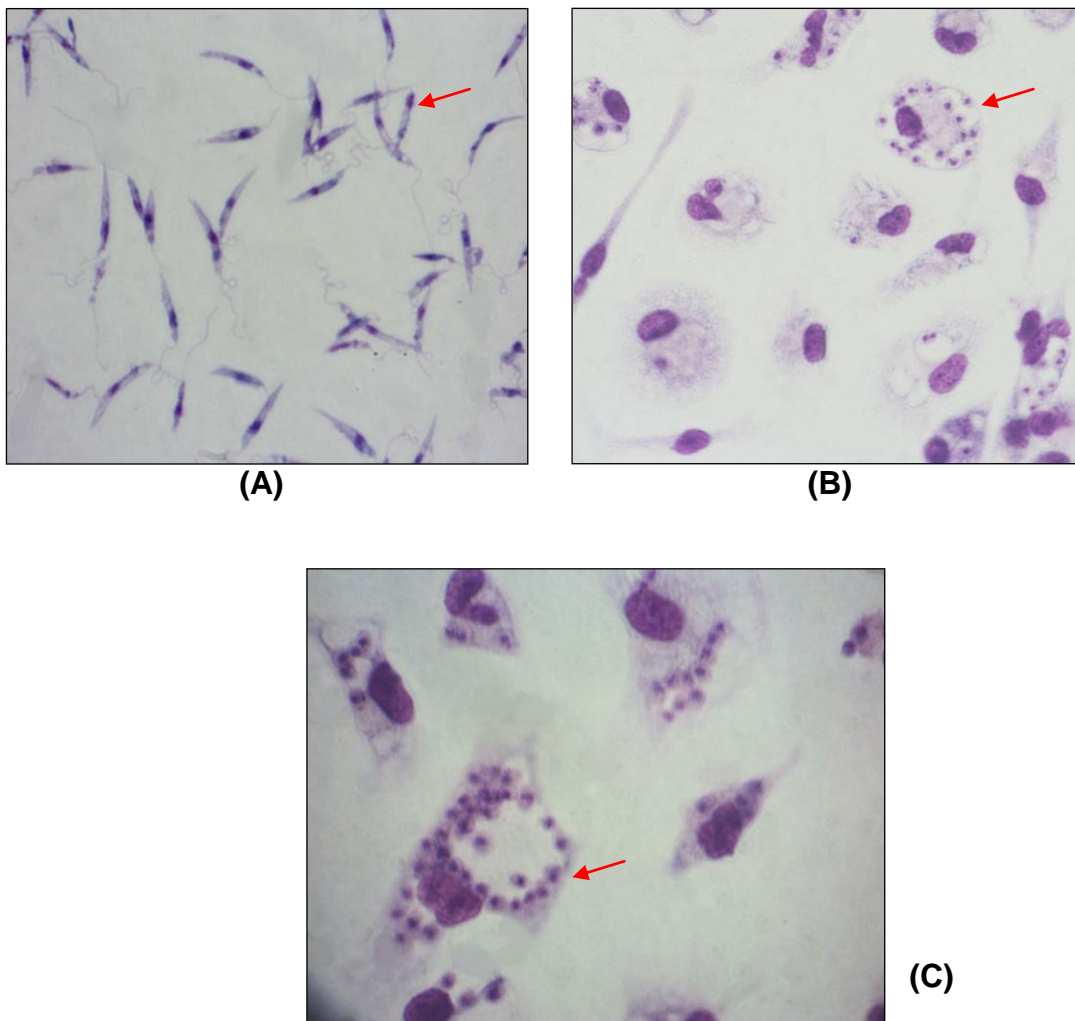
No Brasil, apesar das séries irregulares de dados, foram registrados uma média anual de 26.021 casos de LC no período entre 1988 e 2009, sendo a região Norte responsável por cerca de 37,3% dos casos notificados neste período. Em relação à LV, foi documentado um total de 34.583 casos entre 2003 e 2009, sendo que a maioria dos casos se concentrou na região Nordeste, com 47,5% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

## 1.2 O PARASITO

O gênero *Leishmania* inclui protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, cuja característica principal é a presença da organela cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria, que é única e possui regiões ricas em DNA (MISHRA et al., 2009). O parasito apresenta duas formas morfológicas distintas, promastigotas e amastigotas (Figura 2) cujo processo evolutivo permitiu a sobrevivência do parasito em organismos diversos; estando estas formas distintas adaptadas às diferentes condições de vida que envolve ambos hospedeiros (ROY et al., 2012). A forma promastigota extracelular é encontrada no intestino médio do inseto vetor. São formas alongadas, com um flagelo externalizado emergindo do corpo do parasito na sua porção anterior

(STUART et al., 2008), apresentando núcleo central e cinetoplasto terminal. A diferenciação do estágio de promastigota para a forma amastigota intracelular obrigatória ocorre, principalmente, no interior de vacúolos parasitóforos (VPs) de macrófagos do hospedeiro vertebrado (RUIZ; BECKER, 2007; SHARMA; SINGH, 2008). Os amastigotas apresentam-se tipicamente com formato arredondado e um flagelo curto, que está presente na bolsa flagelar, uma invaginação da superfície do parasito, não observada sob microscopia óptica (SANTOS et al., 2008; MISHRA et al., 2009).

É interessante verificar que existe diferença na formação dos vacúolos parasitóforos (VPs) entre as espécies de *Leishmania* (KIMA, 2007). Estes vacúolos variam em tamanho e número de amastigotas. Espécies pertencentes ao complexo *Leishmania mexicana* se desenvolvem em grandes e distendidos VPs. Por exemplo, na infecção pela espécie *L. amazonensis* observa-se a presença de VPs contendo vários amastigotas aderidos à membrana dos mesmos ou soltos em seu interior (CHANG et al., 2003; REAL, POUCHELET, RABINOVITCH, 2008). Para espécies do complexo *Leishmania braziliensis* como *L. braziliensis* também ocorre a formação de VPs distendidos que abrigam em seu interior um ou vários amastigotas (figura **2C**). Por outro lado, espécies do complexo *Leishmania major* (*L. major*) (figura **2B**) e do complexo *Leishmania donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) verifica-se a presença de VPs pequenos e individualizados, ou seja, contendo um único amastigota (MCCONVILLE et al., 2007).



**Figura 2:** Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de *Leishmania*. **(A)** promastigotas de *L. braziliensis*; **(B)** macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* e **(C)** macrófagos infectados com amastigotas de *L. braziliensis*. As setas em vermelho indicam as diferentes formas evolutivas do parasito. Aumento de 1000 X. Fonte: Do autor.

Uma das características mais marcantes apresentadas pelo gênero *Leishmania* em comparação com os outros gêneros que fazem parte da família Trypanosomatidae é a grande diversidade de espécies. Atualmente, as espécies de *Leishmania* que provocam infecções em humanos estão englobadas em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, os quais são classificados de acordo com a localização do parasito no intestino do inseto vetor (LAINSON; SHAW, 1987). Considera-se que mais de trinta espécies de *Leishmania* podem infectar o homem e outras estão em emergência, especialmente em associação com infecções oportunistas como o vírus HIV (SHUKLA et al., 2012).

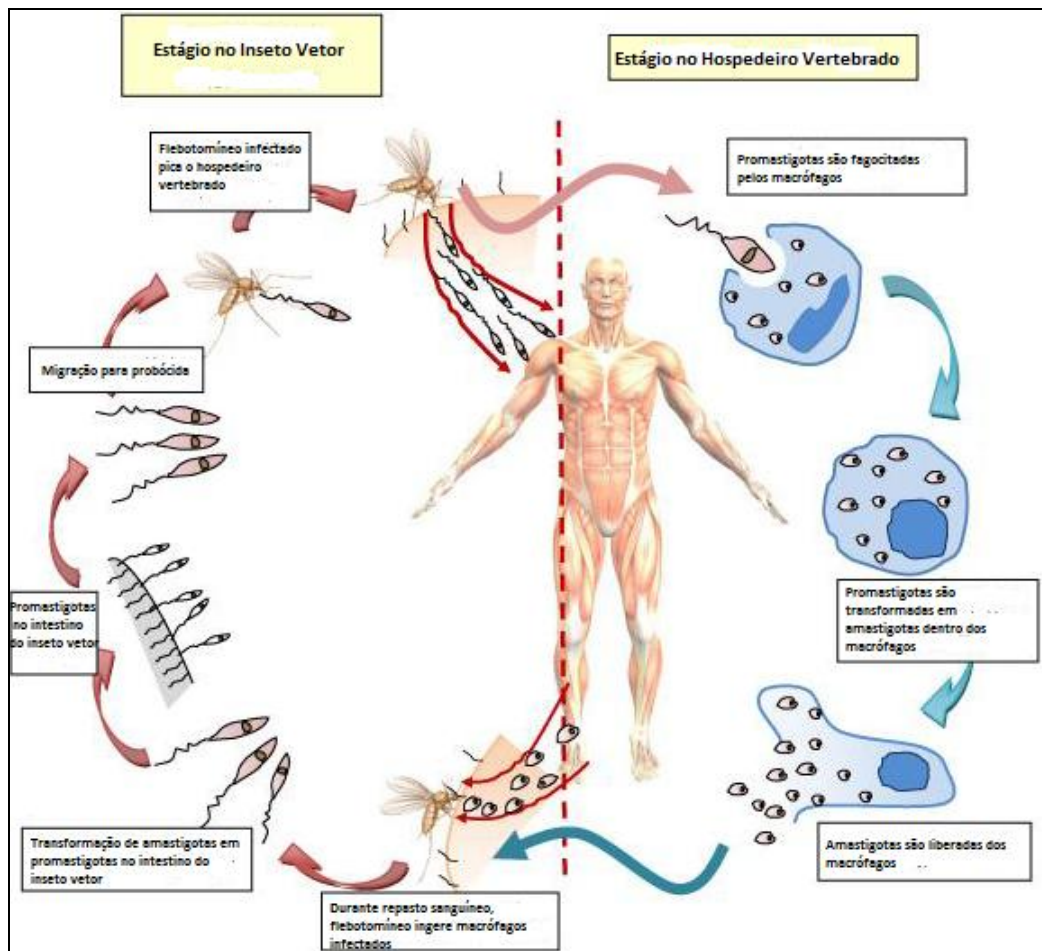
Entretanto, o ciclo biológico é similar para todas as espécies (Figura 3). Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico, o qual se caracteriza pela alternância de forma parasitária entre hospedeiros mamíferos, que incluem humanos, cães e animais silvestres e hospedeiros invertebrados, representados por insetos vetores denominados genericamente de flebotomíneos (BURCHMORE; BARRET, 2001; MISHRA et al., 2009). Dois gêneros de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão natural de *Leishmania* em humanos: *Phlebotomus* no Velho Mundo (Ásia, África e Europa) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (América Central e América do Sul) (READY, 2010).

Os parasitos são transmitidos ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos insetos vetores, mediante a inoculação na derme das formas promastigotas metacíclicas acompanhadas de proteofosfoglicanas imunomodulatórias provenientes do parasito, além de secreções da saliva do flebotomíneo. Este repertório de substâncias bioativas exerce um papel fundamental na fase inicial da resposta imune e inflamatória pelo hospedeiro (DE MOURA et al., 2007; KAYE; SCOTT, 2011). Após a inoculação, as formas metacíclicas infectantes, através de diversos receptores celulares, infectam células do sistema fagocítico mononuclear que são recrutadas para o local de infecção (KIMA, 2007; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012). Os neutrófilos exercem papel importante na fase inicial da infecção pelos promastigotas e, principalmente, os macrófagos por desencadearem a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos infectados (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012).

A diferenciação de promastigotas em amastigotas ocorre dentro do compartimento fagossomo, também denominado vacúolo parasitóforo (VP) que sofre processos de fusão sucessivos, originando a organela fagolisossomo (SHARMA; SINGH, 2008; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Durante este processo, moléculas de lipofosfoglicano (LPG) presentes na superfície dos promastigotas desempenham um importante papel na estratégia de sobrevivência do parasito, retardando o processo de fusão do VP com os lisossomos e promovendo atraso na acidificação e aquisição de enzimas hidrolíticas lisossomais pelo VP (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Na medida em que as formas amastigotas vão se multiplicando por divisão binária, os macrófagos se rompem e liberam os parasitos que serão englobados por novas células hospedeiras, onde continuam a se

multiplicar, contribuindo para a propagação da infecção no hospedeiro vertebrado (LODGE; DESCOTEAUX; 2005; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). A disseminação da infecção pode ocorrer por outros macrófagos, além de células dendríticas, fibroblastos e neutrófilos que também podem funcionar como importantes células hospedeiras (KIMA, 2007; NADERER; MCCONVILLE, 2008; KAYE; SCOTT, 2011).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo, ao realizar outros repastos sanguíneos, se alimenta em um hospedeiro infectado e ingere macrófagos infectados contendo formas amastigotas que acompanham o sangue, diferenciando-se posteriormente em formas promastigotas (ROY et al., 2012). No trato digestivo do inseto vetor, ocorre a lise dos macrófagos e a liberação das formas amastigotas, que se diferenciam inicialmente em promastigotas procíclicas não infectivas, multiplicam-se rapidamente e sofrem modificações morfológicas denominadas metaciclogênese. Ao final da metaciclogênese, quando alcançam a fase estacionária, se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas que não se dividem (REITHINGER et al., 2007; VAN ASSCHE et al., 2011). Estes promastigotas metacíclicos migram para a probóscida e continuam a transmissão para o hospedeiro mamífero durante um novo repasto sanguíneo do inseto vetor (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; STUART et al., 2008; MISHRA et al., 2009).



**Figura 3:** Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.  
Adaptado de ROY et al., 2012.

### 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As leishmanioses desencadeiam uma diversidade de manifestações clínicas. Algumas espécies, denominadas dermatrópicas, apresentam tropismo pelas regiões de pele e mucosas, desencadeando infecções cutâneas que variam desde a forma localizada, disseminada, difusa e mucocutânea. Outras espécies apresentam tendência a proliferar e rapidamente disseminar do sítio inicial de infecção na pele para órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea (READY, 2010; BEATTIE;

KAYE, 2011). Os fatores que determinam esta variedade de formas clínicas dependem de uma complexa interação entre a espécie de *Leishmania* infectante com aspectos relacionados ao hospedeiro, dentre eles, o estado de saúde do indivíduo, além de características genéticas e imunes (SANTOS et al., 2008; KAYE; SCOTT, 2011; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação da doença mais prevalente e a mais comumente causada pelas espécies dermatrópicas de *Leishmania* (SCARISBRICK et al., 2006). As espécies que geralmente provocam este tipo de manifestação são: *L. mexicana*, *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em regiões do México, América Central e América do Sul. Em regiões do Velho Mundo, tais como a África, Ásia e Europa, as espécies prevalentes são: *L. major*, *L. tropica* ou *L. aethiopica* (DAVID; CRAFT, 2009). No Brasil, notifica-se anualmente cerca de 28 mil novos casos, sendo a espécie *L. braziliensis* a mais prevalente (MACHADO et al., 2010; COSTA et al., 2011). A lesão primária é, na maioria das vezes, única, embora, em alguns casos, múltiplas picadas do inseto vetor ou a disseminação local das formas promastigotas infectantes possam culminar em um número elevado de lesões. A forma mais frequente são ulcerações, em geral indolores, bem delimitadas, apresentando bordas elevadas e com fundo granulomatoso (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; DAVID; CRAFT, 2009).

A forma disseminada da LC caracteriza-se pelo surgimento de múltiplas lesões pleomórficas em duas ou mais áreas do corpo (GOTO; LINDOSO, 2010). É relativamente rara, estando associada a infecções por espécies encontradas no Novo Mundo, principalmente *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. No Brasil, a frequência de casos tem aumentado nas duas últimas décadas em áreas do Nordeste, sendo *L. braziliensis* a principal espécie encontrada (TURETZ et al., 2002). Também tem sido relatada em países do Velho Mundo, especialmente em associação com o vírus HIV (BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

A forma recidiva diferencia-se pelo desenvolvimento de lesões de aspecto vesiculares e papulares que se desenvolvem após a cura clínica ou em torno da borda de uma lesão cicatrizada após períodos variáveis de meses a anos (GOTO; LINDOSO, 2010). As principais espécies associadas são: *L. tropica* e *L. braziliensis*. Neste caso, as infecções tendem a ser resistentes ao tratamento (PISCOPO; MALLIA AZZOPARDI, 2006; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).



A leishmaniose cutânea difusa (LCD) constitui uma forma clínica rara, porém de maior gravidade, a qual se caracteriza pela presença de nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção atingindo outras áreas da pele, mucosa e linfonodos. Esta manifestação tipicamente ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na imunidade celular, sendo comum em casos de co-infecção HIV-*Leishmania* e é de difícil tratamento (LAINSON; SHAW, 1998; REITHINGER et al., 2007). No Brasil, casos de LCD têm sido registrados, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste e associados exclusivamente à espécie *L. amazonensis* (LEON et al., 1990; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A leishmaniose cutâneomucosa (LCM), também conhecida como espúndia, caracteriza-se pela capacidade do parasito de alcançar a mucosa de tecidos por disseminação linfática ou hematogênica. A lesão tipicamente começa com inflamação nasal e espalha-se, culminando com ulceração da mucosa nasal e destruição do septo. Nos casos mais graves, o processo ulcerativo pode atingir laringe, traquéia e palato, resultando em complicações respiratórias, dificuldades de alimentação e/ou infecções secundárias, podendo levar o paciente a óbito (REITHINGER et al., 2007; AMATO et al., 2008; BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008). Em grande parte dos casos, a LCM é resultante da LC de evolução crônica cujo processo de cicatrização da lesão primária lento, juntamente com tratamento inicial inadequado pode contribuir para o agravamento do quadro (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; GOTO, LINDOSO, 2010). O principal agente etiológico nas Américas é a espécie *L. braziliensis* (GUERRA et al., 2011), mas outras espécies são também associadas: *L. panamensis* e *L. guyanensis* (RONET; BEVERLEY; FASEL, 2011). No Brasil, observa-se uma variação na frequência de casos dependendo da região geográfica, sendo 0,4% na região Sul, 1,4% na região Central e 2,7% na região Nordeste (GOTO; LINDOSO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a mais severa forma da doença, responsável pela grande maioria dos casos fatais. É causada por espécies pertencentes ao complexo *L. donovani* que se divide taxonomicamente e geograficamente em três grandes grupos: *L. donovani* na Índia, Ásia e África; *L. infantum* na região do Mediterrâneo e *L. chagasi* na América do Sul (MURRAY et al., 2005; MALTEZOU, 2008); sendo que *L. chagasi* tem sido considerada como

sinonímia de *L. infantum* (LUKES et al., 2007). A doença que apresenta evolução crônica tipicamente se manifesta entre 2-8 semanas após a infecção com quadro de febre prolongada, perda de peso, hepatoesplenomegalia severa e piora clínica progressiva do paciente (HAILU et al., 2005; MALTEZOU, 2009). Os principais órgãos acometidos são: baço, fígado, linfonodos e medula óssea (SHARMA; SINGH, 2008). Outros sintomas característicos consistem em anemia severa, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia. Se não tratada, pode levar a complicações como caquexia profunda, sangramentos, trombocitopenia, maior suscetibilidade a infecções secundárias e morte (MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), causada pela espécie *L. donovani*, é uma manifestação dérmica que ocorre após a resolução do quadro de LV em uma pequena porcentagem de pacientes da África e Índia (PISCOPO; MALLIA AZZOPARDI, 2006). O espectro de apresentações dérmicas varia desde múltiplas máculas hipocrômicas a pápulas eritematosas e nódulos que usualmente se espalham a partir da região oral para outras áreas do corpo (SALOTRA; SINGH, 2006; DAVID; CRAFT, 2009). O tratamento farmacológico, assim como o controle da LDPC, é uma importante medida de saúde pública para o controle da LV, haja vista que os pacientes são importantes reservatórios da infecção devido ao número elevado de parasito nas lesões (EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

#### 1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

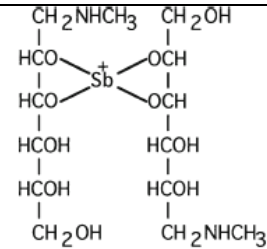
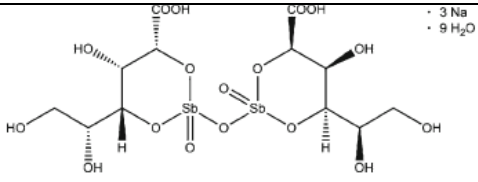
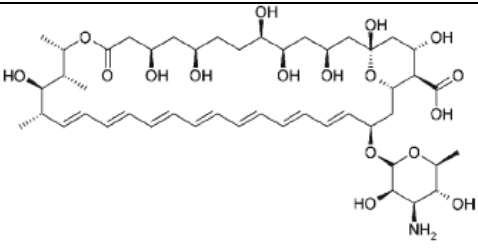
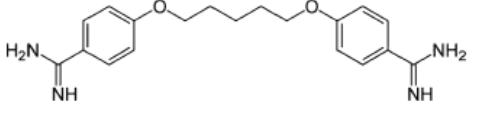
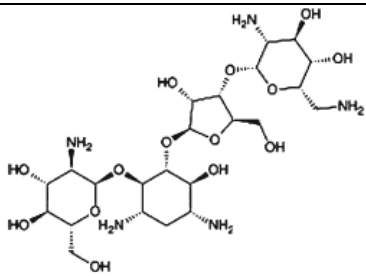
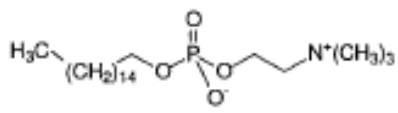
Existe uma diversidade de compostos com atividade leishmanicida descrita, mas apenas alguns são utilizados como fármacos em humanos (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; FIDALGO; GILLE, 2011). Dentre estes, nenhum pode ser classificado como “terapia ideal”, em parte, devido a uma série de limitações como o alto custo, elevada toxicidade e indução de efeitos adversos que diminui a adesão do paciente e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento (FIDALGO; GILLE, 2011; ALVIANO et al., 2012). Aliado a isto, tem-se o fato de que a maioria dos fármacos disponíveis é de administração parenteral, com regime terapêutico prolongado e em

múltiplas doses, o que contribui para inúmeros casos de abandono do tratamento e ao surgimento de cepas resistentes (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; CROFT; OLLIARO, 2011).

A eficácia das drogas para as diferentes formas clínicas da doença está intimamente relacionada a diversos aspectos do parasito e do hospedeiro. Estes incluem a localização intracelular do alvo terapêutico no baixo pH do compartimento fagolisossomal de diferentes populações de macrófagos, diferenças de suscetibilidade entre espécies do Velho Mundo e do Novo Mundo e até mesmo entre cepas da mesma espécie; além da relação com a resposta imune do hospedeiro que em algumas circunstâncias torna as drogas ineficazes. Apesar disto, os medicamentos comumente utilizados são os mesmos para as várias manifestações da doença, não levando em conta tais particularidades da biologia do parasito e do hospedeiro (GOTO; LINDOSO, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011).

Na figura 4 estão listados os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

**Figura 4:** Fármacos atualmente empregados na terapia das leishmanioses.

Nome químico e (comercial)	Estrutura Química
Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	
Estibugluconato de Sódio (Pentostan®)	
Anfotericina B (Fungizone®)	
Isotionato de Pentamidina (Lomidina®)	
Paramomicina (Humatin®)	
Miltefosina (Milteforan®)	

Fonte: Adaptado de Fidalgo; Gille, 2011; Rath et al.; 2003.

Desde a década de 1940, o tratamento de primeira escolha para todas as manifestações clínicas das leishmanioses é realizado com os compostos antimoniais pentavalentes disponibilizados sob duas formulações: o estibugluconato de sódio (Pentostan®, Glaxo Smithkline) e antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis), que podem ser administrados por via endovenosa ou intramuscular com igual eficácia (CRUZ et al., 2009; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

Estudos já demonstraram que a atividade inibitória dos compostos envolve diversos aspectos do metabolismo do parasito. Tem sido sugerido que a forma  $Sb^{5+}$  seja um pró-fármaco que é convertido em  $Sb^{3+}$  no interior dos macrófagos, especialmente nos vacúolos parasitóforos onde os amastigotas residem. Esta forma trivalente ativa é responsável por comprometer o potencial redox do tiol, induzindo um rápido efluxo de tripanotona e glutatona intracelulares (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Além disto, a forma  $Sb^{3+}$  inibe a atividade da tripanotona redutase, enzima importante na proteção do parasito contra o dano oxidativo (HALDAR; SEN; ROY, 2011). O composto também age interferindo nas enzimas glicolíticas e na oxidação de ácidos graxos nas formas intracelulares do parasito, o que resultaria na redução dose-dependente da formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010). Antimoniais também atuam sobre o DNA do parasito, induzindo dano no DNA (LIMA et al., 2010) e inibindo a síntese de topoisomerase I (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

Um dos principais problemas da terapia com antimoniais é a variação da eficácia da droga a depender da região geográfica, espécies de *Leishmania* envolvidas e apresentação clínica da doença (GOTO; LINDOSO, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011). Relatos de falha na resposta ao tratamento têm sido documentados em cerca de 15% dos pacientes tratados com antimoniais, o que aponta para o surgimento de espécies de *Leishmania* resistentes, limitando a sua utilização (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SUNDAR et al., 2008; MEHEUS et al., 2010). Outra problemática da terapia com antimoniais é que o tratamento sistêmico por um período prolongado e o acúmulo da forma ativa em diferentes tecidos resulta em uma elevada toxicidade do fármaco; a qual é acompanhada de uma série de efeitos adversos como artralgia e mialgia, além de efeitos

potencialmente mais graves como cardiotoxicidade e comprometimento renal, principalmente em pacientes idosos. Além disto, o uso deste medicamento não é indicado durante a gravidez (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico isolado da bactéria *Streptomyces nodosus* utilizado inicialmente como antifúngico, principalmente em infecções sistêmicas (MONZOTE, 2009; SHAKYA; BAJPAI, GUPTA, 2011). É indicada como fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV e LCM e tem sido a primeira opção terapêutica em regiões endêmicas como no estado de Bihar na Índia e no Nepal, devido à perda de efetividade aos antimoniais pentavalentes (MEHEUS et al., 2010; CROFT; OLLIARO, 2011). O fármaco também é indicado para o tratamento de pacientes imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos (GOTO; LINDOSO, 2012). Seu mecanismo de ação baseia-se na afinidade ao ergosterol (esterol encontrado em fungos e parasitos), formando um complexo binário com os esteróis da membrana que resulta na abertura de poros, os quais estão associados a danos na permeabilidade da membrana e no balanço iônico, desencadeando a morte do parasito (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; ROY et al., 2012).

A despeito de sua eficácia no tratamento de pacientes não responsivos a terapia com antimoniais, o fármaco apresenta um alto grau de toxicidade com efeitos adversos como hipocalcemia, febre, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e reações anafiláticas. Esses efeitos potencialmente graves são explicados pela sua afinidade pelo colesterol encontrado na membrana da célula humana, além da baixa solubilidade do fármaco (CROFT; COOMBS, 2003). Além disto, trata-se de um medicamento caro e que requer um regime de infusão lento em dias alternados. Alternativas recentes surgiram com o desenvolvimento de formulações lipídicas como a anfotericina B encapsulada em lipossomas (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B, que são mais eficazes e menos tóxicas, mas por outro lado torna o custo do tratamento ainda mais elevado, o que inviabiliza a sua utilização em países menos desenvolvidos (MISHRA et al., 2009; DEN BOER et al., 2011).

A pentamidina, um derivado diamidínico aromático, tem sido utilizada como fármaco de segunda escolha para o tratamento da LC e LV em casos de resistência à terapia com antimoniais e em pacientes cardíacos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). O mecanismo de ação do fármaco não está totalmente definido, mas a morte

do parasito é possivelmente desencadeada pela inibição da síntese do DNA, modificação da morfologia do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial (AMATO et al., 2008; GOTO; LINDOSO, 2010). Efeitos adversos comuns é a hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia e dor no local da injeção (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DAVID; CRAFT, 2009).

A paramomicina pertence à classe dos antibióticos aminoglicosídeos cuja atividade leishmanicida tem sido considerada como promissora pela OMS (SHAKYA; BAJPAI; GUPTA, 2011). Sua eficácia clínica foi comprovada para o tratamento da LV quando administrada por via parenteral tanto na terapia isolada, quanto em associação com estibogluconato de sódio (NEAL et al., 1995; MELAKU et al., 2007) ou em combinação com miltefosina (SEIFERT; CROFT, 2006). O fármaco também tem sido utilizado na terapia da LCL por via tópica (EL-ON et al., 1992; ASILIAN et al., 2003). O tratamento local oferece uma série de vantagens como a facilidade de administração, redução de efeitos adversos e melhor custo-efetividade em comparação com a terapia sistêmica (SEIFERT, 2011). Trabalhos *in vitro* demonstraram que a ação leishmanicida envolve inibição da síntese proteica e interferência na fluidez e permeabilidade da membrana (MALTEZOU, 2010). Edema, prurido e irritação no local da administração são alguns dos efeitos adversos associados à terapia com o fármaco (ARMIJOS et al., 2004).

A miltefosina, análogo da fosfatidilcolina, é um fármaco originalmente desenvolvido como antineoplásico, o qual foi introduzido na última década como a primeira opção terapêutica oral efetiva para o tratamento da LV na Índia (SUNDAR et al., 2002; DE MORAES-TEIXEIRA et al., 2011). Além disto, o fármaco tem sido utilizado com sucesso no tratamento de pacientes resistentes aos antimoniais pentavalentes e crianças com LV (CROFT; ENGEL, 2006). Alguns estudos demonstraram variações na eficácia clínica do fármaco em espécies associadas a LC no Novo Mundo, desapontando a expectativa do uso da miltefosina na Américas (YARDLEY et al., 2005; MONZOTE, 2009; MACHADO et al., 2010). Seu mecanismo de ação parece estar associado a múltiplos alvos, induzindo uma série de alterações celulares típicas de morte por apoptose em *L. donovani*, como condensação do DNA nuclear, fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004; MALTEZOU, 2009; MARINHO et al., 2011). A ação anti-*Leishmania* envolve ainda interação com fosfolipídeos e esteróis da membrana

plasmática, interferindo com a funcionalidade de diversas enzimas envolvidas no metabolismo dos fosfolipídeos, incluindo proteína cinase C (BARRAT; SAINT-PIERRE; CHAZALET, LOUSEAU, 2009). O fármaco também estimula a ativação de células T com aumento na secreção de IFN- $\gamma$  e da capacidade microbicida pelos macrófagos através da produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio (PALUMBO, 2008; MISHRA et al., 2009; GRIEWANK et al., 2010).

Apesar dos importantes avanços obtidos com a terapia oral com miltefosina, o fármaco possui uma série de inconvenientes, dentre eles o alto custo, período prolongado de tratamento, elevada toxicidade, surgimento de cepas resistentes. Além disto, os efeitos adversos incluem náuseas, vômitos e teratogenicidade, o que justifica a busca de novos compostos com possibilidade de administração por via oral, seguros e eficazes (MALTEZOU, 2010; TIUMAN et al., 2011).

Diante de todas as considerações feitas acima acerca da série de limitações da atual quimioterapia para as leishmanioses e levando-se em conta que não existem vacinas disponíveis, existe uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos para o parasito, ou seja, que atuem sobre pontos metabólicos do parasito diferente do hospedeiro humano, de baixo custo e seguros para o controle e tratamento desta importante doença tropical negligenciada (VERMEERSCH et al., 2009; KEDZIERSKI, 2010).

## 1.5 QUINOLINAS

As quinolinas representam uma das mais bem-sucedidas classes de drogas já descritas em função da ampla atividade biológica apresentada por estas moléculas. Compostos heterocíclicos contendo a estrutura quinolínica possuem eficácia antiprotozoária (FAKHFAKH et al., 2003), antimicrobiana (KAUR et al., 2011), antiinflamatória (MUKHERJEE; PAL, 2012), antituberculose (VANGAPANDU et al.; 2004; CARMO et al.; 2011), antitumoral (DEADY et al., 2000), anti-HIV (MOUSCADET; DESMAËLE, 2010) e antifúngica (ZHU et al., 2007). A cloroquina, uma das mais conhecidas drogas desta série, foi uma das substâncias mais



utilizadas no tratamento e profilaxia da malária durante décadas, até o surgimento de resistência parasitária ao fármaco (KAUR et al., 2010).

Em relação à *Leishmania*, diversos estudos demonstram que derivados de quinolinas também possuem resultados promissores neste protozoário (FOURNET et al., 1993; PONTE-SUCRE et al., 2007; NANAYAKKARA et al., 2008; MISHRA et al., 2009; LOISEAU et al., 2011; PALOQUE et al., 2012). Dentre os derivados de quinolinas, destacam-se as aminoquinolinas (AMQ). Por exemplo, sitamaquina é um derivado 8-AMQ, que está sendo avaliado para o tratamento oral da LV na Índia (JHA et al., 2005), Quênia (WASUNNA et al., 2005) e Brasil (DIETZE et al., 2001) sob a responsabilidade da Glaxo Smith Kline. Avaliações realizadas no Quênia mostraram que uma dose de 2 mg/Kg/dia do fármaco administrado por via oral durante 28 dias foi bem tolerado por 83% dos pacientes. No Brasil, 67% dos pacientes infectados com *L. chagasi* foram curados quando tratados com 2 mg/Kg/dia por via oral durante 28 dias (DIETZE et al., 2001). Foi comprovada também a eficácia das formulações tópicas em modelos *in vitro* e *in vivo* de LC (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Contudo, estudos de fase IIb estão sendo realizados na tentativa de se verificar a eficácia clínica do esquema de tratamento para a LV por via oral durante 21 dias (KULSHRESTHA et al., 2011). Trabalhos *in vitro* demonstraram que a atividade do composto está associada à indução de alterações morfológicas em amastigotas intracelulares de *L. tropica* (SEIFERT, 2011), colapso do potencial de membrana em promastigotas de *L. donovani* (VERCESI; DOCAMPO, 1992); bem como acúmulo do fármaco no acidocalcisoma, resultando na alcalinização da organela e morte do parasito (LÓPEZ-MARTÍN et al., 2008). Sua atividade anti-*Leishmania* envolve ainda interação com grupamentos fosfolipídicos na membrana do parasito e acúmulo do fármaco no citosol em um processo independente de esterol (COIMBRA et al., 2010). As reações adversas desenvolvidas nos pacientes em estudo foram dor abdominal, cefaléia, vômito, dispepsia e alguns casos de meta-hemoglobinemia (JHA et al., 2005; WASUNNA et al., 2005).

Outro composto promissor é o imiquimod (Aldara®), um derivado imidazoquinolina, que possui eficácia antitumoral, antiviral e imunomoduladora. Seu uso foi aprovado para tratamento de infecções por HPV, verrugas genitais e algumas condições pré-malignas (MINODIER, PAROLLA, 2007). Em avaliações realizadas

em pacientes com LC no Peru, observou-se que a administração de imiquimod pela via tópica em associação com antimoniato de meglumina pela via intramuscular resultou em maior rapidez na resolução das lesões em comparação com antimoniato sozinho (AREVALO et al., 2001; AREVALO et al., 2007). Diante destas constatações, a OMS recentemente incluiu a terapia combinada de imiquimod com antimoniato de meglumina como segunda opção terapêutica para o tratamento da LC no Novo Mundo (WHO, 2010). Em modelos de infecção *in vitro* e em camundongos infectadas com *L. donovani*, a atividade anti-amastigota foi associada à ativação de macrófagos resultante da indução da expressão gênica de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e aumento nos níveis de NO (BUATES, MATLASHEWSKI, 1999).

Diversos outros estudos confirmam o potencial leishmanicida dos derivados de quinolinas o que resultou na identificação de uma série de moléculas de interesse com substituições em diversas posições no anel quinolínico como derivados bis-quinolinas (PALIT et al., 2008); quinolinas substituídas na posição 2 (NAKAYAMA et al., 2005; DESRIVOT et al.; 2007; VIEIRA et al.; 2008); quinolinas substituídas nas posições 4 (SAHU et al., 2002; CARMO et al., 2011); quinolinas substituídas na posição 8 (BERMAN, LEE, 1983; CARVALHO et al., 2010; YARDLEY; GAMARRO; CROFT, 2010), dentre outros compostos.

Dentre estes, compostos derivados das 4-AMQ foram extensivamente estudados para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos o que resultou na descoberta da cloroquina, que tem sido utilizada durante décadas para o tratamento da malária (GREENWOOD et al., 2005; KAUR et al., 2010). O fármaco também apresenta eficácia clínica no tratamento da artrite reumatóide e do lúpus eritematoso sistêmico (MILLER; RANATUNGA, 2012), além de atividade antitumoral (LOEHLBERG et al., 2012). Neste sentido, a atividade leishmanicida de derivados 4-AMQ também vem sendo alvo de inúmeros estudos em nosso laboratório. Estudos *in vitro* realizados com uma série destes derivados exibiu resultado significativo em diferentes espécies de *Leishmania* e *Mycobacterium tuberculosis* (CARMO et al., 2011).

Amodiaquina (AQ) também é um fármaco da classe das 4-AMQ introduzido na terapia antimalárica na década de 1940, cuja terapia isolada para profilaxia não é atualmente recomendada devido aos potenciais efeitos adversos, dentre eles a

agranulocitose e hepatite (KAUR et al., 2010). A OMS, como parte dos esforços em se combater a crescente resistência parasitária, recomenda a terapia combinada de AQ e artesunato para o tratamento de infecções por *P. falciparum* resistentes à cloroquina (SÁ; CHONG; WELLENS, 2011). Estudos já demonstram a atividade de uma série de derivados estruturalmente relacionados à AQ em formas promastigotas de *L. amazonensis* (DE MELLO et al., 2004) e em amastigotas intracelulares de *L. donovani* (GUGLIELMO et al., 2009). Recentemente, um trabalho realizado em nosso laboratório com uma série de análogos da AQ exibiu resultados promissores em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (COIMBRA et al., 2011).

Dando continuidade aos estudos com esta classe de compostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o potencial leishmanicida de uma série de derivados de quinolinas, incluindo 4-AMQ associados com esteroide (ANTINARELLI et al., 2012) e de derivados heteroaromáticos da AQ (artigo aceito para publicação no *Chemical Biology and Drug Design*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a atividade citotóxica de uma série de derivados de quinolinas em espécies de *Leishmania* associadas a manifestações tegumentares da doença, bem como em células de mamíferos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

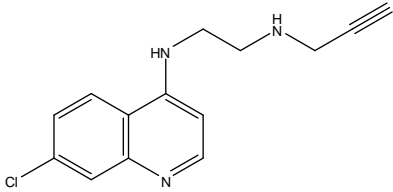
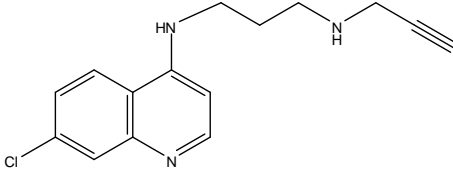
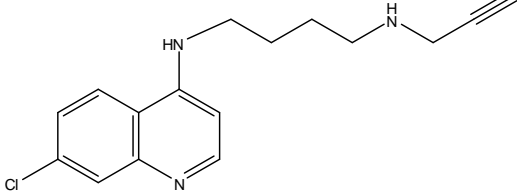
- 1- Avaliar o efeito citotóxico de derivados de 4-AMQ híbridos com esteroide e de derivados da AQ em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*;
- 2- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- 3- Avaliar a atividade dos compostos em amastigotas intracelulares de espécies que se mostraram sensíveis no item 1 e 2;
- 4- Determinar o índice de seletividade dos compostos para promastigotas e amastigotas intracelulares em relação à célula hospedeira;
- 5- Determinar o índice de especificidade dos compostos para os diferentes estágios do parasito;
- 6- Determinar a relação estrutura atividade das séries de derivados de quinolinas testadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COMPOSTOS UTILIZADOS

Os compostos derivados de 4-AMQ descritos neste trabalho foram sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A série de compostos derivados da AQ foi elaborada e sintetizada pelo grupo do Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza do Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Nas Tabelas 1 e 2 dispostas abaixo, estão representadas as estruturas dos derivados de 4-AMQ e seus híbridos com esteroide e dos derivados da AQ, respectivamente, utilizados neste trabalho.

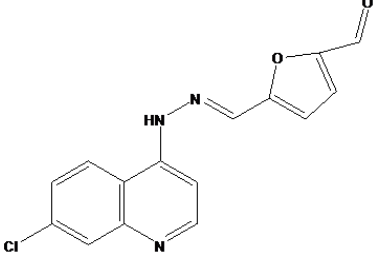
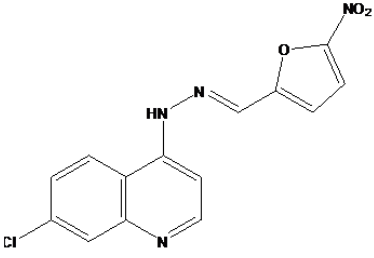
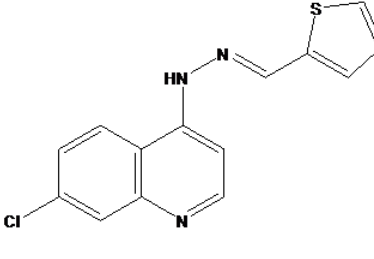
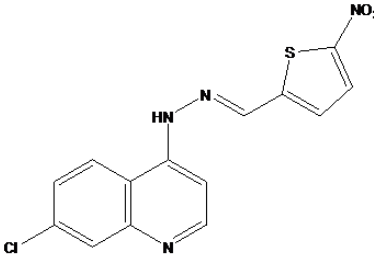
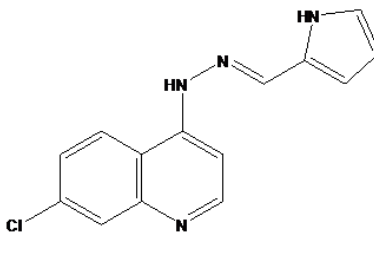
**Tabela 1:** Estruturas químicas dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide.

Composto	Estrutura Química	Nome do Composto
1		$N^1$ -(7-cloroquinolin-4-il)- $N^2$ -(prop-2-inil)etano-1,2-diamina
2		$N^1$ -(7-cloroquinolin-4-il)- $N^3$ -(prop-2-inil)propano-1,3-diamina
3		$N^1$ -(7-cloroquinolin-4-il)- $N^4$ -(prop-2-inil)butano-1,4-diamina

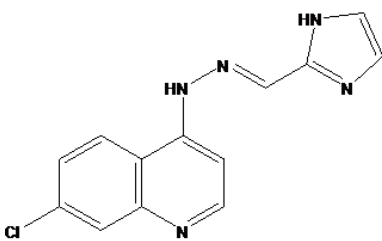
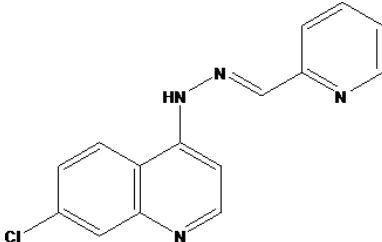
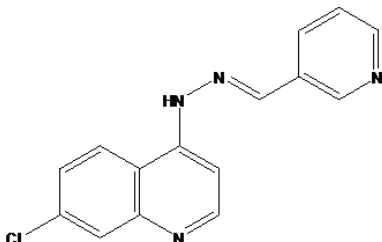
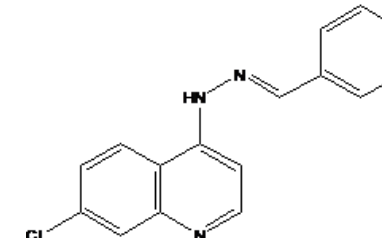
(continuação)

- 
- 4**
- 
- Metil 3 $\beta$ -(*N*-[(7-cloroquinolin-4-il)amino] etilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)] 7 $\alpha$ -12 $\alpha$ -diidroxí-5 $\beta$ -colano-24-oato
- 5**
- 
- Metil 3 $\beta$ -(*N*-[(7-cloroquinolin-4-il)amino] propilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)] 7 $\alpha$ -12 $\alpha$ -diidroxí-5 $\beta$ -colano-24-oato
- 6**
- 
- Metil 3 $\beta$ -(*N*-[(7-cloroquinolin-4-il)amino] butilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)] 7 $\alpha$ -12 $\alpha$ -diidroxí-5 $\beta$ -colano-24-oato
-

**Tabela 2:** Estruturas químicas dos derivados da amodiaquina.

Composto	Estrutura Química	Nome do Composto
7		(E)-5-((2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)metil)furan-2-carbaldeído
8		(E)-7-cloro-4-(2-((5-nitrofuran-2-il)metileno)hidrazinil)quinolina
9		(E)-7-cloro-4-(2-(tiofen-2-il)metileno)hidrazinil)quinolina
10		(E)-7-cloro-4-(2-((5-nitrotiofen-2-il)metileno)hidrazinil)quinolina
11		(E)-7-cloro-4-(2-1H-pirrol-2-il)metileno)hidrazinil)quinolina

(continuação)

- 12  (E)-7-cloro-4-(2-(1H-imidazol-2-il)metileno)hidrazinil quinolína
- 13  (E)-7-cloro-4-(2-(piridin-2-il)metileno)hidrazinil quinolína
- 14  (E)-7-cloro-4-(2-(piridin-3-il)metileno)hidrazinil quinolína
- 15  (E)-7-cloro-4-(2-(piridin-4-il)metileno)hidrazinil quinolína

### 3.2 CULTIVO DOS PARASITOS

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) foram mantidas em meio Warren (Infusão de coração e cérebro-BHI), suplementado com hemina (Sigma, USA) e ácido fólico (Sigma, USA). Formas promastigotas de *L.*



*major* (MRHO/SU/59/P) e *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903) foram cultivadas em meio BHI (Infusão de coração e cérebro) (Himédia, Índia), suplementado com L-glutamina (Vetec, Brasil). Todas as culturas foram suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Brasil), 10% de urina humana estéril como fonte de hipoxantina (PACIENZA-LIMA, 2012), 100 µg/mL de estreptomicina associada a 100 UI/mL de penicilina (Cultilab, Brasil) e mantidas em estufa a 25°C. Os parasitos foram constantemente isolados a partir de lesão de camundongos e os promastigotas foram mantidos em cultura axênica em estufa a 25°C. Repiques foram realizados em intervalos de três a quatro dias, até o máximo de quinze passagens para evitar perda da infectividade.

### 3.3 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM *L. braziliensis*, *L. amazonensis* E *L. major*

No sentido de manter a infectividade das cepas, promastigotas em fase estacionária de crescimento, foram obtidas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer. O inóculo de  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* foi injetado por via subcutânea no coxim plantar de camundongos BALB/c com idade aproximada entre 6 a 8 semanas. Pelas dificuldades em se ter sucesso no desenvolvimento de lesão na pata em infecções por *L. braziliensis*, utilizou-se o modelo de infecção na orelha que melhor mimetiza a infecção natural pela espécie (DE MOURA, 2005). O inóculo de  $10 \times 10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária foi injetado por via intradérmica na orelha de camundongos BALB/c com idade aproximada entre 6 a 8 semanas. Formas amastigotas foram isoladas por aspiração na pata infectada no segundo mês de infecção para as espécies *L. amazonensis* e *L. major* e na orelha infectada no terceiro mês de infecção para *L. braziliensis*. Ambas foram adicionadas em frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura específico para a espécie de *Leishmania*, suplementado com 20% de SBF e mantidas em estufa a 25°C. Após 24

horas, as formas promastigotas começaram a surgir na cultura e foram mantidas viáveis através de repiques em intervalos de três a quatro dias.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania*

Os ensaios antipromastigotas foram realizados pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico ou MTT (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) que consiste em um ensaio colorimétrico no qual o sal tetrazolium de cor amarela e solúvel em água é convertido em formazan, produto insolúvel e de cor lilás pela atividade das desidrogenases mitocondriais das células vivas, tornando-se posteriormente solúvel com a adição de solução de isopropanol/ácido clorídrico (MOSMMAN, 1983). Formas promastigotas na fase logarítmica da curva de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e incubadas em placas de cultura de 96 poços em estufa a 25°C na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL para *L. amazonensis* e  $3 \times 10^6$  células/mL para *L. major* e *L. braziliensis*. Os compostos foram adicionados em concentrações seriadas, após sucessivas diluições em dimetilsulfóxido (DMSO obtido da Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e água deionizada. Em alguns poços não houve adição de compostos (controle negativo), os quais permaneceram incubados com meio de cultura. Após 72 horas de incubação em estufa a 25°C, a motilidade e morfologia dos promastigotas foram avaliadas sob microscópio ótico invertido e, na seqüência, adicionou-se 10 µL de MTT à 5mg/mL em cada poço e a placa permaneceu incubada por mais quatro horas sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/ácido clorídrico (solução de isopropanol/HCl a 0,4%) e o material dissolvido foi lido em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm (Multiskan EX-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle. A partir do teste de viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) para cada composto que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento parasitário. Os valores de  $CI_{50}$  foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos independentes, realizados em

duplicata, por interpolação gráfica, utilizando-se os programas estatísticos Grafit 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K) e Probit (FINNEY, 1978). Anfotericina B (Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) e Miltefosina (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) foram utilizados como fármacos de referência e controles positivos. Amodiaquina foi adquirida comercialmente da Ellipse Pharmaceuticals (Pessac, França).

### 3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Camundongos BALB/c foram previamente estimulados com 2 mL de meio tioglicolato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 3% estéril. Após 72 horas, os animais foram sacrificados e 5 mL de meio 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi injetado no peritônio dos camundongos. Após massagem do local e aspiração do meio 199 contendo as células residentes do peritônio, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm (centrífuga clínica, FANEM Mod. 204N). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF em cada poço da placa de 96 poços que permaneceu por 16 horas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C para a adesão dos macrófagos na placa. Posteriormente, cada poço foi lavado com 100  $\mu$ L de PBS estéril para retirada das células não aderidas; adicionou-se meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e, na seqüência, foram realizadas diluições seriadas dos compostos, utilizando-se a concentração máxima de 200  $\mu$ M. As células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 72 horas de tratamento, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pela adição de 10  $\mu$ L de MTT (MOSSMAM, 1983) a 5 mg/mL e confirmada pela comparação da morfologia dos macrófagos tratados com o grupo controle não-tratado, via microscópio óptico invertido (NIKON Eclipse TS100). Após 2 horas, a reação foi interrompida pela adição 100 $\mu$ L de isopropanol/ácido clorídrico (solução de isopropanol/HCl a 0,4%) e lida em

espectrofotômetro de microplacas a 570 nm (Multiskan EX-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Cada concentração dos compostos foi avaliada em duplicata. Em alguns poços não houve adição de compostos (controle negativo), os quais foram plaqueados com 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF. A concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos em comparação com o controle sem tratamento ( $CC_{50}$ ) foi calculada pelo programa estatístico Probit considerando a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *Leishmania*

Os ensaios anti-amastigota foram realizados com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c obtidos como descrito no item 3.5 e infectados com *L. major* para os compostos derivados 4-AMQ e *L. braziliensis* para os derivados da AQ. Em cada poço da placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro), adicionou-se 300 µL de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF. A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 horas para a adesão dos macrófagos. Posteriormente, as células foram lavadas com 300 µL de PBS estéril para retirada das células não aderidas e adicionou-se em cada poço 300 µL de uma suspensão de  $20 \times 10^6$  promastigotas em fase estacionária/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF. Após um período de 4 horas de interação em estufa a 33°C com 5% CO<sub>2</sub>, cada poço foi lavado seis vezes com 300 µL de PBS estéril para retirada dos promastigotas não fagocitados. Os compostos a serem testados foram adicionados em diferentes concentrações e após 72 horas de tratamento em estufa a 33°C com 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram fixadas com etanol absoluto, submetidas à desidratação em soluções contendo acetona e xilol em diferentes proporções (primeiro acetona pura, na sequência 90% acetona/10% xilol, 50% acetona/50% xilol, 90% xilol/10% acetona e por último xilol puro) e coradas com Giemsa. Ao final, as lamínulas foram montadas com

bálsamo do Canadá sobre lâmina de vidro e analisadas em microscópio. A carga parasitária global foi avaliada pela contagem por microscopia de luz (OPYMPUS BX41) do número de amastigotas intracelulares e macrófagos infectados e não-infectados (total de 100 células infectadas). Os resultados foram expressos de duas maneiras:

- 1) A partir da carga parasitária global foi determinada a concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário ( $CI_{50}$ ) por extrapolação gráfica da curva dose-resposta. A análise foi realizada pelo programa estatístico Probit que considerou a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Anfotericina B e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência e controles positivos.
- 2) % de inibição do Número de amastigotas/macrófagos: Foi obtido dividindo-se o número de amastigotas por macrófagos (total de 100 células infectadas) e calculado o efeito do tratamento em relação ao controle. Os dados foram demonstrados em % de inibição.

### 3.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE E ÍNDICE DE ESPECIFICIDADE DOS COMPOSTOS

O índice de seletividade (IS) determina a relação entre citotoxicidade dos compostos para células de mamíferos e sua atividade leishmanicida. Foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para macrófagos ( $CC_{50}$ ) e a atividade contra promastigotas e amastigotas ( $CI_{50}$ ). Valores de  $IS > 1,0$  indicam que o composto foi mais tóxico para o parasito em relação à célula hospedeira. Valores de  $IS < 1,0$  demonstram toxicidade do composto para macrófagos (TEMPONE, DE OLIVEIRA, BERLINCK, 2011).

O índice de especificidade (IE) estabelece a especificidade dos compostos para as formas promastigotas e amastigotas. Foi calculado pela razão entre o  $CI_{50}$  em promastigota e o  $CI_{50}$  em amastigota. Valores de  $IE > 2,0$  indicam que o composto foi

mais ativo para amastigotas. Valores de IE inferiores a 0,4 sugerem que o composto foi mais efetivo em promastigota. Compostos com valores de IE entre 0,4 e 2,0 foram considerados ativos para ambos os estágios (DE MUYLDER et al., 2011).

### 3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Camundongos da linhagem BALB/c foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Todos os protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (Protocolos Nº 059/2011, 060/2011, 015/2012 e 017/2012).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de  $CI_{50}$  para os derivados 4-AMQ obtidos nos ensaios antipromastigota foram determinados graficamente a partir de uma curva de regressão não linear, estabelecendo o nível em alfa em 5% ( $p=0,05$ ) e o intervalo de confiança em 95% utilizando o programa *GraFit* versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K). Para os derivados da AQ, os valores de  $CI_{50}$  obtidos nos ensaios antipromastigota foram calculados por extrapolação gráfica da curva dose-resposta por análise pelo programa estatístico Probit (FINNEY, 1978), o qual utilizou o método proposto por Litchfiet e Wilcoxon, considerando a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Para os ensaios antiastigotas e de citotoxicidade em macrófagos, os valores de  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$ , respectivamente, foram determinados pelo programa estatístico Probit. Para os resultados de % de inibição do número de amastigotas/macrófago infectado, as análises estatísticas foram realizadas pelo

programa Graph Pad Prism. Os dados foram comparados por análise de variância teste One-way-ANOVA com pós-teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,0001 (\*\*\*) , 0,001 (\*\*) e 0,01 (\*) foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

Para facilitar a apresentação dos resultados, os mesmos foram divididos em dois subitens: no primeiro serão apresentados os resultados referentes a derivados 4-aminoquinolínicos (4-AMQ) conjugados a esteroide. Compostos 4-AMQ foram previamente sintetizados e testados quanto à atividade leishmanicida (CARMO et al. 2011). No intuito de dar continuidade aos estudos com esta classe de derivados, foram sintetizados compostos híbridos de 4-aminoquinolinas conjugados a esteroide (ácido cólico), na tentativa de potencializar o efeito leishmanicida anteriormente observado. Os resultados obtidos foram publicados no *Organic and Medicinal Chemistry Letters* (apêndice **A**). No segundo subitem serão apresentados os resultados referentes aos compostos sintéticos derivados da amodiaquina (AQ) cujos resultados foram publicados no *Chemical Biology and Drug Design* (apêndice **B**).

### 4.1 COMPOSTOS SINTÉTICOS 4- AMINOQUINOLINAS E HÍBRIDOS COM ESTEROIDE

A atividade dos compostos foi testada em formas promastigotas de três espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* relacionadas principalmente a manifestações tegumentares (GOTO; LINDOSO, 2010). A atividade foi avaliada após 72 horas de tratamento com os compostos, através do método colorimétrico do MTT.

A Tabela **3** mostra a atividade antipromastigota dos derivados de 4-AMQ e seus híbridos com esteroide. Dentre as espécies testadas, *L. major* mostrou maior sensibilidade aos compostos relacionados. Destes, cinco apresentaram atividade antipromastigota, tendo sido observado uma nítida relação estrutura atividade. Em relação aos derivados de 4-AMQ, observou-se que a adição de grupo metílico

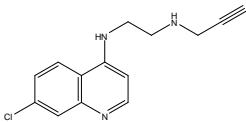
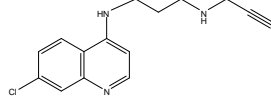
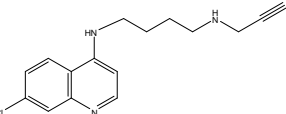
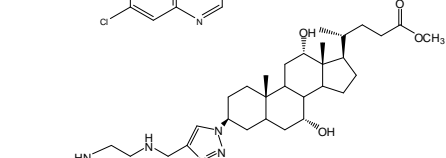
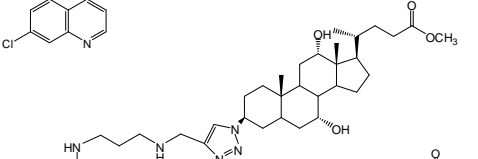
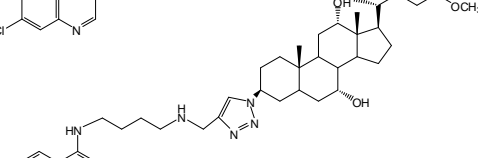
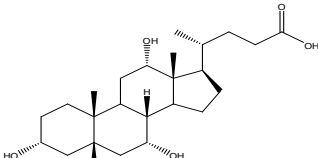
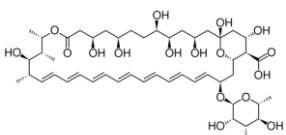



(n) à cadeia carbônica lateral entre as aminas resultou num decréscimo da atividade leishmanicida, haja vista que os valores de  $CI_{50}$  apresentados foram 20,6 e 45,0  $\mu\text{M}$  para os compostos **1** (n=2) e **2** (n=3), respectivamente, sendo que o composto **3** (n=4) não apresentou atividade na concentração máxima testada (87  $\mu\text{M}$ ).

Na sequência, testou-se a atividade dos híbridos de 4-AMQ com esteroide e, em comparação com os precursores, verificou-se que a adição de esteroide potencializou a ação leishmanicida. Nesta série, observou-se também maior sensibilidade de *L. major* para estes compostos. Igualmente aos resultados obtidos com os precursores 4-AMQ, a adição de grupamento metílico (n) à cadeia lateral resultou em redução da atividade leishmanicida de modo que a atividade dos compostos apresentou-se da seguinte maneira:  $CI_{50}$  de 10,6; 21,2 e 25,6  $\mu\text{M}$  para os compostos **4** (n=2), **5**(n=3) e **6** (n=4), respectivamente.

Miltefosina e anfotericina B foram utilizadas como controles positivos e vale a pena ressaltar que o composto **4**, o mais ativo da série em *L. major*, mostrou atividade mais expressiva do que a miltefosina ( $CI_{50}$  de 20,0  $\mu\text{M}$ ). É importante também acrescentar que o esteroide sozinho (ácido cólico) não possui atividade antipromastigota efetiva ( $CI_{50}>87,0 \mu\text{M}$ ).

**Tabela 3:** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Compostos	Estrutura	L. a. <sup>(1)</sup>	L. m. <sup>(2)</sup>	L. b. <sup>(3)</sup>
1*		>87,0	20,6 ± 0,9	35,9 ± 2,5
2*		>87,0	45,0 ± 0,8	>87,0
3*		>87,0	>87,0	>87,0
4		37,0 ± 0,2	10,6 ± 1,6	>87,0
5		>87,0	21,2 ± 0,01	>87,0
6		>87,0	25,6 ± 2,9	13,0 ± 2,4
Ácido Cólico		>87,0	>87,0	>87,0
AmB		0,1 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,3 ± 0,04
Miltefosina		22,0 ± 0,5	20,0 ± 0,2	26,4 ± 0,4

\*Resultados obtidos em nosso laboratório, os quais fizeram parte de publicação anterior (CARMO et al., 2011) e utilizados apenas para comparação.

L.a.<sup>(1)</sup>=*L. amazonensis*; L.m.<sup>(2)</sup>=*L. major*; L.b.<sup>(3)</sup>=*L. braziliensis*

Ácido cólico: esteroide usado na síntese dos compostos híbridos de 4-aminoquinolinas com esteroide.

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

Para verificar a citotoxicidade em macrófagos, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Como pode ser observado na Tabela 4, nenhum dos derivados de 4-AMQ (compostos 1, 2 e 3) apresentou efeitos tóxicos sobre as células de mamíferos na máxima concentração testada (100  $\mu$ M). Em contrapartida, a reação de adição do ácido cólico aos derivados de 4-AMQ resultou em toxidez para macrófagos quando comparados a miltefosina e anfotericina B. Observou-se uma correlação direta entre o número de grupamentos metílicos (n) na cadeia carbônica lateral e os efeitos tóxicos sobre os macrófagos, com  $CC_{50}$  variando de 15,2 (n=2), 19,7 (n=3) e 37,1  $\mu$ M (n=4) para os compostos 4, 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 4:** Citotoxicidade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide em macrófagos.

<b>Compostos</b>	<b>Macrófagos <math>CC_{50}</math> (<math>\mu</math>M) (95% I.C.)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	>100,0
<b>2</b>	>100,0
<b>3</b>	>100,0
<b>4</b>	15,2 (13,0-17,8)
<b>5</b>	19,7 (16,6-23,5)
<b>6</b>	37,1 (30,8-44,7)
<b>Ácido Cólico</b>	>100,0
<b>AmB</b>	122,7 (98,4-153,1)
<b>Miltefosina</b>	99,8 (85,6-116,3)

<sup>a</sup>I.C.=Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.  
AmB (Anfotericina B) e miltefosina utilizados como fármacos de referência.

No intuito de avaliar a seletividade dos compostos entre macrófagos e promastigotas de *Leishmania*, foi calculado o Índice de Seletividade (IS), como descrito em material e métodos. Valores para IS maiores do que 1,0 indicam que o composto

foi mais tóxico para as formas promastigotas, enquanto valores abaixo de 1,0 demonstram maior toxicidade do composto para macrófagos (TEMPONE, DE OLIVEIRA, BERLINCK, 2011). Como pode ser verificado na Tabela 5, os compostos 1, 2 e 3 foram mais tóxicos para promastigotas de todas as espécies de *Leishmania*, com IS acima de 1,0. Em relação aos compostos 4, 5 e 6 houve variações na seletividade entre as diferentes espécies de *Leishmania*, sendo que todos os compostos foram mais tóxicos apenas para promastigotas de *L. major*.

**Tabela 5:** Seletividade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Compostos	I.S.*	I.S.*	I.S.*
	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.major</i>	<i>L.braziliensis</i>
1	-	>4,8	>2,8
2	-	>2,2	-
3	-	-	-
4	0,4	1,4	<0,2
5	<0,2	1,0	<0,2
6	<0,4	1,4	2,8
<b>Ácido Cólico</b>	-	-	-
<b>AmB</b>	1227,0	1752,8	409,0
<b>Miltefosina</b>	4,5	5,0	3,8

\*I.S.=Índice de Seletividade foi calculado pela razão entre CC<sub>50</sub> para macrófagos e CI<sub>50</sub> para promastigotas.

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

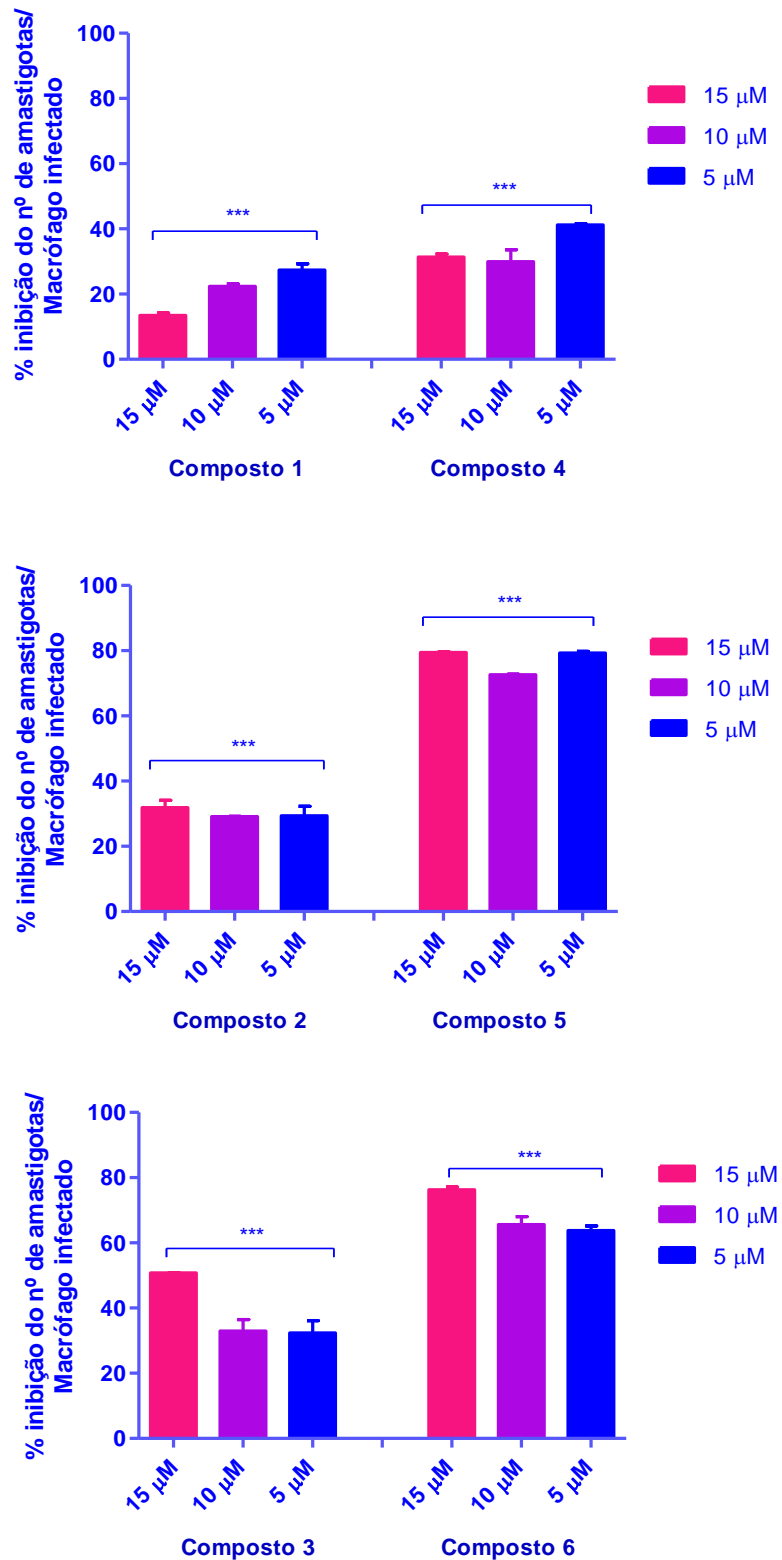
Para os ensaios de atividade nas formas intracelulares de *Leishmania* foi escolhida a espécie *L. major*, pelo fato de ter sido a espécie com resultados mais expressivos no ensaio antipromastigota e, além disto, com valores de IS acima de 1,0 para todos os compostos. O efeito dos compostos foi analisado após 72 horas de tratamento, como descrito no material e métodos. Foi observada uma excelente taxa de infecção com aproximadamente 82% das células do controle infectadas e obtendo-se, em média, nove amastigotas por macrófago infectado. Dentre os sete compostos testados, três exibiram valores de  $CI_{50}$  menores que 5  $\mu\text{M}$ , sendo mais efetivos que a miltefosina cujo  $CI_{50}$  foi de 6,2  $\mu\text{M}$  (Tabela 6). Diferentemente do que foi verificado nos ensaios em promastigotas e em macrófagos, a adição de grupamento metílico (n) na cadeia carbônica lateral resultou em aumento da atividade anti-amastigota. Os compostos 5 e 6, híbridos com esteroide, foram os mais ativos com  $CI_{50}$  de 2,9 e 1,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O ácido cólico não foi ativo até a máxima concentração testada (50  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 6:** Atividade anti-amastigota em *L. major* dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide.

<b>Compostos</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) (95% I.C.)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	14,7 (7,7-28,1)
<b>2</b>	9,5 (8,5-10,7)
<b>3</b>	4,8 (3,9-5,9)
<b>4</b>	>15,0
<b>5</b>	2,9 (2,3-3,7)
<b>6</b>	1,9 (1,3-2,8)
<b>Ácido Cólico</b>	>50,0
<b>AmB</b>	0,06 (0,05-0,08)
<b>Miltefosina</b>	6,2 (4,9-7,8)

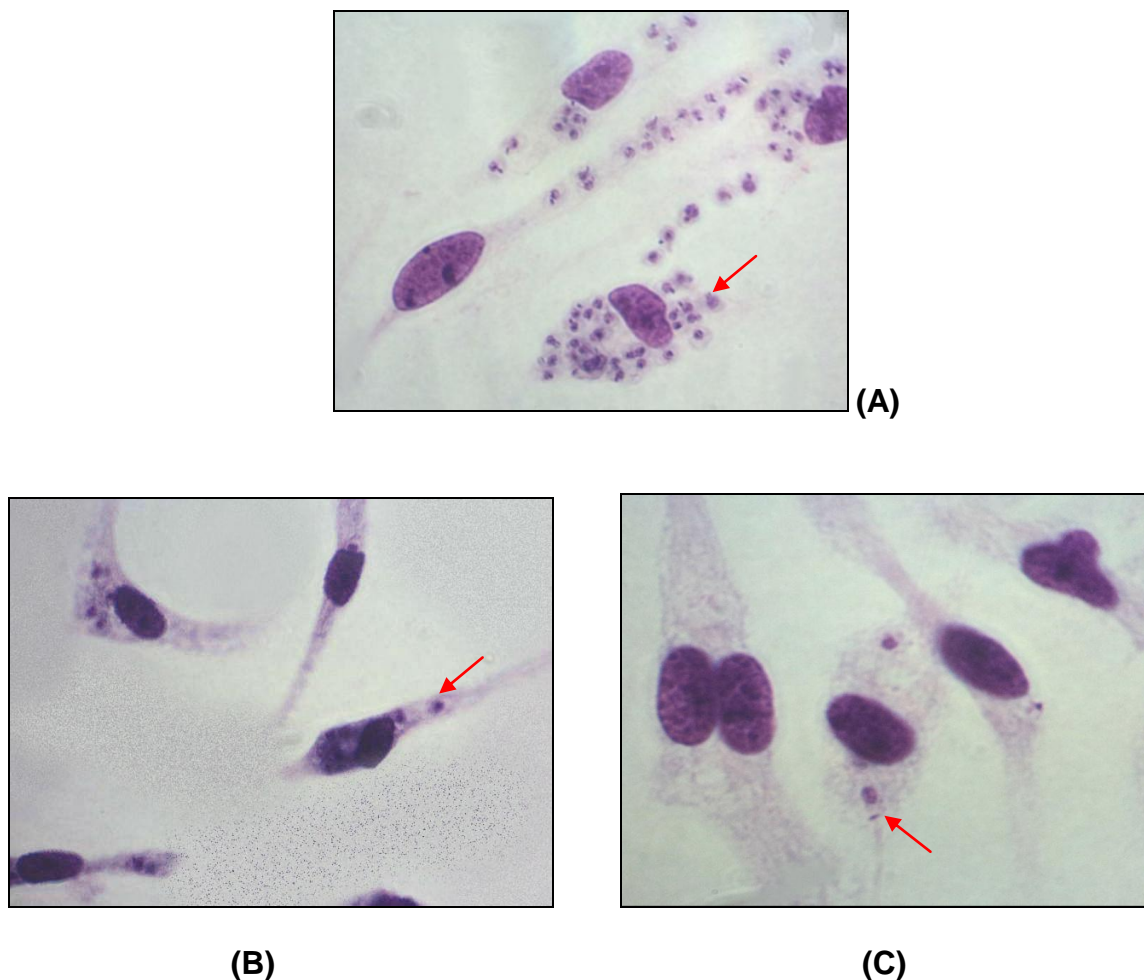
<sup>a</sup>I.C.=Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.  
AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

Quando comparado ao controle, foi verificado também que após 72 horas de tratamento com os compostos 4-AMQ e híbridos esteroides houve redução estatisticamente significativa do número de amastigotas/macrófagos para todos os compostos avaliados (Figura 5). Contudo, esta atividade foi mais significativa para os híbridos com esteroide (compostos 4, 5 e 6). O composto 4, por exemplo, reduziu em torno de 32% o número de amastigotas na concentração de 15  $\mu$ M enquanto que o precursor 1 para esta mesma concentração reduziu apenas 13%. Os compostos 5 e 6 foram os que tiveram uma atividade ainda mais significativa, de modo que o tratamento com o composto 5 na concentração de 15  $\mu$ M resultou em uma redução nestas formas intracelulares de cerca de 79%. Em contrapartida, o seu precursor 2 inibiu apenas 32% para esta mesma concentração. Da mesma forma, o composto 6 quando testado na concentração de 15  $\mu$ M inibiu o número de amastigotas em torno de 78%, sendo que o precursor 3 reduziu em aproximadamente 51% o número de amastigotas intracelulares na concentração de 15  $\mu$ M.



**Figura 5:** Atividade dos derivados de 4-aminoquinolinas (compostos 1, 2 e 3) e híbridos com esteroide (compostos 4, 5 e 6) na redução do nº de amastigotas intracelulares de *L. major*/macrófago infectado. Resultados mostram a porcentagem de inibição em relação ao controle de macrófago infectado. Todos os resultados foram estatisticamente significativos (\*\* $p < 0,0001$ ).

A figura 6 ilustra a atividade anti-amastigota dos compostos 5 e 6 na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (figuras 6B e C, respectivamente) que foram, entre os compostos testados, os mais ativos nas formas intracelulares de *L. major* quando comparados ao controle (figura 6A). Outro aspecto importante é que, observações das lâminas ao microscópio revelou que os compostos não induziram efeito tóxico aparente sobre a viabilidade dos macrófagos como arredondamento das células e perda de aderência dos macrófagos às lamínulas.



**Figura 6:** Fotomicrografia ilustrativa da atividade anti-amastigota em *L. major* dos híbridos com esteroide após 72 horas de tratamento. **(A)** macrófagos infectados com *L. major* (controle), **(B)** macrófagos infectados e tratados com o composto 5 na concentração de 5  $\mu\text{M}$  e **(C)** macrófagos infectados e tratados com o composto 6 na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . As setas em vermelho indicam as formas amastigotas de *L. major*. Aumento de 1000X.



Tendo em vista a significativa atividade anti-amastigota em *L. major*, tentou-se verificar a seletividade dos compostos para amastigotas quando comparados a citotoxicidade em macrófagos. Através do Índice de Seletividade (IS), pode-se observar que, com exceção do composto **4**, todos os outros exibiram valores de seletividade acima de 1,0 (Tabela 7). O composto **6** e seu precursor **3**, por exemplo, foram cerca de 19,5 e no mínimo 20,8, respectivamente, mais tóxicos para a forma intracelular do parasito. Portanto, é importante ressaltar que apesar dos híbridos com esteroide terem apresentado evidente toxicidade para macrófagos, a série se mostrou muito mais tóxica para a forma intracelular, o que demonstra uma ótima seletividade sobre o parasito.

**Tabela 7:** Seletividade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide em amastigotas de *L. major*.

<b>Compostos</b>	<b>I.S.*</b>
<b>1</b>	>6,8
<b>2</b>	>10,5
<b>3</b>	>20,8
<b>4</b>	<1,0
<b>5</b>	6,8
<b>6</b>	19,5
<b>Ácido Cólico</b>	>2,0
<b>AmB</b>	2.045,0
<b>Miltefosina</b>	16,1

\*I.S.=Índice de Seletividade foi calculado pela razão entre  $CC_{50}$  para macrófagos e  $CI_{50}$  para amastigota. AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

A tabela 8 fornece informações acerca da especificidade dos compostos para as formas intracelulares e extracelulares de *L. major* que foi calculada através do índice de especificidade (IE), razão entre o  $CI_{50}$  em promastigota e o  $CI_{50}$  em amastigota de *L. major*. Dentre os seis derivados de 4-AMQ avaliados, os compostos 3 e 6 apresentaram os maiores valores de IE (>18,1 e 13,5 vezes, respectivamente).

**Tabela 8:** Especificidade dos derivados de 4-aminoquinolinas e híbridos com esteroide para as formas evolutivas de *L.major*.

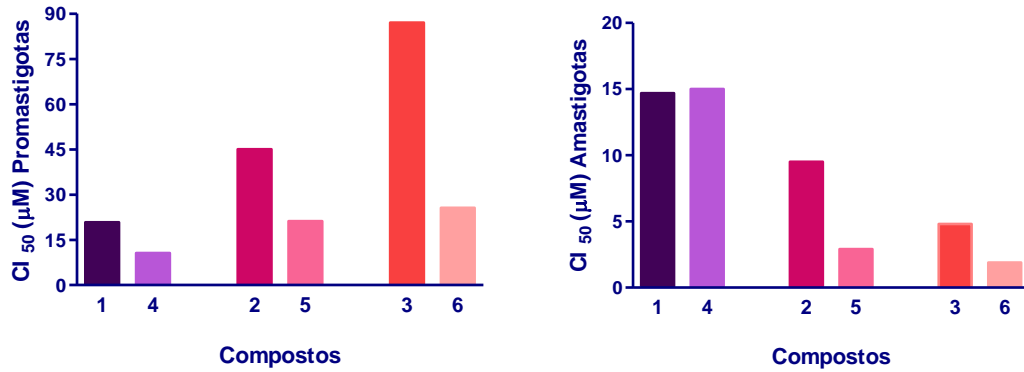
<b>Compostos</b>	<b>I.E.<sup>a</sup> (forma biológica do parasito de atuação do composto)<sup>b</sup></b>
<b>1</b>	1,4 (promastigota e amastigota)
<b>2</b>	4,7 (amastigota)
<b>3</b>	>18,1 (amastigota)
<b>4</b>	<0,7 (promastigota e amastigota)
<b>5</b>	7,3 (amastigota)
<b>6</b>	13,5 (amastigota)
<b>Ácido Cólico</b>	-
<b>AmB</b>	1,4 (promastigota e amastigota)
<b>Miltefosina</b>	3,2 (amastigota)

<sup>a</sup>I.E.=Índice de especificidade foi calculado pela razão entre o  $CI_{50}$  para promastigota e o  $CI_{50}$  para amastigota intracelular.

<sup>b</sup>Valores de IE>2,0 indicam que o composto foi mais ativo para amastigotas; inferiores a 0,4 foi mais ativo em promastigota e entre 0,4 e 2,0 ativos para ambos os estágios (DE MUYLDER et al., 2011).

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

Numa comparação entre a estrutura química dos compostos *versus* atividade em *L. major* foi possível observar que, no geral, a introdução do grupamento esteroide (compostos **4**, **5** e **6**) aos derivados 4-AMQ (compostos **1**, **2** e **3**) levou ao expressivo aumento da atividade tanto em promastigotas quanto nas formas intracelulares do parasito (Figura 7).



**Figura 7:** Atividades antipromastigota e anti-amastigota comparativas em *L. major* entre os derivados de 4-aminoquinolinas (compostos **1**, **2** e **3**) e híbridos com esteroide (compostos **4**, **5** e **6**).

## 4.2 COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS HETEROAROMÁTICOS DA AMODIAQUINA (AQ)

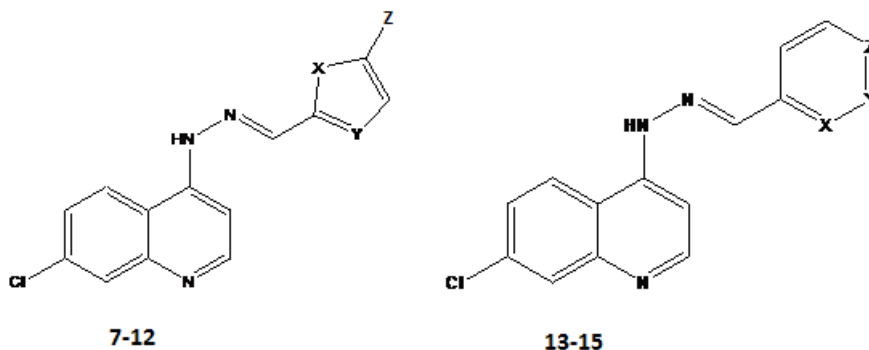
Foram testados nove compostos, os quais foram denominados derivados heteroaromáticos da AQ com anel de cinco membros (**7-12**) e derivados heteroaromáticos da AQ com anel de seis membros (**13-15**).

A atividade leishmanicida dos derivados da AQ foi inicialmente avaliada em formas promastigotas de três espécies de *Leishmania* relacionadas a manifestações tegumentares (Tabela **9**). Como pode ser verificado, os compostos **8**, **9**, **10** e **11** exibiram um amplo espectro de atividade, com valores de  $CI_{50}$  mais baixo do que a miltefosina para todas as espécies avaliadas. Os compostos **12**, **13**, **14** e **15** não tiveram atividade em nenhuma das espécies, até a máxima concentração testada (200  $\mu$ M).

Dentre as espécies de *Leishmania* sp testadas, promastigotas de *L. braziliensis* mostrou maior sensibilidade aos compostos avaliados. Destes, cinco foram ativos, sendo o composto **9** o mais ativo com  $CI_{50}$  de 1,5  $\mu$ M e o composto **7** o menos ativo apresentando um  $CI_{50}$  de 25,4  $\mu$ M.

Comparando-se os derivados heteroaromáticos de cinco membros que foram ativos (**7-12**), observa-se que a presença do átomo de enxofre resultou em um composto (**9**) com melhor atividade que o derivado oxigenado (**7**). No entanto, a introdução do grupamento nitro na posição Z dos derivados **7** e **9** foi vantajosa somente para o derivado nitrofurano (**8**), uma vez que o precursor tiofeno (**9**) foi ainda mais ativo que o seu derivado nitrotiofeno (**10**). Além disto, a introdução do átomo de nitrogênio no anel de cinco membros, também resultou em um derivado (**11**) com expressiva atividade nas três espécies analisadas com  $CI_{50}$  de 10,7; 2,9 e 3,1  $\mu$ M (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente). Contudo, a presença de um segundo átomo de nitrogênio no anel de cinco membros originou um composto (**12**) sem atividade para todas as espécies avaliadas. Nenhum dos derivados heteroaromáticos com anel de seis membros (compostos **13**, **14** e **15**) exibiu atividade antipromastigota para as três espécies de *Leishmania* sp estudadas.

**Tabela 9:** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.



Compostos	X	Y	Z	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
<b>7</b>	O	CH	H	>200,0	25,4 (21,2-30,1)	125,3 (92,9-169,0)
<b>8</b>	O	CH	NO <sub>2</sub>	7,6 (6,4-9,1)	4,8 (3,8-6,0)	1,9 (1,5-2,4)
<b>9</b>	S	CH	H	10,3 (8,8-12,1)	1,5 (1,2-1,7)	1,7 (1,4-2,1)
<b>10</b>	S	CH	NO <sub>2</sub>	28,0 (22,2-35,2)	6,8 (5,4-8,7)	6,9 (5,9-8,0)
<b>11</b>	NH	CH	H	10,7 (9,5-12,1)	2,9 (2,6-3,3)	3,1 (1,9-2,5)
<b>12</b>	NH	N	H	>200,0	>200,0	>200,0
<b>13</b>	N	CH	CH	>200,0	>200,0	>200,0
<b>14</b>	CH	N	CH	>200,0	>200,0	>200,0
<b>15</b>	CH	CH	N	>200,0	>200,0	>200,0
<b>AQ</b>				49,4 (41,3-59,3)	17,7 (15,2-20,8)	59,6 (50,9-70,0)
<b>AmB</b>				0,11 (0,09-0,12)	0,12 (0,09-0,14)	0,10 (0,09-0,11)
<b>Miltefosina</b>				34,6 (30,7-55,7)	25,5 (22,1-29,7)	21,6 (18,6-24,8)

Os valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

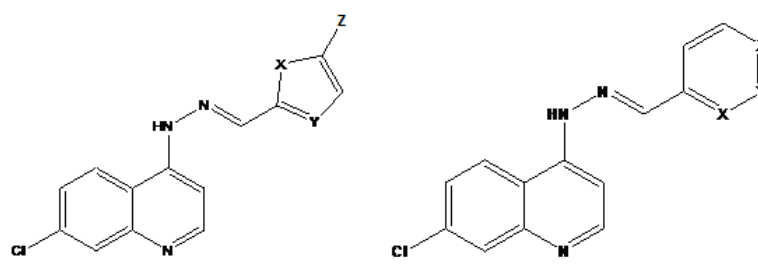
AQ=Amodiaquina

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

Em relação à citotoxicidade dos derivados heteroaromáticos da AQ em macrófagos, somente os compostos **9**, **10** e **11** foram mais tóxicos do que os fármacos de referência AQ, miltefosina e anfotericina B que apresentaram  $CC_{50}$  de 58,7; 99,8 e 122,7  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Todos os demais compostos exibiram valores de  $CC_{50}$  superiores a 200  $\mu\text{M}$  (Tabela **10**).

Analisando-se a relação entre a estrutura química e a citotoxicidade dos compostos, foi possível observar que a presença do átomo de enxofre na posição **X** (compostos **9** e **10**) pode estar associada a efeitos tóxicos para macrófagos. Desta forma, os compostos **9** e **10** foram os mais tóxicos da série com  $CC_{50}$  de 11,8 e 28,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Demais substituições resultaram na redução do efeito tóxico observado nos compostos **9** e **10**.

**Tabela 10:** Citotoxicidade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina em macrófagos.



Compostos	X	Y	Z	CC <sub>50</sub> (μM) (95% I.C.) <sup>a</sup>
7	O	CH	H	>200,0
8	O	CH	NO <sub>2</sub>	>200,0
9	S	CH	H	11,8 (7,6-17,7)
10	S	CH	NO <sub>2</sub>	28,2 (14,7-54,4)
11	NH	CH	H	36,9 (19,2-70,5)
12	NH	N	H	>200,0
13	N	CH	CH	>200,0
14	CH	N	CH	>200,0
15	CH	CH	N	>200,0
<b>AQ</b>				58,7 (50,3-68,3)
<b>AmB</b>				122,7 (98,4-153,1)
<b>Miltefosina</b>				99,8 (85,6-116,3)

<sup>a</sup>I.C.=Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.  
AQ=Amodiaquina.

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

No que se refere à seletividade dos derivados heteroaromáticos da AQ, pode-se verificar que todos os compostos foram mais tóxicos para promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* sp avaliadas, com IS superiores a 1,0 (Tabela 11). Além disto, os compostos **9**, **10** e **11** apesar de terem apresentado toxidez para macrófagos, com  $CC_{50}$  inferiores a 40  $\mu$ M, os mesmos mostraram valores de IS superiores a 1,0 para promastigotas das três espécies de *Leishmania* sp avaliadas, o que demonstra a seletividade para o estágio promastigota. No geral, na comparação entre os valores de IS para as diferentes espécies, pode-se verificar que promastigotas de *L. braziliensis* foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos compostos exibindo os valores de IS mais elevados.

**Tabela 11:** Seletividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Compostos	I.S.*	I.S.*	I.S.*
	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>Lmajor</i>
<b>7</b>	>1,0	>7,9	>1,6
<b>8</b>	>26,3	>41,7	>105,3
<b>9</b>	1,1	7,9	6,9
<b>10</b>	1,0	4,2	4,1
<b>11</b>	3,4	12,7	11,9
<b>12</b>	-	-	-
<b>13</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-
<b>15</b>	-	-	-
<b>AQ</b>	1,2	3,3	1,0
<b>AmB</b>	1115,4	1022,5	1227,0
<b>Miltefosina</b>	2,9	3,9	4,6

\*I.S.=Índice de Seletividade calculado pela razão entre  $CC_{50}$  para macrófagos e o  $CI_{50}$  para amastigota.

AQ=Amodiaquina.

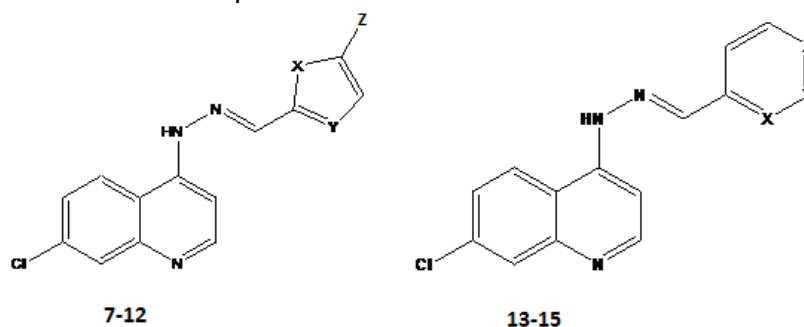
AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.



Os ensaios nas formas intracelulares de *Leishmania* foram realizados com a espécie *L. braziliensis*, pelo fato de ter sido a mais sensível aos compostos nos ensaios antipromastigotas. Além disto, todos os compostos apresentaram valores de IS superiores a 1,0 para esta espécie e, dentre os compostos que foram ativos em promastigotas de *L. braziliensis*, todos tiveram valores de  $CI_{50}$  menores do que a miltefosina. Foi observada uma eficiente taxa de infecção dos macrófagos com amastigotas de *L. braziliensis*, visto que o controle (sem adição dos compostos) apresentou aproximadamente 72% das células infectadas e, em média, cinco parasitos por célula infectada.

Em relação à atividade anti-amastigota dos compostos heteroaromáticos de AQ, dentre os nove derivados avaliados, seis apresentaram  $CI_{50}$  abaixo de 5  $\mu$ M (Tabela 12). Os derivados **7**, **8** e **10** com substituições no anel de cinco membros foram os mais ativos com  $CI_{50}$  abaixo de 2  $\mu$ M. A substituição com grupo nitro na posição Z (compostos **8** e **10**) favorece a atividade leishmanicida, comprovada pela baixos valores de  $CI_{50}$ . Convém ressaltar que o composto **8**, o mais ativo da série ( $CI_{50}$  de 0,4  $\mu$ M), foi cerca de quatorze vezes mais efetivo do que a miltefosina e AQ ( $CI_{50}$  de 5,9 e 5,6  $\mu$ M, respectivamente). Dentre os derivados com substituições no anel de seis membros foi possível observar que a presença do grupo imina em diferentes posições (**X**, **Y** e **Z**) interfere na atividade leishmanicida como, por exemplo, na posição **X** resultou no composto menos ativo da série com  $CI_{50}$  de 103,5  $\mu$ M. Outra consideração importante foi que seis dos compostos avaliados foram mais ativos em amastigotas do que a AQ e miltefosina.

**Tabela 12:** Atividade anti-amastigota em *L. braziliensis* dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina.



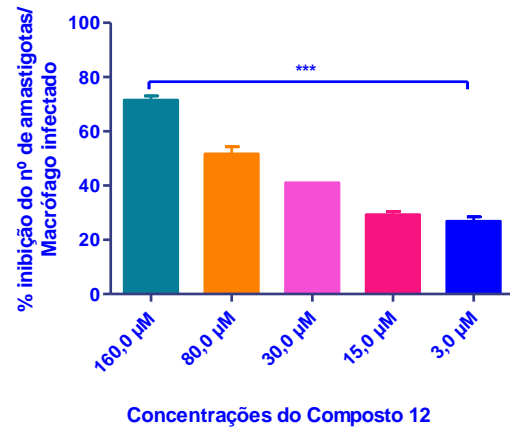
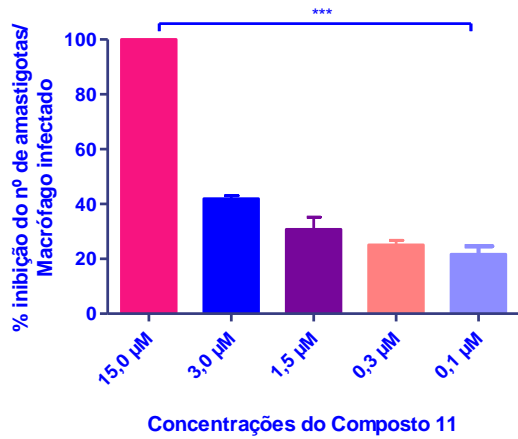
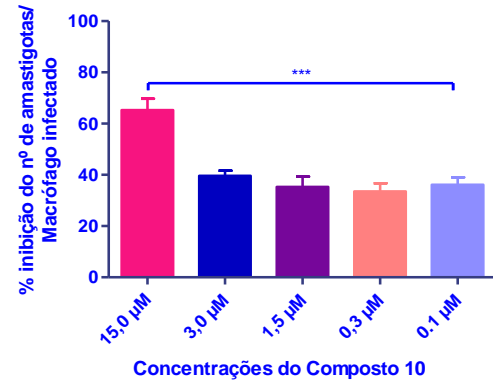
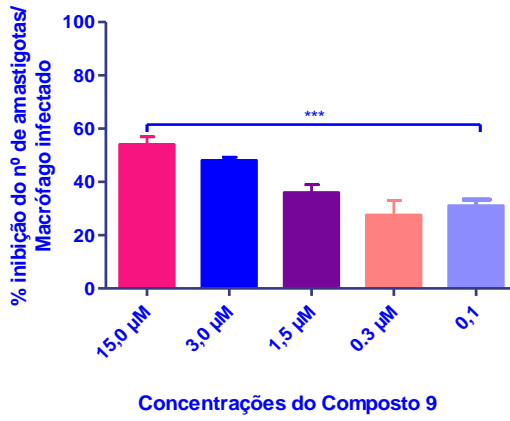
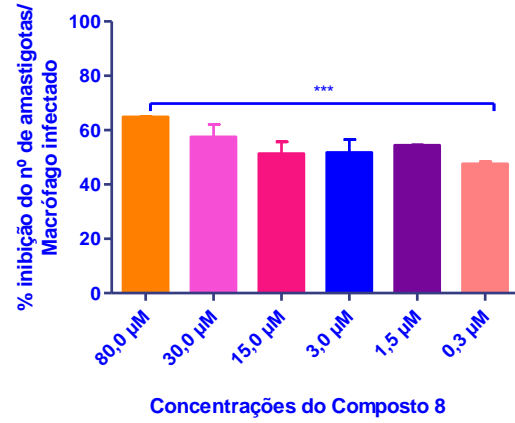
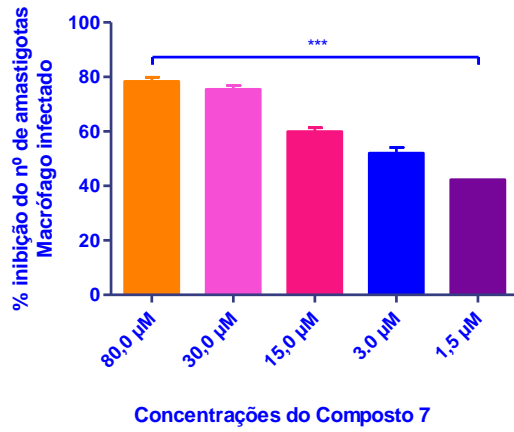
Compostos	X	Y	Z	Cl <sub>50</sub> (μM) (95% I.C.) <sup>a</sup>
7	O	CH	H	1,2 (0,8-1,9)
8	O	CH	NO <sub>2</sub>	0,4 (0,2-0,7)
9	S	CH	H	2,5 (1,8-3,4)
10	S	CH	NO <sub>2</sub>	1,2 (0,8-1,6)
11	NH	CH	H	2,4 (1,6-3,4)
12	NH	N	H	27,1 (21,4-34,2)
13	N	CH	CH	103,5 (75,3-142,3)
14	CH	N	CH	3,5 (2,4-8,5)
15	CH	CH	N	6,7 (3,0-14,8)
<b>AQ</b>				5,6 (4,7-6,8)
<b>AmB</b>				0,06 (0,05-0,08)
<b>Miltefosina</b>				5,9 (5,0-7,1)

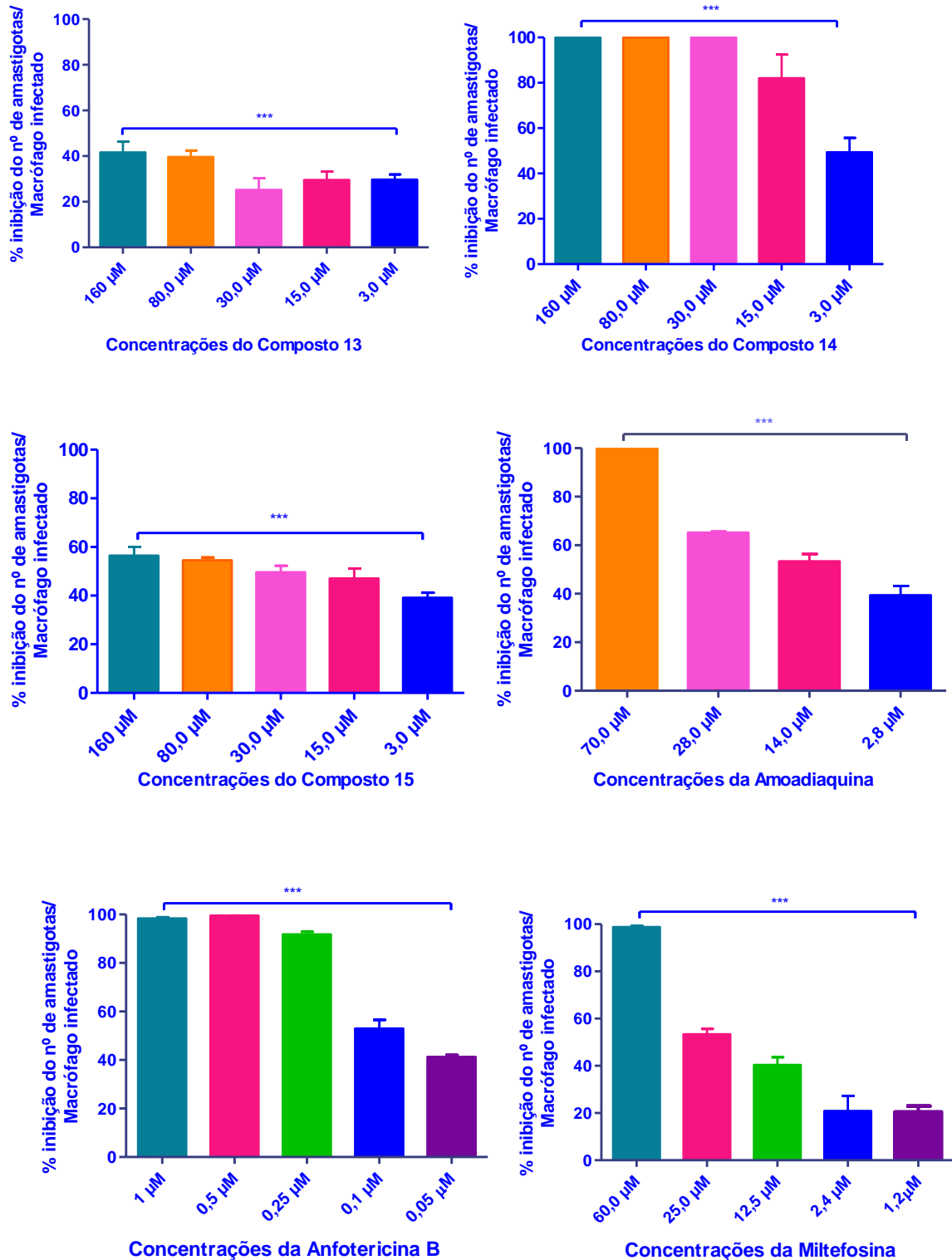
<sup>a</sup>I.C.=Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

AQ=Amodiaquina.

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

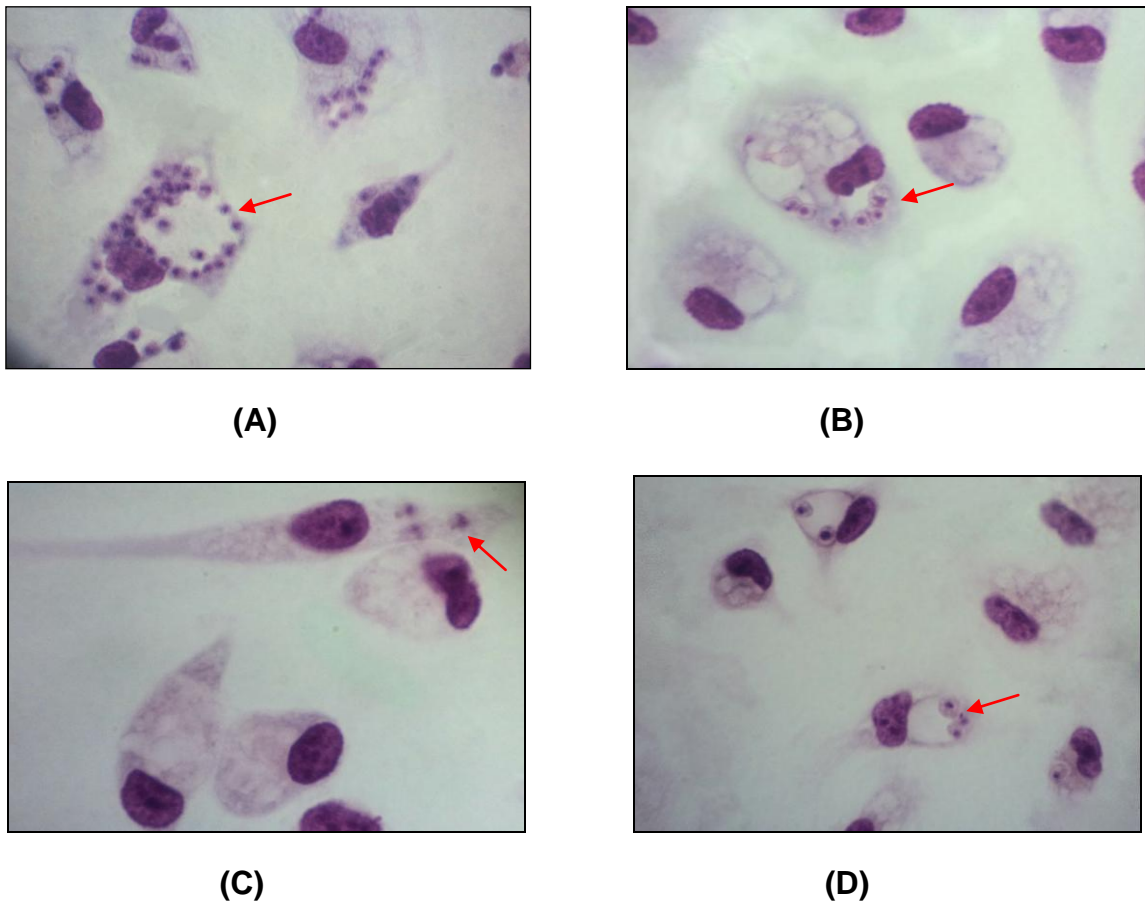
Analisando-se a atividade dos compostos quanto à redução do número de amastigotas/macrófagos, foi possível verificar que, para todos os compostos testados, houve uma redução estatisticamente significativa no número de amastigotas intracelulares após 72 horas de tratamento. Além disso, para a maioria dos compostos foi observado um efeito dose-dependente (Figura 8). O Composto 8 apresentou maior efeito sobre a redução do número de amastigotas visto que até mesmo em concentrações abaixo de micromolar ( $0,3 \mu\text{M}$ ) inibiu em aproximadamente 48% o número de amastigotas intracelulares. Vale a pena destacar também a expressiva atividade do composto 14 que reduziu em 100% o número de amastigotas/macrófagos quando avaliado nas concentrações de 160, 80 e  $30 \mu\text{M}$ . A miltefosina na concentração de  $25 \mu\text{M}$  inibiu em somente 53% o número de amastigotas intracelulares. Dentre os derivados, o composto 13 foi o menos ativo reduzindo em apenas 42% o número amastigotas/macrófago infectado na mais alta concentração avaliada ( $160 \mu\text{M}$ ).





**Figura 8:** Atividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina na redução do nº de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*/macrófago infectado. Resultados mostram a porcentagem de inibição em relação ao controle de macrófago infectado. Todos os resultados foram estatisticamente significativos (\*\*p<0,0001).

A figura 9 exibe resultados representativos da atividade em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* dos compostos **7**, **8** e **10**, os mais ativos da série com  $CI_{50}$  abaixo de  $2 \mu M$ . Pode ser observado que macrófagos infectados e tratados com os compostos na concentração de  $3 \mu M$  apresentaram tanto redução no número de amastigotas intracelulares quanto na porcentagem de macrófagos infectados, sem apresentar alterações típicas de toxicidade as quais podem ser observadas ao microscópio, como perda de adesão as lamínulas e arredondamento celular.



**Figura 9:** Fotomicrografia ilustrativa da atividade anti-amastigota de *L. braziliensis* dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina após 72 horas de tratamento. **(A)** macrófagos infectados com *L. braziliensis* (controle), **(B)** macrófagos infectados e tratados com o composto **7** na concentração de  $3 \mu M$ , **(C)** macrófagos infectados e tratados com o composto **8** na concentração de  $3 \mu M$  e **(D)** macrófagos infectados e tratados com o composto **10** na concentração de  $3 \mu M$ . As setas em vermelho indicam as formas amastigotas de *L. braziliensis*. Aumento de 1000X.

Diante dos resultados obtidos nos ensaios anti-amastigota em *L. braziliensis*, foi determinado o Índice de Seletividade (IS) no intuito de se verificar a seletividade dos compostos para amastigotas quando comparados a citotoxicidade em macrófagos. Analisando-se a tabela 13 pode-se verificar que todos os compostos apresentaram valores de IS superiores a 1,0. Os derivados 7, 8, 14 e 15 foram no mínimo 166,7; 500,0; 57,1 e 29,8 vezes, respectivamente, mais tóxicos para amastigotas em relação a macrófagos.

**Tabela 13:** Seletividade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*.

<b>Compostos</b>	<b>I.S<sup>b</sup></b>
<b>7</b>	>166,7
<b>8</b>	>500,0
<b>9</b>	4,7
<b>10</b>	23,2
<b>11</b>	15,4
<b>12</b>	>7,4
<b>13</b>	>1,9
<b>14</b>	>57,1
<b>15</b>	>29,8
<b>AQ</b>	10,5
<b>AmB</b>	2045,0
<b>Miltefosina</b>	16,9

<sup>b</sup>I.S.=Índice de seletividade calculado pela razão entre o CC<sub>50</sub> para macrófagos e CI<sub>50</sub> para amastigotas.

AQ=Amodiaquina

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

Em relação à especificidade dos compostos para as formas intracelulares e extracelulares de *L. braziliensis*, dentre os nove derivados avaliados, os compostos **7, 8, 14 e 15** apresentaram os maiores valores de IE (21,2; 12,0; >57,1 e >29,8, respectivamente) (Tabela 14).

**Tabela 14:** Especificidade dos derivados heteroaromáticos da amodiaquina para as formas evolutivas de *L. braziliensis*.

<b>Compostos</b>	<b>IE<sup>a</sup> (forma biológica do parasito de atuação do composto)<sup>b</sup></b>
<b>7</b>	21,2 (amastigota)
<b>8</b>	12,0 (amastigota)
<b>9</b>	0,6 (promastigota e amastigota)
<b>10</b>	5,7 (amastigota)
<b>11</b>	1,2 (promastigota e amastigota)
<b>12</b>	>7,4 (amastigota)
<b>13</b>	>1,9 (promastigota e amastigota)
<b>14</b>	>57,1 (amastigota)
<b>15</b>	>29,8 (amastigota)
<b>AQ</b>	3,2 (amastigota)
<b>AmB</b>	2,0 (promastigota e amastigota)
<b>Miltefosina</b>	4,3 (amastigota)

<sup>a</sup>IE=Índice de especificidade foi calculado pela razão entre o CI<sub>50</sub> para promastigota e CI<sub>50</sub> para amastigota intracelular.

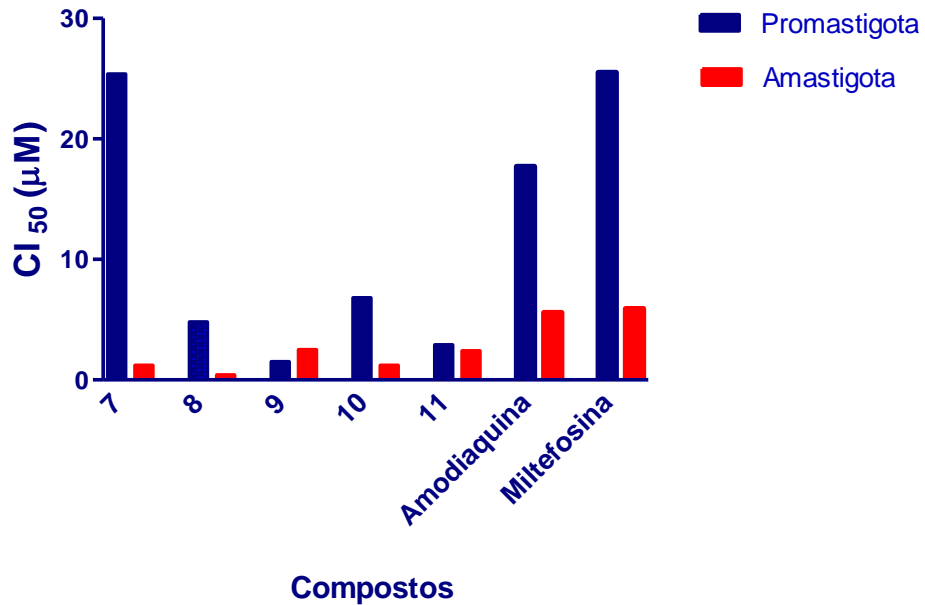
<sup>b</sup>Valores de IE>2,0 indicam que o composto foi mais ativo para amastigota; inferiores a 0,4 foi mais ativo em promastigota e entre 0,4 e 2,0 ativos para ambos os estágios (DE MUYLDER et al., 2011).

AQ=Amodiaquina

AmB (Anfotericina B) e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.



Numa comparação entre a atividade dos derivados heteroaromáticos da AQ em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* pode-se inferir que, de modo geral, os compostos foram mais ativos para as formas intracelulares. A figura 10 compara os valores de  $CI_{50}$  dos compostos que foram mais ativos em ambas as formas evolutivas de *L. braziliensis*.



**Figura 10:** Atividades antipromastigota e anti-amastigota comparativas em *L. braziliensis* de alguns derivados heteroaromáticos da amodiaquina.

## 5 DISCUSSÃO

A atividade leishmanicida de todos os compostos testados neste trabalho foi inicialmente determinada em formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Ensaios com promastigotas apresentam-se como uma alternativa de baixo custo para a triagem inicial de compostos devido às dificuldades existentes na realização dos testes *in vitro* nas formas intracelulares (SIQUEIRA-NETO et al., 2010; DE MUYLDER et al., 2011, TEMPONE; DE OLIVEIRA; BERLINK, 2011). A facilidade de manutenção dos promastigotas em cultura e a existência de ensaios de viabilidade precisos, rápidos, reprodutíveis e de baixo custo permitem a triagem de um elevado número de compostos (BUCKNER; WILSON, 2005; TEMPONE; DE OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Entretanto, como promastigotas são as formas do parasito encontradas no inseto vetor, os mesmos não representam o melhor alvo na busca por fármacos leishmanicidas (CALLAHAN et al., 1997; FUMAROLA, SPINELI, BRANDONISIO, 2004; VERMEERSCH; 2009). Estudos já apontam para a falta de correlação entre a atividade de compostos testados axenicamente em cultura de promastigotas em relação aos testes em amastigotas intracelulares. Além disto, ensaios com promastigotas ocorrem na ausência de células imunes do hospedeiro, que são importantes para a ativação dos mecanismos microbicidas de eliminação do parasito (OSORIO et al., 2011). Outra desvantagem da triagem com promastigotas é a possibilidade de oxidação do substrato MTT na presença de determinados grupamentos químicos dos compostos, resultando em falso-negativos (TEMPONE; DE OLIVEIRA; BERLINCK, 2011). Apesar das desvantagens citadas, ensaios com promastigotas continuam sendo amplamente utilizados em diversas áreas, incluindo estudos acerca da biologia, genoma e bioquímica do parasito (SARDAR et al., 2013, imunologia e mecanismo de ação dos compostos (RIBEIRO, 2011).

Embora os ensaios realizados em amastigotas sejam mais difíceis de serem padronizados e com manipulação em vários dias, existe um consenso entre diversos autores sobre a necessidade de que os testes *in vitro* nas formas intracelulares de *Leishmania* sejam consideradas como padrão-ouro e que os testes com promastigotas sejam utilizados apenas como preliminares (VERMEERSCH et al.,

2009; TEMPONE; DE OLIVEIRA; BERLINCK, 2011). Ensaios em amastigotas fornecem informações acerca da capacidade do composto de atingir em concentrações adequadas o vacúolo parasitóforo, mantendo seu efeito leishmanicida, permitindo também avaliar a atividade citotóxica do fármaco sobre a célula hospedeira (CHANG, 1980; MORISHIGE et al., 1995).

Em relação à atividade antipromastigota de *Leishmania*, observou-se que as diferentes espécies apresentaram variações de sensibilidade em todos os compostos testados. Dentre a série dos derivados de 4-AMQ, os compostos foram mais ativos em *L. major*, principalmente os híbridos com esteroide, se comparados a *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Tabela 3). Já a série dos derivados da AQ foi mais ativa em promastigotas de *L. braziliensis* (Tabela 9). Para ambas as séries, a espécie *L. amazonensis* foi a menos sensível. A diversidade de espécies associadas a infecções em humanos tem importante implicação no tratamento e as diferenças de sensibilidade entre cada espécie devem ser consideradas tanto na triagem *in vitro* quanto no estudo clínico (ESCOBAR et al., 2002; CROFT; OLLIARO, 2011).

Em relação aos compostos 4-AMQ, foi interessante verificar que a conjugação com grupamento esteroide resultou em compostos com melhor atividade leishmanicida que os anteriormente publicados (CARMO et al. 2011). No geral, relacionando-se estrutura química *versus* atividade biológica pode se verificar que a conjugação de derivados de 4-AMQ ao grupo esteroide resultou em aumento significativo da atividade em ambas as formas promastigotas e amastigotas de *L. major* (Tabelas 3 e 6, respectivamente). Neste sentido, vale a pena ressaltar a ação dos compostos 5 e 6, híbridos de 4-AMQ com esteroide, os quais foram cerca de três vezes mais ativos em amastigotas de *L. major* do que seus precursores 2 e 3, respectivamente (Tabela 6). Em relação à citotoxicidade em macrófagos, os compostos 5 e 6 foram cerca de 7 e 19 vezes, respectivamente, mais tóxicos para amastigotas do que para macrófagos (Tabela 4). Estes compostos foram também mais ativos em amastigotas do que a miltefosina, primeiro fármaco oral para o tratamento da LV e principal avanço na terapia das leishmanioses nas últimas décadas (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Assim, neste trabalho, demonstrou-se que a conjugação de dois grupos de grande importância e aplicação biológica como os derivados quinolínicos e derivados esteroidais como o ácido cólico, resultou numa série com atividade

leishmanicida mais expressiva do que seus precursores isolados. A associação de dois grupos farmacofóricos de diferentes moléculas numa mesma estrutura configura-se como uma importante estratégia para o desenvolvimento racional de novos fármacos (VIEGAS JUNIOR et al., 2009). A conjugação de grupamentos numa mesma molécula pode levar ao desenvolvimento de novas estruturas híbridas que mantêm as características farmacológicas da molécula original e permite torná-la mais ativa e direcionada para alvos específicos e, desta forma, aumentar sua atividade específica, minimizando seus efeitos adversos (SAADEH; MOSLEH; MUBARAK, 2009).

Esta nova estratégia tem recebido diferentes denominações como “combinação de terapias”, “drogas híbridas” ou “ligantes direcionados para múltiplos alvos” (“Multi-target-directed ligants”, MTDLs). A respeito desses “híbridos”; a literatura descreve vários protótipos, com destaque para a combinação entre grupos ativos da cloroquina e da imipramina numa droga híbrida que apresentou resultados mais expressivos em *P. falciparum* do que as respectivas estruturas precursoras isoladas (MUSONDA et al., 2009). Saadeh e colaboradores (2009) também desenvolveram uma nova molécula híbrida resultante da combinação entre grupamentos farmacofóricos do metronidazol e da cloroquina com atividade antiparasitária ainda mais significativa se comparado aos fármacos isoladamente.

Diversos estudos já estabeleceram que a membrana de *Leishmania* é formada por microdomínios lipídicos ricos em esteroide; o que abre perspectivas para a investigação do mecanismo de ação de compostos leishmanicidas (ALVES et al., 2003; BEHROUZI-FARDMOGHADAM et al., 2008). O processo de interação droga-membrana é um pré-requisito para a absorção do fármaco antes da molécula ativa atingir o alvo intracelular (SAINT-PIERRE-CHAZALET et al., 2009) e qualquer modificação na composição ou dinâmica da membrana exerce um impacto direto na interação droga-membrana, especialmente quando o fármaco necessita ser solubilizado pela bicamada lipídica antes de alcançar o alvo (MANZANO et al, 2011). Portanto, o aumento da lipofilicidade com a introdução do grupamento esteroide aos derivados 4-AMQ sugere um aumento da afinidade dos compostos pela membrana parasitária, resultando na ampliação da atividade leishmanicida. Além disto, derivados de esteroide tem sido utilizados como aceptores e carreadores de uma variedade de análogos, exibindo natureza anfifílica devido ao grupamento polar

situado em uma extremidade da molécula e ao radical metil de caráter hidrofóbico no outro extremo (PORE et al., 2006).

Outro aspecto relevante é que a reação de conjugação obtida resultou na formação de um heterociclo triazólico de grande interesse, uma vez que são estáveis à degradação metabólica (PORE et al., 2006). Derivados triazólicos têm sido associados a diversas atividades farmacológicas, como antifúngica, antituberculose, antiviral, anti-hipertensiva, antiinflamatória, antidepressiva, antioxidante, antimalárica, dentre outras (KHARB; SHARMA, YAR, 2011). Destacam-se também como fármacos de alta eficácia para o tratamento de doenças de grande impacto econômico e social, como HIV, câncer, Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson (MELO et al., 2006). Resumindo, os híbridos de 4-AMQ com esteroide acumularam numa mesma estrutura química, três importantes grupos com amplo valor biológico, como os derivados quinolínicos, grupo esteroidal (derivado do ácido cólico) e triazol.

Diversos trabalhos já descreveram a atividade leishmanicida de compostos relacionados ao fármaco antimalárico amodiaquina (AQ). Em 2004, De Mello e colaboradores, testaram a atividade de uma série de derivados estruturalmente relacionados à AQ em formas promastigotas de *L. amazonensis*, com o composto mais ativo exibindo um  $CI_{50}$  de 0,12  $\mu$ M. Guglielmo e colaboradores (2009) também avaliaram a atividade de análogos da AQ em formas intracelulares de *L. donovani* e em *P. falciparum*, tendo a maioria dos compostos exibido expressivo perfil de atividade em ambos protozoários, sendo que o composto mais ativo em *Leishmania* apresentou  $CI_{50}$  de 1,9  $\mu$ M. Nosso grupo recentemente demonstrou a atividade antipromastigota de uma série de análogos da AQ tendo o composto mais ativo exibido um  $CI_{50}$  de 2,4; 4,1; 4,0 e 19,1  $\mu$ g/mL em *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major*, respectivamente, sendo mais efetivo do que a AQ e miltefosina (COIMBRA et al., 2011). Assim, não há dúvidas sobre a importância das propriedades biológicas da AQ, abrindo perspectivas interessantes para o estudo do potencial dos derivados da AQ não somente como agentes antimaláricos, mas também como leishmanicidas.

Neste trabalho, derivados de AQ mostraram atividade em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp (Tabelas 9 e 12, respectivamente). Em relação à atividade em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, dentre os

nove compostos avaliados, seis foram mais ativos do que o protótipo AQ e miltefosina. Os ensaios nas formas intracelulares de *Leishmania* foram realizados em *L. braziliensis*, espécie de maior importância epidemiológica para a leishmaniose tegumentar no Brasil (COSTA et al., 2011). Este é o primeiro trabalho a descrever a atividade da AQ e de compostos estruturalmente relacionados ao fármaco em *L. braziliensis*.

É interessante ressaltar que, embora a espécie *L. braziliensis* seja a mais prevalente nas Américas e o mais importante agente etiológico da LC e LCM no Brasil (ZAULI et al., 2012), modelos experimentais *in vitro* com esta espécie são normalmente mencionados pela dificuldade em se avaliar criteriosamente a eficácia de compostos. Isto decorre da baixa capacidade da espécie em infectar macrófagos; além do fato de que as células hospedeiras, quando infectadas, apresentam pequenos vacúolos parasitóforos contendo um ou poucos amastigotas por vacúolo (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Espécies do subgênero *Viannia* caracterizam-se também pela baixa capacidade replicativa em meios de cultura axênicos se comparados a outros subgêneros (SOARES et al., 2005). Ensaios preliminares realizados em nosso laboratório (dados não mostrados) nos levaram a estabelecer a taxa de 10:1 para infecção e avaliação da atividade dos compostos nas formas intracelulares de *L. braziliensis*, uma vez que com esta razão (parasitos/macrófago) foi possível obter, em média, cinco amastigotas por célula infectada com aproximadamente 72% das células infectadas após 72 horas da infecção.

Outro aspecto importante em relação à *L. braziliensis* está relacionado à quimioterapia, visto que o seu tratamento apresenta maior tendência à falha terapêutica quando comparado a outras espécies (ROMERO et al., 2001; AREVALO et al., 2007). O tratamento da LC causada por *L. braziliensis* com antimoniais pentavalentes tem sido acompanhado de crescentes variações na taxa de cura em regiões rurais endêmicas do Brasil (GUIMARÃES et al., 2009). Da mesma forma, a terapia da LC com miltefosina também tem sido relatada como insatisfatória em diferentes países, incluindo o Brasil (MACHADO et al., 2010). Trabalhos recentes sugerem uma forte relação entre a heterogeneidade genética intraespécie com a falha terapêutica associada ao tratamento de infecções causadas por *L. braziliensis* (MACHADO et al., 2010). Vale a pena ainda acrescentar que, dentre as espécies do subgênero *Viannia*, *L. braziliensis* tem grande importância devido ao seu alto grau

de polimorfismo genético e fenotípico (SCHRIEFER et al, 2004). Em 2007, a espécie tornou-se a única do subgênero a ter o seu genoma totalmente sequenciado, o que abre perspectivas para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos com atividade em genes específicos da espécie (PEACOCK et al., 2007).

No que diz respeito aos efeitos tóxicos dos derivados heteroaromáticos da AQ sobre a célula hospedeira de *Leishmania*, a maioria dos compostos apresentou baixa toxidez para macrófagos peritoneais até a máxima concentração avaliada de 200  $\mu$ M (Tabela 10). Além disto, mesmo os compostos 9, 10 e 11 que exibiram efeitos tóxicos para macrófagos, foram ativos em amastigotas de *L. braziliensis* em concentrações muito mais baixas (Tabela 12), o que resultou em valores IS superior a 1,0 (Tabela 13) demonstrando seletividade parasitária. Um trabalho anterior realizado por nosso grupo também comprovou que análogos da AQ exibiram melhor perfil de atividade antipromastigota em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo menos tóxicos para macrófagos do que o protótipo AQ (COIMBRA et al., 2011). Sanchés-Moreno e colaboradores (2011) demonstraram que o glucantime, fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, exibiu valores de IS de apenas 0,5 em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*.

No tratamento da malária, a toxicidade da AQ tem sido associada à presença do radical 4-hidroxilino que sofre oxidação pelo citocromo P-450 (CYP450) hepático, formando o metabólito amodiaquino quinoneimino (AQQI) que é responsável pela mielotoxicidade do fármaco (O'NEIL et al., 1994). O CYP450 são hemoproteínas que catalisam uma variedade de reações químicas incluindo biotransformações de drogas, bioconversão de xenobióticos e síntese de compostos importantes como ácidos graxos e esteroides (BERNHARDT, 2006). Em *L. donovani* foi descrito o CYP450-like, o qual está relacionado a importantes funções do parasito como crescimento, infectividade e respostas a drogas (VERMA; MEHTA; SHAHA, 2011). Uma indicação de que o CYP450 está, de fato, envolvido na sobrevivência da *Leishmania* resulta de estudos em que inibidores do CYP450 como os antifúngicos azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) têm sido utilizados com sucesso como fármacos leishmanicidas (ROBERTS et al., 2003). Neste caso, pode ser sugerido que a AQ e os derivados utilizados neste trabalho, atuem de maneira direta sobre as funções do CYP450 de *Leishmania* ou nas vias metabólicas como, por exemplo, na biossíntese do ergosterol, componente primário da membrana do

parasito e responsável pela manutenção da integridade da membrana e proteção contra o estresse celular (GALEA; BROWN, 2009).

Diversos outros mecanismos de ação das quinolinas em *Leishmania* já foram propostos. Por exemplo, um estudo sugere que a atividade inibitória de quinolinas pode estar relacionada à GDP-manose pirofosforilase, um sistema enzimático responsável pela síntese de glicoconjugados ricos em manose que são essenciais para a sobrevivência e virulência dos amastigotas, estágio clinicamente relevante do parasito. Contudo, esta enzima não é essencial para a sobrevivência dos promastigotas (LACKOVIC et al., 2010). A atividade dos derivados de quinolinas em *Leishmania* também tem sido relacionada à interferência no transporte de elétrons inibindo o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial e produção de radicais oxidativos letais; além da inibição de genes da família das cisteínas proteases, importantes para a virulência do parasito (KOYAMA, 2006).

Neste trabalho, foi demonstrado que tanto compostos 4-AMQ, quanto derivados da AQ demonstraram ausência de correlação entre a atividade antipromastigota e em amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp, reafirmando as diferenças de sensibilidade entre as formas evolutivas do parasito. Em um trabalho recente, De Muylder e colaboradores (2011) estabeleceram um cut-off relacionando a especificidade dos compostos para as diferentes formas evolutivas do parasito. Neste trabalho, a grande maioria dos compostos avaliados apresentou valores de IE maiores que 2,0 (Tabelas **8** e **14**), sendo, portanto, considerados mais ativos para a forma intracelular do parasito. A maioria, inclusive, exibiu valores de IE maiores do que os da anfotericina B e miltefosina. Estes resultados demonstram a elevada especificidade dos derivados de 4-AMQ e da AQ para a forma responsável pelas manifestações clínicas da doença, a qual pode estar associada a uma série de fatores: (1) diferenças metabólicas e bioquímicas entre as duas formas evolutivas de *Leishmania*, o que pode resultar em maior especificidade do composto para amastigotas (PONTE-SUCRE et al., 2007); (2) o fluxo do composto pode ter sido favorecido pela membrana plasmática dos macrófagos, aumentando a concentração intracelular do mesmo em níveis de VP; (3) o composto pode ter sido biotransformado dentro dos macrófagos, originando um metabólito ainda mais ativo (NAKAYAMA et al., 2007), ou ainda, (4) o macrófago sozinho possa ser o alvo de ação direto, resultando na inibição da multiplicação do parasito (VERMEERSCH et



al., 2009; DE MUYLDER et al., 2011). Além disto, estes resultados indicam que a triagem com promastigotas falha na identificação de todos os compostos ativos como anteriormente descrito por De Muylder e colaboradores (2011). Um composto, para ser ativo em amastigota, deve atravessar pelo menos três importantes barreiras celulares formadas pela membrana plasmática do macrófago, membrana do VP e membrana do parasito, além de manter sua estabilidade em condições de pH ácido e na presença de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio encontradas no fagolisossomo. No ensaio antipromastigota, contudo, o parasito é exposto diretamente à ação do composto (SIQUEIRA-NETO et al., 2010).

Ensaio futuros serão realizados em nosso laboratório no intuito de se elucidar o mecanismo de ação dos derivados de 4-aminoquinolinas.

## 6 CONCLUSÕES

A partir deste trabalho foram possíveis as seguintes conclusões:

1- A maioria dos derivados de 4-AMQ e AQ testados possuem um amplo espectro de atividade contra diferentes espécies de *Leishmania* associadas a manifestações tegumentares;

- Em relação aos seis derivados de 4-AMQ avaliados foi possível verificar que a conjugação com o grupo esteroide resultou em aumento significativo da atividade para formas promastigotas e amastigotas de *L. major*;

- Em relação aos nove derivados da AQ avaliados, cinco compostos exibiram atividade em promastigotas de *Leishmania* sp, com valores de  $CI_{50}$  mais expressivos do que a miltefosina. Seis compostos foram mais ativos em amastigotas de *L. braziliensis* do que o protótipo AQ e miltefosina.

2- A maioria dos derivados de 4-AMQ e AQ foram mais seletivos e específicos para amastigotas intracelulares.

Juntos, os expressivos resultados obtidos em formas promastigotas e amastigotas *Leishmania* sp abrem perspectivas para a continuidade do estudo com estas classes de compostos no sentido de se determinar a sua eficácia em modelos de infecção *in vivo*, bem como da elucidação do seu mecanismo de ação. Neste caso, espera-se avaliar mecanismos sugestivos de morte por apoptose e ensaios bioquímicos envolvendo enzimas importantes de *Leishmania* sp, visando-se o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos e não tóxicos para o hospedeiro humano.

## REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J., JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, p. e35671, 2012.

ALVES, L.V.; TEMPORAL, R.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L. Efficacy of a Diarylheptanoid Derivative against *Leishmania Amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 535-555, 2003.

ALVIANO, D.S.; BARRETO, A.L.S.; DIAS, F.A.; RODRIGUES, I.A.; ROSA, M.S.S.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M.A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 1-10, 2012.

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; BACHA, H.A.; NETO, V.A.; NICODEMO, A.C. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v.105, p.1-9, 2008.

ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; LEITE, C.Q.; DA SILVA, A.D.; COIMBRA, E.S.; SALUNKE, D.B. Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 1-28, 2012.

AREVALO, I.; TULLIANO, G.; QUISPE, A.; SPAETH, G.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOSCUENTAS, A. Role of imiquimod and parenteral meglumina antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p.1549-1554, 2007.

AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.C.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.1847-1851, 2001.

AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; CHAPPUIS, F. Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 1846-1851, 2007.

ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; CALVOPINA, M.; MANCHENO, M.; RODRIGUEZ, R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 91, p. 153-160, 2004.

ASILIAN, A.; JALAYER, T.; NILFOROOSHZADEH, M.; GHASSEMI, R.L.; PETO, R.; WAYLING, S.; OLLIARO, P.; MODABBER, F. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 353-359, 2003.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 203-211, 2007.

BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P.M. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, v.10, p. 247-255, 2009.

BEATTIE, L.; KAYE, P.M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us?. **Cellular Microbiology**, v. 13, p. 1659-1667, 2011.

BEHROUZI-FARDMOGHADAM, M.; POORRAJAB, F.; ARDESTANI, S.K.; EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4509-4515, 2008.

BERMAN, J.D.; LEE, L.S. Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 753-759, 1983.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 2, p.1-8, 2008.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 128-145, 2006.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **The Journal of Infectious Diseases**, v.179, p.1485-1494, 1999.

BUCKNER, F.S.; WILSON, A.J. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 600-605, 2005.

BURCHMORE, R.J.S.; BARRET, M.P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1311-1320, 2001.

CALLAHAN, H.L.; PORTAL, A.C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 818-822, 1997.

CARMO, A.M.; SILVA, F.M.; MACHADO, P.A.; FONTES, A.P.; PAVAN, F.R.; LEITE, C. Q.; LEITE, S.R.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D. Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 204-209, 2011.

CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J.R.; MANZANO, J.I.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5344-5351, 2010.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M.L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target- Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 7339-7359, 2009.

CHANG, K.P. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, v. 2209, p. 1240-1242, 1980.

CHANG, K.; REED, S.G.; MCWIRE, B.S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, p. 375-390, 2003.

COIMBRA, E.S.; DA SILVA, A.; DIAS, R.C.; CORRALES, R.N.; BISPO, M.L.F.; KAISER, C.R.; DE SOUZA, M.V.N. Amodiaquine analogs: Synthesis and anti-leishmanial activity. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 3, p. 106-113, 2011.

COIMBRA, E.S.; LIBONG, D.; COJEAN, S.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; SOLGADI, A.; LE MOYEC, L.; DUENAS-ROMERO, A.M.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P.M. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 2548-2555, 2010.

COSTA, C.H.N. Vaccines for the Leishmaniases: Proposals for a Research Agenda. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.5, p. 1-9, 2011.

COSTA, D.L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D.S.; SILVA, N.M.; MILANEZI, C.M.; CARDOSO, C.R.; GIUDICE, Â.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P.; SILVA, J.S. BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of *Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.5, p. 1-11, 2011.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p.502-508, 2003.

CROFT, S.L.; ENGEL, J. Miltefosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S4-S8, 2006.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current Scenario of Drug Development for Leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**. v.123, p. 399-410, 2006.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.111-126, 2006.

CRUZ, A.K.; DE TOLEDO, J.S.; FALADE, M.; TERRÃO, M.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.*: a review. **Current Drug Targets**, v.10, p.178-192, 2009.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.

DEADY, L.W.; DESNEVES, J.; KAYE, A.J.; FINLAY, G.J.; BAGULEY, B.C.; DENNY, W.A. Synthesis and antitumor activity of some indeno[1,2-b]quinoline-based bis carboxamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 977-984, 2000.

DE MELLO, H.; ECHEVARRIA, A.; BERNARDINO, A.M.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L.L. Antileishmanial Pyrazolopyridine Derivatives: Synthesis and Structure–Activity Relationship Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 5427-5432, 2004.

DE MORAIS-TEIXEIRA, E.; DAMASCENO, Q.S.; GALUPPO, M.K.; ROMANHA, A.J.; RABELLO, A. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 475-478, 2011.

DE MOURA, T.R.; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.

DE MOURA, T.R.; OLIVEIRA, F.; NOVAIS, F.O.; MIRANDA, J.C.; CLARÊNCIO, J.; FOLLADOR, I.; CARVALHO, E.M.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C.I. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 1, p. 1-10, 2007.

DE MUYLDER, G.; ANG, K.K.H.; CHEN, S.; ARKIN, M.R.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. 1-9, 2011.

DEN BOER, M.D.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.1471-1477, 2011.

DESRIVOT, J.; HERRENKNECHT, C.; PONCHEL, G.; GARBI, N.; PRINA, E., FOURNET, A.; BORIES, C; FIGADE`RE, B.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P.M. Antileishmanial 2-substituted quinolines: In vitro behavior towards biological components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 441-450, 2007.

DIETZE, R.; CARVALHO, S.F.G.; VALLI, L.C.; BERMAN, J.; BREWER, T.; MILHOUS, W.; SANCHEZ, J.; SCHUSTER, B.; GROGL, M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 685-689, 2001.

EL-ON, J.; HALEVY, S.; GRUNWALD, M.H.; WEINRAUCH, L. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, p. 227-231, 1992.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, p. 151-157, 2002.

EVANS, K.J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

FAKHFAKH, M.A.; FOURNET, A.; PRINA, E.; MOUSCADET, J.F.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R.; FIGADÈRE, B. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Quinolines: Potential Treatment of Protozoal and Retroviral Co-infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 5013-5023, 2003.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.; SOLOMON, A.W. Neglected Tropical Diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2009.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2758-2770, 2011.

FINNEY, D.J. Statistical method in Biological Assay. Academic Press, London, 508p, 1978.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BRUNETON, J. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 859-863, 1993.

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.



FREITAS-JÚNIOR, L.H.; CHATELAIN, E.; KIM, H.A.; SIQUEIRA-NETO, J.L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317-2336, 2009.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v.155, p.224-230, 2004.

GALEA, A.M.; BROWN, A.J. Special relationship between sterols and oxygen: were sterols an adaptation to aerobic life? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 880-889, 2009.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 419-433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 293-307, 2012.

GREENWOOD, B.M.; BOJANG, K.; WHITTY, C.J.; TARGETT, G.A. Malaria. **Lancet**, v. 365, p. 1487-1498, 2005.

GRIEWANK, K.; GAZEAU, C.; EICHHORN, A.; VON STEBUT, E. Miltefosine Efficiently Eliminates *Leishmania major* Amastigotes from Infected Murine Dendritic Cells without Altering Their Immune Functions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 652-659, 2010.

GUERRA, J.A.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M.G.; FERREIRA, L.C.. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. 1-5, 2011.

GUGLIELMO, S.; BERTINARIA, M.; ROLANDO, B.; CROSETTI, M.; FRUTTERO, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; GASCO, A. A new series of amodiaquine analogues modified in the basic side chain with *in vitro* antileishmanial and antiplasmodial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 5071-5079, 2009.

GUIMARÃES, L.H.; MACHADO, P.R.; LAGO, E.L.; MORGAN, D.J.; SCHRIEFER, A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 712-715, 2009.

HAILU, A.; MUSA, A.M.; ROYCE, C.; WASUNNA, M. Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. **PLoS Medicine**, v. 2, p. e211, 2005.

HALDAR, A.K.; SEN, H.P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HOTES, P. J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.6, p. 1-8, 2012.

JHA, T.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; FELTON, J.M.; SABIN, A.J.; HORTON, J.A. phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 1005-1011, 2005.

KAPPAGODA, S.; IOANNIDIS, J.P.A. Neglected tropical diseases: survey and geometry of randomised evidence. **British Medical Journal**, v. 345, p.1-15, 2012.

KAUR, K.; JAIN, M.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; TEKWANI, B.L.; SINGH, S.; SINGH, P.P.; JAIN, R. Synthesis, Antiprotozoal, Antimicrobial,  $\beta$ -Hematin Inhibition, Cytotoxicity and Methemoglobin (MetHb) Formation Activities of Bis(8-aminoquinolines). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 197-210, 2011.

KAUR, K.; JAIN, M.; REDDY, R.P.; JAIN, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3245-3264, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature reviews/Microbiology**, v.9, p.604-615, 2011.

KEDZIERSKI, L., 2010. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, p. 177-185, 2010.

KHARB, R.; SHARMA, P.C.; YAR, M.S. Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 1-21, 2011.

KIMA, P. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1087-1096, 2007.

KOYAMA, J. Anti-infective quinone derivatives of recent patents. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 1, p. 113-125, 2006.

KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; KUMAR, D.; NEGI, N.S.; SALOTRA, P. Antimony-Resistant Clinical Isolates of *Leishmania donovani* are Susceptible to Paromomycin and Sitamaquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 2916-2921, 2011.

LACKOVIC, K.; PARISOT, J.P.; SLEEBES, N.; BAELL, J.B.; DEBIEN, L.; WATSON, K, G.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E.; STREET, J.P.; KEDZIERSKI, L. Inhibitors of *Leishmania* GDP-Mannose Pyrophosphorylase Identified by High-Throughput Screening of Small-Molecule Chemical Library. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 1712-1719, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Academic Press, p. 1-20, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis-The Neotropical *Leishmania* Species. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, v. 5, p. 242-266, 1998.

LEON, L.L.; MACHADO, G.M.; PAES, L.E.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 678-680, 1990.

LIMA, M.I.; ARRUDA, V.O.; ALVES, E.V.; DE AZEVEDO, A.P.; MONTEIRO, S.G.; PEREIRA, S.R. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 227-232, 2010.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v.114, p. 256-265, 2005.

LOEHBERG, C.R.; STRISSEL, P.L.; DITTRICH, R.; STRICK, R.; DITTMER, J.; DITTMER, A.; FABRY, B.; KALENDER, W.A.; KOCH, T.; WACHTER, D.L.; GROH, N.; POLIER, A.; BRANDT, I.; LOTZ, L.; HOFFMANN, I.; KOPPITZ, F.; OESER, S.; MUELLER, A.; FASCHING, P.A.; LUX, M.P.; BECKMANN, M.W.; SCHRAUDER, M.G. Akt and p53 are potential mediators of reduced mammary tumor growth by cloroquine and the mTOR inhibitor RAD001. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 480-488, 2012.

LOISEAU, P.M.; GUPTA, S.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; PURI, S.K.; SLIMAN, F.; NORMAND-BAYLE, M.; DESMAELE, D. *In Vitro* Activities of New 2-Substituted Quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 55, p. 1777-1780, 2011.

LÓPEZ-MARTÍN, C.; PÉREZ-VICTORIA, J.M.; CARVALHO, L.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Sitamaquine Sensitivity in *Leishmania* Species Is Not Mediated by Drug Accumulation in Acidocalcisomes. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 52, p.4030-4036, 2008.

LÓPEZ-MARTIN, C.; PÉREZ-VICTORIA, J.M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 4030-4036, 2008.

LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHL, K.; TINTAYA, K.W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS**, v. 104, p. 9375-9380, 2007.

MACHADO, P.R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, I.H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A.T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R.S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E.M.. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, p. e912, 2010.

MALTEZOU, H.C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

MALTEZOU, H.C. Visceral Leishmaniasis: Advances in Treatment. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 3, p. 192-198, 2008.

MANZANO, J.I.; CARVALHO, L.; PE´REZ-VICTORIA, J.M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2562-2565, 2011.

MARINHO, F.A.; GONÇALVES, K.C.; OLIVEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; BELLIO, M.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L, BRANQUINHA, M.H. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 507-509, 2011.

MCCONVILLE, M.J., SOUZA, D.; SAUNDERS, E.; LIKIC, V.A., NADERER, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **TRENDS in Parasitology**, v. 23, p. 368-375, 2007.

MEHEUS, F.; BALASEGARAM, B.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; FAIZ, M. A.; BOELAERT, M. Cost-Effectiveness Analysis of Combination Therapies for Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.4, p. e818, 2010.

MELAKU, Y.; COLLIN, S.M.; KEUS, K.; RITMEIJER, K.; DAVIDSON, R.N. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 89-94, 2007.

MELO, J.O.F.; DONNICI, C.L; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, M.L.G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-Triazólicos: Histórico, Métodos de preparação, Aplicações e Atividade Farmacológica. **Química Nova**, v. 3, p. 569-579, 2006.

MILLER, A.V.; RANATUNGA, S.K. Immunotherapies in rheumatologic disorders. **The Medical clinics of North America**, v. 96, p. 475-496, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde, 2012.  
[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/3252/415/glossario-de-doencas-\\_doencas-de-a-a-z.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/3252/415/glossario-de-doencas-_doencas-de-a-a-z.html). Acesso em 20 de outubro de 2012.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, p. 150-158, 2007.

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.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9-19, 2009.

MORISHIGE, K.; AJI, T.; ISHII, A.; YASUDA, T.; WATAYA, Y. *Leishmania donovani*: pilot study for evaluation of therapeutic effects of inosine analogs against amastigotes in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 665-671, 1995.

MOUSCADET, J.F.; DESMAËLE, D. Chemistry and structure-activity relationship of the styrylquinoline-type HIV integrase inhibitors. **Molecules**, v. 15, p. 3048-3078, 2010.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; PAL, M. Quinolines: a new hope against inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 1-6, 2012.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

MUSONDA, C.C.; WHITLOCK, G.A.; WITTY, M.J.; BRUN, R.; KAISER, M. Chloroquine-astemizole hybrids with potent *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 481-484, 2009.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M.J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 301-308, 2008.

NAKAYAMA, H.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A.; LOISEAU, P. M. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial efficacy of a new nitroquinoline against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v, 61, p. 186-188, 2007.

NAKAYAMA, H.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; TORRES DE ORTIZ, S.; SCHININI, A.; SERNA, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; FAKHFAKH, M.A.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Efficacy of Orally Administered 2-Substituted Quinolines in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p. 4950-4956, 2005.

NANAYAKKARA, N.P.; AGER, A.L.JR.; BARTLETT, M.S.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; KHAN, I.A.; MCCHESENEY, J.D.; WALKER, L.A. Antiparasitic Activities and Toxicities of Individual Enantiomers of the 8-Aminoquinoline 8-[(4-Amino-1-Methylbutyl)Amino]-6-Methoxy-4-Methyl-5-[3,4-Dichlorophenoxy]Quinoline Succinate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p. 2130-2137, 2008.

NEAL, R.A.; ALLEN, S.; MCCOY, N.; OLLIARO, P.; CROFT, S.L. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, p.577-584, 1995.

O'NEILL, P.M.; HARRISON, A.C.; STORR, R.C.; HAWLEY, S.R.; WARD, S.A.; PARK, B.K. The effect of fluorine substitution on the metabolism and antimalarial activity of amodiaquine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 1362-1370, 1994.

OSORIO, Y.; TRAVI, B.L.; RENSLO, A.R.; PENICHE, A.G.; MELBY, P.C. Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel ex vivo splenic explant model system. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. 1-12, 2011.

PACIENZA-LIMA, W. (2012). **Uso de sistemas micro e nanoparticulados para o tratamento localizado da leishmaniose cutânea com Anfotericina B**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PALIT, P.; PAIRA, P.; HAZRA, A.; BANERJEE, S.; GUPTA, A.D.; DASTIDAR, S.G.; MONDAL, N. B. Phase transfer catalyzed synthesis of bis-quinolines: Antileishmanial activity in experimental visceral leishmaniasis and *in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1-9, 2008.

PALOQUE, L.; VERHAEGHE, P.; CASANOVA, M.; CASTERA-DUCROS, C.; DUMETRE, A.; MBATCHI, L.; HUTTER, S.; M'RABET, M.K.; LAGET, M.; REMUSAT, V.; RAULT, L.; RATHELOT, P.; AZAS, N.; VANELLE, P. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, p.1-12, 2012.

PALUMBO, E. Oral Miltefosine Treatment in Children With Visceral Leishmaniasis: a Brief Review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 2-4, 2008.

PARIS, C.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 852-859, 2004.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J.C.; QUAIL, M.A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M.A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S.L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.P.; OYOLA, S.O.; HILLEY, J.D.; BRITO, L.O.; TOSI, L.R.; BARRELL, B.; CRUZ, A.K.; MOTTRAM, J.C.; SMITH, D.F.; BERRIMAN, M.. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 839-847, 2007.

PISCOPO, T.V.; MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 649-657, 2006.

PONTE-SUCRE, A.; FABER, J.H.; GULDER, T.; KAJAHN, I.; PEDERSEN, S.E.; SCHULTHEIS, M.; BRINGMANN, G.; MOLL, H. Activities of Naphthylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 188-194, 2007.

PORE, V.S. ; AHER, N.G. ; KUMAR, M. ; SHUKLA, P.K. Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction. **Tetrahedron**, v. 62, p. 11178-11186, 2006.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; NUNES DE JESÚS, E.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis. **Quimica Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.



READY, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Siveill**, v. 15, p. 1-11, 2010.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania (L.) amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 15-23, 2008.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007.

REITHINGER, R. Leishmaniasis' Burden of Disease: Ways Forward for Getting from Speculation to Reality. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 1-4, 2008.

RIBEIRO, G.A. (2011). **Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis***. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

RIBEIRO-GOMES, F.L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-8, 2012.

ROBERTS, C.W.; MCLEOD, R.; RICE, D.W.; GINGER, M.; CHANCE, M.L.; GOAD, L.J. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.129-142, 2003.

ROMERO, G.A.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G.; MACÊDO, V.O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimonate. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 456-465, 2001.

RONET, C.; BEVERLEY, S.M.; FASEL, N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World. **Virulence**, v. 2, p. 547-552, 2011.

ROY, P.; DAS, S.; AUDDY, R.G.; MUKHERJEE, A. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 6, p. 73-87, 2012.

RUIZ, J.H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, p.671-678, 2007.

SAADEH, H.A.; MOSLEH, I.M.; MUBARAK, M.S. Synthesis of Novel Hybrid Molecules from Precursors With Known Antiparasitic Activity. **Molecules**, v.14, p.1483-1494, 2009.

SAHU, N.P.; PAL, C.; MANDAL, N.B.; BANERJEE, S.; RAHA, M.; KUNDU, A.P.; GHOSH, M.; ROY, K.; BANDYOPADHYAY, S. Synthesis of a novel quinoline derivative, 2-(2-methylquinolin-4-ylamino)-N-phenylacetamide--a potential antileishmanial agent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1687-1693, 2002.

SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; BEN BRAHIM, M.; LE MOYEC, L.; BORIES, C.; RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P.M. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 993-1001, 2009.

SALOTRA, P.; SINGH, R. Challenges in the diagnosis of post kalaazar dermal leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p.295-310, 2006.

SÁ, M.J.; CHONG, J.L.; WELLEMS, T.E. Malaria drug resistance: new observations and developments. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 137-160, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; SANZ, A.M.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; YUNTA, M.J.R. *In vitro* leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 387-397, 2011.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, p.1-10, 2008.

SARDAR, A.H.; KUMAR, S.; KUMAR, A.; PURKATT, B.; DAS, S.; SEN, A.; KUMAR, M.; SINHA, K.K.; SINGH, D.; EQUIBAL, A.; ALI, V.; DAS, P. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. **Journal of Proteomics**, v. 81, p. 186-199, 2013.

SCARISBRICK, J.J.; CHIODINI, P.L.; WATSON, J.; MOODY, A.; ARMSTRONG, M.; LOCKWOOD, D.; BRYCESON, A.; VEGA-LÓPEZ, F. Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, p. 14-21, 2006.

SCHRIEFER, A.; SCHRIEFER, A.L.; GÓES-NETO, A.; GUIMARÃES, L.H.; CARVALHO, L.P.; ALMEIDA, R.P.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.A.; DE JESUS, A.R.; RILEY, L.W.; CARVALHO, E.M. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 508-514, 2004.

SEIFERT, K.; CROFT, S.L. *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 73-79, 2006.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p.31-39, 2011.

SHAKYA, N.; BAJPAI, P; GUPTA, S. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, p. 104-112, 2011.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHUKLA, A.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 49-58, 2012.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 485-497, 2012.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, p. 307-315, 2004.

SIQUEIRA-NETO, J.L.; SONG, O.R.; OH, H.; SOHN, J.H.; YANG, G.; NAM, J.; JANG, J.; CECHETTO, J.; LEE, C.B.; MOON, S.; GENOVESIO, A.; CHATELAIN, E.; CHRISTOPHE, T.; FREITAS-JUNIOR, L.H. Antileishmanial High-Throughput Drug Screening Reveals Drug Candidates with New Scaffolds. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, p.1-8, 2010.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 139-149, 2004.

SOARES, R.P.P.; SOARES, R.P.; CARDOSO, T.L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M.S.; PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 245-253, 2005.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R.E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

SUNDAR, S.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; AGRAWAL, N.; VAILLANT, M.; OLLIARO, P.; MURRAY, H.W. New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 1000-1006, 2008.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; BHATTACHARVA, S.K.; RAI, M. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1739-1746, 2002.

TEMPONE, A.G.; DE OLIVEIRA, C.M.; BERLINCK, R.S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Medica**, v. 77, p. 572-585, 2011.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. e525-e532, 2011.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug Development for Neglected Diseases: A Deficient Market and a Public-Health Policy Failure. **The Lancet**, v. 359, p. 2188-2194, 2002.

TURETZ, M.L.; MACHADO, P.R.; KO, A.I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R.P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1829-1834, 2002.

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

VANGAPANDU, S.; JAIN, M.; JAIN, R.; KAUR, S.; SINGH, P.P. Ring-substituted quinolines as potential anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2501-2508, 2004.

VARELLA-M,R.E.; VILLA-PULGARIN, J.A.; YEPES, E.; MÜLLER, I.; MODOLELL, M.; MUÑOZ, D.L.; ROBLEDO, S.M.; MUSKUS, C.E.; LÓPEZ-ABÁN, J.; MURO, A.; VÉLEZ, I.D.; MOLLINEDO, F. In Vitro and In Vivo Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, p. 1-14, 2012.

VERCESI, A.E.; DOCAMPO, R.  $Ca^{2+}$  transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of  $Ca^{2+}$ , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **The Biochemical Journal**, v. 284, p. 463-467, 1992.

VERMA, N.K.; DEY, C.S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3010-3015, 2004.

VERMA, S.; MEHTA, A.; SHAHA, C. CYP5122A1, a Novel Cytochrome P450 Is Essential for Survival of *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, v. 6, e 25273, 2011.

VERMEERSCH, M.; LUZ, R.I.; TOTE, K.; TIMMERMANS, J.; COS, P.; MAES, L. *In Vitro* Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 3855-3859, 2009.

VIEGAS JUNIOR, C.; NICASTRO, P.C.; FOSSALUZZA, P.C.; GOMES, C.P.; SANTOS, L.A.; BOLZANI, V.S.; PIVATTO, M.; DA SILVA, D.J.C.; MELO, G.M.A.; DA SILVA, Y.K.C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; DA COSTA, R.S.; AREAS, T.F.M.; CASTRO, N.G. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 117-127, 2009.

VIEIRA, N.C.; HERRENKNECHT, C.; VACUS, J.; FOURNET, A.; BORIES, C.; FIGADÈRE, B.; ESPINDOLA, L.S.; LOISEAU, P.M. Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 684-689, 2008.

WASUNNA, M.K.; RASHID, J.R.; MBUI, J.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; LODENYO, H.; FELTON, J.M.; SABIN, A.J.; HORTON, J. A phase ii dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 871-876, 2005.

WHO. 2010. Technical Report Series, 949. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/>. Acesso em: 16 de dezembro de 2012.

WHO, 2012. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 1 de março de 2012.

WHO, 2013. **Control of Neglected Tropical Diseases**. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). Acesso em: 26 de janeiro de 2013.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 39925-39932, 2004.

YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J.C.; KOIRALA, S.; RIJAL, S.; MIRANDA, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 272-275, 2005.

YARDLEY, V.; GAMARRO, F.; CROFT, S.L. Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of the 8-Aminoquinoline Tafenoquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5356-5358, 2010.

ZAULI-NASCIMENTO, R.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; PEREIRA, L.I.; PELLI DE OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M.L.;

ULIANA, S.R. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, p. 68-76, 2010.

ZAULI, R.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; MIGUEL, D.C.; MOURA, A.S.; PEREIRA, L.I.A.; DA SILVA, I.A. JR.; LEMES, L.G.; DORTA, M.L.; DE OLIVEIRA, M.A.; PITALUGA, A.N.; ISHIKAWA, E.A.; RODRIGUES, J.C.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; BIJOVSKY, A.T.; RIBEIRO-DIAS, F.; ULIANA, S.R. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1-12, 2012.

ZHU, X.Y.; MARDENBOROUGH, L.G.; LI, S.; KHAN, A.; ZHANG, W.; FAN, P.; JACOB, M.; KHAN, S.; WALKER, L.; ABLORDEPPEY, S.Y. Synthesis and Evaluation of Isosteres of N-Methyl Indolo[3, 2-b]-quinoline (Cryptolepine) as New Antiinfective Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.686-695, 2007.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A: Artigo publicado

ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; LEITE, C.Q.; DA SILVA, A.D.; COIMBRA, E.S.; SALUNKE, D.B. Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 1-28, 2012.

### APÊNDICE B: Artigo publicado

COIMBRA, E.S.; ANTINARELLI, L.M.R.; DA SILVA, A.D.; BISPO, M.L.F.; KAISER, C.R.; DE SOUZA, M.V. 7-Chloro-4-quinolinylyl Hydrazones: A Promising and Potent Class of Antileishmanial Compounds. **Chemical Biology and Drug Design**, 2013.



## ORIGINAL ARTICLE

## Open Access

## Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline

Luciana MR Antinarelli<sup>1†</sup>, Arturene ML Carmo<sup>2†</sup>, Fernando R Pavan<sup>3</sup>, Clarice Quelco F Leite<sup>3</sup>, Adilson D Da Silva<sup>2\*</sup>, Elaine S Coimbra<sup>1</sup> and Deepak B Salunke<sup>4</sup>**Abstract**

**Background:** Aminoquinoline/steroid conjugates were synthesized based on the fact that steroid transporters have been shown to accept and carry a variety of drugs. So, in continuing our research of antileishmanial and antitubercular drugs, aminoquinoline/steroid conjugates (12, 13, and 14) were regioselectively synthesized via 1, 3-dipolar cycloaddition of alkynes 3, 5, and 7 with azide 12. The aminoquinoline/steroids conjugates were evaluated *in vitro* against *Leishmania major* and *Mycobacterium tuberculosis*.

**Results:** Regioselective synthesis of the novel aminoquinoline/steroid conjugates was achieved in very high yield. All aminoquinoline/steroid conjugates (12, 13, and 14) exhibited best results against *Leishmania* and *M. tuberculosis* than the respective alkyne intermediate structures (3, 5, and 7, respectively). Among them, the compound 12 exhibited the best activity for *M. tuberculosis* (MC = 8.8 μM). This result is comparable to drugs commonly used in tuberculosis treatment. Also, for antileishmanial assay, the aminoquinoline/steroid conjugates demonstrated a significant activity against promastigote and amastigote forms of *L. major*.

**Conclusions:** Addition of a steroid group to aminoquinoline molecules enhanced the leishmanicidal and antitubercular activities. These results highlight the importance of steroids as carrier.

**Keywords:** Antileishmanial drugs, Antituberculosis drugs, Click chemistry, Quinoline, Steroid

**Background**

Quinolines are among the most important antimalarial drugs ever used [1,2]. In addition, quinoline derivatives have also demonstrated a variety of biological properties that includes antiviral, anti-inflammatory, antitubercular, and antileishmanial activities [2-5]. Leishmaniasis is a disease caused by parasitic protozoans of the genus *Leishmania*. Over 20 different *Leishmania* species can infect humans and cause a wide spectrum of symptoms. It has an estimated prevalence of 12 million cases worldwide, which is continuing to increase, with 1.5–2 million new cases each year [6]. With no available vaccine, the chemotherapy is a major control for the disease. However, the treatment options are severely limited and first line treatment is based on pentavalent antimonials that have been used in therapeutics for more than half a century [7]. Tuberculosis (TB)

is another important neglected disease. TB is more prevalent in the world today than at any other time in human history. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the pathogen responsible for TB, uses diverse strategies to survive in a variety of host lesions and to evade immune surveillance [7,8]. The last 20 years have seen the worldwide appearance of multidrug-resistant TB, followed by extensively drug-resistant TB, and most recently, strains that are resistant to all antituberculosis drugs [9]. Since the discovery of rifampicin (1960), no new drugs have been developed specifically against mycobacteria [10]. Also, only within the last few years some promising drug candidates have emerged [11]. Considering the inefficacy and the high toxicity of the currently used drugs for the treatment of these infectious diseases, as well as the emergence of drug-resistant strains of the causative organisms, the development of new leishmanicidal and antitubercular agents is extremely important.

Bioconjugation has emerged as a fast growing technology and aims at the ligation of two or more molecules to form new complexes with the combined properties of their individual components [12]. To make this linkage,

\* Correspondence: davidasilva@ufjf.edu.br

†Equal contributors

<sup>2</sup>Departamento de Química, LCE, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

the 1,2,3-triazole moieties are attractive as connecting units, since they are stable to metabolic degradation and capable of hydrogen bonding, which can be favorable in binding to biomolecular targets and also improves solubility [13]. Although the 1,2,3-triazole structural moiety does not occur in nature, the synthetic molecules containing the 1,2,3-triazole unit show diverse biological activities including antibacterial, herbicidal, fungicidal, anti-allergic, and anti-HIV [14]. Aminoquinoline/cholic acid conjugates were synthesized based on the fact that steroid transporters have been shown to accept and carry a variety of drugs [15]. Cholic acid is the most common form of the steroid and its derivatives are known to exhibit antimicrobial activities [16]. Bile acids are amphiphilic molecules which may represent alternatives for chemotherapeutic agents by acting synergistically with antibiotics as membrane permeabilizers [17-21]. Moreover, several bile acid/drug conjugates are shown to possess better activity than the precursor [22,23].

In a previous study, we demonstrate that 4-amino-7-chloroquinoline derivatives showed an interesting antileishmanial and anti-MTB activities [24]. In continuation of this study were synthesized aminoquinoline conjugate with steroids in the expectation of improving its biological activity.

## Methods

### General experimental techniques and apparatus

TLC was performed on precoated silica gel F254 plates (0.25 mm; E. Merck). Infrared spectra were recorded on Shimadzu 8400 series FTIR instrument. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 and 500 spectrometers at 300.13 and 500.13 MHz and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 at 75 MHz. The chemical shifts are given in parts per million relative to tetramethylsilane. Mass spectra were recorded on LC-MS/MS-TOF API QSTAR PULSAR spectrometer, and samples were introduced by infusion method using Electro spray Ionization Technique. Standard work up: after extraction of all the reactions, the organic extracts were washed with water and brine and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuum.

### Synthesis of terminal acetylenes

#### General synthetic procedure for *N*-(7-chloroquinolin-4-yl)alkyl-diamine (2, 4, and 6)

A mixture of 4,7-dichloroquinoline (2.0 g, 10.1 mmol) and the corresponding diamines (50.0 mmol), ethane-1,2-diamine, propane-1,3-diamine, or buthane-1,4-diamine, was heated at 80°C for 1 h without stirring for 1 h and then at 110°C for 4–6 h with continued stirring to drive the reaction to completion. The reaction mixture was cooled to room temperature and diluted with dichloromethane. The organic layer was successively

washed with 5% NaOH (30 mL) followed by water wash and then finally with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was removed under reduced pressure to afford the compounds 2, 4, and 6, at 80–90% yield.

*N*-(7-chloroquinolin-4-yl)ethane-1,2-diamine (2) [25]: Yellow solid, yield: 90%; mp = 141°C (145–147°C).

*N*-(7-chloroquinolin-4-yl)propane-1,3-diamine (4) [25]: Yellow solid, yield: 90%; mp = 97°C (96–98°C) [25].

*N*-(7-chloroquinolin-4-yl)butane-1,4-diamine (6) [25]: Yellow solid, yield: 80%; mp = 123°C (122–124°C).

#### General synthetic procedure for 7-chloro-*N*-(3-(prop-2-ynylamino)alkyl)quinolin-4-amine (3, 5, and 7)

The compounds 2, 4, and 6 (6.8 mmol) and propargyl bromide (13.6 mmol), in presence of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (13.6 mmol), were dissolved in EtOH (5.0 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h and then at 25°C for 48 h. Solvent was removed in vacuum until dry. The crude reaction product was purified by flash chromatography (eluent: MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:95) producing the compounds 3, 5, and 7, respectively (2.5 mmol) in 60% yield as yellow solid.

7-chloro-*N*-(2-(prop-2-ynylamino)ethyl)quinolin-4-amine (3) [24]: Yield: 60%, mp = 99°C.

7-chloro-*N*-(3-(prop-2-ynylamino)propyl)quinolin-4-amine (5) [24]: Yield: 60%, mp = 75°C.

7-chloro-*N*-(4-(prop-2-ynylamino)butyl)quinolin-4-amine (7) [24]: Yield: 62%, mp = 72°C.

### Synthesis of terminal azide

#### Synthesis of methyl 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholane-24-oate (9)

Compound 9 was synthesized in overall good yield starting from bile acid 8 using the literature procedure [24]. White solid, m.p. 158°C.

*Methyl-3 $\alpha$ -mesyloxy-7 $\alpha$ -12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholane-24-oate (10)* [23]: To a solution of 9 (2.0 g, 4.92 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added triethylamine (6.4 mL, 49.2 mmol) at 0°C. Methane sulfonyl chloride (0.5 mL, 4.92 mmol) was added dropwise for 10 min at 0°C. The reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub>, water, and brine. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (AcOEt/Hex 2:8) to obtain pure product 7 (1.9 g).

#### Synthesis of methyl-3 $\beta$ -azido-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholane-24-oate (11)

The compound 10 was reacted with NaN<sub>3</sub> (5 equiv) in DMF for 24 h at 120°C to give product 11 [23]. White solid, m.p. 175°C.

**General procedure for cycloaddition (12-14)**

The alkyne **3**, **5**, or **7** (1 equiv) and the azide **11** (1.3 equiv) were dissolved in DMSO/H<sub>2</sub>O 4:1 (5 mL). To this solution, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.05 equiv) and sodium ascorbate (0.40 equiv) were added. The reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature and it was then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub>, water, and brine. The solvent was evaporated under reduced pressure and crude product was purified by column chromatography on silica gel using 30% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> system to obtain aminoquinoline/bile acid conjugates **12**, **13**, or **14**, respectively, linked with 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole in 60% yield.

**Methyl 3β-(N-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethylamino)ethyl-1 H-1,2,3-triazol-1-yl)]7α-12α-dihydroxy-5β-cholane-24-oate (12)**: Yellow crystalline solid; m.p. 128°C,  $\nu_{\max}$  (KBr): 3340 (NH), 2930 (CH); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 8.31 (d, 1 H,  $J_{2,3}$  = 4 Hz, H-2'); 8.08 (d, 1 H,  $J_{5,6}$  = 6 Hz, H-5'); 7.88 (s, 1 H, H-4" triazole); 7.73 (s, 1 H, H-8"); 7.37 (dd, 1 H,  $J_{6,5}$  = 6 Hz,  $J$  = 2 Hz, H-6'); 6.51 (d, 1 H,  $J_{3,2}$  = 4 Hz, H-3'); 4.53 (s, 1 H, H-12); 3.60 (s, 1 H, H-7); 3.89 (s, 2 H, H-3"); 3.49 (s, 3 H, H-25); 3.45 (m, 2 H, H-1"); 2.93 (m, 2 H, H-2"); 0.97 (d, 3 H,  $J$  = 6 Hz, H-21); 0.76 (s, 3 H, H-18); 0.65 (s, 3 H, H-19); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 176.4 (C-24); 152.6 (C-4'); 152.0 (C-2'); 149.3 (C-9'); 146.3 (C-3" triazole); 136.3 (C-7); 127.3 (C-8); 125.9 (C-6); 124.3 (C-4" triazole); 123.3 (C-5'); 118.6 (C-10'); 99.5 (C-3'); 73.7 (C-12); 68.7 (C-7); 58.2 (C-3); 51.8 (C-13); 48.8 (C-25); 47.1 (C-2); 23.3 (C-21); 17.4 (C-19); 12.8 (C-18); HRMS ESI [M + H]<sup>+</sup>: m/z: Calc for C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl 707.4052 [M + H]<sup>+</sup>, found 707.4059 [M + H]<sup>+</sup>.

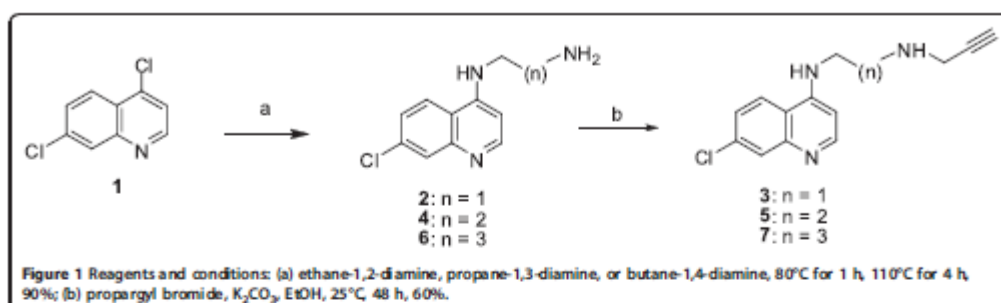
**Methyl 3β-(N-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]propylamino)ethyl-1 H-1,2,3-triazol-1-yl)]7α-12α-dihydroxy-5β-cholane-24-oate (13)**: Yellow oil;  $\nu_{\max}$  (KBr): 3345 (NH), 2928 (CH); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.38 (d, 1 H,  $J_{2,3}$  = 4 Hz, H-2'); 7.87 (s, 1 H, H-8"); 7.74 (d, 1 H,  $J_{5,6}$  = 6 Hz, H-5'); 7.52 (s, 1 H, H-5" triazole); 7.20 (dd, 1 H,  $J_{6,5}$  = 6 Hz,  $J$  = 2 Hz, H-6'); 6.27 (d, 1 H,  $J_{3,2}$  = 4 Hz, H-3'); 4.53 (s, 2 H, H-4"); 3.87 (s, 1 H, H-7); 3.65 (s, 3 H, H-25); 3.45 (m, 2 H, H-1"); 0.97 (d, 3 H,  $J$  = 6 Hz, H-21); 0.81 (s, 3 H, H-18); 0.68 (s, 3 H, H-19); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174.9 (C-24); 151.4 (C-4'); 150.2 (C-2'); 144.6 (C-9'); 144.6 (C-4" triazole); 135.5 (C-7); 126.8 (C-8); 125.4 (C-6); 123.0 (C-5" triazole); 122.9 (C-5); 121.4 (C-10'), 114.0 (C-3'), 73.0 (C-12), 68.2 (C-7), 57.0 (C-3), 51.7 (C-13), 48.4 (C-25), 47.4 (C-2), 38.3 (C-14); 22.9 (C-21); 17.5 (C-19); 12.7 (C-18); HRMS ESI [M + H]<sup>+</sup>: m/z: Calc for C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl 721.4108 [M + H]<sup>+</sup>, found 721.4210 [M + H]<sup>+</sup>.

**Methyl 3β-(N-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]butylamino)ethyl-1 H-1,2,3-triazol-1-yl)]7α-12α-dihydroxy-5β-cholane-24-oate (14)**.

Yellow oil;  $\nu_{\max}$  (KBr): 3347 (NH), 2931 (CH); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.44 (d, 1 H,  $J_{2,3}$  = 2 Hz, H-2'); 7.88 (s, 1 H, H-8"); 7.77 (d, 1 H,  $J_{5,6}$  = 6 Hz, H-5'); 7.51 (s, 1 H, H-7" triazole); 7.23 (dd, 1 H,  $J_{6,5}$  = 6 Hz,  $J$  = 2 Hz, H-6'); 6.32 (d, 1 H,  $J_{3,2}$  = 2 Hz, H-3'); 3.92 (s, 2 H, H-4"); 3.88 (s, 1 H, H-7); 3.66 (s, 3 H, H-25); 3.28 (m, 2 H, H-1"); 0.99 (d, 3 H,  $J$  = 6 Hz, H-21); 0.82 (s, 3 H, H-18); 0.68 (s, 3 H, H-19); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174.9 (C-24); 151.6 (C-4'); 150.5 (C-2'); 148.7 (C-9'); 145.3 (C-6" triazole); 134.8 (C-7); 127.8 (C-8); 124.9 (C-6); 122.3 (C-7" triazole); 121.2 (C-5'); 117.4 (C-10'); 98.8 (C-3'); 72.9 (C-12); 68.0 (C-7); 56.9 (C-3); 51.6 (C-13); 48.7 (C-25); 47.3 (C-2); 22.9 (C-21); 17.5 (C-19); 12.7 (C-18); HRMS ESI [M + H]<sup>+</sup>: m/z: Calc for C<sub>44</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl 735.4365 [M + H]<sup>+</sup>, found 735.4362 [M + H]<sup>+</sup>.

**Biological evaluation****Anti-MTB activity**

The anti-MTB activity of the compounds was determined by the *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) [26]. Stock solutions of the test compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in Middlebrook 7 H9 broth (Difco), supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment—BBL/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), to obtain final drug concentration ranges from 0.15 to 250 μM. The serial dilutions were realized in a Precision XS Microplate Sample Processor (Biotek™). The isoniazid was dissolved in distilled water, as recommended by the manufacturer (Difco laboratories, Detroit, MI, USA), and used as a standard drug. MTB H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 was grown for 7 to 10 days in Middlebrook 7 H9 broth supplemented with OADC, plus 0.05% Tween 80 to avoid clumps. Cultures were centrifuged for 15 min at 3,150 g, washed twice, and resuspended in phosphate-buffered saline and aliquots were frozen at -80°C. After 2 days, an aliquot was thawed to determine the viability and the CFU after freezing. MTB H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) was thawed and added to the test compounds, yielding a final testing volume of 200 μL with 2 × 10<sup>4</sup> CFU/mL. Microplates with serial dilutions of each compound were incubated for 7 days at 37°C, after resazurin was added to test viability. Wells that turned from blue to pink, with the development of fluorescence, indicated growth of bacterial cells, while maintenance of the blue color indicated bacterial inhibition [26]. The fluorescence was read (530 nm excitation filter and 590 nm emission filter) in a SPECTRAfluor Plus (Tecan®) microfluorimeter. The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of MTB. As a standard test, the MIC of isoniazid was determined on each microplate. The acceptable range of isoniazid MIC is from 0.11 to 0.44 μM [10,33]. Each test was set up in triplicate.



#### *In vitro* antileishmanial activity

##### Parasites and cell culture

Promastigote forms of *L. major* (MRHO/SU/59/P) were maintained in Medium BHI supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 24°C. FBS was purchased from Cultilab (Campinas, São Paulo, Brazil) and brain heart infusion (BHI) from Himédia (Mumbai, India).

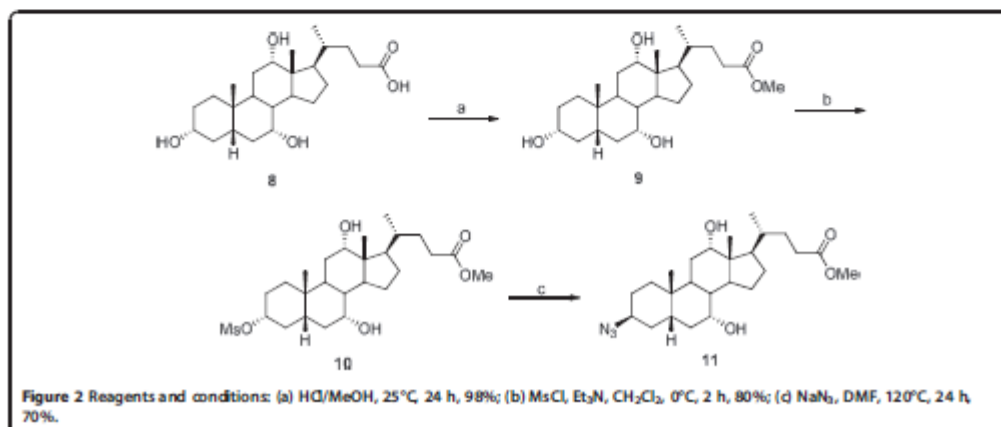
##### Promastigote forms

The viability of parasites was determined by the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (purchased by Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) or MTT method, based on tetrazolium salt reduction by mitochondrial dehydrogenases [27]. Briefly, promastigotes of *L. major* from a logarithmic phase culture were suspended to yield 2 million cells/mL after Neubauer chamber counting. The screening was performed in 96-well microtiter plates maintained at 24°C. Controls with DMSO and without drugs were performed. Absorbance was measured at 570 nm (Multiskan MS microplate reader, LabSystems Oy, Helsinki,

Finland). The results are expressed as the concentrations inhibiting parasite growth by 50% ( $IC_{50}$ ) after a 3-day incubation period. Amphotericin B (supplied by Cristália, São Paulo, Brazil) was used as the reference standard. For data analysis:  $IC_{50}$  values were carried out at 5% significance level ( $p < 0.05$ , CI 95%), calculated using a non-linear regression curve, by using *GraFit* Version 5 software (Erithacus Software Ltd., Horley, UK).

##### Amastigote forms

Concerning the amastigotes *in vitro* model, inflammatory macrophages were obtained from BALB/c mice previously inoculated with 3% thioglycollate medium (Sigma Chemical Co.). Briefly, peritoneal macrophages were plated at  $2 \times 10^5$  cells/mL on coverslips (13-mm diameter) previously arranged in a 24-well plate in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated FBS, and allowed to adhere for 24 h at 37°C in 5%  $CO_2$ . Adherent macrophages were infected with *L. major* (MRHO/SU/59/P) promastigotes in the stationary growth phase using a ratio of 1:10 at 37°C for 3 h. Non-internalized promastigotes were eliminated and



solutions of tested compounds were added and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. Slides were fixed and stained with Giemsa for parasite counting (optical microscopy, 1000× magnification). Amphotericin B was used as a standard drug and the reduction of the number of amastigotes was evaluated after only 24-h post-infection (0.1 μM = 35% and 1.0 μM = 48% of reduction of intracellular amastigotes). The data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), which considered the mean of two assays performed in duplicate. One-way ANOVA was applied to compare all the groups. Differences were regarded as significant when  $p < 0.0001$  (\*\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*).

## Results and discussion

### Chemistry

The aminoquinoline/steroids conjugates **12**, **13**, and **14** were synthesized via 1,3-dipolar cycloaddition of alkyne **3**, **5**, or **7**, respectively, with an azide group of the bile acid **11**. 4,7-dichloroquinoline **1** on treatment with ethylenediamine, propanediamine, or butanediamine at 80–110°C for 4 h furnished the intermediates *N*-(2-aminoethyl)-7-chloroquinolin-4-amine (**2**), *N*-(3-aminopropyl)-7-chloroquinolin-4-amine (**4**), and *N*-(4-aminobutyl)-7-chloroquinolin-4-amine (**6**) in 90% yield [25]. These intermediates **2**, **4**, or **6** on further

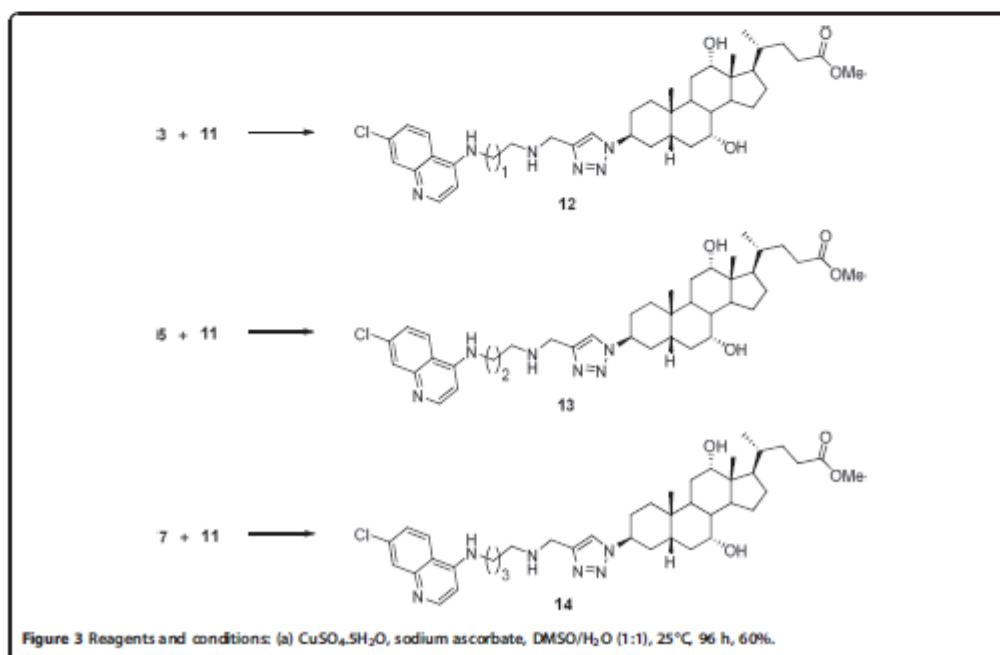
**Table 1** Effect of the compounds on promastigote forms of *L. major*, murine peritoneal macrophages and *M. tuberculosis*

Compounds	Biological tests (μM)	
	<i>M. tuberculosis</i> (MIC) <sup>a</sup>	<i>L. major</i> (IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>
<b>3</b>	60.1 <sup>c</sup>	20.6 <sup>c</sup>
<b>5</b>	60.1 <sup>c</sup>	45.0 <sup>c</sup>
<b>7</b>	54.2 <sup>c</sup>	>87.0 <sup>c</sup>
<b>12</b>	8.8	10.6
<b>13</b>	17.3	21.2
<b>14</b>	17.0	25.6
AmB <sup>d</sup>	–	0.3
isoniazid <sup>d</sup>	0.11–0.44	–

Values represent the mean of triplicate samples. <sup>a</sup>AmB (amphotericin B) and isoniazid were used as reference drug for anti-leishmanial and anti-MTB assays, respectively. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> values (concentrations inhibiting parasite growth by 50%). <sup>c</sup>MIC: lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of MTB. <sup>d</sup>Data have been reported previously [24].

treatment with propargyl bromide and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in EtOH at 25°C for 48 h yielded compounds **3**, **5**, and **7**, respectively, in 60% yield (see Figure 1) [28].

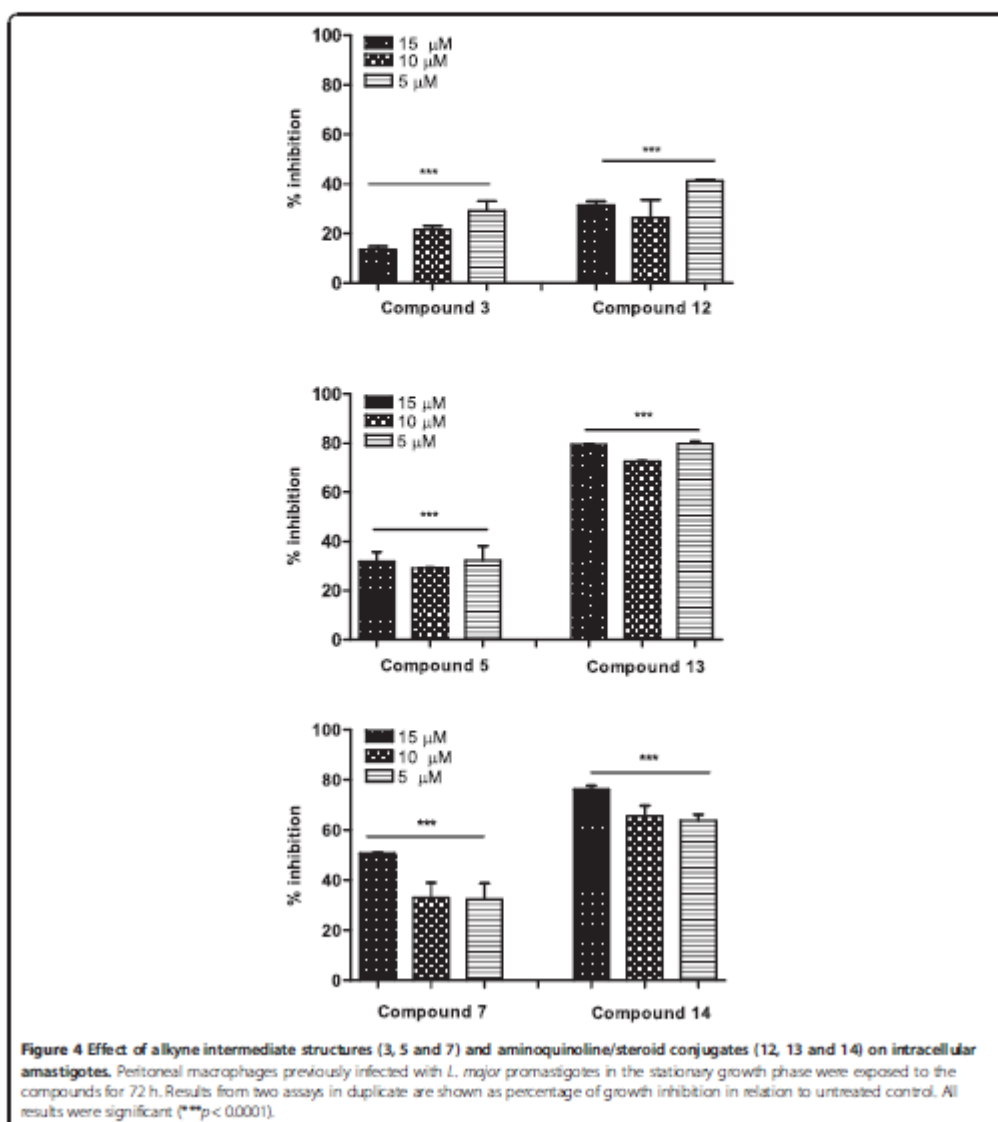
The C-3-azido steroid (bile acid) derivative **11** was synthesized according to the literature procedures [29,30] with small modifications (see Figure 2). Finally, the



aminoquinoline/steroid (bile acid) conjugates **12**, **13**, and **14** were synthesized in very high yield via 1,3-dipolar cycloaddition of alkyne **3**, **5**, or **7** with an azide group of the bile acid **11**, respectively, using  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , sodium ascorbate, DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) at  $25^\circ\text{C}$  for 96 h, in 60% yield (see Figure 3). All the compounds were well characterized by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, and HRMS.

#### Biological evaluation

Previous study demonstrated that 4-amino-7-chloroquinoline derivatives (**2**–**7**) showed an interesting antileishmanial and anti-MTB activities [24]. In continuation of this study, novel steroid linked aminoquinolines were synthesized in an anticipation to improve its biological activity. Table 1 shows the biological results comparing



the alkyne intermediate structures (3, 5, and 7) and their corresponding aminoquinoline/steroid conjugate products (12, 13, and 14).

Anti-MTB activity of the compounds increased in the following order: alkyne intermediate structures (3, 5, and 7) < aminoquinoline/steroid conjugates (12–14). The aminoquinoline/steroid conjugates (12–14) showed excellent results with MICs ranging from 8.8 to 17.3  $\mu\text{M}$ . Within these conjugates, the compound 12 was the most active against MTB bacilli (8.8  $\mu\text{M}$ ) and the presence of the shortest ethylenediamine linker was enough to demonstrate the improved activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) value found for the compound 12 is comparable or better than the MIC of some "second-line" drugs currently used in TB therapy such as cycloserine (122.4–489.7  $\mu\text{M}$ ), kanamycin (2.1–8.6  $\mu\text{M}$ ), tobramycin (8.6–17.1  $\mu\text{M}$ ), and danthromycin (10.7–21.4  $\mu\text{M}$ ) [31].

For antileishmanial test, the assay was performed in both promastigote and amastigote forms of *Leishmania* since both stages of parasite are used for drug screening research [32–34]. Table 1 shows  $\text{IC}_{50}$  values of synthesized compounds on promastigote forms of *L. major*. Aminoquinoline/steroid conjugates (12–14) were more active than the respective alkyne intermediate structures (3, 5, and 7, respectively). Among them, the compound 12 was the most active in promastigotes of *L. major*, inhibiting two times more the viability of the parasite than the alkyne intermediate 3.

Although the promastigotes of the *Leishmania* genus are used for screening of compounds, this assay must be considered as preliminary because: this stage of parasite is significantly more susceptible to drug-induced effects than amastigote, the amastigote are responsible for all clinical manifestations in humans and the intracellular amastigote model has been cited as the golden standard for *in vitro* *Leishmania* drug discovery research [33,34]. *L. major*-macrophage treated with the aminoquinoline/steroid compounds (12–14) showed a significant inhibitory effect against the intracellular amastigotes, as evidenced in Figure 4. Addition of a steroid group to aminoquinoline molecules again enhanced the biological activity of the compounds. Results showed that the compounds 13 and 14 showed the best antiproliferative effects on intracellular amastigotes, inhibiting between 64 and 80% of the parasite burden. These assays were performed in concentrations above those toxic for murine macrophages.

Antileishmanial and anti-MTB results confirm the importance of steroid groups such cholic acid acting as carriers. The cholic acid-derived carriers can possibly increase the solubility in physiological conditions and it could lead to increased cell permeability due to the amphiphilic character of the molecule and could function as an ionophore [22]. Further *in vivo* mouse model

studies could better elucidate the role of bile acid derivatives as carriers.

## Conclusions

Regioselective synthesis of the novel aminoquinoline/steroid conjugates was achieved in very high yield. Addition of a steroid group to aminoquinoline molecules enhanced the anti-MTB activity, having lower MICs than some drugs commonly used to treat TB. For antileishmanial assay, the aminoquinoline/steroid conjugates demonstrated a significant activity against promastigote and amastigote forms of *L. major*.

## Abbreviations

BH: Brain heart infusion; FBS: Fetal bovine serum;  $\text{IC}_{50}$ : Concentrations inhibiting parasite growth by 50%; MIC: Minimum inhibitory concentration; MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; TB: Tuberculosis.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

This study was supported by the FAPB/MG, FAPESP, CAPES, CNPq and BIC/UFJF.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, F.C.F., Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rod. Araraquara-Jaú Km01 s/n, Campus, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. <sup>4</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301 CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

Received: 16 September 2011 Accepted: 15 January 2012

Published: 2 May 2012

## References

- Kaur K, Jain M, Reddy PP, Jain R: Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem* 2010, 45:3245.
- Kaur K, Jain M, Khan S, Jacob MR, Tekwani BL, Singh S, Singh PP, Jain R: Synthesis, antiprotozoal, antimicrobial,  $\beta$ -hematin inhibition, cytotoxicity and methemoglobin (MetHb) formation activities of bis(8-aminoquinolines). *Bioorg Med Chem* 2011, 19:1597.
- Veira NC, Hereniknecht C, Vacus J, Fournet A, Borjes C, Rigadère B, Epindola LS, Lohseu PM: Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. *Biomed Pharmacother* 2008, 62:684.
- Tekwani BL, Walker LA: 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19:623.
- Kaur K, Patel SR, Patel P, Jain M, Khan S, Jacob MR, Ganesan S, Tekwani BL, Jain R: Synthesis, antimalarial, antileishmanial, antimicrobial, cytotoxicity, and methemoglobin (MetHb) formation activities of new 8-quinolinamines. *Bioorg Med Chem* 2007, 15:915.
- World Health Organization: *Leishmaniasis*; <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Accessed May 16, 2011.
- Balocco P, Colotti G, Franceschini S, Ileri A: Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem* 2009, 23:2003.
- Koul A, Arnault E, Lounis N, Guillemont J, Andries K: The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011, 469:488.
- Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, Jensen P, Bayona J: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 2010, 22:1830.

10. Pavan FR, Poehlsitz GV, Do Nascimento FB, Leite SR, Batista AA, Deffon MA, Sato DN, Franziolau SG, Leite CQ: Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. *Eur J Med Chem* 2010, **45**:598.
11. Barry CE 3rd, Slayden RA, Sampson AE, Lee RE: Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochem Pharmacol* 2000, **59**:221.
12. Hermanson GT: *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic; 1996.
13. Breinbauer R, Kohn M: Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. *ChemBiochem* 2003, **4**:1147.
14. Kharb R, Sharma PC, Yarr MS: Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enz Inhib Med Chem* 2011, **26**:1.
15. Bhat I, Jandeleit B, Dias TM, Moon TL, Gallop MA: Synthesis and biological evaluation of novel steroidal pyrazoles as substrates for bile acid transporters. *Bioorg Med Chem Lett* 2005, **15**:85.
16. Savage PB, Li C: Cholic acid derivatives: novel antimicrobials. *Exp Opin Investig Drugs* 2000, **9**:263.
17. Bavliar SN, Salunke DB, Hazra BG, Pore VS, Dodd RH, Thiery J, Shirazi F, Deshpande MV, Kadreppa S, Chattopadhyay S: Synthesis of chimeric tetrapeptide-linked cholic acid derivatives: impending synergistic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, **18**:5512.
18. Pore VS, Aher NG, Kumar M, Shukla PK: Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction. *Tetrahedron* 2006, **62**:11178.
19. Enhsan A, Kamber W, West G: Bile acids in drug discovery. *Drug Discov Today* 1998, **3**:409.
20. Kannan A, De Clercq E, Pannecouque C, Witvrouw M, Hartman TL, Turpin JA, Buckheit RW Jr, Cushman M: Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cotabine. *Tetrahedron* 2001, **57**:9385.
21. Arelli PL, Lantuada L, Lonusso V, Lux G, Morisetti A, Morosini P, Serietti M, Uggeri FJ: Conjugates of gadolinium complexes to bile acids as hepatocyte-directed contrast agents for magnetic resonance imaging. *J Med Chem* 2004, **47**:3629.
22. Sobla BA, Terzic N, Pocsfalvi G, Gerena L, Tinant B, Opsenica D, Milhous WK: Mixed steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes: antimalarial and antimycobacterial activity. *Med Chem* 2002, **45**:3331.
23. Salunke DB, Hazra BG, Pore VS: Steroidal conjugates and their pharmacological applications. *Curr Med Chem* 2006, **13**:813.
24. Carmo AMI, Silva FMC, Machado PA, Fontes AP, Pavan FR, Leite CQ, Leite SR, Coimbra ES, Da Silva AD: Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. *Biomol Pharmacother* 2011, **65**:204.
25. De Souza NB, Carmo AMI, Lagatta DC, Akes MJM, Fontes APS, Coimbra ES, Da Silva AD, Abramo C: 4-aminoquinoline analogues and its platinum(II) complexes as antimalarial agents. *Biomol Pharmacother* 2011, **65**:313.
26. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F: Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:2720.
27. Mossman T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983, **65**:55.
28. Muzonda CC, Gut J, Rosenthal PJ, Yardley V, de Souza RCC, Chibale K: Application of multicomponent reactions to antimalarial drug discovery. Part 2. New antiplasmodial and antitypanosomal 4-aminoquinoline gamma- and delta-lactams via a 'catch and release' protocol. *Bioorg Med Chem* 2006, **14**:5605.
29. Aher NG, Pore VS: Synthesis of Bile Acid Dimers Linked with 1,2,3-Triazole Ring at C-3, C-11, and C-24 Positions. *Synlett* 2005, **14**:2155.
30. Salunke DB, Hazra BG, Pore VS, Bhat MK, Nihar PB, Deshpande MV: New steroidal dimers with antifungal and antiproliferative activity. *J Med Chem* 2004, **47**:1591.
31. Collins I, Franziolau SG: Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:1004.
32. Sereno D, Cordeliro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouassil A: Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007, **56**:3.
33. Vermeersch M, da Luz RJ, Tote K, Timmermans JP, Cos P, Maes L: In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote

- stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:3855.
34. Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinski RG: Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Ranta Med* 2011, **77**:572.

doi:10.1186/2191-2858-2-16

Cite this article as: Antinarelli et al.: Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* 2012 **2**:16

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)





## 7-Chloro-4-quinolinyl Hydrazones: A Promising and Potent Class of Antileishmanial Compounds

Elaine S. Coimbra<sup>1</sup>, Luciana M. R. Antinarelli<sup>1</sup>, Adilson D. da Silva<sup>2</sup>, Marcelle L. F. Bispo<sup>3,4</sup>, Carlos R. Kaiser<sup>4</sup> and Marcus V. N. de Souza<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CP 68563, 21945-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\*Corresponding author: Marcus V. N. de Souza, marcos\_souza@far.fiocruz.br

In this work, we report the antileishmanial evaluation of twenty 7-chloro-4-quinolinyl hydrazone derivatives (1–20). Firstly, the compounds were tested against promastigotes of four different *Leishmania* species. After that, all derivatives were assayed against *L. braziliensis* amastigotes and murine macrophages. Furthermore, it was investigated whether the antiamastigote *L. braziliensis* effect of the compounds could be associated with nitric oxide production. Compounds 6 and 7 showed a strong leishmanicidal activity against intracellular parasite with IC<sub>50</sub> in nanogram levels (30 and 20 ng/mL, respectively). Appreciable activity of three compounds tested can be considered an important finding for the rational design of new leads for antileishmanial compounds.

**Key words:** 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones, amodiaquine, antileishmanial

Received 8 August 2012, revised 3 November 2012 and accepted for publication 8 January 2013

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*. The severity of the disease depends on the species of *Leishmania* responsible for the infection and the immune response to the infection. Therefore, clinical manifestations in humans can occur in three main forms: the most common one, cutaneous leishmaniasis; mucocutaneous leishmaniasis, which causes dam-

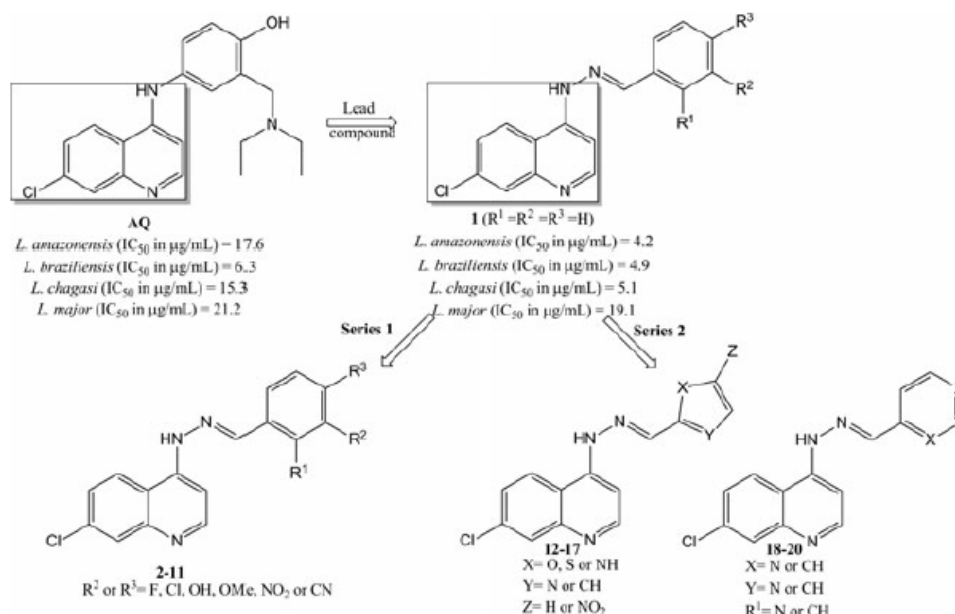
ages to nose and mouth tissues; and the most serious visceral leishmaniasis, which is fatal if untreated (1). This disease is endemic to the American, Asian, and African tropical countries, and there are 12 million people currently infected in about 88 countries. Among these, 72 are developing countries (a).

The first-line treatment against leishmaniasis is still based on pentavalent antimonial drugs, such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. Other medications are used when the first-line regimen fails, such as pentamidine, amphotericin B, and paromycin, despite their high toxicity. In addition, antileishmanial drugs are expensive, and they are not orally active, requiring long-term parenteral administration, which might cause some problems regarding access to treatment, such as long distances to the treatment center, lack of transport and serious financial burden to the patients (2,3). Such problems favor the abandonment of the treatment and drug resistance may emerge. That being considering, there is an urgent need to develop new potent, nontoxic, and selective antileishmanial drugs to treat this neglected disease (4,5).

In this context, quinoline derivatives can be considered promising for the discovery of new antileishmanial agents, which can be exemplified by the activity of the antimalarial drug amodiaquine (AQ) (Figure 1), which is active against different species of *Leishmania* sp at  $\mu\text{M}$  concentration (6–8). Therefore, our research group decided to investigate the use of AQ as a prototype with the aim to develop new active compounds. As a result, we previously described the synthesis and antileishmanial activity of two series of AQ analogs: 7-chloro-4-aminoquinoline-aryl and 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones derivatives (9). Among these, the compound 1 (Figure 1) displayed a significant activity against all promastigote forms of *Leishmania* species (IC<sub>50</sub> values of 4.2, 4.9, 5.1, and 19.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively), being more effective than the AQ. Although, this compound has been cytotoxic in macrophages, we decided to continue exploring the antileishmanial potential of the 4-quinolinyl hydrazones series. As the presence of substituents at R<sup>3</sup> position, such as fluorine, chlorine, bromine, hydroxyl, methoxy, nitro, and cyano, was harmful to the biological activity of said series, we proposed in this work to evaluate the antileishmanial activity of other two series of 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones (Figure 1):



## 7-chloro-4-quinoliny Hydrazones



**Figure 1:** Amodiaquine analogs with potential antileishmanial activity synthesized by our research group.

(i) monosubstituted derivatives at R<sup>1</sup> or R<sup>2</sup> positions (**2–11**) and (ii) heteroaromatic derivatives (**12–20**). The choice of the substituents attached to the hydrazone moiety was made based on the different electronic and steric characteristics of these groups. In addition, the relevance of the present report also arises from the need for developing ongoing studies on the structure-activity relationship in this class of compounds.

## Experimental

### Synthesis

All 7-chloro-4-quinoliny hydrazone derivatives described in this work (**1–20**) were previously synthesized by our research group. They were fully characterized by spectroscopic and spectrometric methods (10,11).

### Antileishmanial activity

Four species of *Leishmania* were used: *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903), *L. major* (MRHO/SU/59/P), and *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8). Promastigotes of *L. amazonensis* were cultured in Warren's medium [brain heart infusion (BHI)-plus hemin and folic acid], promastigotes of *L. major* and *L. braziliensis* were maintained in BHI medium, and promastigotes of *L. chagasi* were maintained in LIT medium, both supplemented with 10% fetal bovine serum at 24 °C. Fetal bovine serum was purchased from Cultilab (Campinas, São Paulo, Brazil); BHI and liver infusion tryptose from Himédia (Mumbai, India), and hemin and folic acid were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Amphotericin B was supplied by Cristália (São Paulo, Brazil), miltefosine was supplied by Cayman Chemical Company (Michigan, USA), and AQ was supplied by Ellipse Pharmaceuticals (Pessac, France).

### Promastigotes assay

Antileishmanial activity was determined by the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), method based on tetrazolium salt reduction by mitochondrial dehydrogenase (12,13). The screening was performed in 96-well microtiter plates maintained at 24 °C. Briefly, promastigotes from a logarithmic phase culture were suspended to yield 2 millions of cells per mL (*L. amazonensis*) or 3 millions of cells per mL (*L. chagasi*, *L. braziliensis* and *L. major*) after Neubauer chamber counting. The analysis was performed in duplicate. The parasites were exposed to increasing concentrations of the compound (at minimum six serial dilutions) for 72 h at 24 °C. Controls containing 0.5% DMSO and medium alone were also included. The viability of promastigotes was assessed by MTT colorimetric method, and the absorbance was measured at 570 nm (Multiskan MS microplate reader; LabSystems Oy, Helsinki, Finland). Amphotericin B and miltefosine were used as the reference drug.

### Amastigotes assay

*In vitro* model of the amastigotes, inflammatory macrophages were obtained from BALB/c mice previously inoculated by the intraperitoneal route with 3% thioglycollate medium (Sigma). Briefly, peritoneal macrophages were pla-

Coimbra et al.



ted at  $2 \times 10^6$  cells/mL on coverslips (13 mm diameter) previously arranged in a 24-well plate in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated FBS and allowed to adhere for 24 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Adherent macrophages were infected with *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903) promastigotes in the stationary growth phase using a ratio of 1:10 at 33 °C for 4 h. Non-internalized promastigotes were eliminated, and solutions of tested compounds were added in different concentrations and maintained at 33 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. After 48 h, all culture supernatants were collected for nitric oxide (NO) measurement. Slides were fixed and stained with Giemsa for parasite counting (optical microscopy, 1000× magnification). The parasite burden was evaluated by counting intracellular parasite and the infected macrophages (100 cells infected). Amphotericin B and miltefosine were used as reference drug.

#### Cytotoxicity on macrophages

Mouse peritoneal macrophages were obtained and cultured as previously described. In brief, the macrophages were used for cytotoxicity assay in a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL in 96-well culture plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated FBS, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 24 h, the adherent macrophages were incubated with the compounds in a serial dilution, in duplicate at each concentration for 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The viability of the macrophages was determined with the MTT assay and was confirmed by comparing the control group morphology via light microscopy (12,13). Dose-response curves were plotted (values expressed as percentage of control optical density), and the values were expressed as CC<sub>50</sub> values (50% cytotoxicity concentration).

#### Nitric oxide production

Nitric oxide production was determined in the supernatants of *L. braziliensis*-macrophages which were incubated for 48 h in the presence of the compounds. The assay was performed as described by Green *et al.* (14). In brief, 50 µL of Griess reagent 1% sulfanilamide in 2.5% of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1% N-1-diiodocloro de naftiletlenodiamina in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v) was added to 50 µL of each sample in a 96-well microplate. Blank reference and standard curve were determined. The absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Multiskan MS microplate reader; LabSystems Oy). Nitrite content was quantified by the extrapolation from sodium nitrite standard curve in each experiment. All the assays were performed in duplicate. The results were expressed as percentages in comparison with the non-treated macrophages infected. Lipopolysaccharides (LPS from *Escherichia coli* J5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as positive control at 10 µg/mL.

#### Statistical analysis

For promastigote and amastigote forms of *Leishmania* and cytotoxicity against macrophages, the IC<sub>50</sub> or CC<sub>50</sub> values were carried out, and the 95% confidence intervals were included, calculated by Litchfiet and Wilcoxon method using the Probit analysis, and the graphs were plotted by the program GRAPHPAD PRISM 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### Results and Discussion

All the 7-chloro-4-quinolinyll hydrazones derivatives 1–20 (Tables 1 and 2) were previously synthesized by our

**Table 1:** IC<sub>50</sub> values (µg/mL) of Series 1 on promastigotes of *Leishmania* species

Compounds	Substituents			Antileishmanial activity (95% C.I.) <sup>a</sup>			
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major</i>
<b>1</b>	H	H	H	4.2 (3.3–5.4)	4.9 (3.6–6.6)	5.1 (4.0–6.6)	19.1 (15.6–23.3)
<b>2</b>	F	H	H	40.9 (34.0–49.2)	7.7 (6.4–9.3)	>100.0	30.1 (26.1–34.8)
<b>3</b>	H	F	H	8.1 (6.4–10.3)	2.1 (1.7–2.6)	32.5 (28.2–37.5)	2.0 (1.9–2.3)
<b>4</b>	H	Cl	H	5.8 (4.5–7.5)	2.1 (1.7–2.5)	17.8 (14.8–21.3)	1.6 (1.4–1.9)
<b>5</b>	OH	H	H	15.6 (13.3–18.3)	4.7 (3.4–6.7)	>100.0	>100.0
<b>6</b>	H	OH	H	>100.0	4.8 (3.4–6.9)	>100.0	>100.0
<b>7</b>	OMe	H	H	>100.0	1.0 (0.5–1.8)	>100.0	>100.0
<b>8</b>	H	OMe	H	4.0 (2.8–5.7)	1.6 (1.3–1.9)	10.3 (6.8–15.7)	2.4 (2.0–2.8)
<b>9</b>	NO <sub>2</sub>	H	H	>100.0	1.0 (0.7–1.6)	>100.0	10.3 (7.0–15.1)
<b>10</b>	H	NO <sub>2</sub>	H	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
<b>11</b>	H	CN	H	>100.0	3.9 (2.3–6.8)	>100.0	>100.0
AQ				17.6 (14.7–21.1)	6.3 (5.4–7.4)	15.3 (12.9–18.2)	21.2 (18.1–24.9)
AmB <sup>b</sup>				0.11 (0.09–0.12)	0.12 (0.09–0.14)	0.05 (0.05–0.06)	0.10 (0.09–0.11)
Miltefosine				14.1 (12.5–15.9)	10.4 (9.0–12.1)	8.3 (7.2–9.5)	8.8 (7.6–10.1)

AQ, amodiaquine.

<sup>a</sup>Data are IC<sub>50</sub> values in µg/mL and 95% confidence intervals are in brackets. These data represent the average of three independent experiments.

<sup>b</sup>AmB (amphotericin B) and miltefosine were used as reference drugs.

**Table 2:** IC<sub>50</sub> values (μg/mL) of Series 2 on promastigotes of *Leishmania* species

Compounds	Substituents			Antileishmanial activity <sup>a</sup> (95% C.I.)			
	X	Y	Z	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major</i>
<b>12</b>	O	CH	H	>100.0	6.9 (5.8–8.2)	30.6 (22.6–41.4)	34.0 (25.2–45.9)
<b>13</b>	O	CH	NO <sub>2</sub>	2.4 (2.0–2.9)	1.8 (1.5–2.2)	2.8 (2.0–3.9)	0.6 (0.5–0.8)
<b>14</b>	S	CH	H	3.0 (2.5–3.5)	0.5 (0.4–0.6)	2.6 (2.3–2.9)	0.5 (0.4–0.6)
<b>15</b>	S	CH	NO <sub>2</sub>	9.3 (7.4–11.7)	3.4 (2.8–4.1)	6.6 (5.8–7.5)	2.3 (2.0–2.7)
<b>16</b>	NH	CH	H	2.9 (2.6–3.3)	0.8 (0.7–1.0)	0.5 (0.4–0.5)	0.8 (0.5–0.7)
<b>17</b>	NH	N	H	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
<b>18</b>	N	CH	CH	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
<b>19</b>	CH	N	CH	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
<b>20</b>	CH	CH	N	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
AQ				17.6 (14.7–21.1)	6.3 (5.4–7.4)	15.3 (12.9–18.2)	21.2 (18.1–24.9)
AmB <sup>b</sup>				0.11 (0.09–0.12)	0.12 (0.09–0.14)	0.05 (0.05–0.06)	0.10 (0.09–0.11)
Miltefosine <sup>b</sup>				14.1 (12.5–15.9)	10.4 (9.0–12.1)	8.3 (7.2–9.5)	8.8 (7.6–10.1)

AQ, amodiaquine.

<sup>a</sup>Data are IC<sub>50</sub> values in μg/mL and 95% confidence intervals (C.I.) are in brackets. These data represent the average of three independent experiments.

<sup>b</sup>Amb (amphotericin B) and miltefosine were used as reference drugs.

research group (10,11). Antileishmanial activities of the compounds were determined *in vitro* against both the insect promastigote and the intramacrophage amastigote forms of *Leishmania*. Furthermore, the cytotoxicity of the compounds was assayed against mammalian cells.

For antipromastigote activity, these derivatives were assayed against four *Leishmania* species, consisting of three different species of *Leishmania* from the New World (*L. braziliensis*, *L. chagasi* and *L. amazonensis*) and one species from the Old World (*L. major*) (Tables 1 and 2). The numerous *Leishmania* species associated with human diseases have important implications for clinical treatment, and the sensitivity of each species should be considered in both experimental and clinical studies (15). With this in mind, it is important to point that the compounds with leishmanicidal activity shown to be effective against all *Leishmania* species tested.

In general, for Series 1 (Table 1), it was observed that the presence of substituents attached to the benzene ring which are electron withdrawing groups (EWG) by polar and by resonance effects, such as nitro (**9** and **10**) and cyano (**11**), seem to be less important to the biological activity than the presence of substituents which are EWG by polar effect but are electron donating groups (EDG) through resonance, such as halogens (**2–4**), hydroxyl (**5** and **6**), and methoxyl groups (**7** and **8**). Regarding this type of substituents, it was observed that when they are at the R<sup>2</sup> position (**3**, **4** and **8**), the spectrum of antileishmanial activity is broader, except for the hydroxyl group (**6**).

In addition, the results presented in Table 2 indicate that the presence of two nitrogen atoms in a five-membered ring (**17**) or the presence of a six-membered ring containing one nitrogen atom (**18–20**) is detrimental to the biologi-

cal activity of such series. Moreover, comparing the five-membered derivatives which were active, it can be observed that the presence of a sulfur atom leads to a compound (**14**) with better activity than the oxygenated derivative (**12**). However, the introduction of a nitro group at Z position in those substances (**13** and **15**) is advantageous only for the nitrofurane derivative (**13**), because the thiophene derivative (**14**) is still more active than the nitrothiophene compound (**15**). Furthermore, the introduction of a nitrogen atom in the five-membered ring (pyrrole) also produces a derivative (**16**) with expressive activity against all four *Leishmania* species tested with IC<sub>50</sub> of 2.9, 0.8, 0.5, and 0.8 μg/mL (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively). Additionally, the five-membered derivatives of the heteroaromatic series (**12–16**) are more active than compounds of Series 1, with IC<sub>50</sub> values below 1.0 μg/mL.

Although tests in amastigote forms of *Leishmania* are more difficult to accomplish, it is a common agreement among many authors that such parasite forms should be those chosen for drug screening, and tests using promastigotes must be preliminarily considered (16,17). Furthermore, Vermeersch and coworkers emphasized that the intracellular amastigote model should be used as 'gold standard' for the evaluation of leishmanicidal activity *in vitro*, due to the fact that the amastigote stage of the parasite is found in mammalian hosts, and it is responsible for all clinical manifestations of leishmaniasis (16). Therefore, we decided to continue studying the leishmanicidal activity of these 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones series against *L. braziliensis* amastigotes (Tables 3 and 4). That species was chosen because its promastigotes were the most sensitive to the tested compounds, because the majority of the active derivatives in both series have shown better activities against this parasite form.

**Table 3:** Effect of the compounds of Series 1 on macrophage murines and intracellular amastigotes of *Leishmania braziliensis*

Compounds	Macrophages CC <sub>50</sub> (μg/mL) (95% C.I.)	Amastigotes IC <sub>50</sub> (μg/mL) (95% C.I.)	Selectivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>b</sup>
<b>1</b>	17.9 (16.1–20.0)	1.1 (0.8–1.5)	16.3	4.4
<b>2</b>	38.0 (28.8–50.0)	0.1 (0.07–0.2)	380.0	77.0
<b>3</b>	32.7 (25.4–42.2)	0.9 (0.7–1.3)	36.3	2.3
<b>4</b>	24.8 (15.5–39.6)	0.3 (0.2–0.4)	82.7	7.0
<b>5</b>	15.9 (10.8–23.1)	0.5 (0.4–0.6)	31.8	9.4
<b>6</b>	>150.0	0.03 (0.01–0.07)	>5000.0	160.0
<b>7</b>	>150.0	0.02 (0.009–0.07)	>7500.0	50.0
<b>8</b>	15.0 (9.9–22.8)	0.5 (0.4–0.7)	30.0	3.2
<b>9</b>	33.8 (27.2–42.0)	2.9 (2.2–3.9)	11.6	0.3
<b>10</b>	>150.0	45.2 (31.0–66.0)	>3.3	>2.2
<b>11</b>	37.0 (26.6–51.6)	0.5 (0.3–0.6)	74.0	7.8
AQ	20.9 (17.9–24.3)	1.3 (1.1–1.6)	16.1	4.8
AmB <sup>c</sup>	>150.0	0.01 (0.005–0.02)	>15 000.0	12.0
Miltefosine <sup>c</sup>	49.4 (43.8–55.7)	1.0 (0.9–1.2)	49.4	10.4

CI, Confidence interval; AQ, amodiaquine.

<sup>a</sup>Selectivity: CC<sub>50</sub> of macrophages/IC<sub>50</sub> of amastigotes of *L. braziliensis*.

<sup>b</sup>Specificity: is the ratio between promastigote IC<sub>50</sub> and intracellular amastigote IC<sub>50</sub>.

<sup>c</sup>AmB (amphotericin B) and miltefosine were used as reference drugs.

**Table 4:** Effect of the compounds of Series 2 on macrophage murines and intracellular amastigotes of *Leishmania braziliensis*

Compounds	Macrophages CC <sub>50</sub> (μg/mL) (95% C.I.)	Amastigotes <sup>0</sup> IC <sub>50</sub> (μg/mL) (95% C.I.)	Selectivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>b</sup>
<b>12</b>	>150.0	0.2 (0.1–0.3)	>750.0	34.5
<b>13</b>	73.4 (35.2–152.8)	0.1 (0.07–0.2)	734.0	18.0
<b>14</b>	3.4 (2.2–5.1)	0.4 (0.3–0.6)	8.5	1.2
<b>15</b>	9.4 (4.9–18.1)	0.5 (0.4–0.7)	18.8	6.8
<b>16</b>	10.0 (5.2–19.1)	0.5 (0.4–0.6)	20.0	1.6
<b>17</b>	>150.0	8.0 (6.7–9.6)	>18.7	>12.5
<b>18</b>	>150.0	25.5 (20.0–32.4)	>5.9	>3.9
<b>19</b>	>150.0	1.0 (0.7–2.4)	>150.0	>100.0
<b>20</b>	>150.0	0.8 (0.5–1.4)	>187.5	>125.0
AQ	20.9 (17.9–24.3)	1.3 (1.1–1.6)	16.1	4.8
AmB <sup>c</sup>	>150.0	0.01 (0.005–0.02)	>15 000.0	12.0
Miltefosine <sup>c</sup>	49.4 (43.8–55.7)	1.0 (0.9–1.2)	49.4	10.4

CI, confidence interval; AQ, amodiaquine.

<sup>a</sup>Selectivity: CC<sub>50</sub> of macrophages/IC<sub>50</sub> of amastigotes of *L. braziliensis*.

<sup>b</sup>Specificity: is the ratio between promastigote IC<sub>50</sub> and intracellular amastigote IC<sub>50</sub>.

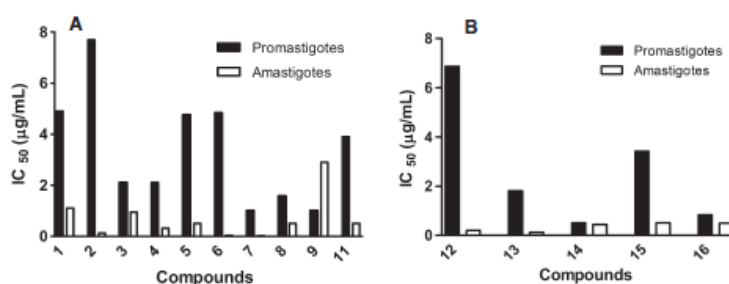
<sup>c</sup>AmB (amphotericin B) and miltefosine were used as reference drugs.

These results showed that all the tested compounds were active against amastigotes of *L. braziliensis*. However, it can be observed that regarding Series 1 and 2, the activity profile against amastigotes was very different from that identified for promastigotes (Table 1 and 2). For example, in the Series 1, among the halogenated compounds (**2–4**), the presence of a fluorine atom at R<sup>1</sup> position led to the best biological activity against amastigotes, whereas substitutions of hydrogen by hydroxyl (**5–6**) or methoxyl groups (**7–8**) at R<sup>2</sup> or R<sup>1</sup> positions, respectively, have promoted improved activities. Interestingly, compounds **6** (R<sup>2</sup>=OH) and **7** (R<sup>1</sup>=OMe) were as active as the reference

drug, amphotericin B, with IC<sub>50</sub> values in the same range (IC<sub>50</sub> = 0.03, 0.02 and 0.01 μg/mL, respectively). Moreover, among the 20 compounds tested, 13 showed to be more active against intracellular forms than miltefosine. Miltefosine is the first oral drug used for the treatment for visceral leishmaniasis and was considered a major breakthrough in antileishmanial chemotherapy (18). In general, comparing Series 1 and 2, the heteroaromatic compounds (Series 2) have been less active against amastigotes than the aromatic ones (Series 1), which is the opposite of what was found for promastigotes. Among heteroaromatic compounds, furan derivatives (**12** and **13**)



## 7-chloro-4-quinolinyl Hydrazones



**Figure 2:** Comparative antipromastigotes and anti-amastigotes activity of some compounds on *Leishmania braziliensis*.

have showed the best leishmanicidal activities, and in this case, the substitution with nitro group at Z position (**13**) promoted a slight improvement to the biological activity.

Despite the relevant activities, the majority of these substances are cytotoxic in macrophages with  $CC_{50} < 150.0 \mu\text{g/mL}$  (Tables 3 and 4). However, regarding the selectivity of those compounds, it is important mention that, when the compounds were assayed against amastigotes, they were much more destructive to that parasitic form than to the host cells. Such behavior can be noticed by the high values of selectivity presented in Tables 3 and 4. In fact, compounds **6** and **7** (Table 3) were 5000 and 7500 times more selective for the parasite than for macrophages, respectively.

Furthermore, Tables 3 and 4 also furnish information about the specificity of those compounds. Specificity value  $>2$  was the cutoff point chosen to define a compound as being more active against the intracellular amastigote stage; while a specificity value  $<0.4$  indicated a more active compound against promastigotes, compounds with specificity values between 0.4 and 2 were considered as being active against both stages (19). Therefore, it can be concluded that only compounds **14** and **16** were considered to be active against both amastigote and promastigote forms, while all the other compounds could be considered more active against amastigotes (Figure 2). These results reinforce the potential leishmanicidal activity of the 7-chloro-4-quinolinyl hydrazone compounds.

Several investigations on the mechanisms of *Leishmania* killing by macrophages have clearly identified the generation of reactive nitrogen products as NO as the most likely cytotoxic molecules responsible for intracellular parasite destruction (20). So, we tried to investigate whether the anti-amastigote *L. braziliensis* effect of the compounds could be associated with NO production. This assay was performed in parallel with the anti-amastigote assay, collecting the supernatants of *L. braziliensis*-macrophages treated with several concentrations of compounds. Table 5 shows nitrite production by NO, only in the maximum concentration tested for each compound, when compared with non-treated, infected macrophages. For positive control, 10  $\mu\text{g/mL}$  of LPS was used, and the results showed

**Table 5:** Production of NO by *Leishmania braziliensis*-macrophages treated with the compounds

Compounds	Production of nitrite (%) <sup>a</sup>
<b>1</b>	N. T.
<b>2</b>	-1.1% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>3</b>	-18.6% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>4</b>	31.6% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>5</b>	-9.3% (5 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>6</b>	31.6% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>7</b>	-22.4% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>8</b>	21.2% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>9</b>	1.0% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>10</b>	-45.0% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>11</b>	-32.1% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>12</b>	45.5% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>13</b>	31.9% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>14</b>	-28.5% (1 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>15</b>	-69.7% (5 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>16</b>	28.3% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>17</b>	-78.2% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>18</b>	-11.2% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>19</b>	-29.0% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
<b>20</b>	-61.9% (10 $\mu\text{g/mL}$ )
Stimulus <sup>b</sup>	320%

NO, nitric oxide.

<sup>a</sup>In parenthesis: maximum concentration tested for each compound.

<sup>b</sup>Stimulus used as positive control: 10  $\mu\text{g/mL}$  of lipopolysaccharides. Tests were performed in duplicate.

that this molecule was effective for stimulating NO production in high levels (320%). In general, a relation between leishmanicidal activity and nitrite production was not observed, and in fact, some of them even inhibited spontaneous NO production (negative values). However, some compounds were able to induce NO production in infected macrophages. For example, among the Series 1 (compounds **1–11**), only the compounds **4**, **6**, and **8** increased the production of nitrite at 31.6%, 31.6%, and 21.2%, respectively, when compared with the control. Among the Series 2 (compounds **12–20**), only compounds **12**, **13**, and **16** increased the production of nitrite at 45.5%, 31.9%, and 28.3%, respectively. It is interesting to note that among compounds **6** and **7**, which showed better

Coimbra et al.



leishmanicidal activity against intracellular parasite ( $IC_{50} = 0.03$  and  $0.02 \mu\text{g/mL}$ ), only compound **6** increased the NO production, but not compound **7**. These results showed that for some compounds, the leishmanicidal activity should be associated with the activation of NO production by macrophages, but it is not the only route, and the compounds can also act directly against the intracellular parasite. It is interesting to note that most of the compounds, including those which induced NO production, were more active against intracellular amastigotes than against free promastigotes, suggesting drug metabolism by macrophages, as observed with the pentavalent antimonials (21).

### Conclusion

In summary, two series of 7-chloro-4-quinolinyl hydrazone derivatives have been evaluated against four different species of *Leishmania* promastigotes. Among these results, the majority of the active derivatives in both series have shown better activity against promastigotes of *L. braziliensis* species. Considering that, we decided to continue studying the leishmanicidal activity of such series against *L. braziliensis* amastigotes, and all the tested compounds were active, among which compounds **6** and **7** were as active as a reference drug used, amphotericin B, with  $IC_{50}$  values in the same range ( $IC_{50} = 0.03$ ,  $0.02$  and  $0.01 \mu\text{g/mL}$ , respectively). Furthermore, these derivatives were 5000 and 7500 times more selective for the parasite than for macrophages, respectively. Together with the structure-activity relationship study performed in this work, these results could be considered a significant contribution to the development of such class of compounds as potential leishmanicidal agents.

### Acknowledgments

We are grateful to FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) which provided financial support for this work.

### References

- Croft S.L., Coombs G.H. (2003) Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*;19:502–508.
- Mishra J., Saxena A., Singh S. (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem*;14:1153–1169.
- Santos D.O., Coutinho C.E.R., Madeira M.F., Bottino C.G., Vieira R.T., Nascimento A.B., Bourguignon S.C., Corte-Real S., Pinho R.S., Rodrigues C.R., Castro H.C. (2008) Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*;103:1–10.
- Singh S., Sivakumar R. (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*;10:307–315.
- Desjeux P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*;27:305–318.
- Coimbra E.S., Carvalhaes R., Grazul R.M., Machado P.A., De Souza M.V.N., Da Silva A.D. (2010) Synthesis, cytotoxicity and antileishmanial activity of some *N*-(2-(indol-3-yl)ethyl)-7-chloroquinolin-4-amines. *Chem Biol Drug Des*;75:628–631.
- Guglielmo S., Bertinaria M., Rolando B., Crosetti M., Fruttero R., Yardley V., Croft S.L., Gasco A. (2009) A new series of amodiaquine analogues modified in the basic side chain with in vitro antileishmanial and antiplasmodial activity. *Eur J Med Chem*;44:5071–5079.
- De Mello H., Echevarria A., Bernardino A.M., Canto-Cavaleiro M., Leon L.L. (2004) Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis. *J Med Chem*;47:5427–5432.
- Coimbra E.S., Da Silva A.D., Dias R.M.P., Corrales R.C.N., Bispo M.L.F., Kaiser C.R., De Souza M.V.N. (2011) Amodiaquine analogs. Synthesis and anti-leishmanial activity. *Med J Chem*;3:106–113.
- Candea A.L.P., Ferreira M.L., Pais K.C., Cardoso L.N.F., Kaiser C.R., Henriques M.G.M.O., Lourenço M.C.S., Bezerra F.A.F.M., De Souza M.V.N. (2009) Synthesis and antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*;19:6272–6274.
- Ferreira M.L., Gonçalves R.S.B., Cardoso L.N.F., Kaiser C.R., Candea A.L.P., Henriques G.M.O.M., Lourenço M.C.S., Bezerra F.A.F.M., De Souza M.V.N. (2010) Synthesis and antitubercular activity of heteroaromatic isonicotinoyl and 7-chloro-4-quinolinyl hydrazone derivatives. *Sci World J*;10:1347–1355.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*;65:55–58.
- Carmo A.M., Silva F.M., Machado P.A., Fontes A.P., Pavan F.R., Leite C.Q., Leite S.R., Coimbra E.S., Da Silva A.D. (2011) Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. *Biomed Pharmacother*;65:204–209.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*;126:131–138.
- Escobar P., Matu S., Marques C., Croft S.L. (2002) Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocoline (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop*;81:151–157.
- Vermeersch M., Da Luz R.J., Toté K., Timmermans J.P., Cos P., Maes L. (2009) In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical rel-



- evance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother*;53:3855–3859.
17. Tempone A.G., Martins de Oliveira C., Berlinck R.G. (2011) Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*;77:572–575.
  18. Singh N., Kumar M., Singh R.K. (2012) Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*;5:485–497.
  19. De Muylder G., Ang K.K., Chen S., Arkin M.R., Engel J.C., McKerrow J.H. (2011) A screen against Leishmania intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl Trop Dis*;5:e1253.
  20. Evans T.G., Thai L., Granger D.L., Hibbs J.B. Jr (1993) Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol*;151:907–915.
  21. Frézard F., Demicheli C., Ribeiro R.R. (2009) Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*;14:2317–2336.

#### 7-chloro-4-quinolinyl Hydrazones

#### Note

<sup>a</sup>WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. Available at <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Accessed on July 30 2012.