

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

**ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE DE
DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS EM ESPÉCIES DE *Leishmania*
RELACIONADAS À LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

TESE DE DOUTORADO

Juiz de Fora

2017

LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI

**ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE DE
DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS EM ESPÉCIES DE *Leishmania*
RELACIONADAS À LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra

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

Juiz de Fora
2017

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

Ribeiro Antinarelli , Luciana Maria .

ESTUDOS IN VITRO, IN VIVO E IN SILICO DA ATIVIDADE DE DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS EM ESPÉCIES DE Leishmania RELACIONADAS À LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA / Luciana Maria Ribeiro Antinarelli . -- 2017.

188 f. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. 4-aminoquinolinas. 2. Mitocôndria. 3. Apoptose-like. 4. Autofagia. 5. leishmaniose cutânea murina. I. Soares Coimbra, Elaine , orient. II. David da Silva, Adilson, coorient. III. Título.

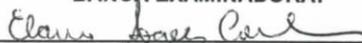
LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI

Estudos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* da atividade de derivados aminoquinolínicos em espécies de *Leishmania* relacionadas à leishmaniose tegumentar americana

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 15/02/2017.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Elaine Soares Coimbra

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Adilson David da Silva

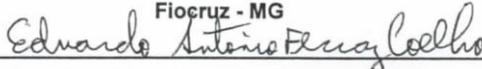
Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



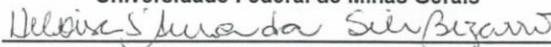
Prof. Dr. Rubens Lima do Monte Neto

Fiocruz - MG



Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof.ª Dr.ª Heloisa D'Avila da Silva Bizarro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Priscila de Faria Pinto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta tese aos meus queridos pais;
Pelos exemplos de vida, superação e
e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por tantas bênçãos e oportunidades concedidas, por me dar força e saúde para vencer todos os dias e perseverar nesta caminhada;

Aos meus queridos pais Maria Lúcia José Bento, meus irmãos Alexandre e Eduardo, minha cunhada Núbia e minha sobrinha Maria Rita. Obrigada pelo imenso apoio, amor, paciência e compreensão ao longo desses anos. Obrigada por me ensinarem que com trabalho e dedicação podemos sempre conquistar nossos objetivos;

À minha orientadora, Prof^a Elaine Soares Coimbra, pela imensa contribuição na minha formação científica. Obrigada pelo constante apoio, confiança, conselhos e paciência. O meu sincero agradecimento e gratidão por todos esses anos de grandes ensinamentos, orientações e dedicação. Muito obrigada!!

À Coordenação de Apoio a Pesquisa Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCBIO) e seu corpo docente e funcionários e a Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de realização do curso de mestrado e doutorado;

Ao Prof. Adilson David da Silva e alunos do laboratório de Química Orgânica do Núcleo em Pesquisa em Química (NUPEQ) da UFJF, pela imensa contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Aos demais professores do Departamento de Parasitologia, Clarice, Florence, Kézia e Pedro Paulo. Agradeço imensamente a oportunidade de crescimento acadêmico e científico, orientações e incentivo constante;

Às técnicas de laboratório Cristina e Ivone, por estarem sempre à disposição para ajudar, pela amizade, carinho e palavras de incentivo nos momentos de dificuldade;

À Banca Examinadora pela revisão da tese e valiosas contribuições com o trabalho;

À Prof^a Dra. Eveline Gomes Vasconcelos, pela disponibilidade em ajudar e valiosas contribuições no enriquecimento neste trabalho;

À Prof^a Dra. Jacy Gameiro, pela disponibilidade na realização das análises de Citometria;

À Profª Dra. Elita Scio pela colaboração e parceria em diversos projetos;

À Profª Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles e equipe, pela disponibilidade na realização dos ensaios de docking;

À Dra. Silvia Regina Costa Dias, pelo auxílio na realização dos experimentos *in vivo*;

À Profª Dra. Bartira Rossi-Bergmann (UFRJ) e ao Dr. Wallace Pacienza Lima, pela colaboração na realização dos experimentos *in vivo*,

À Profª Dra Thais Souto-Padrón (*In memoriam*), pela generosidade em nos auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica e pela atenção com que me recebeu em seu laboratório;

Ao Dr. Celso Vataru Nakamura (Universidade Estadual de Maringá) e a pós-doutoranda Elizandra Britta, pela valiosa contribuição na realização da Microscopia Eletrônica;

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia: Roberta, Patrícia, Fernanda Valério, Juliane Marinho, Alyssa, Daniela Renhe, Bárbara, Ana Carolina, Juliana Granato, Mariana, Stephanie, Yasmin, Marina, Carol Brandi, Lenir e demais alunos. A Flávia, Nicolli, Liliane, Ayla, Mariana Freire, Natália, Michele e todos os colegas que já passaram pelo Laboratório. Foram nove anos de muitos aprendizados, crescimento pessoal, momentos de descontração e experiências compartilhadas. Obrigada pela parceria, companheirismo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas (Depto de Bioquímica), pela parceria e auxílios em muitos momentos do desenvolvimento deste trabalho. À Gabriane, pela amizade, companheirismo e ajuda constante;

À Dona Silvia e a Cinthia, pelo carinho, generosidade e acolhida em Juiz de Fora. Pelo exemplo de vida, sempre me incentivando a lutar pelos meus objetivos. Muito obrigada por tudo!

À Jerusa, minha grande amiga, companheira e incentivadora desde a graduação. Agradeço imensamente por viver comigo cada etapa deste ciclo, sempre com palavras de carinho, fé e conforto;

À Roberta, pela amizade e companhia constante. Obrigada pela força e incentivo de sempre e apoio nos momentos de dificuldade;

Ao Aurius, pelo carinho, amizade e palavras de incentivo nos momentos de ansiedade, nervosismo e preocupação. Obrigada pela presença constante e por vibrar comigo a cada vitória alcançada.

À todos os amigos, primos e tios pelo apoio, torcida e imenso carinho.

RESUMO

As leishmanioses representam um grande problema de saúde pública mundial com sérias limitações na quimioterapia atual, como: número limitado de fármacos, baixa eficácia, custo elevado, crescente resistência parasitária e toxicidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade de uma série de dez derivados de 4-aminoquinolinas em espécies de *Leishmania* relacionadas a leishmaniose tegumentar. Avaliar os possíveis mecanismos de ação do composto com atividade antileishmanial promissora, identificando as organelas alvo e os processos de morte celular desencadeados no parasito, bem como a sua eficácia *in vivo*. Dentre os compostos avaliados, o derivado AMQ-j foi o mais ativo, com atividade expressiva em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (CI₅₀ menor que 6.0 µg/mL e 2,5 µg/mL em promastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente) para ambas as espécies avaliadas. O composto AMQ-j apresentou baixa toxicidade para macrófagos murinos (CC₅₀> 40.0 µg/mL), sendo mais tóxico para amastigotas intracelulares (Índice de Seletividade>12,0). Os resultados preliminares acerca do modo de ação apontam que o composto AMQ-j induziu drásticos efeitos na mitocôndria do parasito e caracterizado pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inchaço da organela, aumento na produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROS) e acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma. O tratamento com AMQ-j induziu nas formas promastigotas uma série de alterações bioquímicas e celulares sugestivas de morte por apoptose-*like* como redução do volume celular, exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, manutenção da integridade da membrana plasmática e alterações drásticas no núcleo celular evidenciadas por meio da desorganização da cromatina e fragmentação do DNA. O efeito do composto em promastigotas está também associado à indução de morte por autofagia evidenciada pelo aumento de vacúolos autofágicos, presença de corpos multivesiculares dentro de vacúolos, vesículas citoplasmáticas e acúmulo de compartimentos acídicos no citoplasma dos promastigotas. O composto também induziu fragmentação do DNA dos amastigotas intracelulares de modo seletivo, sem induzir fragmentação da célula hospedeira. Estudos *in silico* sugerem que AMQ-j é um potencial inibidor da tripanotiona redutase (TryR), enzima fundamental na defesa antioxidante do parasito. Estudos *in vivo* em modelo murino de infecção com *L. amazonensis* demonstraram a eficácia do AMQ-j pela via intralésional na redução do tamanho da lesão e da carga parasitária, sem indução de toxicidade hepática, cardíaca e renal. Os estudos de predição *in silico* relacionados a propriedades farmacocinéticas (ADMET) e características físico-químicas (regra de Lipinsky) sugerem que AMQ-j pode ser utilizado pela via oral. O efeito leishmanicida do composto está associado a múltiplos alvos, desencadeando a morte do parasito por diferentes vias, como apoptose e autofagia. O efeito *in vivo* do composto aponta para a necessidade da continuidade dos estudos no intuito de melhor estabelecer o seu efeito leishmanicida.

Palavras-chave: 4-aminoquinolinas. Mitocôndria. Apoptose-*like*. Autofagia. leishmaniose cutânea murina.

ABSTRACT

Leishmaniasis represents a major global public health problem with serious limitations in current chemotherapy, such as limited number of drugs, low efficacy, high cost, increasing parasitic resistance and toxicity. The objective of the present study was to evaluate a series of ten 4-aminoquinolines derivatives (AMQs) on *Leishmania* species related to tegumentary leishmaniasis. It was also evaluated the possible mechanisms of action of a compound with promising leishmanicidal activity, identifying the target organelles and the type of death triggered in the parasite, as well as to its leishmanicidal effect *in vivo*. Among the evaluated compounds, the AMQ-j derivative was the most active, with expressive activity on *L. amazonensis* and *L. braziliensis* (IC₅₀ less than 6.0 µg/mL and 2.5 µg/mL against intracellular promastigotes and amastigotes, respectively) for both evaluated species. Furthermore, AMQ-j showed low toxicity for murine macrophages (CC₅₀ > 40.0 µg/mL) being more destructive to the intracellular parasites (selectivity index > 12.0). Preliminary studies about the mode of action showed that AMQ-j compound induced marked effects on the parasite mitochondria, characterized by mitochondrial membrane potential collapse ($\Delta\Psi_m$), organelle swelling, increased of Reactive Oxygen Species (ROS) production and lipidic bodies accumulation in the cytoplasm. The treatment with AMQ-j induced in the promastigote forms a series of biochemical and cellular alterations which suggest apoptosis-like death, including reduction of cellular volume, phosphatidylserine exposure on the outer leaflet of the plasma membrane, maintenance of plasma membrane integrity and drastic changes in the cell nucleus evidenced by chromatin disorganization and DNA fragmentation. The effect of AMQ-j in promastigote forms is also associated with the induction of death by autophagy evidenced by the increase of autophagic vacuoles, presence of multivesicular bodies inside vacuoles, cytoplasmic vesicles and accumulation of acidic compartments in the promastigote cytoplasm. The compound also induced DNA fragmentation of intracellular amastigotes selectively, without inducing host cell fragmentation. *In silico* studies suggest that this compound is a potential inhibitor of key redox enzyme trypanothione reductase (TryR). *In vivo* studies in murine infection model of *L. amazonensis* demonstrated the efficacy of AMQ-j by the intralesional route, reducing lesion size and parasite load, without induction of hepatic, cardiac and renal toxicity. The *in silico* prediction studies on pharmacokinetic properties (ADMET) and physico-chemical characteristics (Lipinsky's rule) suggest that AMQ-j can be used orally. Taken together, the results suggest that the leishmanicidal effect of the compound is associated with multiple targets and triggers parasite death through different pathways, including apoptosis and autophagy. The *in vivo* effect indicates that studies with this compound should be continued in order to better establish its leishmanicidal effect.

Keywords: 4-aminoquinolines. Mitochondria. Apoptosis-like. Autophagy. Murine cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp.....	14
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.....	16
Figura 3: Principais fármacos atualmente utilizados na terapia das leishmanioses..	24
Figura 4: Fármacos derivados de quinolinas com atividade leishmanicida.....	38
Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação do composto AMQ-j em <i>L. amazonensis</i>	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIF	“Apoptosis-inducing fator” Fator indutor de apoptose
ALT	Alanina aminotransferase
AMQ	Aminoquinolina
AQP1	Aquagliceroporina 1
AST	Aspartato aminotransferase
Atgs	“Autophagy related genes” Genes relacionados a autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl2	“B-cell lymphoma 2” Linfoma de Células B2
Caco-2	Carcinoma Coloretal
CC ₅₀	Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos
CI ₅₀	Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário
CL	Corpúsculo Lipídico
CYP450	Citocromo P450
DBS	Divisão Binária Simples
DL ₅₀	Dose de uma droga necessária para matar 50% dos animais testados em estudos <i>in vivo</i>
DNA	“Deoxyribonucleic acid” Ácido desoxirribonucleico
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
FITC	“Fluorescein isothiocyanate” Isotiocianato de fluoresceína
GFP	“Green Fluorescent Protein” Proteína Verde Fluorescente
GTP	Guanosina trifosfato
HIV	“Human Immunodeficiency virus” Vírus da Imunodeficiência Adquirida
Hsp	“Heat shock proteins” Proteína do choque térmico
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina-10
IFN- γ	Interferon- γ

InSe	Índice de Seletividade
JC-1	5,5-,6,6-tetrachloro-1,1-,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
Ki	“Inhibitory constant” Constante inibitória
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCL	Leishmaniose cutâneo localizada
LCM	Leishmaniose cutaneomucosa
LDA	“Limiting dilution assay” Método da diluição limitante
LPG	Lipofosfoglicano
Log P	Logarítmico do coeficiente de partição
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MET	Microscopia eletrônica de Transmissão
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico
NADPH	“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”
NO	“Nitric oxide” Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCD	“Program Cell Death” Morte Celular Programada
PS	“Phosphatidylserine” Fosfatidilserina
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
Sb ³⁺	Antimônio trivalente
Sb ⁵⁺	Antimônio pentavalente
SFM	Sistema Fagocítico Mononucler
TDR1	“Thiol-dependent reductase I” Redutase dependente de tiol
TDR	“Tropical Diseases Research” Pesquisa em doenças tropicais
TGF-β	“Transforming growth factor β” Fator de transformação do crescimento β
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TNF	“Tumor Necrosis Factor” Fator de Necrose Tumoral
TriR	Tripanotiona redutase
T[S]2	Tripanotiona dissulfeto
T[SH]2	Tripanotiona ditiol

TUNEL Terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate
biotin nick end-labeling

VP Vacúolo Parasitóforo

WHO "World Health Organization" Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	12
1.2 O PARASITO E O CICLO DE VIDA.....	13
1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA).....	17
1.4 RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	20
1.5 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	23
1.6 MORTE CELULAR EM PROTOZOÁRIOS.....	29
1.7 QUINOLINAS COMO COMPOSTOS LEISHMANICIDAS.....	34
2 OBJETIVOS.....	41
3 RESULTADOS.....	42
3.1 CAPÍTULO 1.....	43
3.2 CAPÍTULO 2.....	52
3.3 CAPÍTULO 3.....	64
3.4 CAPÍTULO 4.....	105
4 DISCUSSÃO.....	125
5 CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
APÊNDICES.....	179
ANEXOS.....	185

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acometem o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos, manifestando-se por um amplo espectro de formas clínicas classicamente divididas em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV) (HARHAY et al., 2011; KEVRIC et al., 2015).

As leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública mundial, sendo endêmicas em 98 países e 3 territórios localizados, em sua maioria, na África, Ásia e América (WHO, 2016). Estimativas recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para a existência de 14 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo com aproximadamente 310 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a infecção. A incidência anual da doença ultrapassa 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e cerca de 0,3 milhões de novos casos de leishmaniose visceral (LV) com uma estimativa de 20.000-40.000 mortes por ano relacionadas à doença (WHO, 2016).

O Brasil é o país com maior incidência de novos casos da doença no continente americano e o terceiro país com o maior número de casos registrados no mundo (WHO, 2016). Os dados epidemiológicos dos últimos anos revelam a ampla distribuição territorial da doença, com registro de casos em todas os estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Em 2015 foram notificados 19.395 casos de LC e 3289 casos de LV no Brasil (WHO, 2016). A notificação de novos casos de leishmanioses é obrigatória no Brasil e em somente 40 países nos quais é endêmica. Estima-se, portanto, que a real prevalência da doença seja muito superior, principalmente, em regiões que possuem assistência médica precária (ALVAR et al., 2012; KEVRIC et al., 2015).

Nos últimos anos, a doença está em franca expansão mundial, principalmente em países desenvolvidos localizados na Europa e América do Norte (ANTINORI et al., 2011; READY, 2014). O aumento significativo na incidência de casos globais da doença é resultante de uma série de situações de risco, sobretudo, a pobreza, má-nutrição, quadros de imunossupressão desencadeados por diferentes fatores

(doenças, transplante de órgãos ou tratamento com drogas), aumento dos casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e agravamento das condições sanitárias. Outros fatores agravantes para a expansão mundial da doença são o aumento de casos de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), ausência de vacina efetiva e desenvolvimento de resistência parasitária à quimioterapia (DEN BOER et al., 2011; DI MUCCIO et al., 2015). Além de fatores ambientais, como o crescimento urbano desordenado, desequilíbrio ambiental em virtude de mudanças climáticas e intervenções sistemáticas do homem, controle inadequado de vetores e adaptação dos vetores ao ambiente urbano (AVERSI-FERREIRA et al., 2014; ORYAN; AKBARI, 2016).

Diante deste panorama atual, a OMS classifica as leishmanioses como doenças tropicais negligenciadas (DTNs) de categoria 1 (reemergente e fora de controle), no intuito de intensificar as ações voltadas para o desenvolvimento de vacinas, novas estratégias de tratamento e diagnóstico e controle de vetores (DE VRIES et al., 2015; SAKKAS et al., 2016).

1.2 O PARASITO E O CICLO DE VIDA

O gênero *Leishmania* inclui protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, cuja característica principal é a presença do cinetoplasto, uma estrutura localizada no interior da mitocôndria que concentra de maneira extremamente organizada uma elevada concentração de DNA (LUKES et al., 2005; DE SOUZA et al., 2009).

Uma das características do gênero *Leishmania* é a grande diversidade de espécies. Desde a primeira descrição do gênero realizada por Ross em 1903, a classificação das espécies tem sido um processo contínuo, com subdivisões em subgêneros e até mesmo em complexos (SCHÖNIAN et al., 2010). Classicamente, as espécies de *Leishmania* que provocam infecções em humanos estão agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Esta classificação é baseada na localização do parasito no intestino do inseto vetor (LAINSON et al., 1987), a qual foi posteriormente confirmada por análises filogenéticas realizada a partir de sequências de DNA (CROAN et al., 1997). O número exato de espécies de *Leishmania* ainda é controverso. Alguns estudos sugerem que sejam mais de trinta (BAÑULS et al., 2007), outros apontam como dezessete pela técnica de eletroforese

de enzimas multilocus (SCHÖNIAN et al., 2011). Estudos recentes, por meio de análises de filogenia pelo gene da hsp 70 (proteína do choque térmico) apontam que este número seja de apenas oito espécies com relevância médica (SCHÖNIAN et al., 2010). Apesar desta controvérsia, é importante ressaltar que, dentre os protozoários da família Trypanosomatidae, *Leishmania* apresenta o maior número de espécies envolvidas na transmissão humana, as quais apresentam variações relacionadas à virulência, preferência pelo inseto vetor e distribuição geográfica, com implicações importantes para o controle da doença, seja no diagnóstico, quimioterapia, desenvolvimento de vacinas ou combate ao inseto vetor (VOLF et al., 2008; ALVAR et al., 2012).

Em seu ciclo de vida, a *Leishmania* apresenta-se sob dois estágios morfológicos distintos, promastigotas e amastigotas (Figura 1), cujo processo evolutivo permitiu a adaptação e sobrevivência destas formas evolutivas às diferentes condições de vida que envolve hospedeiros mamíferos e invertebrados (ROY et al., 2012).

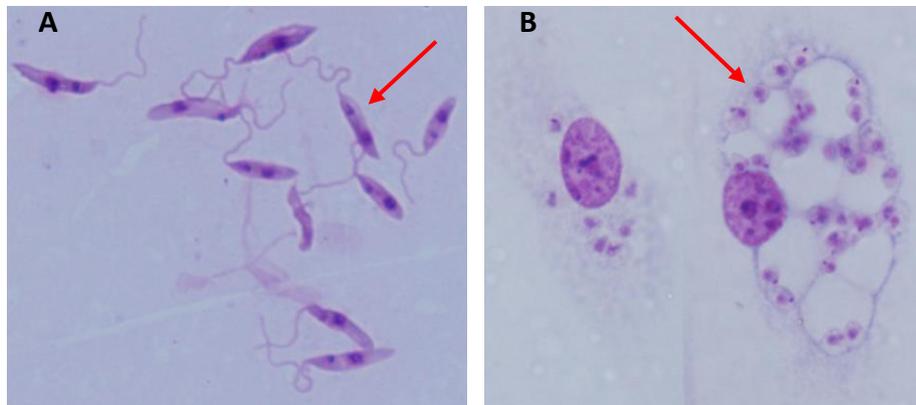


Figura 1: Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*. **(A)** formas promastigotas de *L. amazonensis* **(B)** macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. As setas em vermelho indicam as diferentes formas evolutivas do parasito. Aumento de 1000 X. Fonte: Do autor.

As formas promastigotas são móveis e com formato alongado, com aproximadamente 10 a 15 μm de comprimento e 1,5 a 3,5 μm de largura. O núcleo é arredondado ou oval e está situado na região central ou ligeiramente deslocado para a porção anterior do corpo. O cinetoplasto, no formato de bastão, localiza-se próximo a extremidade anterior do corpo do parasito. Apresentam um flagelo

externalizado que emerge de uma invaginação do corpo celular na sua porção anterior, denominada bolsa flagelar (MCCONVILLE et al., 2007). As formas promastigotas se desenvolvem no intestino médio do inseto vetor onde sobrevivem a temperaturas em torno de 25-26 °C e sob condições de pH básico (MCCONVILLE et al., 2011). As formas amastigotas apresentam-se tipicamente com formato oval ou arredondado, com cerca de 2 a 3 µm de comprimento. No citoplasma, encontra-se o núcleo grande e arredondado e o cinetoplasto em forma de pequeno bastão. Possuem um flagelo curto, que raramente ultrapassa a abertura da bolsa flagelar, sendo observado somente sob microscopia eletrônica. São formas exclusivamente intracelulares que se desenvolvem no interior do vacúolo parasitóforo (VP) formado no citoplasma de células do Sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro mamífero (KAYE et al., 2011, TEIXEIRA et al., 2013). Neste microambiente intracelular sobrevivem a temperaturas entre 30-37 °C, são metabolicamente ativas em pH ácido, sob baixos níveis de oxigênio e diferentes condições nutricionais (BESTEIRO et al., 2007; MCCONVILLE et al., 2011).

Independente da espécie de *Leishmania* envolvida e da manifestação clínica, o ciclo biológico é semelhante para todas as espécies (Figura 2). Os protozoários deste gênero 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) (SHARMA; SINGH, 2008; READY, 2013).

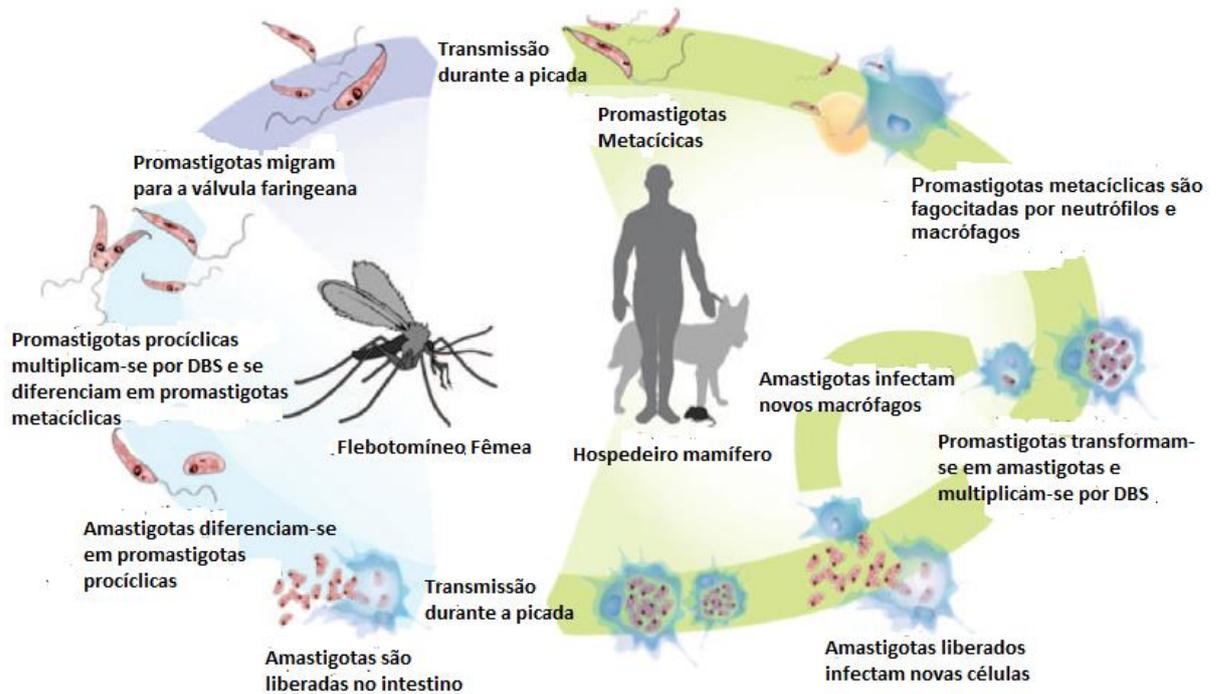


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania* sp. Retirado de HARHAY et al., 2011 com modificações.

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 juntamente com a saliva do flebotomíneo (KAYE; SCOTT, 2011; SCOTT et al., 2016). Após a inoculação das formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro, os parasitos são fagocitados pelos macrófagos e internalizados dentro do vacúolo parasitóforo, onde irão se diferenciar em amastigotas. As formas amastigotas iniciam um processo de multiplicações sucessivas por divisão binária simples (DBS) por um período de 4-6 dias, até ocupar todo o citoplasma do macrófago. Em seguida, os macrófagos se rompem e liberam os parasitos que serão fagocitados por novas células hospedeiras, no interior das quais continuam a se multiplicar, contribuindo para a propagação e estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (LODGE; DESCOTEAUX; 2005; FRANCO et al., 2012). Outras células da imunidade inata como neutrófilos, monócitos, células dendríticas e fibroblastos são recrutados para o sítio da infecção e podem atuar como células hospedeiras, exercendo papéis distintos na regulação da resposta imune inicial do hospedeiro frente à infecção (NADERER; MCCONVILLE, 2008; KAYE; SCOTT, 2011; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebotômíneo, ao realizar novo repasto sanguíneo, se alimenta em um hospedeiro infectado e ingere macrófagos infectados contendo formas amastigotas que acompanham o sangue (RIBEIRO, 1995; ROY et al., 2012). Estas, diferenciam-se em promastigotas procíclicas, realizam multiplicações sucessivas por DBS e após um processo denominado metaciclogênese, irão se transformar em promastigotas metacíclicas; as quais não possuem capacidade proliferativa, são altamente infectivas para células de mamíferos e serão transmitidas a um novo hospedeiro mamífero durante a alimentação da fêmea (PIMENTA et al., 1992; VAN ASSCHE et al., 2011; TEIXEIRA et al.; 2013).

1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

As leishmanioses estão associadas a uma diversidade de manifestações clínicas. A susceptibilidade à infecção, bem como a forma clínica e a gravidade da doença dependem de uma combinação de fatores relacionados ao hospedeiro como status imunológico, predisposição genética, idade, comorbidades, estado nutricional e características inerentes ao parasito como carga parasitária, virulência e tropismo por diferentes órgãos (pele, mucosa ou órgãos viscerais) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; NOVAIS; SCOTT, 2015). Algumas espécies apresentam tropismo por células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) das regiões de pele e mucosas, desencadeando infecções cutâneas que levam inicialmente a produção de um nódulo na pele (“histiocitoma”) e de evolução clínica variada (forma localizada, disseminada, difusa ou mucocutânea). Outras espécies apresentam tendência a se disseminar a partir do sítio inicial de infecção na pele, multiplicando-se nas células do SFM dos órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea (BEATTIE; KAYE, 2011; READY, 2014).

Em relação à LTA, o homem pode apresentar desde infecção subclínica ou assintomática a manifestações distintas que variam de lesões cutâneas localizadas com resolução clínica espontânea; até formas mais graves e de curso crônico como a forma disseminada, difusa e mucocutânea (GOLLOB et al., 2008; KEVRIC et al., 2015).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação clínica de maior prevalência, representando 50-75 % dos novos casos (KUMAR; ENGWERDA,

2014). A lesão é geralmente do tipo ulcerosa, com período de incubação variável entre dez dias a três meses. Na maioria dos casos a lesão primária é 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 (até dez ou mais lesões). O aspecto clínico mais frequente são ulcerações únicas, em geral indolores, bem delimitadas, apresentando bordas elevadas e repletas de parasitos e com fundo granulomatoso (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; DAVID; CRAFT, 2009; KEVRIC et al., 2015). Todas as espécies de *Leishmania* relacionadas à LTA podem ocasionar LCL, sendo que as espécies mais prevalentes no Brasil são *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lainsoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A lesão tende a cura espontânea após 1 ou 2 anos e apresenta boa resposta ao tratamento na maioria dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) constitui uma forma clínica rara, porém de maior gravidade. Inicia-se com uma lesão única, mas que não responde satisfatoriamente ao tratamento farmacológico. Após meses ou anos, ocorre disseminação hematogênica do parasito com aparecimento de numerosos nódulos não ulcerados, com abundância de parasitos em diferentes partes do corpo, como: face (nariz, lábio superior, orelhas) e membros (braços, antebraços, pernas, pés). Esta manifestação tipicamente ocorre em pacientes com anergia imunológica na qual a deficiência na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* é responsável pela acentuada proliferação dos parasitos e disseminação da infecção. Este comprometimento da resposta celular leva a um curso crônico e progressivo da doença, com baixa resposta a quimioterapia (REITHINGER et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; KEVRIC et al., 2015). No Continente Americano, a LCD encontra-se estritamente associada às espécies do complexo mexicana, principalmente *L. amazonensis* e *L. mexicana* (SILVEIRA et al., 2009). No Brasil, casos de LCD têm sido registrados, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste e associados, exclusivamente, a *L. amazonensis* (LAINSON et al., 1987; SILVEIRA et al., 2004).

A forma disseminada da LC é reconhecida pelo surgimento de múltiplas lesões ulceradas de aspecto polimórfico em duas ou mais áreas do corpo e observadas com maior frequência na face e tronco (GOTO; LINDOSO, 2012). As lesões se estabelecem poucos dias após o desenvolvimento das lesões primárias

por meio da disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática e ocasionando lesões distantes do local da picada (COSTA et al., 1986, CARVALHO et al., 1994; MINISTÉRIO da SAÚDE, 2013). Caracteriza-se pela escassez de parasitos na lesão, elevada resposta imune celular e baixa resposta ao tratamento convencional (NOVAIS; SCOTT, 2015). É relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos de LC e frequentemente observada em pacientes co-infectados pelo vírus HIV. Está associada a infecções por espécies do Novo Mundo relacionadas ao subgênero *Viannia* e *Leishmania*, principalmente, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 2009).

A forma recidiva diferencia-se das demais pelo desenvolvimento, após períodos variáveis de meses e anos, de lesões de aspecto vesiculares e pápula em torno da borda de uma lesão cicatrizada espontaneamente ou após tratamento farmacológico (GOTO; LINDOSO, 2012). As infecções tendem a ser resistentes ao tratamento farmacológico. No Brasil, há notificações de casos provocados pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (PISCOPO et al., 2006; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

A leishmaniose cutâneomucosa (LCM) é clinicamente caracterizada pelo desenvolvimento de lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Na maioria dos casos, a LCM é resultante da LC de evolução crônica após a cura clínica espontânea ou com tratamento farmacológico inadequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra pela habilidade dos parasitos de alcançar, meses ou anos após a lesão inicial, a mucosa nasal e orofaríngea por disseminação linfática ou hematogênica, induzindo lesão tecidual severa e metástase resultante da ativação de resposta imune hiper-inflamatória exacerbada pelo hospedeiro (DE MOURA et al., 2005; GOTO; LINDOSO, 2010; SCOTT, NOVAIS, 2016). 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 infecções secundárias, podendo levar o paciente a óbito (REITHINGER et al., 2007; AMATO et al., 2008). Estima-se que cerca de 90% dos casos de LCM ocorram no Brasil, Bolívia e Peru (KUMAR; ENGWERDA, 2014). O principal agente etiológico é a *L. braziliensis* (SILVEIRA et al., 2009), mas outras espécies são também associadas como *L. panamensis* e *L. guyanensis* (RONET et

al., 2011). Apesar da escassez de parasitos, as lesões de LCM são de difícil tratamento em função da resistência à terapêutica convencional e da presença de infecções bacterianas secundárias (DAVID; CRAFT, 2008; MINISTÉRIO da SAÚDE, 2013).

1.4 RESPOSTA IMUNE NA LTA

Nos momentos iniciais da infecção, a *Leishmania* é internalizada por diferentes tipos de células hospedeiras, tais como neutrófilos, macrófagos, macrófagos, monócitos e fibroblastos, resultando na disseminação da infecção para os linfonodos drenantes e a consequente ativação da resposta imune do hospedeiro (CECILIO et al., 2011; GOLLOB et al., 2014, DE MORAIS et al., 2015). A intensidade e qualidade da resposta imune desencadeada nos momentos iniciais da infecção são determinantes se o contato inicial com *Leishmania* irá resultar no controle da infecção pelo hospedeiro, no desenvolvimento de formas autolimitadas (infecções assintomáticas) ou na evolução para formas clínicas mais graves de curso crônico e progressivo (CARVALHO et al., 2012; GOLLOB et al., 2014).

É importante também considerar o papel efetivo da saliva do flebotomíneo na exacerbação da infecciosidade das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado mediante a produção de um conjunto de substâncias, dentre elas o maxadilina e “promastigote secretory gel” (PSG), com atividade vasodilatadora, anti-agregante plaquetária, anti-hemostática e imunossupressora (KAMHAWI, 2000; SOARES; TURCO, 2003). O papel imunomodulatório das moléculas presentes na saliva exerce diversos efeitos na resposta imune do hospedeiro, dentre eles: regulação da produção de anticorpos, recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção e aumento na expressão e atividade de arginase, inibição da ativação de células dendríticas e macrófagos, inibição da produção de citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ) e indução da produção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) que suprimem a resposta imune celular, favorecendo o sucesso da infecção (ROGERS, TITUS, 2003; ROGERS et al., 2009).

No contexto da LTA, a resposta imune efetiva é resultante, principalmente, da ativação da resposta imune celular pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. A diferenciação das células T CD4⁺ nos diferentes subtipos Th1 ou Th2 cumpre uma função central, induzindo susceptibilidade ou resistência à infecção dependendo do contexto de citocinas produzidas (GOLLOB et al., 2014).

A ativação da resposta do tipo Th1 tem sido correlacionada tanto com o controle da infecção, bem como com o agravamento da imunopatologia nas formas cutâneas mais graves como observado na LCM (SILVEIRA et al., 2009; SCOTT, NOVAIS, 2016). A produção de IL-12 pelos macrófagos e células dendríticas infectadas induz as células Th1 a produzir IFN- γ , capaz de ativar os mecanismos microbicidas pelos macrófagos, resultando na síntese de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio e, conseqüentemente, a morte dos parasitos intracelulares. Por outro lado, a produção excessiva de TNF- α e IFN- γ induz uma resposta inflamatória exacerbada, responsável pela destruição tecidual e pode, diretamente, culminar no desenvolvimento de quadros clínicos mais graves (SILVEIRA et al., 2009; DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). A *Leishmania* é também capaz de escapar da resposta imune do hospedeiro e modular a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2. Neste caso, a ação supressiva das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 sobre os macrófagos resulta na inibição da resposta Th1 e desativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, favorecendo a sobrevivência do parasito e estabelecimento da infecção (GOLLOB et al., 2014).

Sabe-se que na LTA as células T CD8⁺ exercem um papel duplo, contribuindo diretamente no controle da infecção e na imunidade protetora frente a novas infecções como observado na LCL, mas também estão envolvidas na indução de uma resposta inflamatória exacerbada e destruição tecidual nas formas cutâneas mais graves (NOVAIS, SCOTT, 2015). Nos estágios iniciais da infecção, as células T CD8⁺ exercem um papel chave no controle da infecção induzindo a produção de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como IFN- γ e IL-12, as quais são importantes na modulação da resposta para Th1 e supressão da resposta Th2 (SCOTT; NOVAIS, 2016). A produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ após a cura das lesões também tem sido correlacionada com o controle da infecção (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012, NOVAIS; SCOTT, 2015). Por outro lado, evidências crescentes demonstram o papel patogênico das células T CD8⁺ no desenvolvimento das manifestações mais graves como LCD e LCM e caracterizada pela elevada

produção de IL-10 e TGF- β (GOMES-SILVA et al., 2007). Outra função patogênica associada às células T CD8⁺ é sua atividade citotóxica marcada pela expressão elevada de moléculas citolíticas tais como perforina e granzima na lesão de pacientes com LCM provocadas por *L. braziliensis* e implicada no agravamento do quadro clínico (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

A contribuição das células B na resposta imune às leishmanioses não está bem estabelecida e parece desempenhar um papel na regulação da resposta imune mediante a produção de citocinas, anticorpos e indução da ativação de células T CD4⁺ (RODRIGUES-PINTO et al., 2014). Neste contexto, estudos demonstram que a produção de anticorpos IgG é necessária para o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora efetiva; outros reforçam o papel das células B na patogênese da infecção, contribuindo para a progressão da infecção mediante a produção de anticorpos policlonais e citocinas imunossupressoras como IL-10. O perfil e intensidade da resposta humoral parece estar diretamente relacionada com a cepa e espécie infectante, carga parasitária e forma clínica; sendo que níveis elevados de anticorpos têm sido observados em pacientes com manifestações clínicas mais graves como a LCD, enquanto pacientes com LCL desenvolvem uma fraca resposta humoral (BOMFIM et al., 2007; RONET et al., 2011; RODRIGUES-PINTO et al., 2014).

Estudos já demonstraram que a resolução da infecção primária com *Leishmania* pode resultar no desenvolvimento de uma imunidade protetora frente à reinfecção. Desta forma, os parasitos remanescentes nas lesões, cuja permanência é regulada principalmente pela IL-10, contribuem para a estimulação constante de uma população de células T CD4⁺ efetoras que respondem prontamente a um novo contato com o parasito (BOGDAN, 2008, SCOTT; NOVAIS, 2016). Este fenômeno da persistência parasitária representa um equilíbrio da relação parasito-hospedeiro de modo que a constante estimulação antigênica confere proteção ao hospedeiro frente a novas infecções mediante a formação de memória imunológica. Por outro lado, a sobrevivência parasitária seria um fator crítico para a ocorrência de casos de reativação espontânea da doença e manutenção do ciclo de transmissão da doença (MENDONÇA et al., 2004; SCOTT; NOVAIS, 2016).

1.5 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

A quimioterapia atual para as leishmanioses é considerada insatisfatória em função de diversos fatores, como: número limitado de fármacos disponíveis, baixa eficácia, custo elevado, aumento dos casos de resistência parasitária e elevado grau de toxicidade. Aliado a isto, tem-se o esquema terapêutico por tempo prolongado e por vias de administração desconfortáveis (parenteral ou intramuscular), as quais necessitam de hospitalização e monitorização terapêutica, resultando em baixa adesão do paciente ao tratamento (JAIN; JAIN, 2013; DE MENEZES et al., 2015; SINGH et al., 2016). Na ausência de uma vacina disponível para uso em humanos, o tratamento farmacológico é a principal alternativa de controle das leishmanioses (KUMAR; ENGWERDA, 2014, SEYED et al., 2016).

Diversos aspectos da biologia da *Leishmania* são considerados limitantes para a eficácia dos fármacos, com destaque para: (i) localização das formas amastigotas intracelulares dentro de compartimentos de natureza ácida (vacúolo parasitóforo) no interior de macrófagos; (ii) desenvolvimento de mecanismos elaborados de evasão do sistema imune do hospedeiro; (iii) características farmacocinéticas diferenciadas para os fármacos alcançarem em concentrações terapêuticas órgãos viscerais como fígado, baço, medula óssea no caso da LV; ou a pele e mucosas na LTA; (iv) diferenças intrínsecas na sensibilidade aos fármacos entre as espécies de *Leishmania* que provocam a infecção em humanos e (v) *Leishmania* tem o potencial de responder à pressão medicamentosa sob múltiplas vias, resultando em falhas terapêuticas, resistência à drogas e dificuldades na elucidação do mecanismo de ação dos fármacos (LOISEAU; BORRIES, 2006; SHUKLA et al. 2010; CROFT; OLLIARO, 2011; NAGLE et al. 2014; DA CUNHA-JUNIOR, 2015; GEIGER et al., 2016). Diante desta série de limitações, o tratamento atual para as leishmanioses dispõe de um número restrito de medicamentos (Figura 3).

Figura 3: Principais fármacos utilizados na terapia das leishmanioses.

Fármaco	Estrutura Química
Antimoniato de meglumina	
Estibugluconato de Sódio	
Anfotericina B	
Pentamidina	
Paromomicina	
Miltefosina	

Fonte: Adaptado de FIDALGO; GILLE, 2011.

Os derivados antimoniais foram inicialmente utilizados no tratamento da LC e LV por Gaspar Vianna em 1912 sob a forma do composto tártaro emético (VIANNA, 1912). Atualmente, os antimoniais pentavalentes permanecem como os fármacos de primeira escolha e estão disponibilizados sob duas formulações: Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) (Figura 3) e estibogluconato de sódio (Pentostam®) (Figura 3), que podem ser administrados por via endovenosa ou intramuscular com igual eficácia (CRUZ et al., 2009; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi totalmente elucidado e parece estar associado a diferentes mecanismos de ação e vias metabólicas do parasito. Tem sido sugerido que a forma pentavalente (Sb^{5+}) atue como um pró-fármaco, sendo reduzida a sua forma ativa antimônio trivalente (Sb^{3+}) no interior do fagolisossomo pela ação da glutatona, glicilcisteína e triapanotona ou por ativação enzimática pela redutase dependente de tiol (DENTON et al., 2004) e antimonito redutase (ASHUTOSH et al., 2007; FRÉZARD et al., 2010).

A atividade do composto é parcialmente resultante da sua interação com o sistema antioxidante do parasito, inibindo a atividade da tripanotona redutase, enzima envolvida na proteção contra o dano oxidativo; e comprometendo a capacidade da *Leishmania* de reduzir tiol, resultando na morte do parasito pelo acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelular (WYLLIE et al., 2004; HALDAR et al., 2011). O composto inibe as enzimas da via glicolítica e da β -oxidação de ácidos graxos nas formas intracelulares do parasito, resultando na redução da formação de ATP e GTP (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). A atividade dos antimoniais também está associada à indução de uma série de eventos sugestivos de apoptose, tais como: fragmentação do DNA (SERENO et al., 2001), inibição da DNA topoisomerase I (CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1988), aumento da produção de EROs, acúmulo de Ca^{2+} citosólico e colapso do potencial de membrana mitocondrial (SHAHA, 2006).

Uma das principais limitações da terapia com antimoniais é a variação da eficácia do fármaco dependendo da manifestação clínica, bem como em função das variações genéticas entre espécies e cepas de *Leishmania* encontradas em regiões geográficas distintas (GOTO; LINDOSO, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011). Os dados mais alarmantes ocorrem na região endêmica de Bihar, na Índia, onde cerca de 60% dos novos casos apresentam refratariedade ao tratamento com antimoniais (AGRAWAL et al., 2005; STAUCH et al., 2013). Estudos já evidenciaram a existência

de múltiplos mecanismos moleculares de resistência aos antimoniais, incluindo: diminuição na captação de Sb^{3+} em função da expressão reduzida de aquagliceroporinas (AQP1) e aumento na expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo do tiol, detoxificação e eliminação da droga (MUKHOPADHYAY et al., 1996; GOUBAL et al., 2004; WYLLIE et al., 2004).

Outra problemática é que o tratamento sistêmico por um período prolongado provoca o acúmulo da forma ativa do fármaco em diferentes órgãos como coração, baço e fígado, resultando em efeitos potencialmente mais graves como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, principalmente em pacientes idosos. Além de uma série de efeitos adversos como artralgia, mialgia, náuseas, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, choque pirogênico, edema, arritmia cardíaca e toxicidade renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Em função da capacidade do composto em atravessar a barreira transplacentária, seu uso não é indicado durante a gravidez (DAVID; CRAFT, 2009; DE MENEZES et al., 2015).

A anfotericina B (Figura 3) é um antifúngico poliênico isolado da bactéria *Streptomyces nodusus* utilizado no tratamento de infecções sistêmicas (HARTSEL; BOLARD, 1996). É indicada como primeira opção terapêutica para o tratamento de pacientes não responsivos a terapia com antimoniais, crianças, gestantes e pacientes co-infectados com HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O mecanismo de ação da anfotericina B está relacionado à afinidade ao ergosterol, principal esteroide de membrana plasmática de tripanossomatídeos e fungos. O fármaco forma um complexo binário com os esteróides da membrana plasmática do parasito que resulta na formação de poros na membrana, com consequente liberação de íons K^+ , Na^+ , H^+ e Cl^- e culminando na morte do parasito resultante da alteração na permeabilidade da membrana plasmática e do equilíbrio osmótico do parasito (HARTSEL; BOLARD, 1996; RAMOS et al., 1996; FREITAS-JUNIOR et al., 2012). A atividade da droga também está associada a características sugestivas de morte por apoptose como colapso do potencial de membrana mitocondrial e fragmentação do DNA (LEE et al. 2002). Sobre o mecanismo de ação *in vivo*, estudos já comprovaram que o efeito do composto seria resultante da sua interação com o ergosterol da membrana do parasito aliado à capacidade de sequestrar o colesterol da membrana da célula hospedeira, comprometendo a interação parasito-macrófago (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). A principal limitação do fármaco são os efeitos tóxicos resultantes da sua elevada afinidade

com o colesterol da membrana plasmática da célula humana, dentre eles: cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, além de efeitos adversos importantes como hipopotassemia, febre, náuseas, flebite no local da infusão e reações anafiláticas (CROFT; COOMBS, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)

Nos últimos anos, uma série de formulações lipossomais da anfotericina B estão disponíveis comercialmente para o tratamento da LV, dentre elas: anfotericina B lipossomal AmBisome®), anfotericina B de dispersão coloidal (Amphocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®) (SINHA; BHATTACHARYA, 2014). Dentre as vantagens das formulações lipídicas, tem-se: aumento da eficácia terapêutica em função da maior captação da droga pelos macrófagos no baço e fígado, redução no tempo de tratamento e diminuição da toxicidade. Em contrapartida, apresenta custo elevado, o que inviabiliza o seu uso na rotina terapêutica em países menos desenvolvidos (MISHRA et al., 2009; DEN BOER et al., 2011; DE MORAIS et al., 2015). No Brasil, o Ministério da Saúde já disponibiliza a anfotericina B lipossomal para o tratamento da LV, sendo indicada para o tratamento de crianças menores de 1 ano, idosos, pacientes transplantados, com quadros de insuficiência renal, cardíaca ou hepática e coinfectados com HIV. Entretanto, não existe registro para uso no tratamento da LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A pentamidina (Figura 3) é um derivado de diamina aromático que tem sido utilizado com uma opção terapêutica para o tratamento da LC e LV em casos de resistência à terapia com antimoniais e em pacientes cardíacos (CROFT et al., 2006). A droga é também utilizada no tratamento da tripanossomíase africana humana (BRUN et al., 2010). O principal alvo de atuação do composto é a mitocôndria da *Leishmania* mediante a inibição do complexo II da cadeia respiratória e induzindo colapso do potencial de membrana mitocondrial (VERCESI; DOCAMPO, 1992; MUKHERJEE et al., 2006). A atividade do composto está também associada à inibição da síntese de DNA e parada do ciclo celular na fase G₂/M (NQUEWA et al., 2005). Seu uso clínico tem sido abandonado em função da eficácia clínica limitada aliado aos efeitos adversos potencialmente graves, como cardiotoxicidade, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia e dor no local da injeção (CROFT et al., 2006; DAVID; CRAFT, 2009; SINGH et al., 2016).

A paromomicina (Figura 3) é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos que foi recentemente aprovada para o tratamento da LV (SHAKYA

et al., 2011; SINGH et al., 2016). Sua eficácia clínica foi comprovada quando administrada por via parenteral tanto na terapia isolada, quanto em associação com estibogluconato de sódio (NEAL et al., 1995) 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). As principais vantagens do fármaco são: baixo custo, poucos efeitos adversos, elevada eficácia e tempo de tratamento reduzido (MOHAPATRA, 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que a ação leishmanicida envolve inibição da síntese proteica e interferência na função mitocondrial do parasito (JHINGRAN et al., 2009). Os principais efeitos adversos associados à terapia com o fármaco são edema, prurido e irritação no local da administração (ARMIJOS et al., 2004).

A miltefosina (Figura 3) é um análogo alquilfosfocolina originalmente utilizada no tratamento de câncer de mama (HILGARD et al., 1993) tendo o seu efeito leishmanicida primeiramente descrito por Croft et al. (1987). Esta descoberta significou um importante avanço no tratamento da LV, pois foi o primeiro fármaco oral utilizado com sucesso na Índia em pacientes resistentes aos antimoniais pentavalentes e com baixa toxicidade em crianças e idosos (SUNDAR et al., 2005; CROFT; ENGEL, 2006; SUNDAR; OLLIARO, 2007). Estudos de triagem clínica do fármaco no tratamento da LC na América do Sul demonstraram eficácia clínica limitada e falhas terapêuticas, o que desaponta a expectativa do seu uso no tratamento da LC pela via oral (SOTO et al., 2001, SOTO et al., 2004; YARDLEY et al., 2005; MACHADO et al., 2010).

O efeito leishmanicida da miltefosina está associado a múltiplos alvos, induzindo uma série de eventos bioquímicos e celulares típicos de morte por apoptose como: disfunção mitocondrial, condensação nuclear, fragmentação do DNA, parada do ciclo celular e exposição de fosfatidilserina (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004, MARINHO et al., 2011). Sua ação anti-*Leishmania* também inclui a interferência na via de biossíntese de fosfatidilcolina (LIRA et al., 2001) e nas vias de transdução de sinais relacionadas a lipídios, resultando em perturbação da dinâmica lipídica (LUX et al., 2000).

Apesar do importante avanço obtido com a terapia oral com miltefosina, o fármaco possui uma série de limitações, dentre eles: variação de sensibilidade entre diferentes espécies de *Leishmania*, falha terapêutica, alto custo, período prolongado de tratamento, elevada toxicidade, tempo de meia-vida prolongado (sete dias),

favorecendo o surgimento de cepas resistentes (DORLO et al., 2008; MALTEZOU, 2010; SINGH et al., 2016). Além disto, seu uso é contra-indicado em crianças e gestantes em função dos efeitos tóxicos sobre o trato gastrointestinal (perda de apetite, vômitos e diarreia), hepato e nefrotoxicidade e potencial teratogenicidade (DORLO et al., 2012). Este conjunto de fatores colocam em risco a continuidade da quimioterapia leishmanicida com o fármaco (MALTEZOU, 2010; DORLO et al., 2012).

1.6 MORTE CELULAR EM PROTOZOÁRIOS

O processo de morte celular em metazoários tem sido amplamente estudado e envolve mecanismos distintos que ocorrem de maneira regulada ou programada ("Programmed cell death" - PCD) e não regulada (GALLUZI et al., 2012; BERGHE et al., 2014). Em contrapartida, em protozoários e outros organismos eucariotos, o mecanismo de morte foi pouco explorado durante décadas e assumia-se que estes microrganismos morriam de maneira não coordenada; sendo os processos relacionados à interação parasito-hospedeiro, patogênese, resposta imunológica e ação de agentes quimioterápicos amplamente ignorados (LÜDER et al., 2010). Atualmente, diversos processos amplamente descritos em metazoários também têm sido evidenciados nos protozoários (DEPONTE, 2008; KACZANOWSK, SAJID, REECE, 2011; BRENNAND et al., 2012; PROTO et al., 2013; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

A apoptose é o tipo de PCD melhor caracterizado, tendo sido primeiramente descrita em metazoários por Richard Lockshin em 1960 e somente em 1995 em organismos protistas por Ameinsen e colaboradores. É um processo altamente regulado, que ocorre sob condições fisiológicas e patológicas e responsável pela manutenção da homeostase de processos biológicos distintos, dentre eles: renovação celular e tecidual, remoção seletiva de células danificadas ou infectadas, desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema imune (MARTINEZ et al., 2010; GALLUZZI et al., 2012). Em protozoários, a apoptose apresenta um papel fundamental na sobrevivência e manutenção do ciclo de vida e está implicada na regulação de processos celulares distintos, como o desenvolvimento parasitário no hospedeiro mamífero e inseto vetor, diferenciação celular, resposta ao estresse e

modulação da resposta imune do hospedeiro (LÜDER et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012).

Na infecção com *Leishmania*, por exemplo, tem sido descrito um processo refinado de manipulação da maquinaria apoptótica da célula hospedeira, conhecido como “cavalo de Tróia”. Nas primeiras horas de infecção, os neutrófilos são recrutados ao local da infecção e servem como célula hospedeira primária para *Leishmania*. O processo de interiorização inicial dos promastigotas nos neutrófilos cumpre um importante papel na sobrevivência dos parasitos no hospedeiro vertebrado. Os neutrófilos rapidamente entram em apoptose e a fagocitose das células apoptóticas pelos macrófagos induz uma resposta anti-inflamatória resultante da secreção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β , inibindo a atividade microbicida dos macrófagos, favorecendo a entrada silenciosa do parasito e estabelecimento da infecção (LASKAY et al., 2003; PETERS et al., 2008; CECÍLIO et al., 2014).

Outra estratégia utilizada pela *Leishmania* para mimetizar o fenótipo apoptótico é a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície de uma subpopulação promastigotas no momento da infecção da célula hospedeira. Estas formas promastigotas apoptóticas são fagocitadas pelos macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüente, ativação da resposta imune do hospedeiro; garantindo a sobrevivência intracelular dos promastigotas que não expressam o fenótipo apoptótico e o sucesso da infecção (BRUCHHAUS et al., 2007; WANDERLEY et al., 2009; EL-HANI et al., 2012; WANDERLEY et al., 2013). Um mecanismo semelhante é também observado nas formas amastigotas, na qual a mimetização da morte por apoptose mediante a exposição de PS na membrana plasmática externa, resulta na desativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, favorecendo o estabelecimento e manutenção da infecção (WANDERLEY et al., 2005; SHAHA, 2006; WANDERLEY et al., 2006; EL-HANI et al., 2012).

As características sugestivas de morte por apoptose em protozoários têm sido observadas em resposta a uma variedade de estímulos, tais como: metaciclogênese, cultura de células em fase estacionária, deficiência nutricional, EROs, óxido nítrico, choque-térmico, toxinas, inibidores da cadeia respiratória, efeito de drogas, prostaglandinas, anticorpos, peptídeos antimicrobianos, mutações em genes regulatórios do ciclo celular, dentre outros processo (DEBRADANT et al.,

2003; DUSZENKO et al., 2006, BRUCHHAUS et al., 2007; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; SHEMAROVA, 2010; SMIRLIS et al., 2010).

A apoptose em protozoários está associada a diversas alterações bioquímicas e celulares classicamente encontrados em células mamíferas, como colapso do potencial de membrana mitocondrial, aumento nos níveis de EROs, liberação do citocromo c, atividade de caspase-*like*, exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática externa, manutenção da integridade da membrana plasmática até os estágios finais, aumento nos níveis de cálcio citosólico, retração celular, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA nuclear (SERENO et al., 2001; ARNOULT et al., 2002; LEE et al., 2002; DEBRADANT et al., 2003; BRUCHHAUS et al., 2007; DEPONTE, 2008; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; LÜDER et al., 2010; SHEMAROVA et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012).

Em contrapartida, elementos centrais para a ativação da maquinaria apoptótica no núcleo como as proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, tais como o fator indutor de apoptose (AIF) e proteínas da família Bcl2, bem como os receptores de morte da família TNF e a ativação proteolítica de caspases não foram evidenciados no genoma de protozoários (SHEMAROVA et al., 2010; SMIRLIS et al., 2010). Contudo, estudos bioquímicos e moleculares já identificaram a presença de uma variante desta proteína, denominadas metacaspases, amplamente conservadas em protozoários, fungos e plantas (LEE et al., 2002; SMIRLIS et al., 2010; TSIATSIANI et al., 2011; CASANOVA et al., 2015). Apesar de estruturalmente distinta das caspases de metazoários, as metacaspases estão envolvidas no processo de morte celular, sobretudo, regulando negativamente o ciclo celular, diferenciação celular e a proliferação do parasito no hospedeiro mamífero (CASTANYS-MUNOZ et al., 2012),

Em função da ausência de diversas características classicamente observadas em organismos multicelulares e do entendimento dos mecanismos moleculares que desencadeiam a maquinaria apoptótica em protozoários, a apoptose em protozoários ainda é alvo de inúmeros questionamentos sendo, atualmente, o termo “apoptose-*like*” o mais aceito (RODRIGUES et al., 2006; KACZANOWSKI et al., 2011; PROTO et al., 2013; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

O termo autofagia, primeiramente descrito por Christian de Duve em 1963, tem sido amplamente caracterizado como um processo fisiológico e evolutivamente

conservado de auto-degradação celular essencial para a manutenção do balanço metabólico em organismos eucariotos, que resulta na renovação de estruturas celulares danificadas durante o ciclo celular normal e também sob condições de estresse celular. Também reconhecido como PCD é considerada um “double-edged sword”, exercendo um duplo papel entre uma estratégia de sobrevivência da célula sob diversas condições de estresse celular e quando, excessivamente induzida, a desregulação do processo desencadeia a ativação da via de morte celular (MAIURI et al., 2007). A execução e regulação do processo autofágico é orquestrada por um conjunto de cerca de 30 proteínas da família das “autophagy-specific genes” (ATGs) que são caracterizadas pelo elevado grau de conservação entre mamíferos e organismos unicelulares (BRUCHHAUS et al., 2007; DUSZENKO, 2011; BRENNAND et al., 2012).

Em metazoários, o processo é tipicamente induzido sob diversas condições de estresse celular, incluindo: privação de nutrientes e oxigênio, acúmulo de cálcio intracelular, estresse oxidativo, inibição do receptor tirosina quinase, estresse do retículo endoplasmático, deprivação do fator de crescimento, infecção com microrganismos e sob efeito de fármacos e toxinas (FULDA et al., 2010). Contudo, os mecanismos moleculares que condicionam ora o efeito protetor da autofagia ora a indução de morte celular ainda permanece pouco compreendido e parece estar associado ao agente indutor, contexto, intensidade e conteúdo fagocitado e tempo de indução (FULDA et al., 2010), sendo que a modulação desse processo tem se tornado um importante alvo terapêutico no tratamento do câncer e diferentes processos patológicos (RUBINSZTEIN et al., 2007).

A autofagia é um processo evolutivamente conservado e que também está presente em organismos unicelulares, incluindo protozoários (BERA et al., 2003; BRUCHHAUS et al., 2007; TOTINO et al., 2008, KIEL et al., 2010; LUDER et al., 2010; BRENNAND et al., 2011; DUSZENKO et al., 2011). Assim como observado nos organismos multicelulares, a autofagia em protozoários cumpre um papel duplo entre um mecanismo pró-sobrevivência sob condições de estresse celular, mas que pode resultar em processo de morte celular programada se as condições adversas excederem a capacidade celular (SMIRLIS et al., 2010; LUDER et al., 2010; DUSZENKO et al., 2011; WILLIAMS et al., 2012; PROTO et al., 2013).

Em infecções com *Leishmania*, assim como em outros tripanossomatídeos, a autofagia está diretamente envolvida na regulação de processos biológicos distintos,

dentre eles: remodelamento da morfologia do parasito durante os estágios de diferenciação celular do seu ciclo evolutivo, metaciclogênese, infectividade, adaptação parasitária ao hospedeiro, evasão do sistema imune do hospedeiro, reciclagem de organelas, manutenção da função mitocondrial e capacidade metabólica (LUDER et al., 2010; BRENNARD et al., 2011; DUSZENKO et al., 2011; BRENNARD et al., 2012).

As principais características fenotípicas sugestivas de morte celular autofágica em mamíferos já foram evidenciadas em protozoários, inclusive sob efeito de diversas drogas, dentre elas: intensa vacuolização citoplasmática, acúmulo de autofagossomos, acúmulo de organelas vesiculares ácidas, presença de corpos multivesiculares, formação de estruturas de membrana concêntrica no citoplasma, desorganização celular, presença de proteínas homólogas a ATGs, preservação da integridade membrana plasmática, ausência de fragmentação do DNA, em um processo independente da ativação de *caspase-like* (BERA et al., 2003; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; TOTINO et al., 2008; RODRIGUES; DE SOUZA, 2008; DUSZENKO et al., 2011; BRENNAND et al., 2012). O processo também envolve intensa participação mitocondrial, caracterizada pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial e produção de EROs (RODRIGUES et al., 2006; ZONG; THOMPSON, 2006), o que comprova a importância da regulação desta via como um alvo para novos fármacos antiprotozoários (DEBRABANT et al., 2003; SANTA-RITA et al. 2005; BRAGA; DE SOUZA, 2006; MENNA-BARRETO et al., 2009; BRENNAND et al., 2011; DUSZENKO et al., 2011; BRENNAND et al., 2012).

Por várias décadas, a morte por necrose foi considerada um processo de “morte celular acidental”. Contudo, recentes evidências apontam a existência de múltiplas vias de sinalização em um processo altamente regulado geneticamente (VANDENABEELE et al., 2010; BERGHE et al., 2014). O processo pode ser desencadeado sob diferentes condições fisiopatológicas, incluindo resposta ao estresse celular, infecção por patógenos e lesões teciduais por isquemia (ZONG; THOMPSON, 2006; FULDA et al., 2010).

As principais alterações celulares observadas são vacuolização citoplasmática, degradação das organelas, aumento do volume celular (oncoses), permeabilização da membrana lisossomal e perda da integridade da membrana plasmática. Estas alterações resultam na ruptura da célula com liberação de parte do conteúdo citoplasmático para os tecidos circundantes, culminando no recrutando

de células do sistema imune e desenvolvimento de uma resposta inflamatória local (RODRIGUES et al., 2006; ZONG; THOMPSON, 2006; FULDA et al., 2010; BERGHE et al., 2014). Em estágios mais avançados ocorre a desintegração nuclear e, em alguns casos, também resulta em condensação da cromatina (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). O processo é também caracterizado por alterações drásticas na mitocôndria, como: produção excessiva de EROs, permeabilização da membrana mitocondrial, depleção nos níveis de ATP e perda da homeostase de cálcio.

A morte celular por necrose também tem sido descrita em protozoários, contudo, a importância do processo para a interação parasito-hospedeiro e se o mesmo ocorre de maneira regulada como descrito em metazoários, ainda é pouco esclarecido (MENNA-BARRETO et al.; 2009; LÜDER et al., 2010, JIMENEZ-RUIZ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014).

Em função da ampla divergência acerca da ocorrência de processos de morte celular programada em organismos unicelulares, Proto et al. (2013) propuseram uma nova classificação para a morte celular em protozoários em dois tipos principais: necrose e morte incidental. Segundo esta classificação, o termo necrose caracteriza um processo de morte celular que ocorre na ausência de mecanismos regulatórios e evidenciado mediante alterações morfológicas classicamente observada em metazoários, tais como: arredondamento celular, oncose, inchaço de organelas e ruptura da membrana plasmática. Já a terminologia “morte celular incidental” seria mais adequadamente empregada frente a um processo de morte celular descoordenado desencadeado sob condições de estresse fisiológico ou tratamento com drogas. O processo abrange uma variedade de eventos celulares com características morfológicas e bioquímicas comuns a diferentes subtipos de morte celular e, na ausência de evidências bioquímicas precisas acerca do mecanismo de morte, o termo “morte celular incidental” seria o mais adequadamente empregado.

1.7 QUINOLINAS COMO COMPOSTOS LEISHMANICIDAS

Os compostos heterocíclicos do grupo das quinolinas representam uma das mais bem-sucedidas classes de drogas já descritas (KUMAR et al., 2009; AFZAL et al., 2014; HUSSAINI, 2016) e amplamente reconhecidas por sua eficácia no

tratamento da Malária (FOLEY; TILLEY, 1998; KUMAR et al., 2009). Além disto, apresentam um amplo perfil de atividade farmacológica com eficácia antiprotozoária (FAKHFAKH et al., 2003), antitripanossoma (KINNAMON et al., 1996), antibacteriana (KAUR et al., 2011), antiinflamatória (MUKHERJEE, PAL, 2013), antituberculose (VANGAPANDU et al.; 2004), antitumoral (DEADY et al., 2000; AFZAL et al., 2014), anti-HIV (MOUSCADET; DESMAËLE, 2010) e antifúngica (ZHU et al., 2007).

Diversos trabalhos também demonstram o potencial das quinolinas em *Leishmania* (TEKWANI; WALKER, 2006; RICHARD; WERBOVETZ, 2010; SEIFERT, 2011; NAGLE et al., 2014), com destaque para a sitamaquina (Figura 4), um derivado de 8-aminoquinolina avaliado em estudos de fase clínica para o tratamento oral da LV no Brasil (DIETEZE et al., 2001), na Índia (JHA et al., 2005) e no Quênia (WASUNNA et al., 2005). Apesar dos resultados promissores, eventos adversos renais foram observados e novos estudos estão sendo realizados pela Glaxo Smith na tentativa de se avançar no desenvolvimento deste medicamento (LOISEAU et al., 2011; GSK, 2016). O mecanismo de ação da sitamaquina em *Leishmania* inclui uma variedade de alvos bioquímicos e celulares. Evidências apontam a mitocôndria como um alvo primário para a ação do composto, desencadeando colapso do potencial de membrana mitocondrial (VERCESI; DOCAMPO, 1992), inibição do complexo II da cadeia respiratória, inchaço da organela, diminuição no conteúdo de ATP, acúmulo de EROs, inibição do consumo de oxigênio, culminando em morte por apoptose-*like* (CARVALHO et al., 2011). Estudos evidenciaram também o acúmulo do fármaco no acidocalcissoma, resultando na alcalinização da organela e morte do parasito (LÓPEZ-MARTÍN et al., 2008). A 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).

Outro derivado de 8-aminoquinolina com perfil leishmanicida promissor é a tafenoquina (Figura 4), fármaco em triagem clínica para o tratamento antimalárico. O efeito leishmanicida do composto parece estar associado a mitocôndria do parasito, com inibição do citocromo c redutase (complexo III da cadeia respiratória), diminuição do consumo de oxigênio, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e aumento de EROs; a qual é acompanhado de aumento nos níveis de Ca intracelular e fragmentação do DNA nuclear, culminando em morte por apoptose-*like* (CARVALHO et al., 2010).

Outro composto promissor é o imiquimod (Figura 4) um derivado imidazoquinolina (MINODIER; PAROLLA, 2007) com uso clínico para o tratamento de verrugas genitais provocadas pelo papilovirus humano (HPV) e na terapia do câncer de pele. O fármaco foi recentemente incluído pela OMS na terapia combinada com antimoniato de meglumina como segunda opção terapêutica para o tratamento da LC no Novo Mundo (WHO, 2016), Estudos já demonstraram sua potente atividade imunomodulatória induzindo a produção de diferentes citocinas pro-inflamatórias, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999; SCHÖN, SCHÖN, 2007).

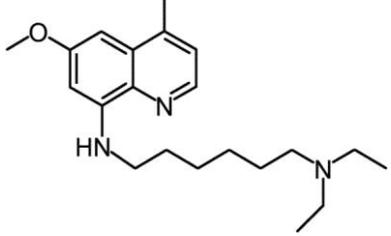
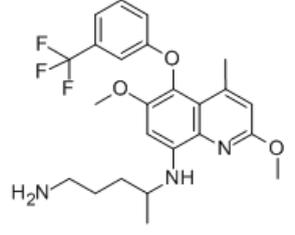
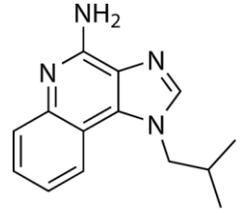
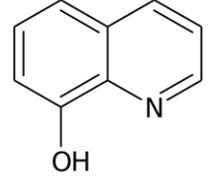
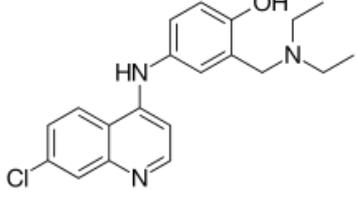
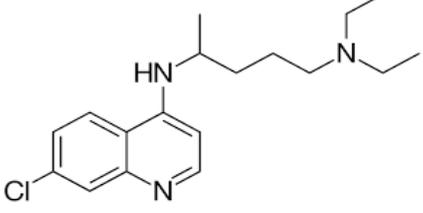
A 8-hidroxiquinolina (Figura 4) e seus derivados compreendem uma classe de derivados com atividade farmacológica versátil, dentre elas: neuroprotetora, antitumoral, antibacteriana e antifúngica. Em *Leishmania*, estudos têm demonstrado que a 8-hidroxiquinolina apresenta um perfil promissor *in vitro* em diferentes espécies de *Leishmania* (DARDARI et al. 2004; PALOQUE et al., 2012; COA et al., 2015; COSTA DUARTE et al., 2016). Em paralelo, o composto foi eficaz por via subcutânea em camundongos cronicamente infectados com *L. amazonensis* (COSTA DUARTE et al., 2016) e em modelo murino de leishmaniose visceral com *L. Infantum* (COSTA DUARTE et al., 2016). Estudos preliminares relacionados ao modo de ação do composto apontam para a interferência na funcionalidade mitocondrial, marcada pela produção de EROs e perda de potencial de membrana mitocondrial (COSTA DUARTE et al., 2016).

Outro importante grupo de derivados de quinolinas com ampla atividade farmacológica são as 4-aminoquinolinas e melhor representadas pela cloroquina (Figura 5) e amodiaquina (Figura 4), as quais têm sido utilizadas durante décadas como principal opção terapêutica para o tratamento da malária (O'NEILL et al., 1998). Em função do surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes e, mais recentemente, *P. vivax*; o uso da cloroquina é atualmente restrita ao tratamento de infecções por *P. vivax* não-complicada (WHO, 2015). O mecanismo de ação das 4-aminoquinolinas em *Plasmodium* está relacionado ao acúmulo da droga no vacúolo digestivo, inibindo a formação do pigmento malárico (hemozoína) e induzindo a morte do parasito pela produção de EROs (DAWSON et al., 1993; GRAVES et al., 2002). O efeito antimalárico da cloroquina está também associado a indução de morte por apoptose, autofagia e acúmulo em compartimentos intracelulares acídicos (O'NEILL et al., 1998; CH'NG et al., 2010; TOTINO et al., 2012). A cloroquina

apresenta ação anti-inflamatória, com uso terapêutico para a artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico. Atualmente, o fármaco está em estudo de fase clínica avançada para a quimioterapia de diversos tipos de câncer, sendo um potente inibidor da via autofágica, o que aponta para o desenvolvimento de novos usos terapêuticos com esta classe de derivados (ZHANG et al., 2015).

A Amodiaquina (AQ) é um fármaco da classe das 4-AMQ introduzido na terapia antimalárica na década de 1940, cuja terapia isolada não é recomendada devido aos efeitos adversos potencialmente graves, tais como agranulocitose e hepatite (KAUR et al., 2010). A OMS atualmente preconiza a terapia combinada da amodiaquina com artesunato para o tratamento de infecções por *P. falciparum* ou *P. vivax* não-complicada. O fármaco possui mecanismo de ação similar a cloroquina, sendo indicada para o tratamento de cepas resistentes à cloroquina (WHO, 2015).

Figura 4: Fármacos derivados de quinolinas com atividade leishmanicida.

Fármaco	Estrutura Química
Sitamaquina	
Tafenoquina	
Imiquimod	
8-hidroxiquinolina	
Amodiaquina	
Cloroquina	

Fonte: KAUR et al., 2010; LOISEAU et al., 2011.

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm evidenciado o potencial leishmanicida de compostos que conservam a estrutura básica das 4-aminoquinolinas (SAHU et al., 2002; GUGLIELMO et al., 2009;; PALIT et al., 2012; VALE-COSTA et al., 2013; SHARMA et al., 2014). A avaliação do efeito da cloroquina evidenciou expressiva atividade *in vitro* e sua eficácia pela via intralesional e oral no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea no Paquistão (NOOR et al., 2005; KHAN et al., 2007). Estudos preliminares sugerem que o efeito leishmanicida da cloroquina esteja relacionado ao seu acúmulo no interior do acidocalcissoma (VALE-COSTA et al., 2013).

Estudos já demonstram a atividade da amodiaquina e de uma série de derivados estruturalmente relacionados em formas promastigotas de *L. amazonensis* (DE MELLO et al., 2004) e em amastigotas intracelulares de *L. donovani* (GUGLIELMO et al., 2009). Um trabalho realizado em nosso laboratório com uma série de análogos da amodiaquina (AQ) exibiu resultados promissores em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (COIMBRA et al., 2011; 2013) e em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* (COIMBRA et al., 2013).

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa têm evidenciado resultados promissores para os derivados de 4-aminoquinolinas. Dentre estes, uma série de dez derivados 7-cloro-4-quinolinilhidrazona demonstrou atividade expressiva em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. O composto mais ativo exibiu um CI_{50} de 8,1 μM e estudos preliminares acerca do modo de ação destes compostos apontam para a indução de perturbação na função mitocondrial, evidenciadas pelo colapso do potencial de membrana e aumento nos níveis de EROs intracelular (ANTINARELLI et al., 2016). Em outro trabalho, uma série de novos derivados de quinolinas foram avaliados em *L. amazonensis*. Dentre os protótipos investigados, o derivado QuinDer 1 apresentou atividade promissora para amastigotas intracelulares (CI_{50} de 0.0911 μM), com baixa toxicidade para macrófagos murinos e eritrócitos humanos e aumento expressivo nos níveis de EROs (COIMBRA et al., 2016).

Esta conjunto de resultados obtidos em nosso laboratório, em concordância com os descritos na literatura apontam que os derivados de 4-aminoquinolinas apresentam atividade leishmanicida promissora (COIMBRA et al., 2010, 2011, 2013; CARMO et al., 2011; GLANS et al., 2012; ANTINARELLI et al., 2012; GEHRKE et al., 2013; ANTINARELLI et al., 2016; SOARES et al., 2016), o que torna evidente que esta classe de compostos podem representar uma fonte promissora de fármacos

para o tratamento das leishmanioses. Em contrapartida, o alvo de atuação das 4-aminoquinolinas em *Leishmania* ainda necessita ser profundamente avaliado. Assim, o objetivo do presente trabalho será avaliar uma série de dez derivados de 4-aminoquinolinas em espécies de *Leishmania* relacionadas à leishmaniose tegumentar americana e, uma vez selecionado um composto com perfil promissor, verificar qual (ais) processo(s) de morte envolvidos, bem como avaliar seu efeito leishmanicida *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade *in vitro* de uma série de derivados 4-aminoquinolínicos (AMQs) em espécies de *Leishmania* associadas à leishmaniose tegumentar americana. Selecionar um composto com expressiva atividade leishmanicida e baixa toxicidade em macrófagos para subseqüentes estudos *in vitro* e *in silico* relacionados aos alvos e/ou mecanismo de morte do parasito, bem como avaliar a sua atividade *in vivo* em modelo murino de leishmaniose tegumentar.

3 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos, os quais foram subdivididos em artigos publicados (**CAPÍTULOS 1 e 2**), submetidos para publicação (**CAPÍTULO 3**) ou em fase de preparação (**CAPÍTULO 4**).

3.1 **CAPÍTULO 1:** *In Vitro* Antileishmanial Activity of 4-Aminoquinoline Derivatives Hybridized to Isoniazid or Sulfa or Hydrazine Groups.

3.1.1 **Objetivos específicos**

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de uma série de derivados AMQ em formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*;
- Determinar a relação estrutura-atividade entre a série de compostos testados.

RESEARCH ARTICLE

In Vivo Antimalarial and In Vitro Antileishmanial Activity of 4-Aminoquinoline Derivatives Hybridized to Isoniazid or Sulfa or Hydrazine Groups

Roberta R. Soares^{a,+}, Luciana M. R. Antinarelli^{a,+}, Isabela de O. Souza^{b,+}, Fernanda V. Lopes^a, Kézia K. G. Scopel^a, Elaine S. Coimbra^{a,#}, Adilson D. da Silva^{b,#} and Clarice Abramo^{a,#,*}

^aDepartamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil; ^bDepartamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

Abstract: Background: Quinoline-containing compounds have displayed an impressive array of pharmacological actions over the years, including antiprotozoal activities.

Methods: In this work we evaluate antimalarial and antileishmanial activities of some aminoquinoline (AMQ) derivatives hybridized to sulfa or isoniazid or hydrazine groups.

Results and Conclusion: In murine model of infection occasioned by *P. berghei*, compounds AMQ-a, AMQ-d and AMQ-e have shown promising antiplasmodial activity inhibiting the multiplication of parasites in a manner similar to chloroquine in some cases. For leishmaniasis, the majority of the compounds exhibited a strong *in vitro* activity against amastigotes of *L. braziliensis* (IC₅₀ values below 10 µg/mL). Furthermore, AMQ-f, -g and -h (IC₅₀ of 2.1, 1.4 and 1.8 µg/mL against amastigotes of *L. braziliensis*, respectively) showed IC₅₀ values very close to miltefosine (IC₅₀ 1.6 mg/mL), the reference drug. None of the compounds showed cytotoxicity *in vitro* against uninfected human erythrocytes (HC₅₀ > 500.0 µg/mL). These results provide evidence that the AMQ compounds are promising candidates as antimalarial and leishmanicidal drugs, which are extremely important considering that these are endemic parasitic diseases in tropical countries and sometimes occur concurrently..

ARTICLE HISTORY

Received: July 05, 2016
Revised: September 15, 2016
Accepted: September 22, 2016

DOI:
10.2174/1570180813666160927113
743

Keywords: Malaria, leishmaniasis, chemotherapy, quinoline derivatives, 4-aminoquinoline, hydrazine.

1. INTRODUCTION

Infections caused by protozoan parasites are among the most widespread transmissible diseases affecting the developing world, malaria and leishmaniasis being the most costly in terms of morbidity and mortality [1].

Malaria remains one of the greatest public health challenges worldwide, having a major negative impact on countries where it is endemic, contributing to a cycle of poverty and limiting economic development [2]. According to the most recent World Malaria Report, in 2015 there were 3.2 billion people living in areas at risk of transmission of the disease. About 214 million of clinical cases and 438 thousand deaths worldwide were recorded [3]. Coordinated actions, such as vector control, rapid and accurate diagnosis, development of vaccines and appropriate therapy are of fundamental importance in the fight against the disease [3]. Antimalarial drugs have been the mainstay for managing

new infections and established disease. *Plasmodium falciparum*, the parasite species that causes most of the severe forms of malaria, has acquired resistance to most of the currently available antiparasmodial drugs, including Artemisinin-based Combination Therapy (ACTs). ACTs is recommended as first line treatment and even here resistances are upcoming and spreading, making searches for new chemotherapeutic agents essential [4, 5].

Leishmaniasis is classified as one of the most important and neglected tropical diseases as evidenced by the statistics. According to data from the WHO, there are 12 million people infected worldwide and an estimated two million new cases per year [6]. Furthermore, it is estimated that over 350 million people live in endemic areas in 98 countries and territories, and that there are approximately 20,000 to 30,000 deaths per year [6]. As no efficient vaccine is available, chemotherapy is the main treatment used to control the disease. The first-line treatment is based on pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. Other drugs such as pentamidine and amphotericin B are used when the first-line regimen fails [7]. Miltefosine is the only orally administered drug available for the treatment of visceral leishmaniasis in India [8, 9]. However, most of the few available treatments for leishmaniasis were developed decades ago and are no longer effective due

*Address correspondence to this author at the Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil; Tel: +55 32 2102 3219; Fax: +55 32 2102 3214; E-mail: clarice.abramo@ufjf.edu.br

⁺These authors contributed equally to this work.

[#]ESC, ADS, CA are co-authors on this work.

to parasite resistance. Furthermore, they are expensive and produce highly toxic side effects. Therefore, development of novel and effective antileishmanial drugs is in order to overcome these problems [10].

Quinoline-containing compounds have displayed an impressive array of pharmacological activities, including antiviral, antibacterial, antineoplastic and antimicrobial properties [11-13]. Chloroquine (CQ), a 4-aminoquinoline, has been widely used to treat malaria due to its efficacy, low cost, safety and stability, but it is now largely ineffective because of widespread parasite resistance. 4-aminoquinolines form complexes with ferriprotoporphyrin IX (FPPIX) in the digestive vacuole of the parasite, thereby preventing its polymerization into non-toxic hemozoin [14]. Recent work has also confirmed the interesting antileishmanial properties quinoline series and this is exemplified by sitamaquine, an 8-aminoquinoline derivative, which is currently undergoing clinical trials for use in treating visceral leishmaniasis [15]. The antiplasmodial and leishmanicidal activities of aminoquinoline derivatives have been the target of numerous studies in our laboratory [13,16-18].

Sulfa groups have been used as antibiotics since the 1930s and their use as antimalarials was prevalent during the Second World War due to their ability to inhibit folate biosynthesis. However, their short half-life and the ability of *P. falciparum* to develop resistance limited its use as a sole agent. Isoniazids have been described as possessing antimicrobial, anticonvulsant, analgesic, anti-inflammatory, antiplatelet, antitubercular and antitumor activities, among others [19].

Continuing our studies with quinoline compounds, we decided to evaluate the *in vivo* antimalarial activity of 4-aminoquinoline (AMQ) derivatives linked to sulfa, isoniazid or hydrazine groups and to determine their effects on hemolytic activity in uninfected human erythrocytes. Furthermore, we also evaluated their activity against the growth of promastigotes and amastigotes of different *Leishmania* species.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemistry

Infrared spectra (wave numbers in cm^{-1}) were recorded on a BOMEM-FIR MB-102 spectrometer. Melting points were determined using an MQAPF-301-Micro-química digital apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed on Merck silica gel (70–230 mesh). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance III HD 500 apparatus operating at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C), using standard Bruker software; dioxane (δ 67.30) was used as reference for ^{13}C NMR. Electron impact mass spectra was measured with an AEI MS 50 mass spectrometer. Compounds 1 - 9, named AMQ a-i (Fig. 1) have been described in the literature [20-24].

2.2. Pharmacology

2.2.1. *In Vivo* Antimalarial Assay

Animals

For the *in vivo* tests, Swiss albino female mice, 6-8 weeks of age weighing 20-22g, were inoculated with 1×10^5

P. berghei (NK 65 strain) infected red blood cells by the intraperitoneal route, and were randomly distributed in groups of five mice each. These animals were obtained from the Biology Research Center at the Federal University of Juiz de Fora and all protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Juiz de Fora (# 054/2010-CEEA and 055/2010-CEEA) [24].

Evaluation of Antimalarial Activity

Drugs were diluted in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) in water. Using the 4-day suppressive test modified [25], treatment was performed daily by the oral route (0.1 mL for each mouse) for four consecutive days. This treatment began on the day of infection, named as day 1. Two control groups were used: one received the standard antimalarial drug chloroquine and the other received 5% DMSO in water [24]. The dose used for the compounds and for chloroquine was 10 mg/kg. Giemsa (Doles, Goiás, Brazil) stained blood smears were made on day 5, 7, 9 and 12 and examined by microscopy to assess the percentage of parasitemia.

Inhibition of Parasite Multiplication

The antimalarial activity of the drugs was established on the basis of the average parasitemia of each group. The percent inhibition of parasite multiplication was calculated by comparing the treated groups with the untreated group, by means of the following formula [26]: $[(A - B)/A] \times 100$, where A = parasitemia in the control group and B = parasitemia in the test group. The results were expressed as a percentage of inhibition of parasite multiplication. A treatment was considered effective if the parasitemia was reduced by 30% or more [26] and the survival of the mice as a function of time after treatment was monitored for a period of 30 days.

2.2.2. Hemolysis Assay

The hemolytic activity of the compounds was assessed following Wang *et al.* [27]. Briefly, the compounds were previously diluted in a 0.2% (v/v) DMSO solution and incubated (0.062-0.5 mg/mL) with a human erythrocytes suspension (1% hematocrit) at 37°C, overnight. Solutions were centrifuged at 1000g for 10 min and the absorbance of the supernatants was measured in a microplate-reader (Multiskan EX Thermo Scientific, Ohio, USA) at 540 nm. Positive and negative controls were also determined by incubating human red blood cells with 1% Saponin in PBS and PBS alone, respectively. The rate of hemolysis was calculated in relation to the hemolysis of erythrocytes in 1% saponin, which was considered to be 100%. Each assay was performed in duplicate in two independent experiments [27].

2.2.3. *In Vitro* Antileishmanial Activity

Parasites

Promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM/Br/ 75/M2903) and *L. major* (MRHO/SU/59/P) were cultured in BHI Medium (Himédia, Mumbai, Indian), containing hemin, L-glutamine and folic acid (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) and 10% human urine at 25 °C in at BOD incubator (Fanem, São Paulo,

Brazil). Amastigotes were routinely isolated from cutaneous lesions of infected BALB/c mice and allowed to transform into the promastigote form by maintenance at 25 °C in BHI medium supplemented as previously described. All protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Juiz de Fora (#016/2012-CEEA and 017/2013-CEEA) [28].

Antipromastigote Assay

Antileishmanial activity was determined by the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) based on conversion of the tetrazolium salt (MTT) to insoluble formazan by the mitochondria of viable cells [29]. Briefly, promastigotes from a logarithmic phase culture were suspended to a density of three million cells/mL (*L. braziliensis* and *L. major*) after Neubauer chamber counting. The samples tested were added at different concentrations (1.5 to 30.0 µg/mL) after dilution in DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). The highest used concentration of DMSO was 0.1% (v/v), which is not toxic to the parasites. The absorbance at 570 nm, directly proportional to the number of viable cells, was quantified by using a microplate reader (Multiskan EX Thermo Scientific, Ohio, USA). The assay was performed in duplicate in three independent experiments. Miltefosine (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) at several concentrations (6.2 to 100.0 µg/mL) was used as the reference drug [28, 30].

Antiamastigote Assay

Inflammatory macrophages were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice previously inoculated with 3% thioglycollate medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 72 h, the peritoneal exudate was collected by washing with cold Hank's Balanced Sal Solution (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, USA) [30,31]. Briefly, peritoneal macrophages were added at a density of 2×10^6 cells/mL to coverslips (13 mm diameter) previously arranged in a 24-well plate in RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% inactivated FBS, and allowed to adhere at 33°C in 5% CO₂. Adherent macrophages were infected with *L. braziliensis* promastigotes in the stationary growth phase using a 1:10 ratio at 33°C for 4h. After this time, promastigotes that had not undergone phagocytosis were removed by washing twice in sterile phosphate buffered saline (PBS) and solutions of the test compounds were added at nontoxic concentrations to the macrophages (1.5 to 30 µg/mL) and maintained at 33°C in 5% CO₂ for 72 h. The highest concentration of DMSO used was 0.1%, which is not toxic to the parasite. Cells were washed, fixed with absolute ethanol, and stained with Giemsa (Dóles, Goiás, Brazil). Cells were then dehydrated in acetone followed by an acetone-xylool gradient (9:1; 1:1; 1:9) and finally xylool [30, 31]. Slides were mounted with Canada balsam for parasite counting. The parasite burden was evaluated by counting the intracellular amastigotes, and the uninfected and infected macrophages (minimum 200 cells) in treated and untreated cultures, and was obtained by dividing the number of amastigotes per macrophage in cells treated with the compound by the number in the untreated control. Assays were performed in duplicate in two independent ex-

periments. Miltefosine (1.6-25.0 µg/mL) was used as a reference drug. All procedures were performed in agreement with the Ethical Principles in Animal Research and according to protocols approved by the Ethical Committee for Animal Research (#016/2012-CEEA) [28].

2.3. Statistical Analysis

For *in vivo* antimalarial assays, the results were analyzed using the program **GraphPad Prism 5** (GraphPad Inc, San Diego, CA, USA) using the non-parametric Mann-Whitney test for comparison between two independent samples. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant. For antileishmanial assays 50% inhibitory concentrations, *i.e.* the minimum compound concentration that caused 50% reduction in survival or viability of the *Leishmania* (IC₅₀) and 50% hemolytic concentration (HC₅₀) were determined and the 95% confidence intervals were included, calculated by the Litchfiet and Wilcoxon method using Probit analysis, considering the means of two independent experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemistry

This work is a continuation of our efforts exploring the biological properties of 4-aminoquinoline hybridized to isoniazid, sulfa or hydrazine groups. This series was previously synthesized and showed an important antioxidant activity and an effect against *L. amazonensis* [20-22]. In the present work, we complemented these studies by exploring the antimalarial effect of this series and also determined their hemolytic activity on uninfected human erythrocytes. Furthermore, we performed a series of biological assays against different *Leishmania* species. Compounds **1 - 9**, hybridized to isoniazid (**AMQ-a**), sulfa (**AMQ-b-d**) or hydrazine (**AMQ-e-i**) groups (Fig. 1) have been described in the literature [20-23].

3.2. Pharmacology

3.2.1. In vivo Antimalarial Activity

The parasite *P. berghei* (NK65 strain), specific to rodents, has proven to be very efficient for antimalarial activity studies, and it is generally accepted that infection of this parasite in mouse is a valid model to trial drugs for potential use in human malaria [32, 33]. The *in vivo* model is simple and easy to maintain and is therefore widely used for testing [34]. The inhibition of parasite multiplication in mice infected with *P. berghei* and treated with the 4-aminoquinoline compounds was evaluated and is summarized below.

Table 1 shows that three of the five analogs tested showed promising activity (**AMQ-a**, **AMQ-d** and **AMQ-e**). The **AMQ-a** compound, which is a quinoline isoniazid hybrid with an amino group at position 4 of the aromatic ring, showed antiplasmodial action in the early days after infection, with suppression of parasitemia of 55% on day 5, losing its activity over the study period. The **AMQ-e** compound exhibited a distinct profile compared with the other analogs tested, with no action on the first day evaluated and antimalarial activity that increased over time in the days

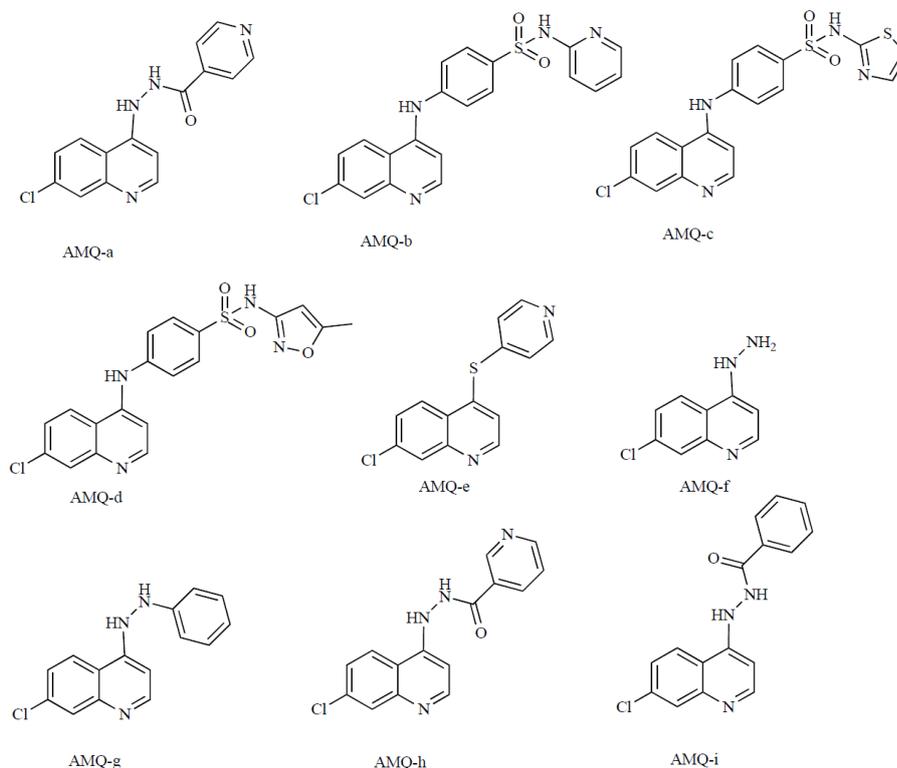


Fig. (1). Aminoquinoline derivatives: compounds hybridized to isoniazid (AMQ-a), sulfa (AMQ-b-d) or hydrazine (AMQ-e-i) groups.

Table 1. Effect of the tested aminoquinoline (AMQ) compounds on inhibition of *P. berghei* multiplication in mice on days 5, 7, 9 and 12 post infection.

Compound	Dosage (mg/kg)	Inhibition of Parasite Multiplication (%) on Days			
		5	7	9	12
AMQ-a	10	55 ^a	46 ^a	4	16
AMQ-b	10	31	44 ^a	0	0
AMQ-c	10	24	0	2	0
AMQ-d	10	54 ^a	42	8	0
AMQ-e	10	0	61	28	65
CQ ^b	10	97 ^a	73 ^a	81 ^a	86 ^a

The data were analyzed by GraphPad Prism 5 (GraphPad, Inc[®], EUA) using the Mann-Whitney Test for comparison between two independent samples. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

^aSignificant differences were evaluated in relation to the untreated control ($p < 0.05$).

^bCQ: chloroquine (control drug).

post-infection, reaching 65% suppression on day 12. The AMQ-b and -c compounds did not exhibit significant antimalarial activity, while AMQ-d exhibited 54% suppression of parasitemia on day 5. Chloroquine, the reference drug used in this antimalarial test, maintained an average of 84% of suppression of parasitemia considering all the analyzed days. These results show that the dose used in the screening for antimalarial activity (10mg/kg/day) was not

sufficient to promote a permanent cure of the disease, and appears only to have a suppressive action. All animals involved in the tests survived until the end of the experiments.

The antiplasmodial effect of these compounds can be attributed to well known mechanisms. 4-aminoquinolines inhibit the polymerization of heme, preventing the formation of hemozoin in the digestive vacuole of the parasite and

Table 2. Percentage of hemolysis caused by the aminoquinoline (AMQ) compounds in human erythrocytes.

Compounds	% of Hemolysis at 500 µg/mL	Hemolysis HC ₅₀ (µg/mL) ^a (95% C.I.) ^b
AMQ-a	18.7	>500.0
AMQ-b	33.2	>500.0
AMQ-c	11.7	>500.0
AMQ-d	2.4	>500.0
AMQ-e	6.7	>500.0
CQ ^c	21.2	>500.0

^aHemolytic Concentration (HC₅₀).

^bData are HC₅₀ values in µg/mL and 95% confidence intervals are in brackets, calculated by Litchfiet and Wilcoxon method using Probit analysis considering the mean of two independent experiments. C.I.: Confidence interval.

^cCQ: Chloroquine (control drug).

leading to the accumulation of free heme, which is highly toxic to *Plasmodium* species [35]. Sulfonamides compete with para-aminobenzoic acid (PABA) interrupting the formation of di-tetrahydrofolic acid, which is essential for the synthesis of nucleic acids by inhibiting dihydrofolate hydropterote synthase (DHPS) [36]. Studies in a murine model of infection with *P. berghei* have shown isoniazides display a blood schizonticide action by a mechanism that is not yet elucidated. Reduced parasitic load and the survival of infected mice are observed when they are administered in combination with rifampicin or ethambutol/rifampicin [37].

The symptoms of malaria are associated with the intraerythrocytic development of the parasite. Therefore, besides the antimalarial activity, the cytotoxicity of the compounds AMQ-a-e was assayed in uninfected human erythrocytes (Table 2). The hemolytic activity of the compounds was determined as described previously by Wang *et al.* [38] and was based on the ability of derivatives tested to cause damage to uninfected normal human erythrocytes by spectrophotometric quantification of hemoglobin released to the external environment [38,39]. The compounds AMQ-a-e did not cause significant alterations to human red blood cells at the highest concentration tested (500.0 µg/mL) with hemolysis levels of less than 50%, thus considered non-toxic to human erythrocytes (Table 2). Chloroquine caused hemolysis levels of 21.2% at the same concentration.

Hemolysis can be caused by several distinct mechanisms. It can result from the formation of pores in cell membranes that modify their permeability or may be due to changes in sodium, potassium and calcium ATPase activity [40,41]. Some antimalarial drugs, such as primaquine, can cause oxidation of hemoglobin to form methemoglobin thus causing hemolysis, especially if the individual is deficient in the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [42].

3.2.2. In vitro Antileishmanial Activity

Recently, we demonstrated that the majority of the compounds tested here showed low cytotoxicity against murine macrophages [22] and against HepG2 and HeLa human cell lines [23]. Continuing our research, we decided to evaluate the antileishmanial activity of the nine 4-aminoquinoline derivatives and their precursors against both the extracellular

promastigote and the intramacrophage amastigote forms of *Leishmania* species (Table 3). *Leishmania braziliensis* and *L. major* are the causative agents of cutaneous leishmaniasis in the New World and the Old World, respectively. *Leishmania major* causes self limiting ulcers in most cases and *L. braziliensis* is related with a variety of other manifestations including mucocutaneous leishmaniasis [43]. For antipromastigote activity (Table 3), among all of the compounds tested, of the three compounds containing the quinoline scaffolds and their sulfonamide precursors (compounds AMQ-b-d), only AMQ-b presented a notable antipromastigote activity (IC₅₀ of 10.5 and 7.9 µg/mL for *L. major* and *L. braziliensis*, respectively). Compounds combining quinoline with arylhydrazine, nicotinoylhydrazide and arylhydrazide (compounds AMQ-e-i) were also interesting. Compounds AMQ-e, AMQ-g, and AMQ-i presented significant effects against *L. braziliensis* promastigotes (IC₅₀ of 23.6, 3.7 and 10.0 µg/mL, respectively). Furthermore, AMQ-g and -i showed IC₅₀ values near to or better than of miltefosine (IC₅₀ of 10.4 µg/mL), the reference drug. None of the precursors showed leishmanicidal effects against either of the *Leishmania* species at the highest concentrations tested (IC₅₀> 20.0 µg/mL).

The effect of the 4-aminoquinoline derivatives against the intracellular amastigote forms of *Leishmania* was also determined since these forms are responsible for human disease. *Leishmania braziliensis* was the most sensitive to the compounds and this *Leishmania* species was chosen for the assay. *Leishmania braziliensis* is not only the most common etiological agent of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the New World, but is also the main cause of the high annual incidence of the disease in Brazil [44]. As can be seen in at Table 3, the compounds exhibited greater activity against amastigotes than promastigotes, which may be advantageous because amastigotes are the parasitic forms present in the mammalian host and are responsible for the maintenance of the infection [31]. For example, compounds AMQ-a and -d did not show significant antipromastigote activity against *L. braziliensis* (IC₅₀> 30.0 µg/mL), however, they exhibited high activity against amastigotes of *L. braziliensis* with IC₅₀ values of 3.9 and 5.0 µg/mL, respectively. Furthermore, compounds AMQ-b and -e that exhibited activity against promastigotes of *L. braziliensis* also showed a significant effect against the amastigote forms of the species

Table 3. IC₅₀ values (µg/mL) of the aminoquinoline (AMQ) derivatives against promastigote and amastigote forms of *Leishmania* species.

Compounds	Leishmanicidal Effect (IC ₅₀ - µg/mL) ^a		
	<i>L. major</i> Promastigotes (95% C.I.) ^b	<i>L. braziliensis</i> Promastigotes (95% C.I.) ^b	<i>L. braziliensis</i> Amastigotes (95% C.I.) ^b
AMQ-a	> 30.0	> 30.0	3.9 (0.8-18.6)
AMQ-b	10.5 (8.9-12.4)	7.9 (7.0-9.0)	7.1 (5.2-9.5)
AMQ-c	> 30.0	> 30.0	> 30.0
AMQ-d	> 30.0	> 30.0	5.0 (2.3-11.1)
AMQ-e	> 30.0	23.6 (18.8-29.7)	7.2 (5.8-8.9)
AMQ-f	> 30.0	> 30.0	2.1 (1.7-2.7)
AMQ-g	> 30.0	3.7 (3.1-4.4)	1.4 (0.9-2.2)
AMQ-h	> 30.0	> 30.0	1.8 (1.4-2.4)
AMQ-i	> 30.0	10.0 (8.1-12.3)	2.6 (1.8-3.8)
Sulfanilamide	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Sulfapyridine	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Sulphadiazine	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Sulfathiazole	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Sulfamethoxazole	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Isoniazid	> 20.0	> 20.0	> 20.0
Miltefosine ^c	8.8 (7.6-10.1)	10.4 (9.0-12.1)	1.6 (1.3-2.0)

^aInhibitory Concentration (IC₅₀)= Drug concentration that reduced cell viability to 50% after 72 h of treatment.

^bData are IC₅₀ values in µg/mL and 95% confidence intervals are in brackets, calculated by the Litchfield and Wilcoxon method using the Probit analysis considering the mean of two independent experiments. C.I.: Confidence interval.

^cMiltefosine was used as a reference drug.

(IC₅₀ values of 7.1 and 7.2 µg/mL, respectively). Only compound AMQ-c did not exhibit anti-amastigote activity at the highest tested concentrations (IC₅₀ > 30.0 µg/mL). Previously, we demonstrated that some of these AMQ derivatives are effective against *L. amazonensis* amastigotes [22]. Clinical manifestations are caused by a variety of *Leishmania* species, and *Leishmania* species vary in sensitivity to accessible therapies, which should be considered when conducting both experimental and clinical studies [43]. With this in mind, it is important to point out that these AMQ compounds were shown to be effective against several different *Leishmania* species.

The hydrazine series exhibited stronger activity against amastigotes with IC₅₀ values of 2.1, 1.4, 1.8 and 2.6 µg/mL for compounds AMQ-f-i, respectively. Recently, we demonstrated the effective and selective action of these compounds against *L. amazonensis* and their mechanism of action appears to be mediated by mitochondrial dysfunction associated with ROS production [22]. Furthermore, compounds AMQ-f-i were also active against the malaria parasite *P. falciparum* *in vitro*

and *P. berghei* *in vivo* by inhibiting parasitemia [23]. These results are favorable with regard to the association of these pharmacophoric groups (quinoline and benzene nucleus) in a single structure.

CONCLUSION

The present results confirm the antiprotozoal activity of a series of 4-aminoquinoline derivatives with promising antiplasmodial and antileishmanial activities. Development of a single molecule targeting different species and genera of protozoans (*Plasmodium* and *Leishmania*) is attractive and may lead to innovative therapies for multiple parasitic diseases.

LIST OF ABBREVIATIONS

AMQ	=	Aminoquinoline derivatives
CQ	=	Chloroquine
DMSO	=	Dimethyl sulphoxide
HC ₅₀	=	50% hemolytic concentration

HeLa	=	Human adenocarcinoma cell line
HepG2	=	Human liver carcinoma cell line
IC ₅₀	=	50% inhibitory concentration
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
µg	=	Microgram
mg	=	Milligram
mL	=	Milliliter
kg	=	Kilogram
PBS	=	Phosphate buffered saline
ROS	=	Reactive oxygen species
WHO	=	World health organization

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – grant n. 471940/2010-0; 308495/2014-4), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG – grant n. CBB-APQ 0170215; Rede Mineira 80 CDS-RED-01314) and Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Authors thank the fellowship by CNPq (E.S. Coimbra and A.D. da Silva) and CAPES (L.M.R. Antinarelli and R.R. Soares, F.V. Lopes and I.O. Souza). The authors are grateful to Maria Cristina de Andrade for technical assistance. Thanks are also due to Reproduction Biology Center (CBR) of the Federal University of Juiz de Fora for supply of animals.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Tate, E.W.; Bell, A.S.; Rackham, M.D.; Wright, M.H. N-Myristoyltransferase as a potential drug target in malaria and leishmaniasis. *Parasitology*, **2014**, *141*(1), 49.
- [2] World Health Organization. World Malaria Report 2015. Available at: <http://www.rbm.who.int/>. (Accessed April 26, 2016).
- [3] World Health Organization. 2014. World Malaria Report 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/. (Accessed March 23, 2015).
- [4] Ménard, D.; Khim, N.; Beghain, J.; Adegnik, A.A.; Shafiul-Alam, M.; Amodu, O.; Rahim-Awab, G.; Barnadas, C.; Berry, A.; Boum, Y.; Bustos, M.D.; Cao, J.; Chen, J.H.; Collet, L.; Cui, L.; Thakur, G.D.; Dieye, A.; Djallé, D.; Dorkeno, M.A.; Eboumbou-Moukoko, C.E.; Espino, F.E.; Fandeur, T.; Ferreira-da-Cruz, M.F.; Fola, A.A.; Fuehrer, H.P.; Hassan, A.M.; Herrera, S.; Hongvanthong, B.; Houzé, S.; Ibrahim, M.L.; Jahirul-Karim, M.; Jiang, L.; Kano, S.; Ali-Khan, W.; Khanthavong, M.; Kremsner, P.G.; Lacerda, M.; Leang, R.; Leelawong, M.; Li, M.; Lin, K.; Mazarati, J.B.; Ménard, S.; Morlais, I.; Muhindo-Mavoko, H.; Musset, L.; Na-Bangchang, K.; Nambozi, M.; Niaré, K.; Noedl, H.; Ouédraogo, J.B.; Pillai, D.R.; Pradines, B.; Quang-Phuc, B.; Ramharter, M.; Randrianarivelojosa, M.; Sattabongkot, J.; Sheikh-Omar, A.; Silué, K.D.; Sirima, S.B.; Sutherland, C.; Syafruddin, D.; Tahar, R.; Tang, L.H.; Touré, O.A.; Tshibangu-wa-Tshibangu, P.; Vigan-Womas, I.; Warsame, M.; Wini, L.; Zakeri, S.; Kim, S.; Eam, R.; Berne, L.; Khean, C.; Chy, S.; Ken, M.; Loch, K.; Canier, L.; Durtu, V.; Legrand, E.; Barale, J.C.; Stokes, B.; Straimer, J.; Witkowski, B.; Fidock, D.A.; Rogier, C.; Ringwald, P.; Ariey, F.; Mercereau-Pujalon, O.; KARMA Consortium. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N. Engl. J. Med.*, **2016**, *374*(25), 2453-64.
- [5] Wells, T.N.C.; Van Huijsduijnen, R.H.; Van Voorhis, W.C. Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2015**, *14*(6), 424-442.
- [6] World Health Organization. 2016. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. (Accessed March 25, 2015).
- [7] Tempone, A.G.; Martins de Oliveira, C.; Berlink, R.G. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.*, **2011**, *77*(6), 572-585.
- [8] Sundar, S.; Jha, T.K.; Thakur, C.P.; Engel, J.; Sindermann, H.; Fischer, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, **2002**, *347*(22), 1739-1746.
- [9] Dorlo, T.P.; Balasegaram, M.; Beijnen, J.H.; de Vries, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2012**, *67*(11), 2576-2597.
- [10] Singh, N.; Mishra, B.B.; Bajpai, S.; Singh, R.K.; Tiwari, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*(1), 18-45.
- [11] Tekwani, B.L.; Walker, L.A. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **2006**, *19*(6), 623-631.
- [12] 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. *Biomed. Pharmacother.*, **2011**, *65*(3), 204-209.
- [13] Antinarelli, L.M.; Carmo, A.M.; Pavan, F.R.; Leite, C.Q.; Da Silva, A.D.; Coimbra, E.S.; Salunked, D.B. Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Org. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *2*(1), 1-16.
- [14] Kouznetsov, V.V.; Gomez-Barrio, A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiparasitodal evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*(8), 3091-3113.
- [15] Jha, T.K.; 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2005**, *73*(6), 1005-1011.
- [16] de Souza, N.B.; Carmo, A.M.; Lagatta, D.C.; Alves, M.J.; Fontes, A.P.; Coimbra, E.S.; Da Silva, A.D.; Abramo, C. 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomed. Pharmacother.*, **2011**, *65*(4), 313-316.
- [17] Coimbra, E.S.; Antinarelli, L.M.; da Silva, A.D.; Bispo, M.L.; Kaiser, C.R.; de Souza, M.V. 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: a promising and potent class of antileishmanial compounds. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **2013**, *81*(5), 658-665.
- [18] Soares, R.R.; Corrales, R.C.; Lopes, F.V.; Alves, M.J.; Da Silva, A.D.; Abramo, C. Synthesis and In Vivo Antimalarial Activity of Novel Derivatives of 6-Mercaptopurine. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2013**, *10*(8), 741-747.
- [19] Rollas, S.; Küçüküzümlü, S.G. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*, **2007**, *12*(8), 1910-1939.
- [20] Polonini, H.C.; Dias, R.M.; Souza, I.O.; Gonçalves, K.M.; Gomes, T.B.; Raposo, N.R.; da Silva, A.D. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*(16), 4506-4510.
- [21] Polonini, H.C.; Lima, L.L.; Gonçalves, K.M.; Carmo, A.M.; da Silva, A.D.; Raposo, N.R. Photoprotective activity of resveratrol analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*(4), 964-968.
- [22] Antinarelli, L.M.; Dias, R.M.; Souza, I.O.; Lima, W.P.; Gameiro, J.; da Silva, A.D.; Coimbra, E.S. 4-Aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2015**, *86*(4), 704-714.
- [23] Soares, R.R.; da Silva, J.M.; Carlos, B.C.; da Fonseca, C.C.; de Souza, L.S.; Lopes, F.V.; Dias, R.M.; Moreira, P.O.; Abramo, C.; Viana, G.H.; de Pila Varotti, F.; Da Silva, A.D.; Scopel, K.K. New

- Quinoline Derivatives Demonstrate a Promising Antimalarial Activity against *Plasmodium falciparum* In Vitro and *Plasmodium berghei* In Vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25(11), 2308-2313.
- [24] Corrales, R.C.; de Souza, N.B.; Pinheiro, L.S.; Abramo, C.; Coimbra, E.S.; Da Silva, A.D. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. *Biomed. Pharmacother.*, **2011**, 65(3), 198-203.
- [25] Peters, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp. Parasitol.*, **1965**, 17(1), 80-89.
- [26] Carvalho, L.H.; Brandão, M.G.; Santos-Filho, D.; Lopes, J. L.; Krettli, A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studies in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1991**, 24(11), 1113-1123.
- [27] Wang, C.; Qin, X.; Huang, B.; He, F.; Zeng, C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 402(4), 773-777.
- [28] da Silva, J.M.; Antinarelli, L.M.; Ribeiro, A.; Coimbra, E.S.; Scio, E. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. *Exp. Parasitol.*, **2015**, 159 (2015), 143-150.
- [29] Mossman, N. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, **1983**, 65(1-2), 55-63.
- [30] Antinarelli, L.M.; Pinto, N.C.; Scio, E.; Coimbra, E.S. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2015**, 87(2), 733-742.
- [31] da Silva, J.M.; Antinarelli, L.M.; Pinto, N.C.; Coimbra, E.S.; de Souza-Fagundes, E.M.; Ribeiro, A.; Scio, E. HPLC-DAD analysis, antileishmanial, antiproliferative, and antibacterial activities of *Lacistema pubescens*: an Amazonian medicinal plant. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 2014, 545038.
- [32] WHO. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. World Health Organization Technical Report Series, no. 529, **1973**.
- [33] Peters, W. The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **1975**, 69(2), 155-171.
- [34] Adebayo, J.O.; Krettli, A.U. Potential antimalarials from Nigerian plants: a review. *J. Ethnopharmacol.*, **2011**, 133(2), 289-302.
- [35] Kaur, K.; Jain, M.; Reddy, R.P.; Jain, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45(8), 3245-3264.
- [36] Olliaro, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.* **2001**, 89(2), 207-219.
- [37] Aditya, N.P.; Patankar, S.; Madhusudhan, B. Assessment of in vivo antimalarial activity of rifampicin, isoniazide, and ethambutol combination therapy. *Parasitol. Res.*, **2010**, 106(6), 1481-1484.
- [38] Wang, C.; Qin, X.; Huang, B.; He, F.; Zeng, C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 402(4), 773-777.
- [39] Li, J.; Xiao, H.; Li, J.; Zhong, Y. Drug carrier systems based on water-soluble cationic beta-cyclodextrin polymers. *Int. J. Pharm.*, **2004**, 278(2), 329-342.
- [40] Hu, M.; Konoki, K.; Tachibana, K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1996**, 1299(2), 252-258.
- [41] Mukherjee, A.; Rajasekaran, C. In-vitro hemolytic activity of *Alium stracheyi* Baker. *J. Pharm. Res.*, **2010**, 3(5), 1160-1162.
- [42] Brewer, G.J.; Zarafonitis, C.J. The haemolytic effect of various regimens of primaquine with chloroquine in American Negroes with G6PD deficiency and the lack of an effect of various antimalarial suppressive agents on erythrocyte metabolism. *Bull. World Health Organ.*, **1967**, 36(2), 303-308.
- [43] de Vries, H.J.; Reedijk, S.H.; Schallig, H.D. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J. Clin Dermatol.*, **2015**, 16(2), 99-109.
- [44] Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, **2012**, 7(5), 35671.

3.2 CAPÍTULO 2: 4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents.

3.2.1 Objetivos Específicos:

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de uma série de derivados AMQ em macrófagos peritoneais, formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar a relação estrutura-atividade entre os compostos testados;
- Selecionar o composto com promissora atividade leishmanicida e baixa toxidez para macrófagos;
- Estudar o efeito do composto sobre a mitocôndria do parasito, mediante a avaliação do potencial de membrana mitocondrial e produção das espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Avaliar o efeito imunomodulador *in vitro* em macrófagos infectados com *L. amazonensis* pela análise dos níveis de óxido nítrico (ON);
- Avaliar se o mecanismo de ação do composto está associado a indução de necrose, pela análise da integridade da membrana plasmática.



4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents

Luciana M. R. Antinarelli¹, Rafael M. P. Dias²,
Isabela O. Souza², Wallace P. Lima³,
Jacy Gameiro¹, Adilson D. da Silva² and
Elaine S. Coimbra^{1,*}

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

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

³Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author: Elaine S. Coimbra, elaine.coimbra@ufjf.edu.br

Received 3 November 2014, revised 18 December 2014 and accepted for publication 29 January 2015

The leishmanicidal activity of a series of 4-aminoquinoline (AMQ) derivatives was assayed against *Leishmania amazonensis*. This activity against the intracellular parasite was found stronger than for *L. amazonensis* promastigotes. Neither compound was cytotoxic against macrophages. The compound AMQ-j, which exhibited a strong activity against promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* (IC₅₀ values of 5.9 and 2.4 μg/mL, respectively) and similar leishmanicidal activity to reference drugs, was chosen for studies regarding its possible mechanism of action toward parasite death. The results showed that the compound AMQ-j induced depolarization of the mitochondrial membrane potential in promastigotes and in *L. amazonensis*-infected macrophages, but not in uninfected macrophages. Furthermore, the depolarization of the mitochondrial membrane potential was dose dependent in infected macrophages. We have established that promastigotes and *L. amazonensis*-infected macrophages treated with AMQ-j were submitted to oxidative stress. This is in line with the increase in the level of reactive oxygen species (ROS). *Leishmania amazonensis*-infected macrophages treated with AMQ-j did not show a significant increase in the production of nitric oxide. Our results indicate the effective and selective action of AMQ-j against *L. amazonensis*, and its mechanism of action appears to be mediated by mitochondrial dysfunction associated with ROS production.

Key words: aminoquinoline, *Leishmania*, *Leishmania amazonensis*, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by the protozoan *Leishmania* and classified as one of the most important neglected tropical diseases (NTDs). According to data from WHO's, 12 million people are infected worldwide and an estimated 2 million new cases per year. Furthermore, over 310 million people live in endemic areas in 98 countries or territories, and that there are 20 000–30 000 deaths per year, and 2.4 million disability-adjusted life years lost. Furthermore, according to disease burden estimates, leishmaniasis is the second cause of parasite-related deaths after malaria^a (1).

Leishmaniasis is caused by about 20 different species of *Leishmania*, and the clinical manifestations depend on the species of *Leishmania* associated with it (2). Leishmaniasis can assume three clinical forms, ranging from the usual non-fatal cutaneous leishmaniasis to the progressive mucocutaneous and the potentially fatal visceral leishmaniasis, if left untreated (3).

The drugs used in therapy such as pentavalent antimonials (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate) and others such as pentamidine and amphotericin B have some characteristics in common: (i) they are toxic and their long-time administration causes various undesirable side-effects; (ii) they are costly; (iii) furthermore, they show low efficacy in endemic areas due to the observed resistance of various parasite species (3,4). Miltefosine, a new drug used as an antineoplastic agent, is the only oral agent in use for Indian and East African visceral leishmaniasis, but this drug is teratogenic and contraindicated in pregnancy (4). Thus, the discovery of new drugs which are less toxic and more effective against leishmaniasis is of utmost urgency.

Quinolines belong to an important class of compounds showing several remarkable biological properties, including antiprotozoa activity (5). Indeed, substituted quinolines have been found effective against several *Leishmania* species for both *in vitro* and *in vivo* models (6–8). Furthermore, sitamaquine, an 8-aminoquinoline, is in development at GlaxoSmithKline (UK) for the oral treatment of visceral leishmaniasis in India and Africa (9–11).



To obtain original molecules exhibiting anti-*Leishmania* activities, our research group previously reported promising results with aminoquinoline derivatives (12–16). Now, as a continuation of our efforts to obtain new drugs against the leishmaniasis, we decided to continue exploring the biological properties of the 4-aminoquinoline (**AMQ**) derivatives by conjugating sulfonamide, hydrazide and hydrazine residues. Some sulfonamides and isoniazid hybrids have shown interesting biological properties, including antileishmanial activity (17). Accordingly, this new class of compounds may represent an attractive subunit association. A series of **AMQ** (Figure 1), based on the amodiaquine structure, a 4-aminoquinoline active against *Leishmania* sp. at μM concentration (16), was previously synthesized showing an important antioxidant activity (18). In this work, these **AMQ** were assayed against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*. As compound **AMQ-j** was found very active against both forms of *L. amazonensis*, we have undertaken a series of biological assays in order to clarify the mechanism of action leading to the cell death of this protozoan.

Materials and Methods

Chemicals

Miltefosine was supplied by Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Amodiaquine was purchased by Ellipse Pharmaceuticals (Pessac, France). Geneticin (G418), propidium iodide (PI), rhodamine 123 (Rh 123), LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O26:B6), Hanks' balanced sal solution (HBSS), hemin, folic acid, MTT, and

4-Aminoquinolines as Antileishmanial Agents

JC-1 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was obtained from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Fetal bovine serum and RPMI 1640 medium were purchased from Cultilab (Campinas, São Paulo, Brazil); brain–heart infusion (BHI) was purchased from Himédia (Mumbai, Indian).

Parasites

Promastigotes of *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) and *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) transfected with the gene of green fluorescent protein (GFP) were cultured in Warren's medium (brain–heart infusion-BHI-plus hemin and folic acid), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 10% of human urine at 25 °C. Promastigotes of *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) were periodically selected for green fluorescence by culturing in 1 mg/mL of geneticin antibiotic for 72 h (19). The parasites were routinely isolated from cutaneous lesions of infected BALB/C mice and maintained as promastigote forms at 25 °C in Warren's medium supplemented with 10% FBS.

Leishmanicidal assays

Antipromastigote assay

Antipromastigote assay was accomplished using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT) which is based on tetrazolium salt reduction by mitochondrial dehydrogenases (20). Briefly, promastigotes of *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) from

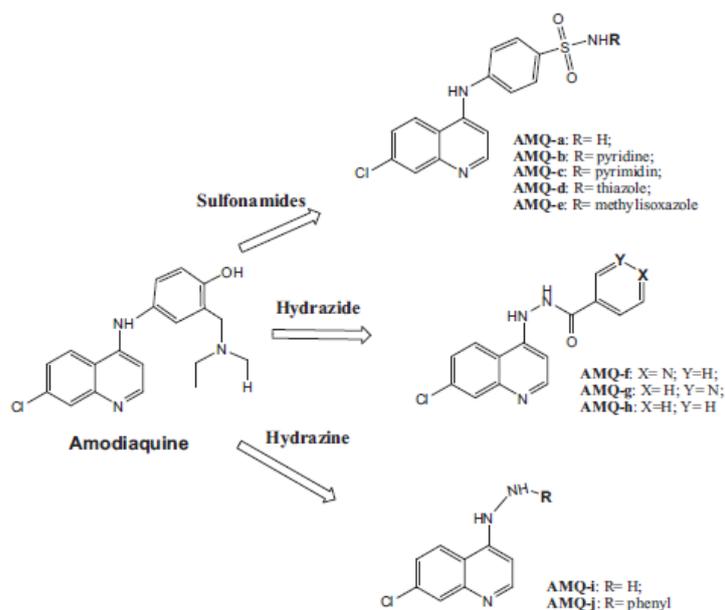


Figure 1: Design of three groups of 4-aminoquinoline (**AMQ**) derivatives, based on the amodiaquine structure.

Antinarelli et al.



a logarithmic phase culture were suspended to yield 2×10^6 cells/mL after Neubauer chamber counting. The parasites were exposed to an increasing concentration of the compounds (0.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h at 25 °C. Controls containing 0.1% DMSO (which is not toxic to the parasites) and medium alone were also included. The viability of the promastigotes was measured at 570 nm (Multiskan MS microplate reader, LabSystems Oy, Helsinki, Finland). The results are expressed as the concentration inhibiting parasite growth by 50% (IC_{50}) after a 72-h incubation period. The IC_{50} values were obtained from three independent experiments performed in duplicate. Miltefosine (0.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) and amodiaquine (0.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) were used as the reference drug.

Antiamastigote assay

Leishmania amazonensis-GFP was used to verify the effect of the compounds on intracellular amastigotes. Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice previously inoculated with 3% thioglycollate medium (Sigma Chemical Co). Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis*-GFP promastigotes at a parasite cell ratio of 20:1 for 4 h at 33 °C. After 72 h of incubation with different concentrations of compounds (1.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in DMSO (final concentration <0.1% v/v), macrophages were lysed with distilled water and transferred to black microplates. Uninfected macrophages were used as a blank. The fluorescence intensity of the cultures was measured using a plate-reader fluorometer (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) set at 485 nm excitation/528 nm emission (21). The results were expressed as percent inhibition in relation to controls *L. amazonensis*-infected macrophages. Three independent experiments performed in duplicate were done. The compound concentration which inhibited 50% of the parasite growth (IC_{50}) was calculated using the Probit regression model. Miltefosine (0.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) and amodiaquine (0.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) were used as the reference drug. All protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Federal University of Juiz de Fora (#016/2012-CEEA).

Cytotoxicity on macrophages

Mouse peritoneal macrophages were obtained and cultured as described before. Briefly, the macrophages were used for cytotoxicity assay in a concentration of 2×10^5 cells/mL in 96-well culture plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated FBS, at 33 °C and 5% CO_2 atmosphere. After 24 h, the adherent macrophages were incubated with the compounds in a serial dilution (1.5–30.0 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h at 33 °C and 5% CO_2 atmosphere. Untreated macrophages were used as negative control. The viability of the macrophages was determined through the MTT assay, as described above. All protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Federal University of Juiz de Fora (#015/2012-CEEA).

Biological assays using promastigote forms of *L. amazonensis* treated with AMQ-j

Determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$)

Leishmania amazonensis promastigotes (10×10^6 cells/mL) were cultured in the absence and in the presence of 12.0 and 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j at 25 °C. The procedures were performed according to Ribeiro *et al.* (22), with some modifications. After 24 h, the parasites were incubated with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ fluorescent dye Rh 123 for 15 min in dark at 37 °C. Data acquisition and analysis were performed using a FACScanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with DIVA software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). A total of 10 000 events were acquired using the FITC channel. The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. The index of variation (IV) was used to quantify alterations in Rh 123 fluorescence obtained by the equation: $\text{IV} = (M_p - M_c)/M_c$, where M_p is the median of the fluorescence for treated promastigotes, and M_c is the median of the fluorescence for untreated promastigotes. Negative IV values correspond to the depolarization of the mitochondrial membrane (22). Miltefosine was used as a positive control (9 $\mu\text{g/mL}$).

Additionally, the assay was also performed using JC-1 fluorochrome, which is a lipophilic cationic mitochondrial vital dye which becomes concentrated in the mitochondrion in response to $\Delta\Psi\text{m}$ (23). *L. amazonensis* promastigotes (10×10^6 cells/mL) were cultured for 24 h in the absence and in the presence of 12.0 and 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j at 25 °C. Cells were harvested, resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS), and the cell number was counted in the Neubauer chamber. Promastigotes (5×10^6 cells/mL) were incubated with JC-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) for 20 min in the dark at 37 °C. After washing twice with HBSS, the fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800, BioTek Instruments, Inc.) at both 528 and 600 nm using an excitation wavelength of 485 nm. The relative $\Delta\Psi\text{m}$ value was quantified using the ratio between the reading at 600 nm and the reading at 528 nm. The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. Miltefosine at 9 $\mu\text{g/mL}$ was utilized as positive control.

Measurement of ROS levels

Promastigotes of *L. amazonensis* were cultured for 24 h in the absence and in the presence of 24.0 and 30.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j. Promastigotes were then harvested and resuspended in phosphate-buffered saline, (PBS) and the parasite concentration was adjusted to 4×10^7 promastigotes in 200 μL of PBS. Then, 20 μM of H_2DCFDA was added, and the samples were incubated for 30 min in the dark at 37 °C (23). The fluorescence was spectrofluorometrically monitored (FLx800, BioTek Instruments, Inc.)



using excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. Miltefosine at 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was used as a positive control.

Determination of the cellular membrane integrity

Promastigotes of *L. amazonensis* (10×10^6 cells/mL) were treated or untreated with 12.0, 24.0, and 30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **AMQ-j** for 24 h at 25 °C, harvested, washed with PBS, resuspended in PBS and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI for 15 min in the dark at room temperature. The procedures were performed according to Volpato *et al.* (24), with some modifications. The fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800, BioTek Instruments, Inc.) using an excitation wavelength of 540 nm and an emission wavelength of 600 nm. The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. As positive control, cells heated at 65 °C for 10 min were used to obtain a maximum value for the fluorescence intensity.

Biological assays using *L. amazonensis*-infected macrophages treated with **AMQ-j**

Leishmania amazonensis-infected macrophages were used, and the peritoneal macrophages were obtained as previously described. The macrophages were added at 2×10^6 cells/mL to coverslips (13 mm diameter) previously arranged in a 24-well plate in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated FBS and allowed to adhere at 33 °C in 5% CO_2 . Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes (FLA/Br/67/PH8) in the stationary growth phase using a 1:10 ratio at 33 °C; 5% CO_2 for 4 h. Non-internalized promastigotes were eliminated and the cells were treated with **AMQ-j** at 7.0, 13.5, and 27.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and maintained at 33 °C in 5% CO_2 for 24 h. Cells were washed, fixed with absolute ethanol, and stained with Giemsa. Cells were then dehydrated in acetone followed by a gradient acetone-xylol (9:1; 1:1; 1:9) and finally xylol. The slides were mounted with Canada balsam for parasite counting (optical microscopy, 1000 \times magnification). The parasite burden was evaluated by counting the intracellular parasites, uninfected and infected macrophages (at minimum 200 cells) in treated and untreated cultures. The results were obtained from at least two independent experiments performed in duplicate.

Determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$)

The assay was performed in uninfected and in infected macrophages as described above, but the macrophages were plated in black 96-well tissue culture plates. After 24 h of treatment of **AMQ-j** at 7.0, 13.5, and 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the medium was discarded, the macrophages were washed in PBS, and then the cells were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JC-1 for 30 min in the dark at 37 °C in 5%

4-Aminoquinolines as Antileishmanial Agents

CO_2 . After being washed three times with HBSS, the fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800, BioTek Instruments, Inc.) at both 528 and 600 nm using an excitation wavelength of 485 nm. The relative $\Delta\Psi\text{m}$ value was quantified using the ratio between the reading at 600 nm and the reading at 528 nm. The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. Miltefosine was used as the positive control (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Measurement of ROS levels

Intracellular ROS levels in *L. amazonensis*-infected macrophages which were previously treated with **AMQ-j** at 7.0, 13.5, and 27.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were measured using the H_2DCFDA dye. After 24 h of infection, the medium was discarded, the macrophages were washed in PBS, and then the cells were incubated with H_2DCFDA (20 μM) for 60 min in the dark at 37 °C in 5% CO_2 . Fluorescence was spectrofluorometrically measured using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm (25). The results were obtained from at least two independent experiments performed in triplicate. Miltefosine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control.

Nitric oxide (NO) production

Nitric oxide production was determined in the culture supernatants of *L. amazonensis*-infected macrophages after incubated for 24 h in the presence of **AMQ-j** compound. The assay was performed as described by Green *et al.* (26). Briefly, 50 μL of Griess reagent: 1% sulfanilamide in 2.5% of H_3PO_4 and 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dichloride in 2.5% H_3PO_4 (v/v) was added to 50 μL of the cell culture supernatants in a 96-well microplate. Blank reference was performed, and nitrite content was quantified by extrapolation from a sodium nitrite standard curve in each experiment. All the assays were carried out in duplicate. The levels of absorbance were quantified at 540 nm using a microplate reader (Multiskan MS microplate reader, LabSystems Oy, Helsinki, Finland). The results were calculated as percentages compared with the LPS-positive control (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Statistical analysis

The 50% inhibitory concentration, that is, the minimum compound concentration which caused 50% reduction in the survival or viability of the *Leishmania* (IC_{50}) and murine macrophages (CC_{50} values) was carried out, and the 95% confidence intervals were included, calculated by Litchfield and Wilcoxon method using the Probit considering the mean from three independent experiments. The data were statistically analyzed using analysis of variance followed by Dunnett post-test using GRAPHPAD PRISM 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were regarded as significant when $p < 0.0001$ (***), $p < 0.001$ (**), and $p < 0.01$ (*).



Results

Activity of the 4-aminoquinoline (AMQ) derivatives against *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes

In this work, we evaluated the cytotoxicity in mammalian cells and *in vitro* activity against both the insect promastigote and the intramacrophage amastigote forms of *L. amazonensis* of ten 4-aminoquinoline (AMQ) derivatives and their precursors (Table 1). For the antipromastigote activity, among ten AMQ compounds evaluated, three compounds (AMQ-b, f, and j) presented a strong antipromastigote activity (IC_{50} of 10.9, 0.5, and 5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively), being more effective than amodiaquine and miltefosine on this extracellular stage of the parasite. Of the five compounds containing the quinoline nucleus and their sulfonamide derivatives, compound AMQ-b displayed significant activity (IC_{50} values of 10.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The presence of these two heterocyclic groups within the same structure (quinoline and pyridine) may be responsible for the activity of this compound when compared to the others in the series (AMQ-a-e). The association between the aminoquinoline compound and the hydrazide analogs also proved to be advantageous. This is highlighted in the case AMQ-f, which is about 28 times more active against *L. amazonensis* promastigotes when compared to miltefosine used as positive control. Again, the presence of both heterocycles found to be interesting, because even in this series, they also exhibit activity (such as the compound AMQ-f). It is valid to point out that, apparently, displacing the pyridine ring to position 4, as compound AMQ-i also contains heterocycles, has not proved to be active because the

substitution pattern in the pyridine ring is 1,3 (or 3-position). In the hydrazine series, the combination quinoline moiety with a benzene ring was also favorable. The case of compound AMQ-j which presents an IC_{50} of 5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *L. amazonensis* promastigotes is noteworthy.

To evaluate the cytotoxic effects of AMQ, host macrophages were treated with these compounds and evaluated by MTT method. Among the evaluated compounds (AMQ-a-j), none of them showed cytotoxicity toward peritoneal macrophages at the highest tested concentrations (30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In contrast, amodiaquine was more cytotoxic for macrophages (IC_{50} of 20.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This result is favorable with regard to the association (or combination) of these pharmacophoric groups in a single structure.

We carried out assays on amastigote with these conjugated compounds to more precisely determine their potential as selective leishmanicidal agents. As it can be seen in Table 1, the majority of the tested compounds were active against *L. amazonensis* amastigotes, with better results in the hydrazide and hydrazine series (AMQ-f-j). In general, they exhibited a higher activity against amastigotes when compared to promastigotes. This should prove to be an advantage, because amastigotes represent the form of the parasite which is present in the mammalian host, being responsible for the maintenance of the host infection. For example, compounds AMQ-g, AMQ-h, and AMQ-i did not show any significant antipromastigote activity ($IC_{50} >30.0 \mu\text{g}/\text{mL}$). However, they exhibited a high activity against amastigotes with IC_{50} values of 1.2, 16.5, and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Table 1: Effect of the AMQ derivatives on macrophages murines, promastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis*

AMQ derivatives	Macrophages CC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (95% C.I.) ^a	Promastigotes IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (95% C.I.) ^a	Amastigotes IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (95% C.I.) ^a	Selectivity Index (SI) ^b
a	>30.0	>30.0	27.6 (19.8–38.5)	>1.1
b	>30.0	10.9 (9.2–13.0)	26.6 (15.7–33.9)	>1.1
c	>30.0	>30.0	>30.0	–
d	>30.0	>30.0	>30.0	–
e	>30.0	>30.0	>30.0	–
f	>30.0	0.5 (0.3–0.9)	20.7 (17.2–24.9)	>1.4
g	>30.0	>30.0	1.9 (0.4–9.2)	>15.8
h	>30.0	>30.0	16.5 (8.0–33.9)	>1.8
i	>30.0	>30.0	0.8 (0.6–1.2)	>37.5
j	>30.0	5.9 (4.8–7.2)	2.4 (1.7–3.4)	>12.5
Sulfanilamide	>30.0	>20.0	>20.0	–
Sulfapyridine	>30.0	>20.0	>20.0	–
Sulphadiazine	>30.0	>20.0	>20.0	–
Sulfathiazole	>30.0	>20.0	>20.0	–
Sulfamethoxazole	>30.0	>20.0	>20.0	–
Isoniazid	>30.0	>20.0	>20.0	–
AQ ^c	20.9 (17.9–24.3)	17.6 (14.7–21.1)	0.6 (0.3–1.1)	34.8
Miltefosine	49.4 (43.8–55.7)	11.8 (10.0–14.0)	0.8 (0.7–1.0)	61.7

^aData are IC_{50} values in $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 95% confidence intervals are in brackets. These data represent the average of at least three independent experiments performed in duplicate.

^bSelectivity Index (SI) was calculated dividing the CC_{50} of macrophages by the IC_{50} values of amastigotes of *L. amazonensis*.

^cAQ, amodiaquine.



The relation between mammalian toxicity and activity against intracellular amastigote were compared using the selectivity index (SI) ratio (CC_{50} for macrophages/ IC_{50} for parasite). When this value is greater than 1, the compound is more selective for the activity against the parasite than the macrophages; otherwise, the compound is more toxic in macrophages (27). A remarkable selectivity was observed in the case of compounds **AMQ-g**, **AMQ-i**, and **AMQ-j**. They were much more active against intracellular amastigotes than against the host cells (SI >12.0).

The ability of compound **AMQ-j** to inhibit both *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes growth by means of high selectivity index should stimulate further studies, in order to characterize its protozoan targets.

AMQ-j induces oxidative stress in *L. amazonensis*

We evaluated the effects of total ROS production in promastigotes and *L. amazonensis*-infected macrophages treated with **AMQ-j** using a fluorescent probe, H_2DCFDA . In promastigotes, our results showed that after 24 h incubation with this compound at 24.0 and 30.0 $\mu g/mL$, the ROS production was increased by 48.9% and 66.9%, respectively, when compared with the control group (Figure 2). Miltefosine (9.0 $\mu g/mL$), used as the control drug, induced an increase of 40% in the ROS levels.

When *L. amazonensis*-infected macrophages were treated with **AMQ-j**, the ROS production was increased in a dose-dependent manner when compared with non-treated *L. amazonensis*-infected macrophages (Figure 3). After 24 h of treatment with the compound at 7.0, 13.5, and 27.0 $\mu g/mL$, we can observe an increase in ROS production (25.3%, 33.0%, and 46.3%, respectively) compared with the control (*L. amazonensis*-infected macrophages). *Leishmania amazonensis*-infected macrophages treated

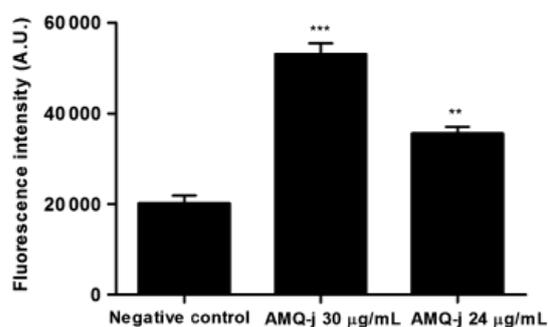


Figure 2: ROS production in promastigote forms treated with **AMQ-j**. The parasites were treated with **AMQ-j** and after 24 h were probed with H_2DCFDA . The fluorescence was measured fluorometrically. $p < 0.0001$ (***) and $p < 0.001$ (**). Significant difference compared with the negative control. The data were expressed as the means of at least two different experiments performed in triplicate.

4-Aminoquinolines as Antileishmanial Agents

with **AMQ-j** at the same concentrations used for ROS assays, that is, at 7.0, 13.5, and 27.0 $\mu g/mL$ also inhibited the multiplication of intracellular parasites in all concentrations tested (51.7%, 55.3%, and 91.2%, respectively). Furthermore, a linear correlation ($R^2 = 0.9666$) between the percent inhibition of global burden of intracellular parasites and the ROS production upon treatment was also observed.

AMQ-j induces depolarization of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in *L. amazonensis*

The histograms showed that a 24-h treatment of *L. amazonensis* promastigotes with 12.0 and 24.0 $\mu g/mL$ **AMQ-j** led to a reduction of Rh123 fluorescence of 83.9% and 97.9%, respectively. Miltefosine (9.0 $\mu g/mL$) was used for comparison and decreased $\Delta\psi_m$ in 35.2% (Figure 4A). Results of the IV confirmed depolarization of the mitochondrial membrane, because the promastigotes treated with the compound at 12.0 and 24.0 $\mu g/mL$ presented IV values of -0.83 and -0.97 , respectively (Figure 4B).

Using the fluorescent probe JC-1, the results also confirmed that **AMQ-j** damaged the mitochondria function of *L. amazonensis* promastigotes (Figure 5). Treatment with the compound at 12.0 and 24.0 $\mu g/mL$ for 24 h decreased the red/green fluorescence intensity ratio (70.7% and 73.7% inhibition, respectively), when compared with the control untreated parasites. Furthermore, fluorescence decreased by 53.8% for control cells treated with miltefosine (9.0 $\mu g/mL$).

To evaluate the effects of **AMQ-j** on the mitochondrial function of *L. amazonensis*-infected macrophages, we measured the mitochondrial membrane potential using the fluorescent probe JC-1. The results were expressed as a fluorescence intensity ratio obtained at 600 and 528 nm. A decrease in the red/green fluorescence intensity ratio indicates a collapse in the mitochondrial membrane potential. Figure 6A shows a significant reduction in the potential of the infected macrophage mitochondrial membrane corresponding to 43.6%, 36.7%, and 53.0% after treatment with 7.0, 13.0, and 27 $\mu g/mL$ **AMQ-j**, respectively. A linear correlation ($R^2 = 0.8486$) was observed between the percent inhibition of global burden of intracellular parasites as well as a decrease in the mitochondrial potential (Figure 6B). Cells treated with 25.0 $\mu g/mL$ miltefosine showed a 58.0% decrease in the membrane potential. On the other hand, analysis performed with uninfected macrophages treated with **AMQ-j** did not have a statistical significant reduction of $\Delta\psi_m$ when compared with the non-treated control (Figure S1).

AMQ-j does not alter the plasma membrane integrity in *L. amazonensis* promastigotes

To evaluate whether the mechanism of cell death triggered by **AMQ-j** involves rupture of the plasma membrane

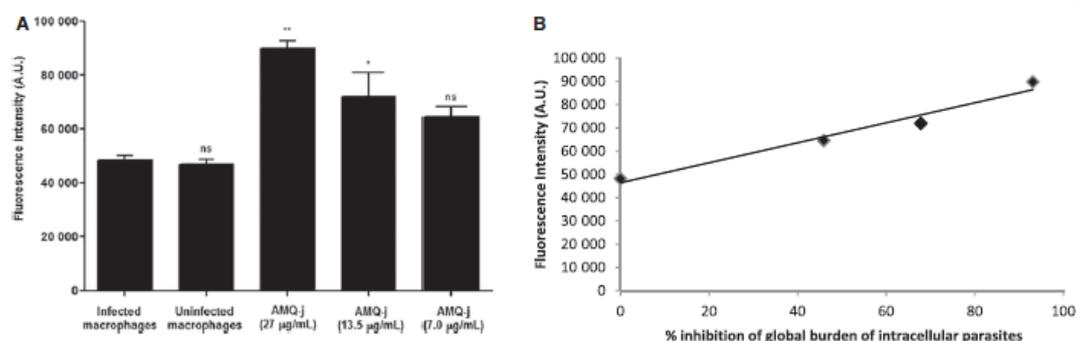


Figure 3: (A) ROS production in *L. amazonensis*-infected macrophages and treated with **AMQ-j**. ROS production was quantified using H₂DCFDA after 24 h of treatment, as described in the Materials and Methods. Fluorescence intensity was expressed as arbitrary units (A.U.). $p < 0.001$ (**) and $p < 0.01$, significant difference compared with the control group (infected macrophages). The data are expressed as the means of at least two different experiments performed in triplicate. (B) Correlation between the percent inhibition of global burden of intracellular parasites and increased ROS production after treatment with **AMQ-j** ($R^2 = 0.9666$).

integrity, promastigotes were treated with the compound and stained with PI, which is a specific nucleic acid stain which diffuses across compromised plasma membrane. The **AMQ-j** compound at 12.0; 24.0 and 31.0 µg/mL did not induce a significant increase in PI-stained promastigotes when compared with the negative control, thus indicating a non permeabilization of the plasma membrane (Figure S2). The positive control (cells heated at 65 °C for 10 min) showed an 80.3% increase in the percentage of PI-stained promastigotes.

AMQ-j does not induce NO production in *L. amazonensis*-infected macrophages

Regarding the production of reactive nitrogen products such as NO, our results revealed that **AMQ-j** did not induce a significant increase in the production of nitric oxide in all concentrations used when compared to untreated *L. amazonensis*-infected macrophages (data not shown).

Discussion

In this work, we reported the leishmanicidal activity of 4-aminoquinoline (**AMQ**) derivatives against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*. The results showed that some compounds exhibited a strong leishmanicidal effect against *L. amazonensis*, being more selective against the parasite than toward the macrophage host. *Leishmania amazonensis* has been associated with various clinical features of the human leishmaniasis, including cutaneous and diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil and can also induce a fatal clinical outcome, including the visceral form of the disease (28,29).

Many antimalarial compounds are based on the usage of quinoline nucleus such as 4-aminoquinolines, aryl-aminoquinoline alcohols and 8-aminoquinolines (30). This has

also been the case of leishmanicidal drugs such as sitamaquine and tafenoquine (31,32). Besides other targets, the mechanism of action of these drugs in *Leishmania* is related to mitochondrial disorders and their consequences (31–34). In the studies described here, we also confirm that the leishmanicidal effect of **AMQ** is related to mitochondrial dysfunction. The **AMQ-j** compound induces the depolarization of the mitochondrial membrane potential in promastigotes and *L. amazonensis*-macrophages. As the amastigotes are within the host cell, it would be of interest to determine whether the mitochondrial depolarization observed in infected cells was either from macrophages or from intracellular parasites. Interestingly, uninfected macrophages treated with **AMQ-j** did not induce the depolarization of the mitochondrial membrane potential, suggesting that this compound was selectively toxic to the mitochondria only in *L. amazonensis*-infected macrophages. Furthermore, in infected macrophages, the depolarization of the mitochondrial membrane potential was dose dependent. A correlation was also observed between the reduction in the global burden of intracellular parasites and the decrease in the mitochondrial potential. Consequently, we can conclude that the **AMQ-j** can act directly within the parasite mitochondria, causing mitochondrial protozoan dysfunction and subsequently the intracellular parasite death.

Furthermore, we observed an increase in the ROS levels in promastigotes and *L. amazonensis*-infected macrophages treated with **AMQ-j**. Mitochondria are the major sources of ROS in *Leishmania* and an increase in the ROS might induce mitochondrial alterations (33). These results are really interesting, because the most remarkable morphological difference between the mitochondria of higher eukaryotes and trypanosomatids is the number and relative volume of these organelles. In contrast to eukaryotes, these parasites contain only one single organelle which becomes a potential site for drug intervention (33).

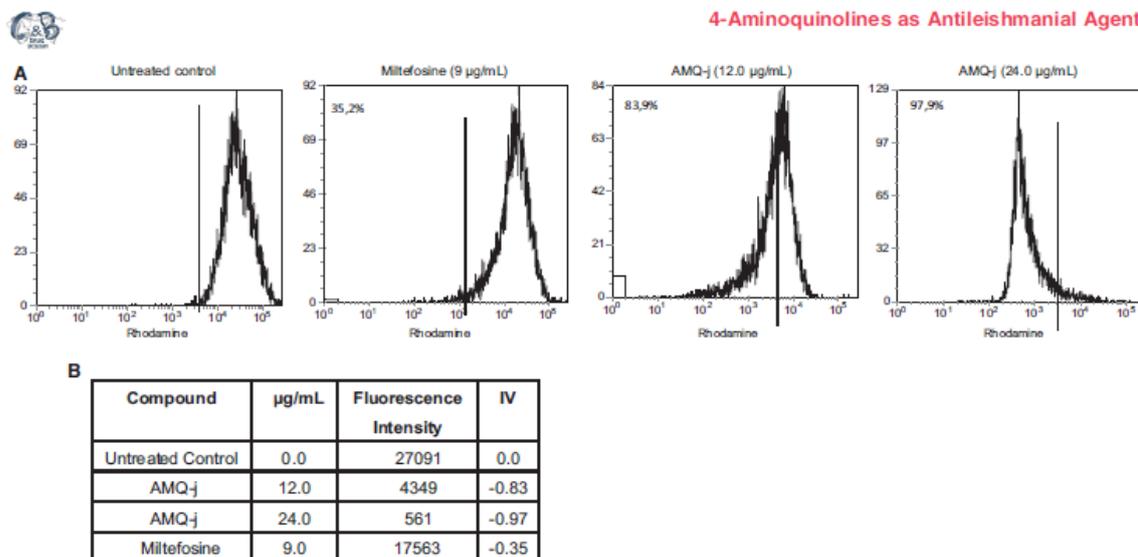


Figure 4: (A) Analysis of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of *L. amazonensis* promastigotes treated with **AMQ-j**. The parasites were treated with **AMQ-j** and after 24 h and stained with Rh123. (B) The index of variation (IV) was used to quantify differences among the promastigote forms treated and untreated (control). Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane potential. Miltefosine was used as positive control (A and B). The data were expressed as the means of at least two different experiments performed in triplicate.

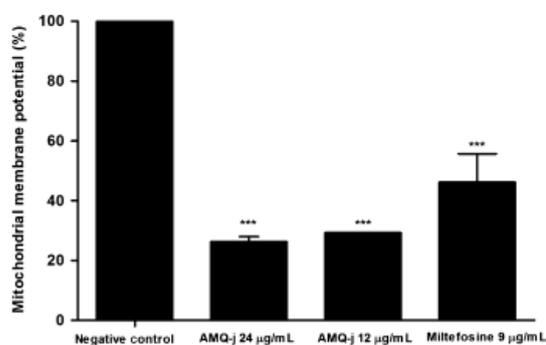


Figure 5: Changes of the mitochondrial membrane potential of *L. amazonensis* promastigotes treated with **AMQ-j**. The parasites were treated with **AMQ-j** and after 24 h were probed with JC-1. The fluorescence was measured fluorometrically. The ratio (600/528) was calculated in treated and untreated (negative control) promastigote forms. The negative control was regarded as 100% and the results expressed as a percentage in relation of the negative control. $p < 0.0001$ (***), significant difference compared with the negative control. The data were expressed as the means of at least two different experiments performed in triplicate.

In this work, a depolarization of the mitochondrial potential associated with the ROS production in *L. amazonensis* was observed. However, the **AMQ-j** treatment of the promastigotes did not involve the rupture of the plasma membrane. Some events, including the aforementioned ones, associated with the externalization of the membrane associated phosphatidyl serine and fragmentation of the nuclear DNA are indicated as apoptosis like in protozoan

Leishmania. Some drugs, including the 8-aminoquinolines sitamaquine and tafenoquine, have their leishmanicidal effect associated with an apoptosis-like event (31–34). Further studies are necessary to clarify whether the mode action of **AMQ-j** compound is related to apoptosis or another death of *Leishmania* parasite.

Although *Leishmania* infect other cells, macrophages are considered as the main host cells for such parasite. These phagocytic cells have a dual role in controlling the disease, because in the experimental leishmaniasis macrophages are significant in both the survival and elimination of the parasite (34). Some microbicidal molecules produced by macrophages are involved in the complete elimination of *Leishmania*. Regarding the production of nitrogen-reactive products, nitric oxide (NO) is one the mechanisms used by macrophages to kill the intracellular amastigote (35). However, our results revealed that *L. amazonensis*-infected macrophages treated with **AMQ-j** did not induce significant increase in the production of nitric oxide in all concentrations used when compared to the untreated *L. amazonensis*-infected macrophages. This suggests that the leishmanicidal activity against the intracellular parasite observed in this work may be more strongly related to other mechanisms, such as ROS production, than to the NO production by infected macrophages.

Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that **AMQ-j** exhibits promising leishmanicidal activity. Furthermore, **AMQ-j**

Antinarelli et al.

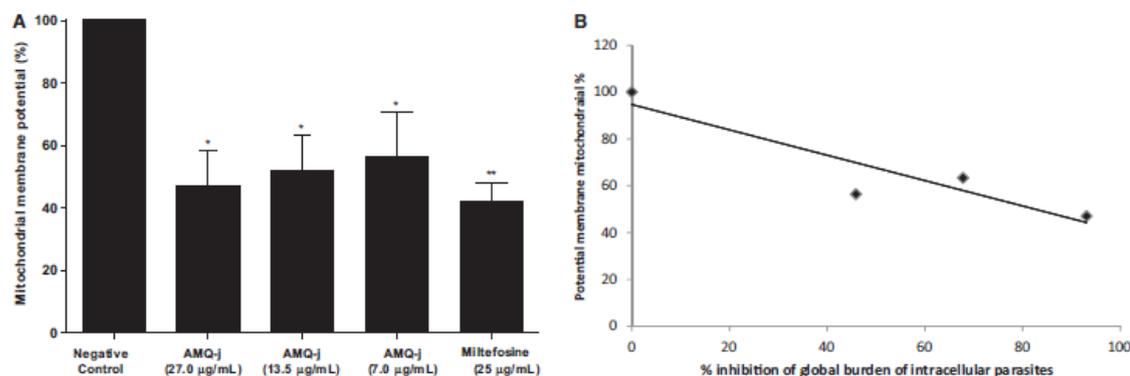


Figure 6: (A) *L. amazonensis*-infected macrophages and treated with AMQ-j were probed with JC-1 and analyzed fluorometrically. The ratio (600/528) was calculated in treated and untreated (negative control) *L. amazonensis*-infected macrophages. The negative control was regarded as 100% and the results expressed as a percentage in relation of the control. The control was regarded as 100%. $p < 0.001$ (**) and 0.01 (*), significant difference compared with the negative control. The data were expressed as the means of at least two different experiments performed in triplicate. (B) Correlation between the percent inhibition of global burden of intracellular parasites and decreased in mitochondrial membrane potential after treatment with AMQ-j ($R^2 = 0.8486$).

compound was able to induce parasite disorders which are mainly mediated by the mitochondrial dysfunction associated with the ROS production. Further *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to increase our understanding regarding the mode of action of this compound.

Acknowledgments

Leishmania amazonensis (WHOM/BR/75/Josefa) transfected with GFP was generously donated by Dr. Bartira Rossi-Bergmann (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). The authors are grateful to 'Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais' (FAPEMIG), 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES), 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq), and 'Universidade Federal de Juiz de Fora' (UFJF) for financial support.

Conflict of Interest

None of the authors of this manuscript has declared any conflict of interest.

References

- Den Boer M., Argaw D., Janin J., Alvar J. (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect*;17:1471–1477.
- Singh N., Mishra B.B., Bajpai S., Singh R.K., Tiwari V.K. (2014) Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*;22:18–45.
- Kaye P., Scott P. (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*;9:604–615.
- McGwire B.S., Satoskar A.R. (2014) Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*;107:7–14.
- Tekwani B.L., Walker L.A. (2006) 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis*;19:623–631.
- Desrivot J., Herrenknecht C., Ponchel G., Garbi N., Prina E., Fournet A., Bories C., Figadère B., Hocquemiller R., Loiseau P.M. (2007) Antileishmanial 2-substituted quinolines: in vitro behaviour towards biological components. *Biomed Pharmacother*;61:441–450.
- Vieira N.C., Herrenknecht C., Vacus J., Fournet A., Bories C., Figadère B., Espindola L.S., Loiseau P.M. (2008) Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. *Biomed Pharmacother*;62:684–689.
- Reynolds K.A., Loughlin W.A., Young D.J. (2013) Quinolines as chemotherapeutic agents for leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem*;13:730–743.
- Loiseau P.M., Cojean S., Schrével J. (2011) Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite*;18:115–119.
- Patra P., Guha S.K., Maji A.K., Saha P., Ganguly S., Chakraborty A., Kundu P.K., Sarker S., Ray K. (2012) Efficacy of oral miltefosine in visceral leishmaniasis in rural West Bengal, India. *Indian J Pharmacol*;44:500–503.
- Sundar S., Jha T.K., Thakur C.P., Engel J., Sindermann H., Fischer C., Junge K., Bryceson A., Berman J. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*;347:1739–1746.
- Coimbra E.S., Carvalhaes R., Grazul R.M., Machado P.M., De Souza M.V., 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.
13. 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.
 14. Coimbra E.S., Da Silva A.D., Dias R.M., Corrales R.N., Bispo M.L., Kaiser C.R., de Souza M.V. (2011) Amodiaquine analogs. Synthesis and antileishmanial activity. *Med J Chem*;3:106–113.
 15. Antinarelli L.M., Carmo A.M., Pavan F.R., Leite C.Q., Da Silva A.D., Coimbra E.S., Salunked D.B. (2012) Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Org Med Chem Lett*;2:1–8.
 16. Coimbra E.S., Antinarelli L.M., Da Silva A.D., Bispo M.L., Kaiser C.R., de Souza M.V. (2013) 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: a promising and potent class of antileishmanial compounds. *Chem Biol Drug Des*;8:658–665.
 17. Peixoto M.P., Beverley S.M. (1987) In vitro activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*;10:1575–1578.
 18. Polonini H.C., Dias R.M., Souza I.O., Gonçalves K.M., Gomes T.B., Raposo N.R., Da Silva A.D. (2013) Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorg Med Chem Lett*;23:4506–4510.
 19. Rossi-Bergmann B., Pacienza-Lima W., Marcato P.D., De Conti R., Durán N. (2012) Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous Leishmaniasis. *J Nano Res*;20:89–97.
 20. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*;65:55–63.
 21. Dos Santos A.R., Falcão C.A., Muzitano M.F., Kaiser C.R., Rossi-Bergmann B., Férézou J.P. (2009) Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorg Med Chem*;17:496–502.
 22. Ribeiro G.A., Cunha-Júnior E.F., Pinheiro R.O., Da-Silva S.A., Canto-Cavalheiro M.M., da Silva A.J., Costa P.R., Netto C.D., Melo R.C., Almeida-Amaral E.E., Torres-Santos E.C. (2013) LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother*;68:789–799.
 23. Fonseca-Silva F., Inacio J.D., Canto-Cavalheiro M.M., Almeida-Amaral E.E. (2011) Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE*;6:e14666.
 24. Volpato H., Desoti V.C., Cogo J., Panice M.R., Sarraggiotto M.H., Silva S.D.O., Ueda-Nakamura T., Nakamura C.V. (2013) The effects of N-Butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* are mediated by mitochondrial dysfunction. *Evid Based Complement Alternat Med*;2013:874367.
 25. Fonseca-Silva F., Inacio J.D., Canto-Cavalheiro M.M., Almeida-Amaral E.E. (2013) Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *J Nat Prod*;76:1505–1508.
 26. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*;126:131–138.
 27. Tempone A.G., Martins de Oliveira C., Berlinck R.G. (2011) Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*;77:572–585.
 28. Barral A., Badaró R., Barral-Neto M., Grimaldi G. Jr, Momem H., Carvalho E.M. (1986) Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*;35:732–734.
 29. Silveira F.T., Lainson R., De Castro Gomes C.M., Laurenti M.D., Corbett C.E. (2009) Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*;31:423–431.
 30. Njogu P.M., Chibale K. (2013) Recent developments in rationally designed multitarget antiprotozoan agents. *Curr Med Chem*;20:1715–1742.
 31. Carvalho L., Luque-Ortega J.R., Manzano J.L., Castanys S., Rivas L., Gamarro F. (2010) Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*;54:5344–5351.
 32. Yardley V., Gamarro F., Croft S.L. (2010) Antileishmanial and antitypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob Agents Chemother*;54:5356–5358.
 33. Menna-Barreto R.F., de Castro S.L. (2014) The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int*;2014:614014.
 34. Carvalho L., Luque-Ortega J.R., López-Martin C., Castanys S., Rivas L., Gamarro F. (2011) The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother*;55:4204–4210.
 35. Horta M.F., Mendes B.P., Roma E.H., Noronha E.S., Macêdo J.P., Oliveira L.S., Duarte M.M., Vieira L.O. (2012) Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res*;2012: 203818.

Note

©World Health Organization (WHO). Available at: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Accessed October 20, 2014.

Antinarelli et al.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Uninfected macrophages and treated with AMQ-j.



Figure S2. Cell membrane integrity assay in *L. amazonensis* promastigotes treated with AMQ-j for 24 h and stained with PI.

3.3 CAPÍTULO 3: Potential effect of a quinoline derivative in *Leishmania amazonensis*: induction of apoptosis, autophagy and *in silico* inhibition of the Trypanothione reductase.

3.3.1 Objetivos específicos

Com o composto selecionado no capítulo 2:

- Complementar estudos relacionados à atividade leishmanicida e toxicidade *in vitro*;
- Avaliar se o mecanismo de morte envolve eventos sugestivos de apoptose, como: aumento de corpúsculos lipídicos, redução do tamanho celular, exposição de resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática externa, alteração nas fases do ciclo celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA;
- Avaliar se o mecanismo de morte envolve eventos sugestivos de necrose, pela análise da integridade da membrana plasmática;
- Avaliar se o mecanismo de morte envolve alterações celulares sugestivas de autofagia, mediante análise da formação de vacúolos autofágicos, acúmulo de compartimentos acídicos e formação de corpos multivesiculares;
- Verificar o efeito do composto sobre a atividade da Tripanotiona Redutase de *L. amazonensis* por estudos computacionais (*in silico*).

Parasitology Research

Potential effect of a quinoline derivative in *Leishmania amazonensis*: induction of apoptosis, autophagy and in silico inhibition of the Trypanothione reductase.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Potential effect of a quinoline derivative in <i>Leishmania amazonensis</i> : induction of apoptosis, autophagy and in silico inhibition of the Trypanothione reductase.
Article Type:	Original Paper
Funding Information:	
Abstract:	<p>Quinolines are a class of heterocyclic compounds with multiple chemotherapeutic properties, including antileishmanial activity. In a previous work, a new series of 4-aminoquinoline derivatives, named AMQ, were designed and synthesized. Among these derivatives, AMQ-j was the most promising compound against <i>Leishmania amazonensis</i> and preliminary studies showed that this compound induced marked oxidative stress. Here, we complemented our studies exploring further the antileishmanial effect of this compound against <i>L. amazonensis</i>, as well as determining the cellular processes involved in the death of the parasite. Our results confirmed the expressive antileishmanial effect of the compound AMQ-j on extracellular amastigote-like (IC50 of 7.0 µg/mL) and intracellular amastigote (IC50 of 2.6 µg/mL) forms of <i>L. amazonensis</i>. In addition, <i>L. amazonensis</i>-infected macrophages showed low capacity for reversion of the effect of this compound. The compound AMQ-j affects the mitochondrial membrane potential of extracellular amastigote-like and triggers several characteristics of apoptosis in promastigotes of <i>L. amazonensis</i>. The treatment of promastigotes with AMQ-j also induced the formation of several structures suggestive of autophagic cell death, including autophagic vacuoles, accumulation of acidic compartments and multivesicular bodies inside vacuoles. In silico studies suggest that this compound is a potential inhibitor of key redox enzyme trypanothione reductase (TryR) of <i>L. amazonensis</i>. Our results suggest that oxidative stress, considered as a primary key event, triggers parasite death through different pathway, including apoptosis and autophagy.</p>
Corresponding Author:	ELAINE COIMBRA Universidade Federal de Juiz de Fora JUIZ DE FORA, Minas Gerais BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Juiz de Fora
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	ELAINE COIMBRA
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	<p>ELAINE COIMBRA</p> <p>Isabela Souza</p> <p>Lara Alves</p> <p>Larissa Laque</p> <p>Vinícius de Souza</p> <p>Priscila Capriles</p> <p>Jacy Gameiro</p> <p>Elizandra Britta</p> <p>Celso Nakamura</p>

1 **Potential effect of a quinoline derivative in *Leishmania amazonensis*: induction of**
2 **apoptosis, autophagy and *in silico* inhibition of the Trypanothione reductase.**

3

4 **Luciana Maria Ribeiro Antinarelli¹, Isabela de Oliveira Souza², Lara de Azevedo**
5 **Alves³; Larissa Corrêa Laque³; Vinicius Carius de Souza³; Priscila Vanessa**
6 **Zabala Capriles³, Jacy Gameiro¹, Elizandra Aparecida Britta⁴, Celso Vataru**
7 **Nakamura⁴, Adilson David da Silva², Elaine Soares Coimbra^{1*}**

8 *¹Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade*
9 *Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-*
10 *900, Brasil.*

11 *²Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus*
12 *Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

13 *³Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, Departamento de*
14 *Ciência da Computação, I.C.E., Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, M.*
15 *G., 36036-900, Brasil.*

16 *⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de*
17 *Maringá, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil*

18

19 *Corresponding author

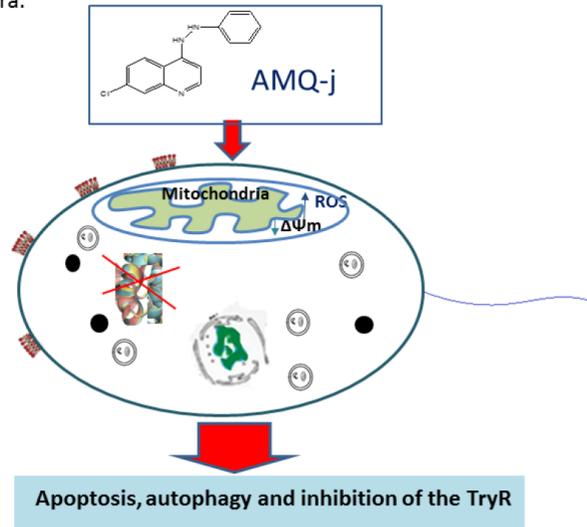
20 E-mail address: elaine.coimbra@ufjf.edu.br (E.S. Coimbra).

21 Tel.: +55 32 2102 3219; fax: +55 32 2102 3214.

22

Potential effect of a quinoline derivative in *Leishmania amazonensis*: induction of apoptosis, autophagy and *in silico* inhibition of the Trypanothione reductase

Luciana MR Antinarelli, Isabela O Souza, Lara A Alves, Larissa C Laque, Vinícius C Souza, Priscila VZ Capriles, Jacy Gameiro, Elizandra A Britta, Celso V Nakamura, Adilson D da Silva, Elaine S Coimbra.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

23

24 **Abstract**

25 Quinolines are a class of heterocyclic compounds with multiple chemotherapeutic
26 properties, including antileishmanial activity. In a previous work, a new series of 4-
27 aminoquinoline derivatives, named AMQ, were designed and synthesized. Among these
28 derivatives, AMQ-j was the most promising compound against *Leishmania*
29 *amazonensis* and preliminary studies showed that this compound induced marked
30 oxidative stress. Here, we complemented our studies exploring further the
31 antileishmanial effect of this compound against *L. amazonensis*, as well as determining
32 the cellular processes involved in the death of the parasite. Our results confirmed the
33 expressive antileishmanial effect of the compound AMQ-j on extracellular amastigote-
34 like (IC₅₀ of 7.0 µg/mL) and intracellular amastigote (IC₅₀ of 2.6 µg/mL) forms of *L.*
35 *amazonensis*. In addition, *L. amazonensis*-infected macrophages showed low capacity
36 for reversion of the effect of this compound. The compound AMQ-j affects the
37 mitochondrial membrane potential of extracellular amastigote-like and triggers several
38 characteristics of apoptosis in promastigotes of *L. amazonensis*. The treatment of
39 promastigotes with AMQ-j also induced the formation of several structures suggestive
40 of autophagic cell death, including autophagic vacuoles, accumulation of acidic
41 compartments and multivesicular bodies inside vacuoles. *In silico* studies suggest that
42 this compound is a potential inhibitor of key redox enzyme trypanothione reductase
43 (TryR) of *L. amazonensis*. Our results suggest that oxidative stress, considered as a
44 primary key event, triggers parasite death through different pathway, including
45 apoptosis and autophagy.

46

47 **Keywords:** *Leishmania amazonensis*; aminoquinoline; antileishmanial activity;
48 apoptosis; autophagy; Trypanothione reductase.

49

50 **Introduction**

51 *Leishmania amazonensis* has been isolated from patients with diverse clinical
52 forms, including localized cutaneous leishmaniasis (LCL), the most common American
53 Cutaneous Leishmaniasis form, mucocutaneous leishmaniasis (MCL), anergic diffuse
54 cutaneous leishmaniasis (ADCL) and was also implicated in borderline disseminated
55 cutaneous leishmaniasis, an intermediate form of disease. The ADCL is a rare but
56 severe form marked by poor responses and frequent relapses of patients following
57 chemotherapy (Silveira and Lainson 2005; Silveira et al. 2009). Additionally, *L.*
58 *amazonensis* has already been associated with post-kala-azar dermal leishmaniasis
59 (PKDL) and visceral leishmaniasis (VL) in humans and dogs (Aleixo et al. 2006).

60 The current chemotherapy for the treatment of leishmaniasis is rather
61 unsatisfactory due to high costs, limited effectiveness, being a long-term treatment,
62 severe side effects due to high toxicity, and emerging drug resistance (Aït-Oudhia et al.
63 2011; Nagle et al. 2014). Consequently, the search for new chemotherapeutic targets
64 became a priority for the control of leishmaniasis.

65 Quinolines are a class of heterocyclic compounds with multiple
66 chemotherapeutic properties, including antiplasmodial, antitumoral, antioxidant,
67 antiviral and antimicrobial activities (Kumar et al. 2009; Afzal et al. 2015). Regarding
68 antileishmanial activity, sitamaquine, an 8-aminoquinoline, has been proposed as
69 alternative oral treatment against VL, but its preliminary clinical studies in Kenya and
70 Brazil showed limited efficacy (Loiseau et al. 2011).

71 Our research group has extensively investigated the antileishmanial activity of
72 new aminoquinoline derivatives and reported interesting results (Coimbra et al. 2010;
73 Carmo et al. 2011; Antinarelli et al. 2012; Coimbra et al. 2013; Antinarelli et al. 2016;
74 Coimbra et al. 2016). Recently, we designed and synthesized a new series of 4-

75 aminoquinoline derivatives and the compounds presented *in vitro* and *in vivo*
76 antimalarial (Soares et al. 2015) and *in vitro* antileishmanial activities (Antinarelli et al.
77 2015a). Among these derivatives, the AMQ-j, a 4-hydrazinoquinoline, was the most
78 promising compound against both promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*.
79 Moreover, preliminary studies showed that this compound induced marked effects on
80 the parasite mitochondria, reflected by ROS production and a reduction of
81 mitochondrial membrane potential (Antinarelli et al. 2015a). In this work, we
82 complemented our studies related to the antileishmanial effect of the AMQ-j against *L.*
83 *amazonensis*, as well as determining the mode of action of the compound that are
84 involved in the cell death of this parasite.

85

86 **Material and methods**

87 **Synthesis of compound**

88 The compound AMQ-j has been described in the literature (Polonini et al. 2013;
89 Antinarelli et al. 2015a; Soares et al. 2015). The stock solution of AMQ-j was prepared
90 in dimethylsulfoxide (DMSO). For the assays, AMQ-j was solubilized in 0.03% DMSO,
91 which was found not to affect the parasite.

92

93 **Biological assays**

94 **Reagents**

95 Miltefosine was supplied by Cayman Chemical Company (Michigan, USA),
96 Ribonuclease A (RNAse), Propidium Iodide (PI), JC-1, Carbonyl cyanide 4-
97 (trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 9-diethylamino-5H-benzo[alpha]
98 phenoxazine-5-one (Nile Red), monodansylcadaverin (MDC), Acridine orange, Hank's
99 Balanced Sal Solution (HBSS), dimethylsulfoxide (DMSO), hemin, saponin, folic acid

100 and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were
101 obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS), RPMI
102 1640 medium, penicillin G and streptomycin were purchased from Cultilab (Campinas,
103 São Paulo, Brazil). Brain heart infusion (BHI) was purchased from Himedia (Mumbai,
104 Indian). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was obtained from
105 LGC Biotechnology. Annexin V-FITC was obtained from Invitrogen (Eugene, OR,
106 USA). 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (Dapi) was acquired from
107 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The terminal deoxyribonucleotidyl
108 transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) In Situ Cell Death Detection
109 Kit was acquired from Roche (Indianapolis, IN, USA). DNase was obtained from New
110 England BioLabs (Bishops Cleeve, UK).

111

112 **Parasites**

113 Promastigotes of *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) were cultured as described
114 previously (Antinarelli et al. 2015a). The parasites were isolated from cutaneous lesions
115 of infected BALB/c mice and subcultures were performed twice a week until the tenth
116 passage.

117

118 **Activity against extracellular amastigote-like forms**

119 Extracellular amastigote-like forms were obtained from infected monolayers of
120 African green monkey kidney (Vero) cells. Vero cells were infected with 1×10^7
121 stationary growth phase *L. amazonensis* promastigotes. Extracellular parasites were
122 removed after 24 h by washing with PBS, and the culture was maintained in DMEM
123 medium supplemented with 10 % FBS at 33 °C and 5 % CO₂ atmosphere until
124 amastigotes emerged from the infected cells (Moreno and De Meirelles 1998).

125 For the assay against extracellular amastigote-like forms, these cells were
126 suspended to 3×10^6 cells/mL after Neubauer chamber counting and unexposed (negative
127 control) and exposed to an increasing concentration of AMQ-j (1.7-27.0 $\mu\text{g/mL}$) for 24
128 h at 33 °C and 5 % CO_2 atmosphere. The viability of the extracellular amastigote-like
129 forms was determined by using the colorimetric MTT assay. Miltefosine (6.2-100.0
130 $\mu\text{g/mL}$) was used as the reference drug.

131

132 **Activity against intracellular amastigotes and analysis of the reversibility of the**
133 **effect of AMQ-j on parasite proliferation**

134 Adherent macrophages, obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice,
135 were infected with promastigotes of *L. amazonensis* in the stationary growth phase and
136 *L. amazonensis*-macrophages were treated with different concentrations of the
137 compound AMQ-j (1.7-27.0 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in DMSO (final concentration 0.1 %
138 v/v). The parasite burden was evaluated as previously reported (Antinarelli et al.
139 2015b). The results were expressed as percent inhibition of the global burden of
140 amastigotes in relation to infected macrophages control. Miltefosine (1.6-25.0 $\mu\text{g/mL}$)
141 was used as the reference drug. For analysis of the reversibility the protocol was
142 performed as described by Costa et al. 2014.

143 All procedures were performed in agreement with the Ethical Principles in
144 Animal Research and according to the protocol approved by the Ethical Committee for
145 Animal Handling - UFJF (#0056/2013-CEUA).

146

147 **Cytotoxic effect on erythrocytes**

148 Hemolytic activity was determined by incubation of 180 μL of a 1 % suspension
149 of fresh human red blood cells in PBS with 20 μL of different concentrations of AMQ-j

150 (2.5-40.0 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h at 37 °C, according to protocol previously described
151 (Antinarelli et al. 2016).

152

153 **Detection of phosphatidylserine exposure by annexin-V-FITC labeling**

154 Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^7 cells/mL) were incubated for 24 h in the
155 absence or presence of 12.0 or 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j. The parasite concentration was
156 adjusted to 5×10^6 cells and suspended in 100 μL binding buffer (10 mM HEPES, 150
157 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2), containing 2.5 μL annexin V-FITC. After 20 min, the
158 cells were incubated with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of PI for 15 min in the dark at room temperature
159 (Stroppa et al. 2017). Treated promastigotes with miltefosine (18 $\mu\text{g/mL}$) were used as
160 positive control. Data acquisition and analysis were performed using a FACsCanto II
161 flow cytometer (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with DIVA
162 software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). A total of
163 10,000 events were analyzed per sample in the region that was previously established as
164 the one that corresponded to the parasites.

165

166 **Cell Cycle analysis**

167 The analysis of cell cycle was performed as previously described (Ribeiro et al.
168 2013). Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^7 cells/mL) were treated with 12.0 or 24.0
169 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j for 24 h. The cells were stained with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ PI for 20 min in the dark
170 at room temperature and the percentage of parasites in each stage of the cell cycle was
171 determined using a FACsCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Rutherford, NJ,
172 USA) equipped with DIVA software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La
173 Jolla, CA, USA). A total of 10,000 events were analyzed per sample in the region that
174 was previously established as the one that corresponded to the parasites.

175 **Detection of lipid bodies accumulation**

176 Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^7 cells/mL) were treated with 12.0 or
177 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j for 24 h. Cells were harvested, suspended in PBS and the cell
178 number was counted in the Neubauer chamber. Cells concentration were adjusted to
179 5×10^6 cells in 200 μL of PBS and incubated with 10 $\mu\text{g/mL}$ Nile Red for 20 min
180 (Stroppa et al. 2017). Fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800,
181 BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using an excitation wavelength of 485
182 nm and an emission wavelength of 528 nm.

183

184 **Evaluation of autophagic vacuoles formation by labeling with MDC**

185 *Leishmania amazonensis* promastigote forms (1×10^7 cells/mL) were treated with
186 AMQ-j (12.0 or 24.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively) or not (negative control) for 24 h. After, the
187 promastigotes were washed with PBS and cells concentration was adjusted to 1×10^7
188 cells/mL. The parasites were incubated with 50 μM of MDC, a fluorescent marker that
189 accumulates in autophagosome vacuole, in the dark for 1 h at 25 °C (Stroppa et al.
190 2017). The parasites were then washed twice in PBS and 200 μL parasites were added
191 in quadruplicate in a black 96-well plate and analyzed in a microplate reader
192 (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, USA) using a 335 nm and 460 nm for excitation
193 and emission, respectively. PBS-starved culture was used as positive control.

194

195 **Evaluation of acidic compartments formation by labeling with acridine orange**

196 Acridine orange was used as previously described (Mendes et al. 2016).
197 Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^7 cells/mL) were treated with 12.0 or 24.0 $\mu\text{g/mL}$
198 AMQ-j for 24 h. After wash, the cells were incubated with 5 $\mu\text{g/mL}$ acridine orange for
199 10 min, washed and the fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800,

200 BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using an excitation wavelength of 540
201 nm and an emission wavelength of 600 nm.

202

203 **Ultrastructural analysis by Transmission Electron Microscopy**

204 Ultrastructural analysis was performed with treated promastigote forms for 48 h
205 at 25°C with concentration that corresponded at 12.0 µg/mL AMQ-j. Untreated
206 parasites or treated with DMSO (0.008 %) were used as representative of a normal
207 ultrastructure. The parasites were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium
208 cacodylate buffer at 4°C and post-fixed in a solution of 1 % osmium tetroxide, 0.8%
209 potassium ferrocyanide, and 5 mM calcium chloride. Then, the parasites were
210 dehydrated in acetone series and embedded in Epon resin for 72 h at 60°C. Ultrathin
211 sections were stained with 5% uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEOL
212 JEM 1400 transmission electron microscope (Britta et al. 2014).

213

214 **Determination of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cellular 215 membrane integrity evaluation of extracellular amastigote-like forms**

216 Extracellular amastigote-like forms (1×10^7 cells/mL) were cultured for 24 h in
217 the absence or presence of 14.0 or 28.0 µg/mL AMQ-j at 33 °C and 5 % CO₂
218 atmosphere. For the determination of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), these
219 parasites were incubated with JC-1 fluorochrome and the assay was performed
220 according to procedure previously described (Antinarelli et al. 2015a). For the
221 evaluation of cell membrane integrity, these parasites (1×10^7 cells) were incubated with
222 PI, according to protocol previously described.

223

224 **DNA Fragmentation Assay**

225 Intracellular amastigotes DNA fragmentation was analyzed using an *in situ* cell
226 death detection kit, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the peritoneal
227 macrophages from BALB/c mice were infected with stationary growth phase *L.*
228 *amazonensis* promastigotes at a ratio of 1:10 (macrophages/parasites) at 33 °C in 5 %
229 CO₂ atmosphere for 4 h. The resulting monolayers were washed twice with PBS to
230 remove the free parasites and the cells were treated at 1.3 µg/mL AMQ-j for 72 h. Cells
231 were fixed in a solution of 4 % paraformaldehyde for 10 min. Cells were washed in PBS
232 and permeabilized with a solution of 0.2 % Triton x-100 and then labeled with the *in*
233 *situ* cell death detection TUNEL solution for 1 h at 37 °C. Cells were washed and
234 suspended in 0.5 mL of PBS (pH 7.4) containing 0.1 mg/mL DAPI for 30 min. Finally,
235 the coverslips were mounted and the fluorescence was observed using an Olympus
236 BX53 fluorescence microscope, and the images were captured with an Olympus camera
237 DP73. *Leishmania amazonensis*-infected macrophages and treated with DNase at
238 10 mg/ml for 30 min were used as a positive control.

239

240 **In silico Analysis**

241 **Homology Modeling**

242 Sequence of trypanothione reductase of *L. amazonensis* (LaTryR) was obtained
243 from UNIPROT database (ID: A5JV95). This sequence was aligned against PDB
244 database attempting to found templates to three-dimensional (3D) model construction of
245 LaTryR by the homology modeling method using Modeller9v17 program (Sali and
246 Blundell 1993) Templates were selected based on sequence identity, similarity and
247 maximum query coverage, and on the presence of ligands in catalytic and NADP
248 binding sites.

249 To assess the quality of 3D models, we used Procheck (Laskowski et al. 1993) and
250 Molprobit (Chen et al. 2010) programs to perform the Ramachandran analysis. The
251 energy of 3D models were analyzed using nDOPE and Molpdf functions from
252 Modeller9v17. The structure of LaTryR with best quality was submitted to docking
253 studies and to analysis of electrostatic profiles using the programs PDB2PQR v1.9
254 (Dolinsky et al. 2004) and APBS v1.4.1 (Holst et al. 2000).

255

256 **Protein-ligand Docking**

257 Protein model and AMQ-j compound were prepared for docking analysis in Glide
258 program (Friesner et al. 2004) using OPLS2005 force field with pH 7.4 ± 0.2 . The
259 compound AMQ-j was prepared using Ligprep tool (LigPrep v4.0. Schrödinger LLC.
260 New York) while LaTryR model was prepared using Protein Preparation Wizard tool.
261 Docking studies were performed in the Glide Single Precision (SP) mode using the
262 post-refinement step with the parameters set to the default values.

263 Two grids for docking were calculated with Glide program. The dimensions of the grid
264 for NADP binding site (NBS) were $X = Y = 25 \text{ \AA}$ and $Z = 27 \text{ \AA}$ and for catalytic site
265 (CS) were $X = Y = 24 \text{ \AA}$ and $Z = 26 \text{ \AA}$. The grid for NBS was centered on coordinates
266 $X = -22.668$, $Y = 1.310$ and $Z = 3.860$, and the grid for CS was centered on coordinates
267 $X = -26.042$, $Y = 2.547$ and $Z = 5.976$.

268

269 **Analysis of electrostatic profile**

270 To comprehend possible differences between the catalytic and NADP binding
271 sites, we analyzed the electrostatic profile of both sites using the PDB2PQR v1.9
272 (Dolinsky et al. 2004) and APBS v1.4.1 programs (Holst et al. 2000).

273

274 **Statistical Analysis**

275 The compound concentration that inhibited 50% of the survival of the parasites
276 (IC₅₀ values) was carried out and the 95 % confidence intervals were included,
277 calculated by Litchfiet and Wilcoxon method using the Probit regression model
278 considering the mean from three independent experiments performed in duplicate. The
279 90 % inhibitory concentration, i.e., the minimum concentration of compound that
280 caused 90 % reduction in the survival of the parasites (IC₉₀ value) was obtained by
281 using OriginPro 8 software considering the mean from three independent experiments.
282 Data were statistically analyzed using One-way-ANOVA followed by Dunnett post-test
283 to compare all the groups to the negative control using GraphPad Prism 5 (GraphPad
284 Software, San Diego, CA, USA). The data presented in the graphs were obtained from
285 three independent experiments performed in triplicate and results were regarded as
286 statistically significant when $p < 0.0001$ (***), $p < 0.001$ (**) and $p < 0.01$ (*).

287

288 **Results**

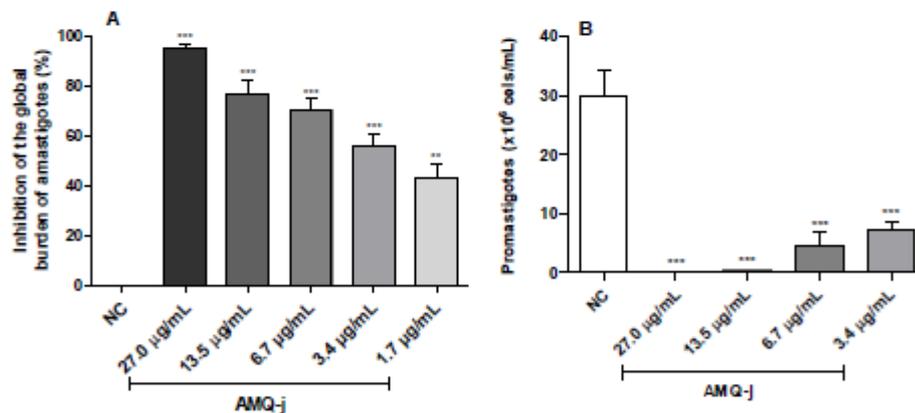
289 **AMQ-j inhibits the proliferation of amastigotes of *L. amazonensis* in an** 290 **irreversible manner without toxic effect on mammalian cells**

291 The compound AMQ-j exhibited a strong antileishmanial activity against the
292 extracellular (IC₅₀ of 7.0 µg/mL) and intracellular amastigote (IC₅₀ of 2.6 µg/mL)
293 forms. For intracellular parasites, this activity is very close to the IC₅₀ value obtained
294 for the reference drug miltefosine (2.5 µg/mL). In addition, this compound exhibited an
295 IC₉₀ of 22.8 µg/mL (84.4 µM) against intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after
296 72 h of treatment. The compound AMQ-j significantly inhibited the growth of the
297 intracellular amastigotes of *L. amazonensis* in all concentrations evaluated and in a
298 dose-dependent effect (Fig. 1A). At concentrations of 27.0, 13.5, 6.7, 3.4 and 1.7

299 $\mu\text{g/mL}$, the treatment with AMQ-j reduced the global burden of amastigotes by 95.3,
 300 76.3, 70.0, 56.3 and 43.1%, respectively, as compared to the untreated parasites (Fig.
 301 1A). To evaluate the survival of the parasites remaining after treatment of infected
 302 macrophages with AMQ-j for 72 h, we performed a complementary assay to investigate
 303 the ability of these amastigotes to differentiate into promastigotes. As shown in the
 304 Figure 1B, the treatment with AMQ-j reduced the capacity of the remaining amastigotes
 305 to differentiate into promastigotes in all concentrations evaluated and completely
 306 prevented the growth of the parasites at the concentrations of 27.0 and 13.5 $\mu\text{g/mL}$.
 307 Human erythrocytes were used to determine the hemolytic effect of AMQ-j on
 308 mammalian cells and this compound not produced significant cytotoxicity, showing
 309 haemolysis levels of less than 5% in all concentrations available (2.5-40.0 $\mu\text{g/mL}$) (data
 310 not shown).

311

312



313

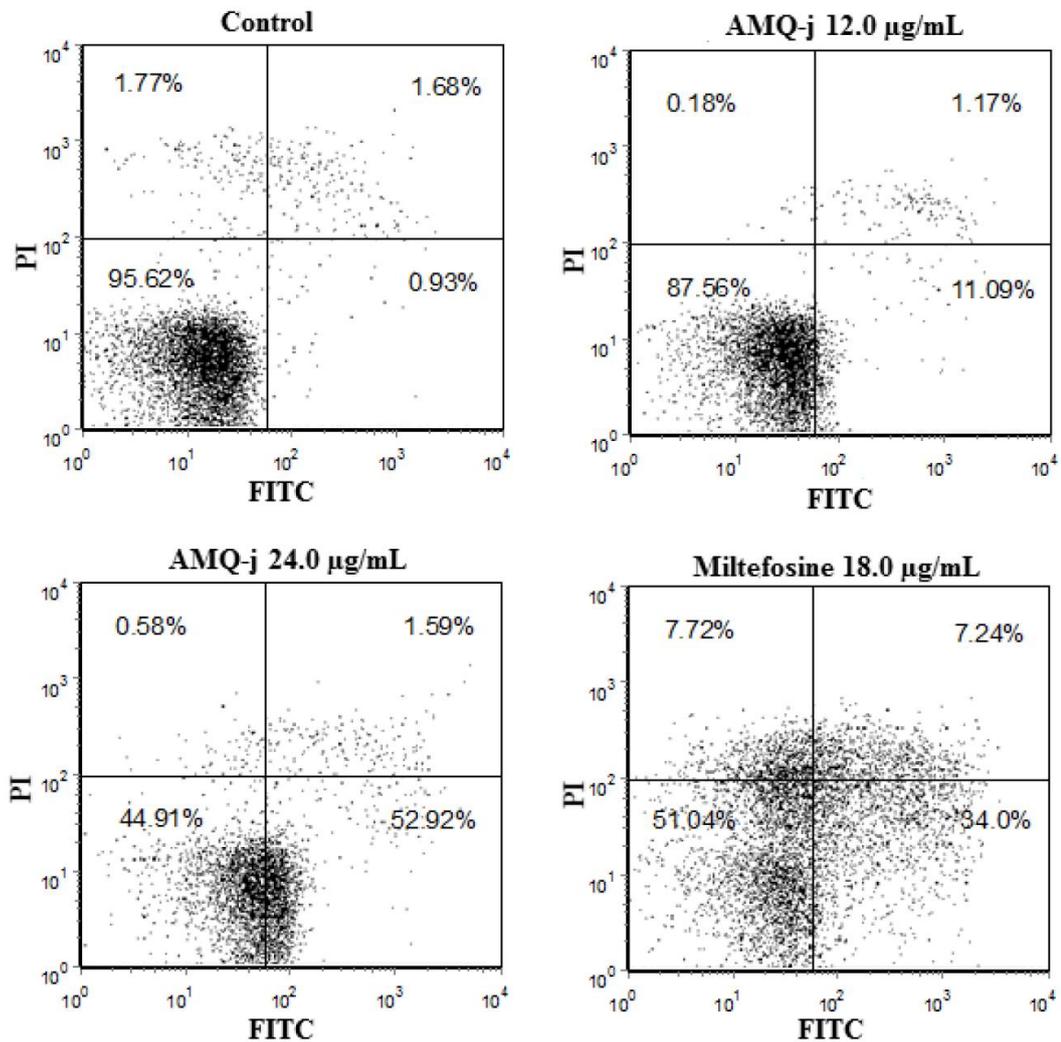
314 Fig. 1. AMQ-j induces death of intracellular amastigotes of *L. amazonensis*. (A) Macrophage monolayer
 315 was stained with Giemsa and the parasite burden was determined by counting of 200 macrophages under
 316 optical microscopy. (B) After 72 h of the treatment, the infected macrophages were washed twice and
 317 incubated with Warren's medium and 10 % FBS at 25 °C for more 72 h without the compound and the

318 viable promastigotes were counted under the microscope. NC=Negative Control. The data were obtained
319 from three independent experiments performed in duplicate. $P < 0.0001$ (***), statistically significant
320 difference compared to negative control (NC).

321

322 **AMQ-j induces phosphatidylserine exposure in *L. amazonensis* promastigotes**

323 The annexin V-FITC classic assay was performed to evaluate the externalization
324 of PS in treated promastigotes with AMQ-j for 24 h (Fig. 2). Histograms analysis
325 showed that AMQ-j induced a dose-dependent increase in annexin-V fluorescence
326 intensity. In fact, treatment at 12.0 and 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j (corresponding to two and
327 four times of IC_{50} for 72 h, respectively) increased the percentage of annexin-V positive
328 promastigotes of 11.9 and 56.9 fold, respectively, compared to untreated parasites
329 (negative control). On the other hand, flow cytometry revealed no significant increase
330 late apoptosis (double labeled with annexin V and PI) and necrosis-like stage (PI
331 staining) after the treatment at both concentrations used. Promastigotes treated with
332 miltefosine (18.0 $\mu\text{g/mL}$), used as positive control, exhibited distinct features: early
333 apoptosis (36.5 %), late apoptosis (4.3%) and necrosis process (4.4%).



334

335

336 **Fig. 2.** Phosphatidylserine externalization on the cell membrane in promastigotes of *L. amazonensis*

337 treated with AMQ-j. Promastigotes were incubated with 12.0 or 24.0 µg/mL AMQ-j for 24 h, cells were

338 stained with the fluorescent probes annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometer. Miltefosine

339 (18.0 µg/mL) was used as positive control. Representative histograms of three independent experiments.

340 The percentage of annexin V-positive cells is shown in the upper and lower right quadrants. The

341 percentage of PI-positive cells is shown in the upper and lower left quadrants.

342

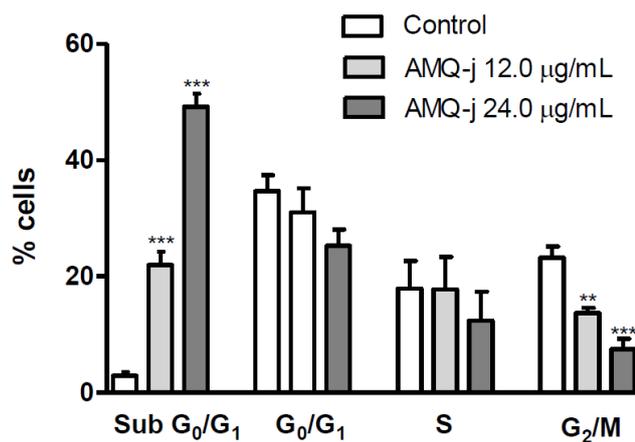
343

344

345 **AMQ-j induces sub-G₀/G₁ phase cell cycle arrest in *L. amazonensis* promastigotes**

346 Cell cycle analysis by flow cytometry indicated that promastigotes treated with
 347 AMQ-j presented a significant increasing in the sub-G₀/G₁ population (7.4- and 16.7-
 348 fold greater than untreated controls) after treatment with 12.0 and 24.0 µg/mL AMQ-j,
 349 respectively, in a concentration-dependent manner, indicating nuclear DNA and/or
 350 mitochondrial DNA fragmentation. Moreover, AMQ-j induced a significant reduction
 351 of the percentage of cells in the G₂/M phase (DNA duplication) compared to untreated
 352 parasites. These results showed that the treatment of promastigotes with AMQ-j by 24 h
 353 was able to induce drastic changes in the cell cycle of the parasites (Fig. 3).

354



355

356 **Fig. 3.** Evaluation of cell cycle through analysis of DNA content of *L. amazonensis* promastigotes treated
 357 with AMQ-j. Promastigotes were incubated without (negative control) or with 12.0 or 24.0 µg/mL AMQ-
 358 j for 24 h and then loaded with PI. DNA content was analyzed by flow cytometry. The results represent
 359 the percentage of cells in different stages of the cell cycle. The data were expressed from three
 360 independent experiments. P < 0.0001 (***) and P < 0.001 (**), statistically significant difference
 361 compared to control.

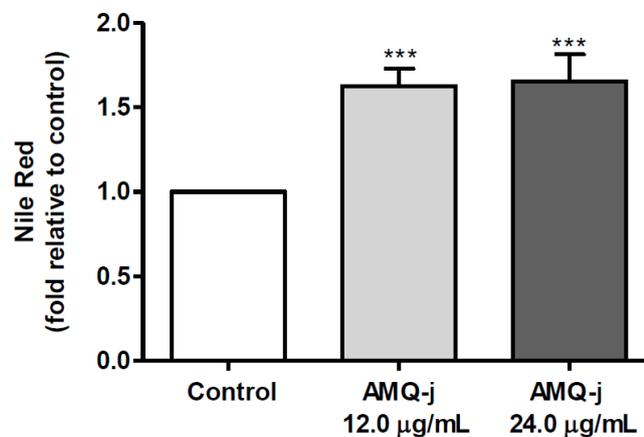
362

363

364

365 **AMQ-j induces accumulation of lipid bodies in *L. amazonensis* promastigotes**

366 To determine whether AMQ-j also induces the formation of lipid bodies, we
 367 quantified the Nile Red accumulation in promastigotes of *L. amazonensis* treated with
 368 the compound AMQ-j. The treatment of parasites with AMQ-j resulted in a significant
 369 increase of Nile Red fluorescence by 1.62 and 1.65 fold after treatment with 12.0 and
 370 24.0 $\mu\text{g/mL}$ of AMQ-j, respectively, demonstrating that treated promastigotes induce
 371 accumulation of lipid bodies (Supplementary Fig. S1).



372

373 **Fig. S1.** Analysis of lipid body accumulation in *L. amazonensis* promastigotes treated with AMQ-j.
 374 Parasites were untreated (negative control) or treated with 12.0 or 24.0 $\mu\text{g/mL}$ AMQ-j and after 24 h the
 375 cells were probed with Nile Red. Fluorescence intensity was measured fluorometrically and the data were
 376 expressed by the increase of fluorescence intensity in relation to control. The data were obtained from
 377 three different experiments performed in triplicate. $P < 0.0001$ (***), statistically significant difference
 378 compared to negative control.

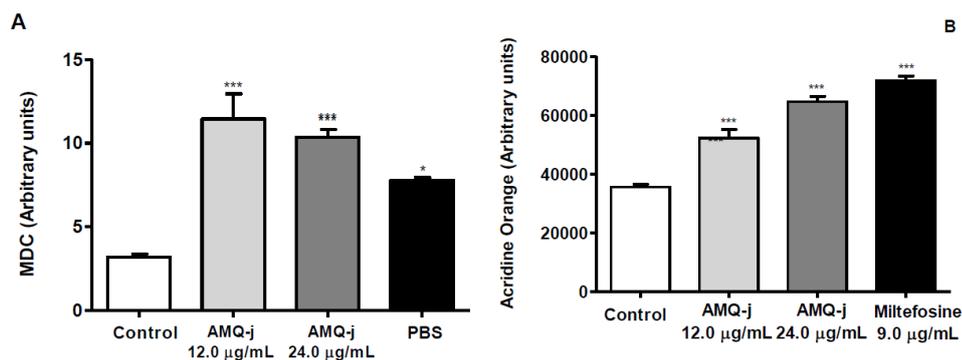
379

380 **Promastigotes of *L. amazonensis* treated with AMQ-j exhibit autophagic**
 381 **characteristics**

382 The induction of parasite death by autophagy in promastigotes treated with
 383 AMQ-j was initially evaluated by using MDC labeling, a fluorescent probe that

384 accumulates in autophagic vacuoles. Figure 4A shows a strong increase in the intensity
 385 of MDC fluorescence at both concentrations tested (3.6 and 3.1 fold at 12.0 and 24.0
 386 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). PBS-starved culture was used for comparison and an increased
 387 fluorescence of 2.4 fold was observed. Furthermore, analysis performed by fluorescence
 388 microscopy showed the presence of MDC-labeling autophagic vacuoles in parasite
 389 cytoplasm (data not shown).

390 In addition, parasites treated with AMQ-j and stained with acridine orange, a
 391 selective marker for the formation of acidic vesicular organelles, showed intense
 392 increase in the red fluorescence intensity of 46.8 and 81.6 % (at 12.0 and 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 393 AMQ-j, respectively), compared to untreated parasites (Figure 4B). Promastigotes
 394 treated with miltefosine at 9.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ also increased fluorescence in 101.7%.



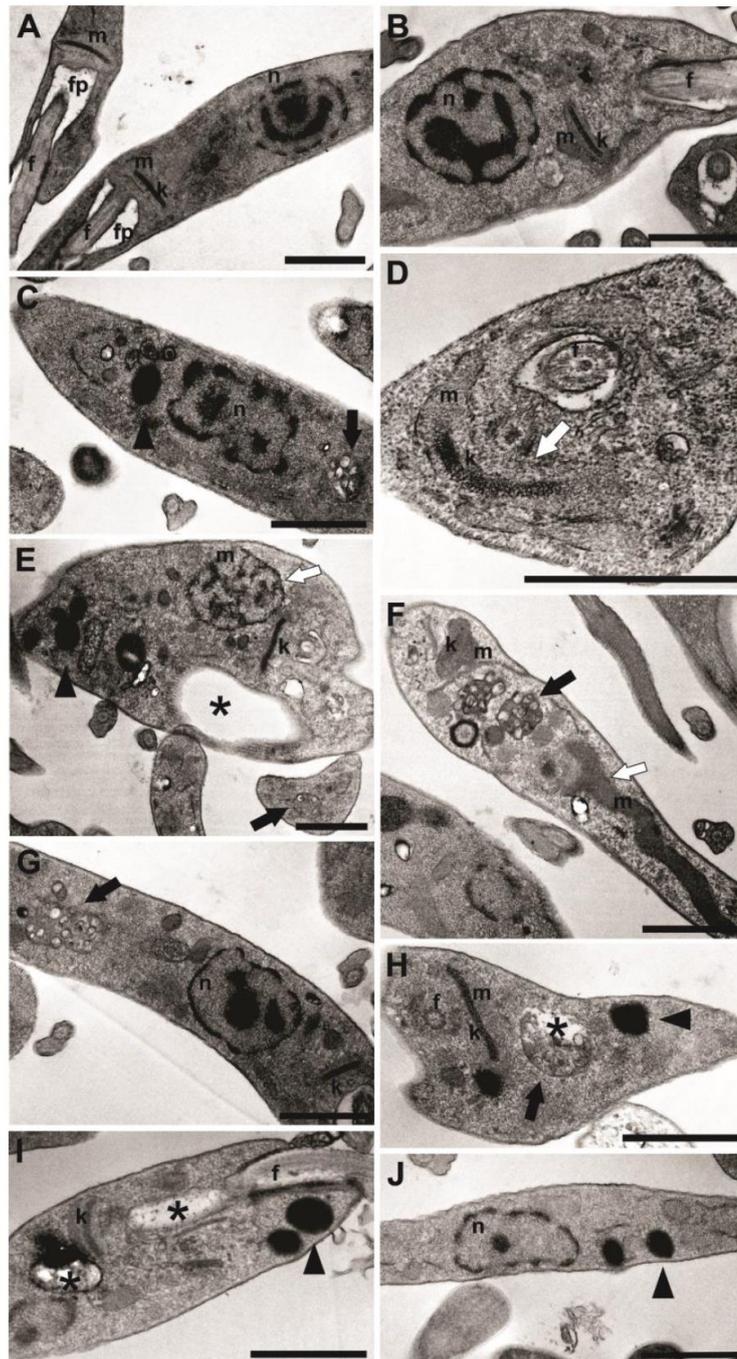
395
 396 **Fig. 4.** Effect of AMQ-j on the formation of autophagic compartments. (A) The autophagic vacuoles
 397 formation in promastigote forms of *L. amazonensis* treated with AMQ-j treated with AMQ-j at 12.0 or
 398 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h were evaluated after labeling with monodansylcadaverin (MDC). (B) The
 399 accumulation of acidic compartments in promastigote forms of *L. amazonensis* treated with AMQ-j at
 400 12.0 or 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h was determined after incubation with acridine orange. The analysis of MDC
 401 and acridine orange labelling were performed in a fluorimetry microplate reader. The data were obtained
 402 from three different experiments performed in triplicate. $P < 0.0001$ (***) , statistically significant
 403 difference compared to negative control (NC).

404

405 **AMQ-j induces ultrastructural changes in promastigotes of *L. amazonensis***

406 Transmission electron microscopy showed that untreated parasites and treated
407 with DMSO (0.008 %) exhibited a normal ultrastructure of organelles, including
408 mitochondria, kinetoplasts and nuclei. The treatment of promastigotes with AMQ-j led
409 to severe ultrastructural damage in the parasite, such as swelling mitochondrial,
410 presence of autophagic vacuoles, lipid bodies and vesicles in the parasite's cytoplasm,
411 changes in chromatin organization and multivesicular bodies inside vacuoles (Fig. 5).

412

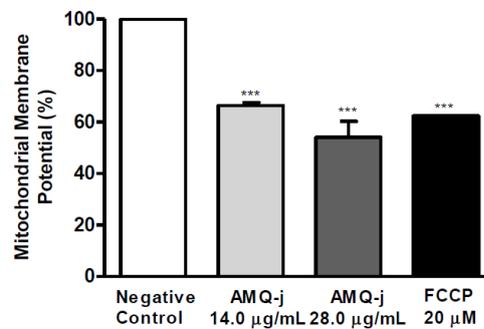


413

414 **Fig. 5.** Ultrathin sections of *L. amazonensis* promastigotes treated with AMQ-j for 48 h. (A) Untreated
 415 parasites and (B) treated with DMSO (0.008%) that presented a normal ultrastructure. Parasites treated
 416 with AMQ-j at concentration that corresponded at 12.0 µg/mL AMQ-j (C-J). White arrows indicate
 417 swollen mitochondria. Black arrowheads represent lipid-storage bodies. Black arrows indicate the
 418 presence of vesicles inside the vacuoles. The asterisk indicates autophagic vacuoles. n, nucleus; m,
 419 mitochondrion; k, kinetoplast; f, flagellum; fp, flagellar pocket. Scale bar = 1 µm.

420 **AMQ-j induces alterations of the mitochondrial membrane potential on**
 421 **extracellular amastigote forms of *L. amazonensis* without rupture of plasma**
 422 **membrane**

423 Figure 6 shows a pronounced loss of $\Delta\Psi_m$ in treated extracellular amastigote-
 424 like forms with the compound at 14.0 or 28.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (two and four times of IC_{50} value,
 425 respectively), with reduction of $\Delta\Psi_m$ of 33.6 and 46.0 %, respectively, as compared to
 426 untreated parasites. As expected, parasites treated with FCCP (positive control) showed
 427 a decreased in the $\Delta\Psi_m$.



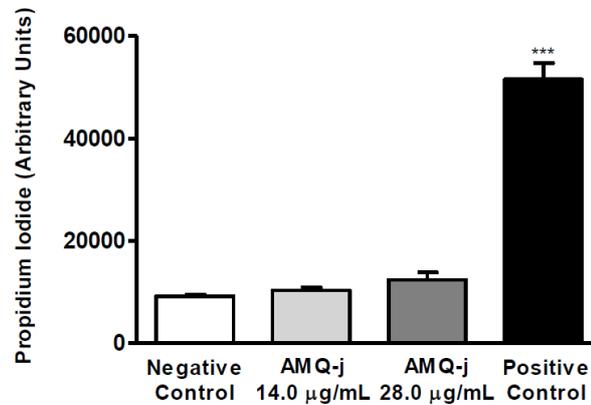
428

429 **Fig. 6.** Evaluation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of extracellular amastigote-like
 430 forms of *L. amazonensis*. Parasites were untreated (NC - negative control) or treated with AMQ-j (14.0 or
 431 28.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and after 24 h the cells were probed with JC-1. Fluorescence was measured fluorometrically.
 432 NC was regarded as 100 % and the results were expressed as a percentage in relation of the control.
 433 Amastigote-like forms incubated with FCCP at 20.0 μM were used as positive control. The data were
 434 obtained from three different experiments performed in triplicate. $P < 0.0001$ (***) , statistically
 435 significant difference compared to negative control.

436

437 In order to evaluate whether the strong mitochondrial damage could be assigned
 438 to the ability of the compound to alter the plasma membrane integrity of the
 439 extracellular amastigote-like forms, we investigated the permeability of the plasma
 440 membrane using the PI dye. Extracellular amastigotes treated with 14.0 or 28.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

441 AMQ-j for 24 h did not show significant permeabilization of the plasma membrane as
 442 compared to the untreated parasites (Supplementary Fig. S2).



443

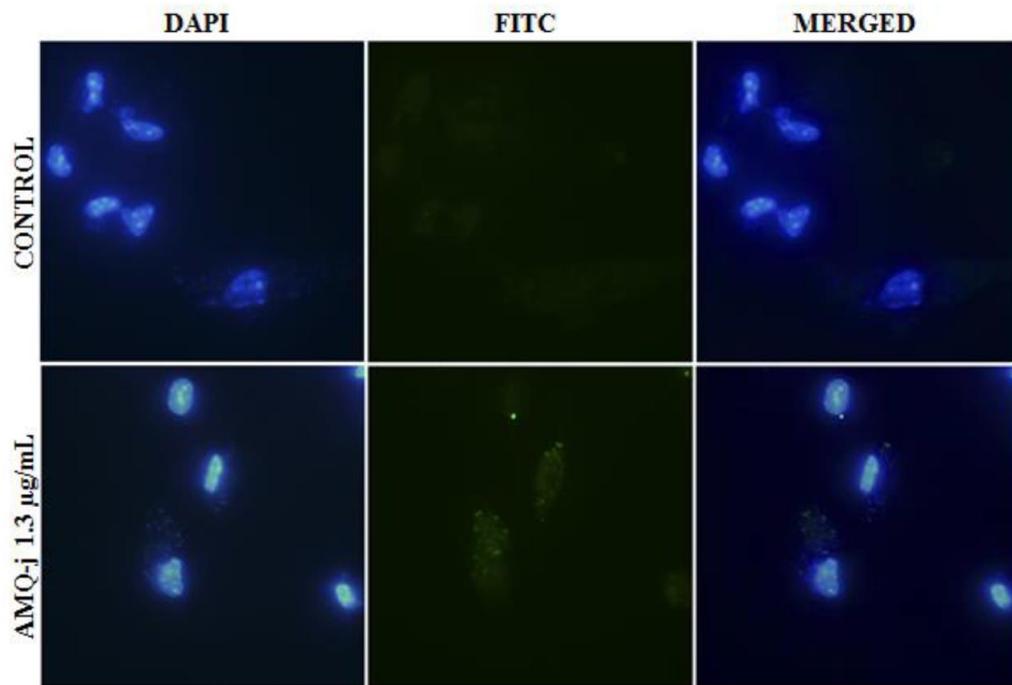
444 **Fig. S2.** Cell membrane integrity of extracellular amastigote-like forms of *L. amazonensis*. Parasites were
 445 untreated (NC - negative control) or treated with 14.0 or 28.0 µg/mL AMQ-j for 24 h and stained with PI.
 446 Fluorescence was measured fluorometrically and the data were expressed as the fluorescence intensity in
 447 arbitrary units of three independent experiments performed in triplicate. Positive control: parasites heated
 448 at 65 °C for 10 min. $P < 0.0001$ (***), statistically significant difference compared to negative control
 449 (NC).

450

451 **AMQ-j induces DNA fragmentation in intracellular amastigotes of *L. amazonensis***

452 To evaluate the occurrence of fragmentation of DNA in intracellular
 453 amastigotes, DNA degradation of infected-macrophages treated with AMQ-j was
 454 evaluated by TUNEL assay. Fluorescence analysis revealed that compound at
 455 concentrations of 1.3 µg/mL (corresponding to 1/2 x IC₅₀ value, respectively) was
 456 enough to induce DNA fragmentation in intracellular amastigotes (green-labelled) and
 457 no label was observed in the macrophages nuclei, confirming the selectivity of
 458 compound on the parasite (Fig. 7). Infected-macrophages treated with DNase (positive
 459 control) showed DNA fragmentation of both macrophages and intracellular amastigotes,
 460 which showed intense green labeling (data not shown).

461



462

463 **Fig. 7.** *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) of intracellular amastigotes of *L.*
 464 *amazonensis* treated with AMQ-j. *Leishmania amazonensis*-infected macrophages were treated with 1.3
 465 µg/mL AMQ-j for 72 h and then a TUNEL assay was performed. The macrophages and amastigotes
 466 DNA are visualized in blue (DAPI) and TUNEL-positive amastigotes are stained in green (FITC). Images
 467 were obtained by fluorescence microscopy at 100X magnification.

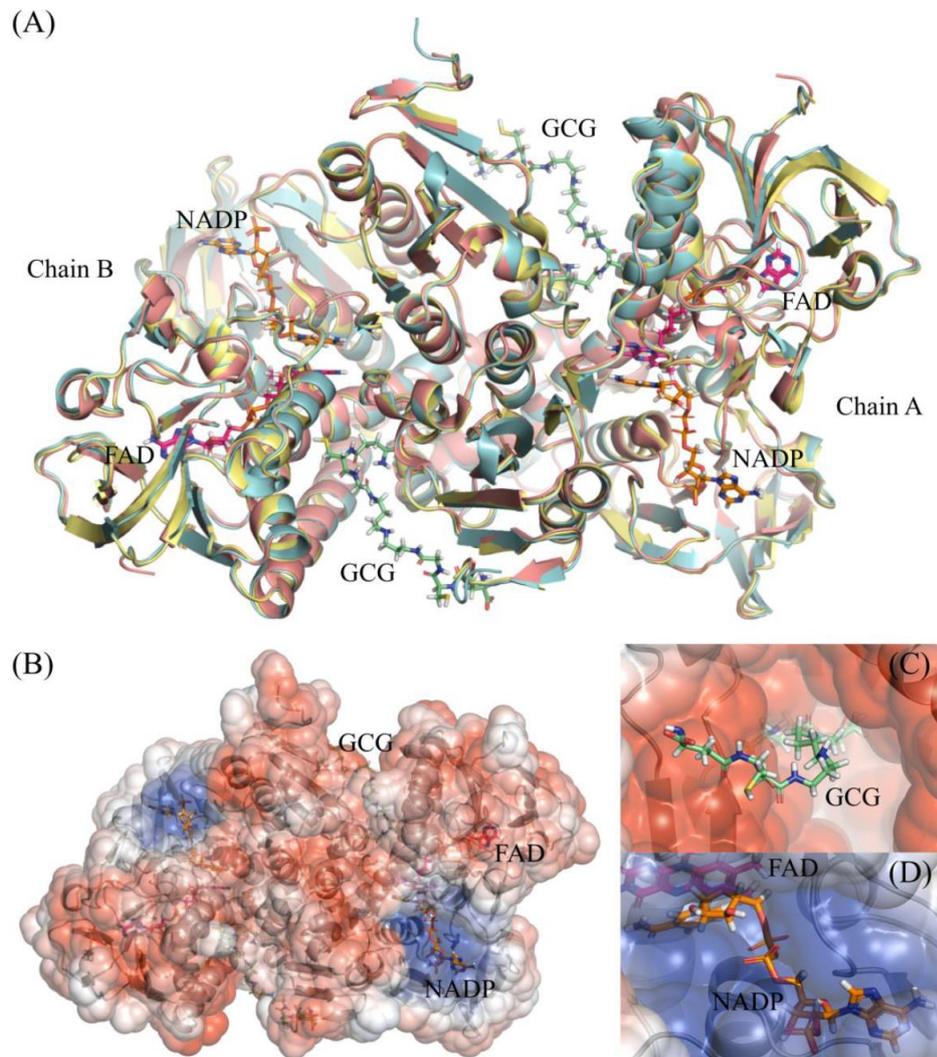
468

469 **AMQ-j inhibits in silico the trypanothione reductase of *L. amazonensis***

470 The 3D model of the trypanothione reductase homodimer of *L. amazonensis*
 471 (LaTryR) (Supplementary Fig. S3-A) was constructed by homology modeling using as
 472 template two conformations (PBDID: 2JK6 and 4ADW) of trypanothione reductase of
 473 *Leishmania infantum* (LiTryR), selected considering the configuration of catalytic (CS)
 474 and NADP binding (NS) sites. Sequence alignment of LaTryR and LiTryR showed 95%
 475 of identity, 97% of similarity and no gaps. The heteroatoms present in templates (FAD,
 476 NADP and trypanothione – GCG) were considered for model construction. The

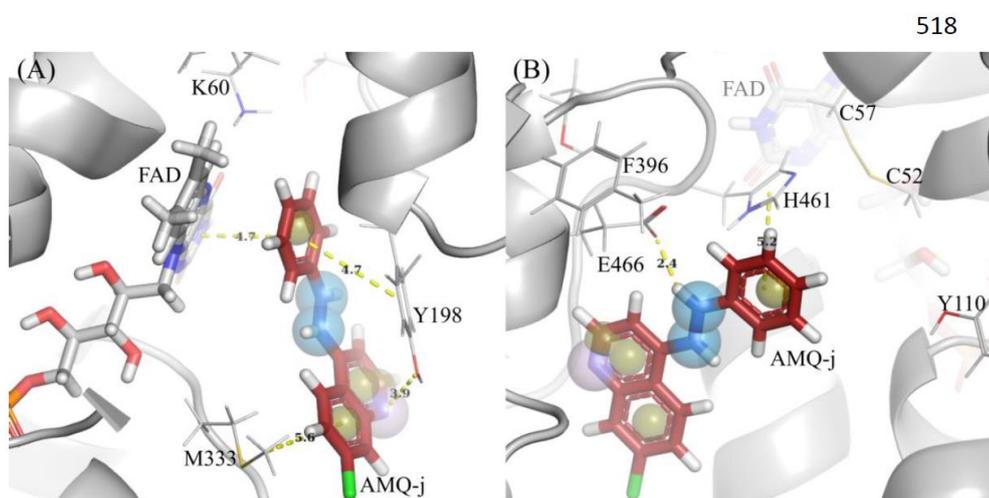
24

477 structural alignment of LaTryR and templates are presented as Supplementary data (Fig.
 478 S3-B), and the results show the electrostatic potential profile of protein and in detail we
 479 can observe the profiles of negatively charged catalytic site in red (Fig. S3-C) and
 480 positively charged NADP binding site in blue (Fig. S3-D).



500 **Fig. S3.** Structural alignment between 3D model of LaTryR and templates and electrostatic potential
 501 profile of LaTryR. (A) Cartoon representation of TryR from *L. amazonensis* (cyan) and *L. infantum*
 502 (2JK6 in pink and 4ADW in yellow). (B) The electrostatic potential profile of LaTryR vary from -5 (red)
 503 to 5 (blue) kT/e. In detail are presented (C) the catalytic and (D) NADP binding sites. Ligand and
 504 heteroatoms are presented in sticks: GCG (green), NADP (orange) and FAD (magenta). The images were
 505 generated using PyMOL, version 1.8.2, Schrödinger - LLC.

506 Docking results of AMQ-j (Fig. 8) show that this compound interacts with
 507 several residues needed for catalytic activity of LaTryR. In NS site, AMQ-j can occupy
 508 the NADP position performing a stacking interaction with FAD and Y198, a Pi-cation
 509 interaction with M333 and a hydrogen bond interaction with Y198. The interaction with
 510 FAD can prevent the electron transfer processes from FAD to residue C57 avoiding the
 511 catalytic reaction (Fig. 8A). The affinity calculated by Glide of AMQ-j to this site was -
 512 6.478 kcal/mol with a calculated K_i of 17.86 μ M. In CS site, the binding affinity
 513 determined by Glide was -3.993 kcal/mol with a calculated K_i of 1.183 mM. In Figure
 514 8B, we can observe that even presenting low affinity to the catalytic site, AMQ-j
 515 interacts with residues considered as important for the catalytic activity of LaTryR
 516 (stacking interaction with H461 and the hydrogen bond interaction with E466).
 517



527

528 **Fig. 8.** Best conformations of AMQ-j compound obtained from docking results in (A) NADP binding site
 529 and (B) catalytic site of LaTryR. LaTryR is presented in cartoon (grey) and FAD (grey) and AMQ-j (red)
 530 in sticks. Main interactions are represented by yellow dashes with distances in Angstroms. Interaction
 531 centers of AMQ-j compound are represented by follow spheres: aromatic ring and lipophilic region
 532 (gold), hydrogen bond donor (light blue) and hydrogen bond acceptor (purple). The images were
 533 generated using PyMOL, version 1.8.2, Schrödinger - LLC.

534 **Discussion**

535 In the present study, we provided new insights into the mode of cell death
536 induced by the compound AMQ-j in *L. amazonensis*. Initially, we investigated the *in*
537 *vitro* effects of AMQ-j against extracellular amastigote-like and intracellular amastigote
538 forms and the results showed that the compound AMQ-j was highly active in both
539 stages of parasite. Moreover, a complementary assay demonstrated that
540 intramacrophage amastigotes treated with AMQ-j showed a low capacity to reversion of
541 the effect of the compound in a drug-free medium, reflecting the efficacy of the treated
542 and infected-macrophages in eliminate these parasite forms. This absence of
543 reversibility of the compound action suggests severe damage to the target(s) that cannot
544 be corrected by the parasite. Recently, the compound AMQ-j also showed activity
545 against *L. braziliensis*, considered as the most prevalent *Leishmania* species in Brazil
546 and related to American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Silveira et al.
547 2009), and was also effective against *L. chagasi*, related to American visceral
548 leishmaniasis (data not published).

549 We also have previously shown that the mitochondria is an important target of
550 compound AMQ-j reflected by biochemical dysfunction marked by intense ROS
551 production and strong depolarization of mitochondrial membrane potential in both
552 promastigotes and intramacrophage amastigotes of *L. amazonensis* (Antinarelli et al.
553 2015a). Here, we have sought to understand the process of cell death induced by AMQ-j
554 and analysis by transmission electron microscopy (TEM) in promastigote forms
555 evidenced intense mitochondrial swelling. In addition, a depolarization of mitochondrial
556 potential was also observed in extracellular amastigote-like forms, confirming the
557 mitochondria as key target to the action of this drug. Consistent with this observation,
558 we demonstrated that the compound AMQ-j also induced the formation of neutral lipid

559 bodies in promastigotes, revealed by Nile Red staining and by TEM analysis. The
560 formation of lipid bodies has been associated with mitochondrial oxidative stress,
561 accompanied by depolarization of membrane potential and by increase of ROS
562 production (Boren and Brindle 2012; Lee et al. 2013). Despite mitochondrial damage of
563 extracellular amastigote-like observed in this work and in previous data obtained in
564 promastigotes (Antinarelli et al. 2015a), no rupture of *L. amazonensis* parasite
565 membrane integrity was observed, thus ruling out the possibility of cell death by
566 necrosis.

567 After evidencing ultrastructural changes and biochemical dysfunction in the
568 mitochondria of the parasite treated with AMQ-j, our next question was to know
569 whether this event could induce biochemical features related to apoptosis-like. Although
570 annexin V labeling is not exclusive to the externalized PS membrane of *Leishmania*, it
571 has high affinity for this phospholipid, which is present in significant amount on the
572 surface of promastigote. Flow cytometry analysis after annexin V labeling indicated that
573 treatment with AMQ-j induced phosphatidylserine (PS) externalization in the surface of
574 plasma membrane of promastigotes. In addition, the results showed that the compound
575 can interact with DNA parasite (i.e., by binding to DNA or intercalating DNA), thus
576 leading to structural perturbations in DNA, reflected by changes in chromatin
577 organization observed by TEM analysis and increase in the population of cells in the
578 sub-G₀/G₁ phase (DNA fragmentation). Having evidenced the occurrence of apoptosis-
579 like process induced by AMQ-j on extracellular parasites, we decided to investigate
580 whether the AMQ-j-mediated apoptosis-like death in amastigotes, the clinically relevant
581 infective stage of *Leishmania*. Our results showed that AMQ-j selectively induces DNA
582 fragmentation in the intracellular parasites without interfering with the host cell nuclei.
583 The data of literature concerning the mechanism of action of quinoline derivatives in

584 *Leishmania* are also compatible with apoptosis-like death process (Carvalho et al.
585 2010; Carvalho et al. 2011; Costa Duarte et al. 2016). Moreover, several studies have
586 demonstrated the anticancer properties of quinoline scaffold through different death
587 pathway, including growth inhibitors by cell cycle arrest and apoptosis induction
588 (Loiseau et al. 2011; Srivastava and Lee 2015).

589 Autophagy is a mechanism of cell death that involves degradation of
590 unnecessary or dysfunctional cellular molecules/organelles through the actions of
591 lysosomes/vacuoles (Filomeni et al. 2015). Although apoptosis and autophagic are
592 processes with distinct biochemical, molecular and morphological characteristics, they
593 are closely related to mitochondrial dysfunction (Maiuri et al. 2007; Brennand et al.
594 2012; Filomeni et al. 2015). Since the compound strongly affected the mitochondria of
595 *Leishmania*, we investigated whether the autophagy regulation was involved in the cell
596 death. In fact, several features suggestive of autophagy were observed in promastigotes
597 treated with AMQ-j, such as the increase of autophagic vacuoles, formation of acidic
598 compartments and multivesicular bodies inside vacuoles. Regarding the induction of
599 autophagy process, our hypothesis is that this compound can act in several ways: (i)
600 directly, inducing autophagic process; (ii) indirectly, this process can be associated with
601 the marked effect of the compound on the mitochondria of *Leishmania* and a selective
602 autophagy-like is occurring in order to degrade this organelle in a process denominated
603 mitophagy (Brennand et al. 2012); (iii) the autophagy can favor the accumulation of the
604 AMQ-j: this compound like others aminoquinolines, such as chloroquine and
605 tafenoquine, shows weak base properties and can entry to the cells by diffusing across
606 the parasite membrane, and be subsequently protonated, sequestered and accumulate in
607 inside the acidic compartments (O'Neill et al. 1998; Carvalho et al. 2015). This
608 acidotropism of the compound could lead disruptions of the lysosomal functions, as

609 well as to cumulate in parasitophorous vacuole containing amastigotes of *L.*
610 *amazonensis*, culminating in the parasite death.

611 Trypanothione Reductase (TryR) is an enzyme (E.C. 1.6.4.8 transferred to E.C.
612 1.8.1.12) found exclusively on trypanosomatids and has been suggested as a molecular
613 target for the treatment of some neglected diseases, such as leishmaniasis (Krauth-
614 Siegel and Inhoff 2003; Alves-Ferreira et al. 2009; Capriles et al. 2010). The activity of
615 TryR is essential for the anti-oxidant defenses in trypanosomatids parasites (Van Assche
616 et al. 2011). This enzyme is NADPH dependent and catalyzes the reduction of
617 trypanothione disulfide dithiol to trypanothione, promoting a cascade of events
618 associated with ROS neutralization (Van Assche et al. 2011). In this work, we
619 performed *in silico* studies and the results have shown that AMQ-j interacts with
620 residues described as important for catalytic activity of LaTryR (Baiocco et al. 2013),
621 suggesting that this compound can be a potential inhibitor of LaTryR of *L. amazonensis*.
622 In addition, this compound showed affinity by NADP binding (NS) site with K_i value in
623 the micromolar range (17.86 μM) which is greater or close to the IC_{50} values against the
624 intracellular amastigotes ($\text{IC}_{50} = 9.7 \mu\text{M}$) and promastigotes ($\text{IC}_{50} = 23.1 \mu\text{M}$) of *L.*
625 *amazonensis*. These results suggest that the inhibition of LaTryR could be the pathway
626 responsible for the excessive increase in mitochondrial ROS production, which leads to
627 oxidative damages to cell structural components such as DNA, lipids and proteins,
628 culminating in parasite death (Rodrigues et al. 2011; Van Assche et al. 2011). The
629 positive charge of NS can contribute to this interaction and future works should be
630 performed to explore the importance of this electrostatic profile. Some quinoline
631 derivatives have been reported to inhibit the TRyR of the trypanosomatids and the
632 presence of a protonatable nitrogen atom has been necessary for this effect since
633 because it mimics the positively charged substrates (Sola et al. 2016).

634 In conclusion, AMQ-j presents a significant and interesting leishmanicidal
635 activity and their effect on *L. amazonensis* is related to multitarget action, affecting the
636 LaTryR and key organelles such as mitochondria, nucleus, lysosome, and this
637 compound displays a mix of phenotype that could correlate with both autophagy-related
638 and apoptotic-like processes. Anyway, all biochemical and morphological alterations
639 induced by oxidative stress, led to cumulative damage that are incompatible with cell
640 survival. Further studies of these pathways should lead to a better understanding of the
641 molecular mechanisms of drug action.

642

643 **Acknowledgements**

644 This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
645 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG),
646 and Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Authors thank the fellowship by
647 CNPq (E.S. Coimbra and A.D. da Silva) and Coordenação de Aperfeiçoamento de
648 Pessoal de Nível Superior-CAPES (L.M.R. Antinarelli and I.O. Souza). The authors are
649 grateful to the Reproduction Biology Center (CBR) of the Universidade Federal de Juiz
650 de Fora (UFJF) for supply of animals and Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa
651 (COMCAP) of Universidade Estadual de Maringá (UEM).

652

653 **Conflict of interest**

654 The authors have not supplied their declaration of conflict of interest.

655 **References**

656 Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D (2011) *Leishmania* antimony
657 resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res* 109:1225-
658 32.

- 659 Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, Bawa S (2015) A review
660 on anticancer potential of bioactive heterocycle quinolone. *Eur J Med Chem* 97:871-
661 910.
- 662 Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME,
663 Pearson RD, Jeronimo SM (2006) Atypical American visceral leishmaniasis caused
664 by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and
665 adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:79-82.
- 666 Alves-Ferreira M, Guimarães AC, Capriles PV, Dardenne LE, Degraeve WM (2009) A
667 new approach for potential drug target discovery through in silico metabolic pathway
668 analysis using *Trypanosoma cruzi* genome information. *Mem Inst Oswaldo Cruz*
669 104:1100-1110.
- 670 Antinarelli LM, Carmo AM, Pavan FR, Leite CQ, Da Silva AD, Coimbra ES, Salunked
671 DB (2012) Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked
672 to aminoquinoline. *Org Med Chem Lett* 2:1-8.
- 673 Antinarelli LM, Dias RM, Souza IO, Lima WP, Gameiro J, Da Silva AD, Coimbra ES
674 (2015a) 4-Aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Chem Biol*
675 *Drug Des* 86:704-714.
- 676 Antinarelli LM, Pinto NC, Scio E, Coimbra ES (2015b) Antileishmanial activity of
677 some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An Acad Bras*
678 *Cienc* 87:733-742.
- 679 Antinarelli LM, Souza IO, Glanzmann N, Almeida AD, Porcino GN, Vasconcelos EG,
680 Da Silva AD, Coimbra ES (2016) Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-
681 quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*
682 171:10-16.

- 683 Baiocco P, Poce G, Alfonso S, Coccozza M, Porretta GC, Colotti G, Biava M, Moraca
684 F, Botta M, Yardley V, Fiorillo A, Lantella A, Malatesta F, Ilari A (2013) Inhibition
685 of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: A
686 comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography.
687 ChemMedChem 8:1175-1183.
- 688 Boren J, Brindle KM (2012) Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes
689 cytoplasmic lipid droplet formation. Cell Death Differ 19:1561-1570.
- 690 Brennand A, Rico E, Michels PA (2012) Autophagy in trypanosomatids. Cells 1:346-
691 371.
- 692 Britta EA, Scariot DB, Falzirolli H, Ueda-Nakamura T, Silva CC, Filho BP, Borsali R,
693 Nakamura CV (2014) Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania*
694 *amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone
695 derived from S-limonene. BMC Microbiol 14:1-12.
- 696 Capriles PV, Guimarães AC, Otto TD, Miranda AB, Dardenne LE, Degraeve WM
697 (2010) Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and
698 specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug
699 targets for chagas' disease treatment. BMC Genomics 11:1-10.
- 700 Carmo AM, Silva FM, Machado PA, Fontes AP, Pavan FR, Leite CQ, Leite SR,
701 Coimbra ES, Da Silva AD (2011) Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their
702 platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. Biomed
703 Pharmacother 65:204-209.
- 704 Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, Gamarro F (2010)
705 Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory
706 complex III and induces apoptosis. Antimicrob Agents Chemother 54:5344-5351.

- 707 Carvalho L, Martínez-García M, Pérez-Victoria I, Manzano JI, Yardley V, Gamarro F,
708 Pérez-Victoria JM (2015) The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity
709 against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6151-6160.
- 710 Carvalho L, Luque-Ortega JR, López-Martín C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F
711 (2011) The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in
712 *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase.
713 *Antimicrob Agents Chemother* 55:4204-4210.
- 714 Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Richardson
715 DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular
716 crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12-21.
- 717 Coimbra ES, Antinarelli LM, Da Silva AD, Bispo ML, Kaiser CR, De Souza MV
718 (2013) 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: a promising and potent class of
719 antileishmanial compounds. *Chem Biol Drug Des* 8:658-665.
- 720 Coimbra ES, Antinarelli LM, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, Soares RP,
721 Da Silva AD (2016) Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and
722 involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol*
723 *Interact* 24:50-57.
- 724 Coimbra ES, Carvalhaes R, Grazul RM, Machado PM, De Souza MV, Da Silva AD
725 (2010) Synthesis, cytotoxicity and antileishmanial activity of some N-(2-(indol-3-
726 yl)ethyl)-7-chloroquinolin-4-amines. *Chem Biol Drug Des* 75:628-631.
- 727 Costa Duarte M, Dos Reis Lage LM, Lage DP, Mesquita JT, Salles BC, Lavorato SN,
728 Menezes-Souza D, Roatt BM, Alves RJ, Tavares CA, Tempone AG, Coelho EA
729 (2016) An effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity and mechanism of
730 action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and
731 tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol* 217:81-88.

- 732 Costa L, Pinheiro RO, Dutra PM, Santos RF, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Da
733 Silva AJ, Costa PR, Da-Silva AS (2014) Pterocarpanquinone LQB-118 induces
734 apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and controls lesions in infected
735 hamsters. PLoS One 9:e109672.
- 736 Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB2PQR: An automated
737 pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. Nucleic
738 Acids Res 32:665-667.
- 739 Filomeni G, De Zio D, Cecconi F (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash
740 between damage and metabolic needs. Cell Death Differ 22:377-388.
- 741 Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Shenkin PS
742 (2004) Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method
743 and Assessment of Docking Accuracy. J Med Chem 47:1739-1749.
- 744 Holst M, Baker N, Wang F (2000) Adaptive multilevel finite element solution of the
745 Poisson-Boltzmann equation I. Algorithms and examples. J Comput Chem 21:1319-
746 1342.
- 747 Krauth-Siegel RL, Inhoff O (2003) Parasite-specific trypanothione reductase as a drug
748 target molecule. Parasitol Res 90 Suppl 2:S77-85.
- 749 Kumar S, Bawa S, Gupta H (2009) Biological activities of quinoline derivatives. Mini
750 Rev Med Chem 9:1648-1654.
- 751 Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a
752 program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Cryst
753 26:283-291.

- 754 Lee SJ, Zhang J, Choi AM, Kim HP (2013) Mitochondrial dysfunction induces
755 formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell*
756 *Longev* 2013:327167.
- 757 Loiseau PM, Cojean S, Schrével J (2011) Sitamaquine as a putative antileishmanial
758 drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite*
759 18:115-119.
- 760 Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing:
761 crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741-752.
- 762 Mendes EA, Desoti VC, Silva SO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Yamada-Ogatta
763 SF, Sarragiotto MH, Nakamura CV (2016) C5 induces different cell death pathways
764 in promastigotes of *Leishmania amazonensi*. *Chem Biol Interact* 256:16-24.
- 765 Moreno ML, De Meirelles MN (1998) *In vitro* method for isolation of amastigote forms
766 of *Leishmania amazonensis* from J774G8 macrophage induced by temperature
767 shifting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:99-102.
- 768 Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJ, Chennamaneni
769 NK, Pendem N, Buckner FS, Gelb MH, Molteni V (2014) Recent developments in
770 drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem Ver*
771 114:11305-11347.
- 772 O'Neill PM, Bray PG, Hawley SR, Ward SA, Park B (1998) 4-Aminoquinolines-past,
773 present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol Ther* 77:29-58.
- 774 Polonini HC, Dias RM, Souza IO, Gonçalves KM, Gomes TB, Raposo NR, Da Silva
775 AD (2013) Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorg Med Chem*
776 *Lett* 23:4506-4510.
- 777 Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, Da-Silva SA, Canto-Cavalleiro MM, Da
778 Silva AJ, Costa PR, Netto CD, Melo RC, Almeida-Amaral EE, Torres-Santos EC

- 779 (2013) LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative
780 stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 68:789-
781 799.
- 782 Rodrigues MA, Rodrigues JL, Martins NM, Barbosa F, Curti C, Santos NA (2011)
783 Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance
784 and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Chem Biol Interact* 189:45-51.
- 785 Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial
786 restraints. *J Mol Biol* 234:779-815.
- 787 Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP (2005) Further observations on clinical, histo-
788 pathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous
789 leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo*
790 *Cruz* 100:525-534.
- 791 Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE (2009)
792 Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.)*
793 *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31:423-431.
- 794 Soares RR, Da Silva JM, Carlos BC, Da Fonseca CC, De Souza LS, Lopes FV, de Paula
795 Dias RM, Moreira PO, Abramo C, Viana GH, De Pila Varotti F, Da Silva AD,
796 Scopel KK (2015) New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial
797 activity against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo.
798 *Bioorg Med Chem Lett* 25:2308-2313.
- 799 Sola I, Artigas A, Taylor MC, Pérez-Areales FJ, Viayna E, Clos MV, Pérez B, Wright
800 CW, Kelly JM, Muñoz-Torrero D (2016) Synthesis and biological evaluation of *N*-
801 cyanoalkyl-, *N*-aminoalkyl-, and *N*-guanidinoalkyl-substituted 4-aminoquinoline
802 derivatives as potent, selective, brain permeable antitrypanosomal agents. *Bioorg*
803 *Med Chem* 24:5162-5171.

- 804 Srivastava V, Lee H (2015) Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel
805 chemotherapeutic agents. *Eur J Pharmacol* 762:472-486.
- 806 Stroppa PHF, Antinarelli LMR, Carmo AML, Gameiro J, Coimbra ES, Da Silva AD
807 (2017) Effect of 1,2,3-Triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on
808 *Leishmania amazonensis*. *Bioorg Med Chem* doi:
809 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.051>
- 810 Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RA, Maes L, Cos P (2011) *Leishmania*-
811 macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*
812 51:337-351.
- 813

3.4 CAPÍTULO 4: *In vivo* efficacy of an aminoquinoline derivative (AMQ-j) against murine cutaneous leishmaniasis (Manuscrito em preparo para submissão).

3.4.1 Objetivos específicos

Com o composto selecionado no capítulo 2:

- Avaliar o efeito *in vivo* do composto em modelo murino de infecção com *L. amazonensis*;
- Verificar a toxicidade sistêmica *in vivo* e propriedades ADMET *in silico*;
- Avaliar a resposta imune humoral *in vivo*.

In vivo efficacy of an aminoquinoline derivative (AMQ-j) against murine cutaneous leishmaniasis

Luciana Maria Ribeiro Antinarelli¹, Isabela de Oliveira Souza², Gabriane Nascimento Porcino³, Ana Carolina Ribeiro Maia³, Eveline Gomes Vasconcelos³, Wallace Pacienza Lima⁴, Adilson David da Silva², Elaine Soares Coimbra^{1*}

¹*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil.*

²*Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil.*

³*Departamento de Bioquímica, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil.*

⁴*Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil.*

*Corresponding author

E-mail address: elaine.coimbra@ufjf.edu.br (E.S. Coimbra).

Tel.: +55 32 2102 3219; fax: +55 32 2102 3214.

Abstract

In a previous work, we described the antileishmanial activity of a 4-aminoquinoline derivative, named AMQ-j, against *in vitro* promastigotes and intra-macrophage amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis*, both *Leishmania* species included among the most prevalent agents related to the cutaneous leishmaniasis in Brazil. Here, we evaluated the *in vivo* effect of the compound AMQ-j in BALB/c mice experimentally infected by *L. amazonensis* transfected with green fluorescent protein (GFP), as well as ADMET theoretical analysis and Lipinski's rule. Significant decreased of the parasite burden in the ear and draining lymph node evaluated by limiting dilution and fluorimetry was observed when the treated group was compared with the control group. No significant increase in serum levels of toxicity markers of hepatic, kidney or renal damage was observed. It was also possible to verify that the treatment with AMQ-j was effective in inducing an elevated level of *L. amazonensis* specific IgG antibodies and specific IgG2a/IgG1 ratios, suggesting that the treatment could modulate the immune response. The *in silico* prediction studies on pharmacokinetic properties (ADMET) and physico-chemical characteristics (Lipinsky's rule) suggest that AMQ-j can be used orally. The intralésional activity of the compound AMQ-j against *L. amazonensis* revealed by this study, together with the excellent theoretical predictions encourage us to support further studies of the oral treatment with the compound AMQ-j against *Leishmania* sp.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, aminoquinoline, Balb/c mice, chemotherapy, murine cutaneous leishmaniasis.

Introduction

The incidence of cutaneous leishmaniasis (CL) is globally with 1.0-1.5 million cases annually (WHO, 2016). Brazil is the country with the highest prevalence of new cases of the cutaneous leishmaniasis in the Americas. American cutaneous leishmaniasis (ACL) includes a variety of manifestations that are commonly classified according to their clinical and pathologic features in localized cutaneous leishmaniasis (LCL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). In Brazil, *Leishmania amazonensis* is an etiological agent with high prevalence and associated with a spectrum of clinical forms of ACL (Afonso and Scott 1993; Grimaldi and Tesh, 1993), including the diffuse cutaneous form characterized by defective cell mediated immune responses and poor response to chemotherapy (Silveira et al., 2009). Although rare, this species has been implicated with the most severe form, visceral leishmaniasis (VL) in humans and dogs (Barral et al. 1991; Aleixo et al., 2006).

Currently, available treatment options for leishmaniasis are limited and unsatisfactory because of serious systemic toxicity, high costs, lack of efficacy, relapses treatment, and emerging parasite resistance (De Menezes et al., 2015). So far, the only oral antileishmanial drug approved is miltefosine, but its use remains mostly restricted to VL treatment due to CL variable efficacy in different geographic regions (Soto et al., 2004; Marinho et al., 2010). However, it has the drawback of high cost, poor compliance due to serious digestive side effects and danger of teratogenicity, and its use is not recommended for the treatment of pregnant women and childbearing age (Singh et al., 2016).

Therefore, the development of alternative therapeutic strategies to treatment of CL has become a high priority. In this context, topical treatment offer significant advantages over systemic therapy, such as ease of administration, improved safety, noninvasive, better patient

compliance, few adverse effects and cost-effectiveness (Garnier and Croft 2002; Ben Salah et al., 2009; Croft and Olliaro, 2011).

Our research group have extensively investigated the antileishmanial activity of new aminoquinoline derivatives and reported interesting results (Antinarelli et al., 2012, Coimbra et al., 2013; Antinarelli et al., 2016; Coimbra et al., 2016). A recent study developed by our group described the antileishmanial activity of a 4-aminoquinoline derivative, named AMQ-j (Figure 1), against *in vitro* promastigotes and intra-macrophage amastigotes of *L. amazonensis* with non-cytotoxic activity to murine macrophages (Antinarelli et al., 2015). The AMQ-j compound was also active against both promastigote and intracellular amastigote forms of *L. braziliensis*, considered the main causative agent of LCL and MCL in Brazil (Soares et al., 2017). Furthermore, AMQ-j compound were also effective against the malaria parasite *Plasmodium falciparum in vitro* and *P. berghei in vivo* (Soares et al., 2016).

Taking into consideration these results, the purpose of the present study was investigated the efficacy of the AMQ-j in the treatment of BALB/c mice experimentally infected by *L. amazonensis*, a highly susceptible murine model.

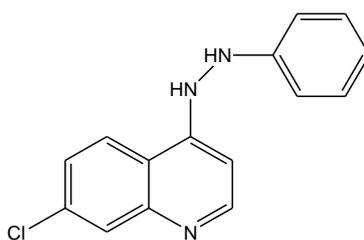


Figure 1. Chemical structure of AMQ-j.

2. Material and methods

2.1 Chemicals: The AMQ-j compound has been described in the literature (Polonini et al., 2013; Antinarelli et al., 2015; Soares et al., 2015).

2.2 Biological assays:

2.2.1 Mice: Female BALB/c mice (8-10 weeks age) were obtained from the Biology Research Center of Federal University of Juiz de Fora and this study was approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Juiz of Fora (Protocol number 046/2014).

2.2.3 Parasites and antigen preparation: *Leishmania amazonensis* WHOM/BR/75/Josefa) transfected with the gene of green fluorescent protein (GFP) was used. The parasites were periodically isolated from cutaneous lesions of infected BALB/c mice and maintained in culture as the insect stage promastigote forms at 25 °C in Warren's medium (brain heart infusion- BHI- plus hemin and folic acid), supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) from Cultilab (Campinas, São Paulo, Brazil), 0.1% of the antibiotic 100 UI/mL penicillin G and 0.1 mg/mL of streptomycin (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) at 25 °C in a BOD incubator. Promastigotes of *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) were periodically selected for green fluorescence by incubation in 1 mg/mL of geneticin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibiotic for 72 h (Antinarelli et al., 2015; Antinarelli et al., 2016). The soluble *Leishmania* antigenic (SLA) extract was prepared from stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis*-GFP as previously described by Detoni et al., 2013. The antigen concentration was estimated by the Lowry method (Detoni et al., 2013).

2.2.4 In vivo infection and therapeutic regimen: Susceptible BALB/c mice were infected in the ear with 2×10^6 stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis*-GFP using an

established model (Rossi-Bergamann et al., 2012). After 7 days of infection, animals were divided in three groups (5 mice/group): negative control group treated with solution of 5% DMSO; positive control group treated with 250 µg/Kg of Amphotericin B diluted in 5% DMSO solution; experimental group treated with 100 µg/Kg of AMQ-j diluted in 5% DMSO solution. Then, the animals were treated twice a week in a total of eight doses receiving subcutaneous injections. Lesion development was monitored two times a week by measuring the thickness of the infected ear with a dial caliper (Digimess, SP, Brazil), and the thickness of the contralateral uninfected ear was subtracted from that value (da Cunha-Junior et al., 2011; Inacio et al., 2013).

The treatments efficacy was evaluated by measuring the lesion average diameter and by the estimation of the parasite load in the infected tissue (ear), as well as in the draining lymph nodes (dLN) of the animals. The mice were euthanized three day after the end of treatments using carbon dioxide chamber (Insight, São Paulo, Brazil).

Preliminary, a dose-titration curve using the concentrations of 250 µg/Kg, 100 µg/Kg and 50 µg/Kg of AMQ-j was performed to determine the best concentration of AMQ-j able to induce the most effective results in treating the infected mice (data not shown). Then, after the determination of the best dose regimen in mice, the efficacy of AMQ-j was evaluated at concentration of 100 µg/kg by a subcutaneous route in the ear of the animals, two times week in a total of eight doses.

2.2.5 Parasite Load Quantification: Parasite load was estimated using two different assays: a quantitative limiting dilution assay (LDA) and measuring of intensity of fluorescence. Briefly, at the end of the experiment (day 35), infected ears and draining lymph node (dLN) were aseptically removed, and forced through a steel mesh with 1ml/per organ of Warren's medium supplemented with 10% SBF and 1% of the antibiotic 100 UI/mL penicillin G and 0.1 mg/mL of streptomycin. The pool of tissue homogenates were transferred to a microtube and

debris were allowed to precipitate for 10 min. For LDA assay, performed a dilution of supernatant macerated in a 1:500 (ear) or 1:100 (lymph node) and different serial dilutions of the ear or lymph nodes were prepared in the same medium, in triplicate in 96 well plates sterile, and incubated in BOD incubator at 25 °C. After seven days, the number of viable parasites in ear and draining lymph node (dLN) in each experimental group were estimated from the highest dilution that promoted promastigote growth (LDA assay) (da Cunha-Junior et al., 2011; Inacio et al., 2013). For the fluorimetric determination of the parasite loads, 200µL of supernatants were transferred in PBS in triplicates in 96-well black microplates and the intensity of fluorescence was measured using a plate-reader fluorometer (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at 485 nm excitation and 528 nm emission. Non-infected ears were used to discount the basal tissue fluorescence (Rossi-Bergmann et al., 2012).

2.2.6 *In vivo* toxicity studies: At the end of the experiment (day 35 of infection), serum samples from treated mice (n= 3) were used for measurements of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and creatinine level (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). As positive control, an experimental group (n= 3) received a single dose of 300 mg/Kg of acetaminophen, a cytotoxic compound, by oral route. In addition, the weight of each animal was measured before, during and after the treatments (Rossi-Bergmann et al., 2012).

2.2.7 Detection of *Leishmania*-specific IgG antibodies by ELISA: The antibody production was evaluated three day after the end of the treatments. Briefly, *Leishmania* antigen (SLA) obtained as previously described (Detoni et al., 2013) was adsorbed on flat-bottom Immunolon II microtiter plates overnight (5 µg/well in 0.1 M NaHCO₃, pH 9.6) and blocked (phosphate buffer solution 0.15 M, pH 7.2, Tween-20 0.3%, casein 1.5%). The sera were diluted from 1:100-12800 in duplicates in blocking buffer without Tween-20 (Sigma, St.

Louis, MO). Antibodies bound to the SLA-plate were detected using peroxidase-conjugated, isotype-specific (Pharmingen, San Diego, CA) anti-mouse IgG, anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a and o-phenylenediamine dihydrochloride/H₂O₂ solution as the substrate. Subsequent colour reaction was read at 492 nm on a microplate reader (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA). The considered values of optical density (A_{492 nm}) were the means of two determinations with a variation of no more than 15% between them (Detoni et al., 2013).

2.2.8 *In silico* analysis: The absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties of AMQ-j were evaluated using the admetSAR tool (Cheng et al., 2012) and Lipinski's rule of five was calculated using Molsoft Molecules *In silico* Software (Lipinsky et al., 2001).

2.2.9 Statistical analysis: The data were analyzed using GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA, USA). The median and the 95% confidence interval were calculated and data were analyzed using the Mann-Whitney test to compare two groups or Kruskal-Wallis test to compare three groups. P values of less than 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

The experimental infection was performed in a widely described BALB/c murine model of cutaneous leishmaniasis which is extremely susceptible to infection and can be considered a highly suitable model for experimental chemotherapy (Miguel et al., 2008; Cunha-Junior et al., 2011; Rossi-Bergmann et al., 2012; Montrieux et al., 2014). BALB/c mice infected with *L. amazonensis* commonly develop a progressive lesion at the inoculation site, that reproduces aspects of the human infection such as the presence of an ulcerated lesion followed by parasite dissemination to lymphoid areas, visceralization and metastasis at distant sites. Moreover, the infection is characterized by development of a Th2 type immune response

and non-healing, and fatal disease (Fournet et al. 1996; Cupolilo et al. 2003; Valadares et al. 2012, Scott and Novais, 2016).

The efficacy of AMQ-j in treating *L. amazonensis*-infected BALB/c mice was evaluated by administration of 100 µg/kg by an intralesional route in the ear of the animals, two times week in a total of eight doses. As shown in Figure 2, after the end of therapeutic regimen (28 days), the intralesional administration of the AMQ-j compound promoted a significant reduction of the lesion size by 48.0%, when compared to the control group. The treatment with Amphotericin B at concentration of 250 µg/kg was capable of controlling lesion growth (Figure 2).

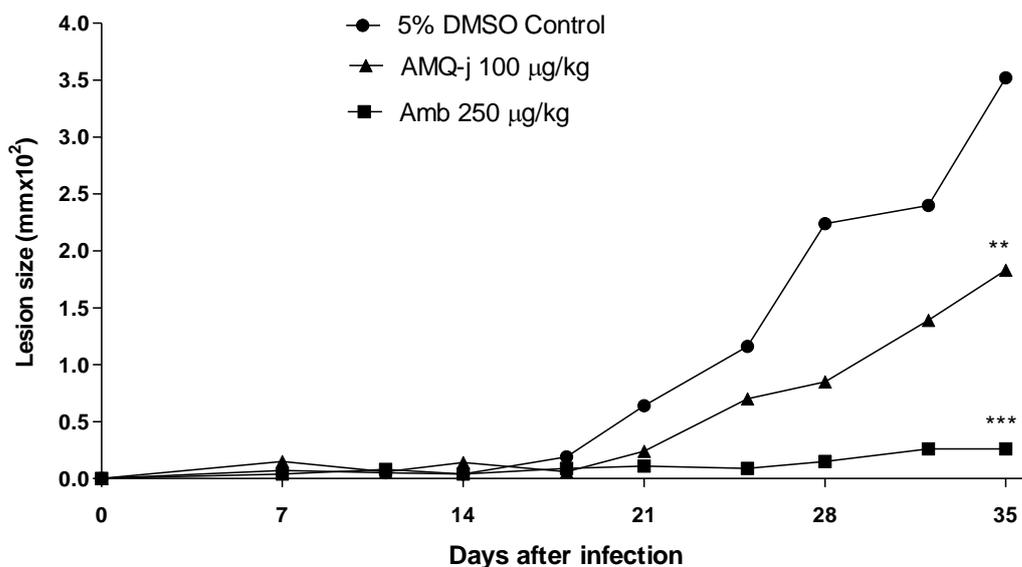


Figure 2: Efficacy of AMQ-j in the intralesional treatment of murine cutaneous leishmaniasis. BALB/c mice were subcutaneously infected with 2×10^6 *L. amazonensis* promastigotes in the ear. After 7 days of infection, the animals were treated intralesionally (n= 5 per group) with AMQ-j (100 µg/kg), Amphotericin B (250 µg/kg) or solution of DMSO 5% twice a week in a total of eight doses. Lesion development was measured with a dial caliper twice a week.

The quantification of parasite burdens by LDA assay showed a significant reduction of parasite load by 97.3% in the lesions in the experimental group treated with solution of AMQ-j in 5% DMSO, when compared with the control group of animals treated with 5% DMSO (Figure 3; A). In addition, the parasite burden quantified by fluorimetry showed significant

reduction (83.4%) in the group treated with AMQ-j when compared with the 5%DMSO treated group (Figure 3; B). Control groups that received intralesional injections with amphotericin B (AmB) in 5% DMSO effectively controlled the parasite load with a complete elimination of the parasites as can be observed in both LDA assay and fluorimetry quantification (Figure 3; A and B).

Furthermore, the parasite load in the regional draining lymph nodes of mice intralesionally treated with solutions of AmB or AMQ-j in 5% DMSO was significantly lower when compared to the control group treated with 5% DMSO, suggesting the ability of these compounds to reduce a systemic infection (Figure 3; C).

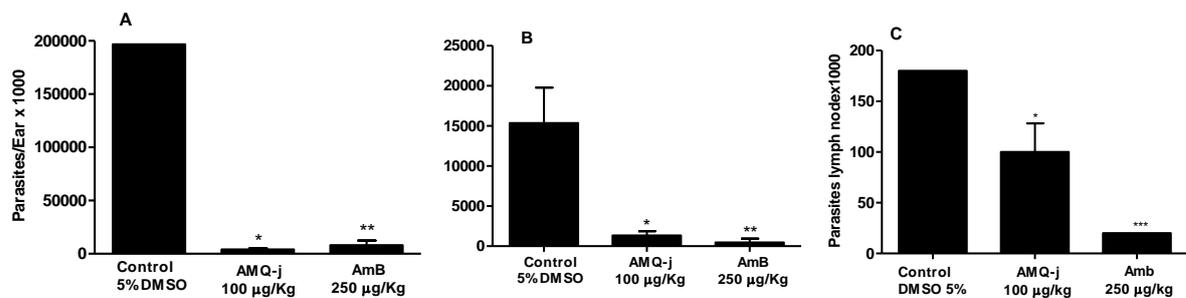


Figure 3: Efficacy of the AMQ-j compound in the intralesional treatment of murine cutaneous leishmaniasis. (A) Parasite burden of ear lesion was estimated by limiting dilution analysis (LDA) at the end of treatment. (B) Parasite burden of ear lesion was estimated by fluorimetry and expressed as specific fluorescence units (FU) (C) Parasite burden of draining lymph node was estimated by limiting dilution analysis. The value of $P < 0.001$ (***) or $P < 0.01$ (**) represents significant difference compared with DMSO 5% treatment.

In a comparative analysis of the two parameters evaluated (lesion size versus parasitic burden of ear), it was possible to verify that the treatment with AMQ-j resulted in a partial reduction in lesion size (48.0%), although the treatment resulted in a significant inhibition of parasite load in both assay performed (LDA and fluorimetry assays). Several studies have already reported that the lesion size values did not directly correlate with the parasite load (Van Bocxlaer et al., 2016). One possible hypothesis is the fact that the lesion diameter development is a result not only of local parasite multiplication, but also of a progressive inflammatory process that sometimes does not spontaneously evolve to cure, even when it

occurs a reduction of the parasite burden (Oliveira et al., 2016; Queiroz et al., 2016; Van Bocxlaer et al., 2016).

Ideally, the therapeutic efficacy of a topical drug candidate for CL depends on both physicochemical properties such as their effect on percutaneous absorption and retention or drug release at the sites of infection in the dermis and pharmacological potency (Garnier and Croft, 2002; Moreno et al., 2014). The AMQ-j compound has several physicochemical properties suitable for topical administration like low molecular weight, log P octanol <5.0, good solubility in the formulation vehicle used (5% DMSO), and few functional groups capable of hydrogen bond donors and hydrogen bond acceptors (Hadgraft and Pugh, 1998; Moreno et al., 2014). Furthermore, AMQ-j is a compound of the class of 4-aminoquinolines that have weak basic property and can entry easily penetrates into infected dermal macrophages and reach the parasitic compartment (O'Neill et al., 1988).

At the end of the treatment period, alanine aminotransferase (ALT) and Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), serological markers of liver toxicity, and aspartate aminotransferase (AST) and creatinine, markers of heart and kidney toxicity, respectively, were analyzed. No alteration was observed in AMQ-j-treated animals, and the values were similar to the control group treated with 5% DMSO (Figure 4; A). These results suggest absence of systemic toxicity following AMQ-j treatment, an important criterion in the choice of new compounds for antileishmanial therapy. On the other hand, creatinine and ALT level increased in the group treated with AmB, values significantly higher when compared to the control group treated with 5% DMSO 5%. These results are compatible with its reported hepatotoxicity and nephrotoxicity, which are considered the most important side effect related to treatment in humans (Deray et al., 2002; Ribeiro et al., 2014). No significant change in the body weight was observed among the mice treated with AMQ-j or AmB compared to the control group (data not shown).

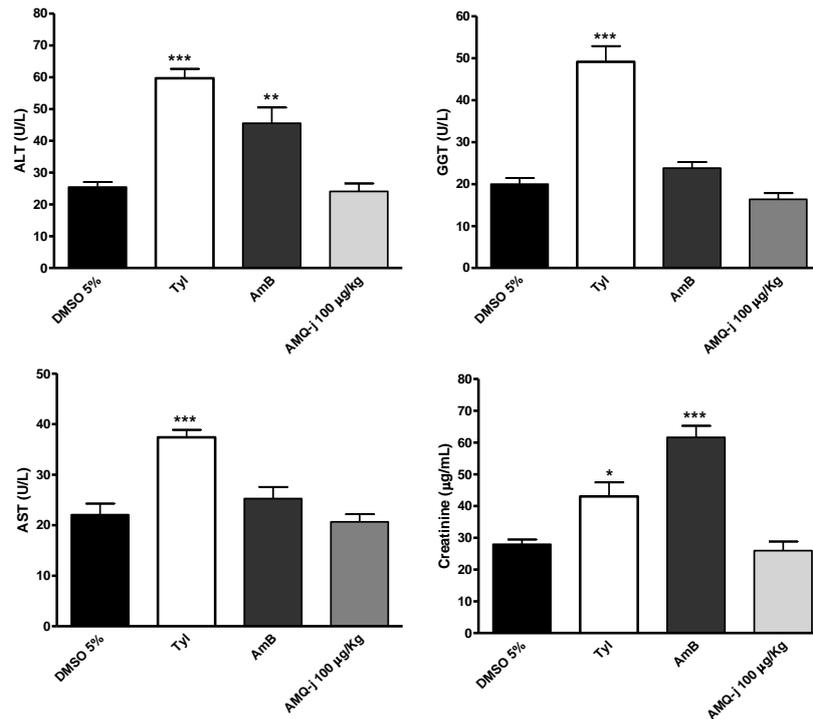


Figure 4: Evaluation of the *in vivo* toxicity. After 72 hours of the end of treatment, alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and creatinine level were measured in the serum samples of the animals. Serum samples of acetaminophen-treated animals (TyI) were used as positive control of toxicity. The results are represented by mean \pm SD (n= 3), and the value of P < 0.001 (***) or P < 0.05 (**) represents significant difference compared with DMSO 5% treatment.

In order to evaluate synergic interaction between anti-*Leishmania* effect of the AMQ-j compound and immune response, the level of total IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were quantified. The IgG and IgG2a antibody levels from AMQ-j treated animals reactive with soluble *Leishmania* antigen (SLA) were significantly higher than those found in DMSO- or AmB-treated animals, used as control groups (Figure 5). In addition, a higher IgG2a/IgG1 ratio, antibodies used as surrogate markers for Th1 and Th2 activation, respectively, was found in mice treated with AMQ-j (Figure 5; B), suggesting that cell-mediated immune response shift from a Th2-type response induced by the infection to a Th1-type response, which is considered most suitable for the control of *Leishmania* infection (Valadares et al., 2012; Gamboa-Leon et al., 2014; Rostamian et al., 2015).

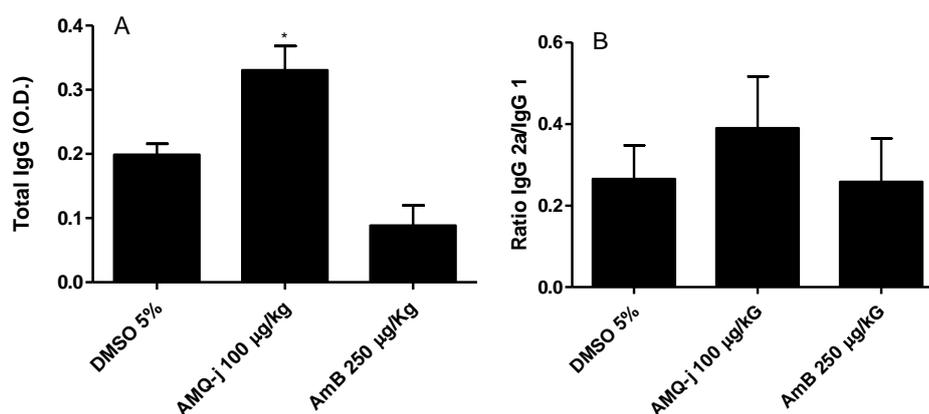


Figure 5: Effect of AMQ-j treatment on *Leishmania*-specific antibody production. Mice were infected and treated as described in Figure 1. IgG (A), IgG1 or IgG2a (B) antibody reactivity was quantified by the ELISA technique using soluble *Leishmania* antigen (SLA) as coating antigen and serum samples (diluted 1:???) from DMSO 5%, AMQ-j or AMB-treated animals obtained at 35 days after infection. The results are represented as the mean \pm S.D. (n= 5) of the optical density (O.D.; 495 nm), and IgG2a/IgG1 ratio (B). * P<0.01.

Despite the experimental assays were performed by IL route, theoretical analysis of the absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties were performed to evaluate the bioavailability of AMQ-j compound by oral delivery. The calculated ADMET properties showed that compound has a high probability (98.9% and 71.5%) for human intestinal absorption (HIA) and Caco-2 cell permeability, respectively, suggesting a good chance of druglikeness and oral bioavailability. Regarding toxicity, we found that AMQ-j is predicted as a class III risk for acute toxicity, i.e., compounds with LD₅₀ greater than 500 mg/kg (Cheng et al., 2012; Fonseca-Silva et al., 2016). In terms of metabolism, the simulation of the affinity by different isoforms of cytochrome P450 (CYP450) active site indicated that AMQ-j compound has a high probability of acting as a promiscuous inhibitor of the enzymatic activity of the CYP450 enzymes (Table 1).

In addition, the *in silico* analysis of physico-chemical properties by Lipinski rule of five were performed. The compound AMQ-j showed the highest potential as a leishmanicidal agent with excellent physico-chemical properties. AMQ-j has one hydrogen bond acceptors and two hydrogen bond donors, molecular weight of 269.07 and logarithm of partition

coefficient between n-octanol and water of 4.31, fulfilling the Lipinski rule of five (Table 1). The *in silico* prediction studies on pharmacokinetic properties (ADMET) and physico-chemical characteristics (Lipinsky's rule) suggest that AMQ-j can be used orally.

Table 1: *In silico* analysis of druglikeness of AMQ-j.

Property	Results	Probability
Absorption		
BBB	+	95.80
HIA	+	98.87
Caco-2	+	71.53
Metabolism		
CYP450 2C9 substrate	Non-substrate	88.14
CYP450 2D6 substrate	Non-substrate	86.58
CYP450 3A4 substrate	Non-substrate	61.19
CYP450 1A2 inhibitor	Inhibitor	86.44
CYP450 2C9 inhibitor	Inhibitor	52.56
CYP450 2D6 inhibitor	Non-Inhibitor	63.31
CYP450 2C19 inhibitor	Inhibitor	79.16
CYP450 3A4 inhibitor	Inhibitor	73.98
Toxicity		
Acute Oral Toxicity	III	47.41
AMES Toxicity	AMES toxic	64.40
Carcinogens	Non-carcinogens	59.26
Lipinski descriptors		
NHBA (<10)	1	
NHBD (<5)	2	
clogP (<5)	4.31	
MW (<500)	269.07	

BBB: blood-brain barrier; HIA: human intestinal absorption;

Caco-2: human epithelial colorectal adenocarcinoma cells.

NHBA: number of hydrogen bond acceptors; NHBD: number of hydrogen bond donors; clogP: logarithm of the compound partition coefficient between n-octanol and water; MW: molecular weight.

In conclusion, the data showed that AMQ-j compound was highly effective in treating *L. amazonensis* infected BALB/c mice in the experimental model used. Additional studies should be conducted to determine the ideal dose and therapeutic regimen in order to optimize its therapeutic efficacy in new *in vivo* studies of models of infection by different *Leishmania* species.

Conflict of interest

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Authors thank the fellowship by CNPq (E.S. Coimbra and A.D. da Silva) and CAPES (L.M.R. Antinarelli). Thanks are also due Reproduction Biology Center (CBR) of the Federal University of Juiz de Fora for supply of animals.

References

- Afonso LC, Scott P.** Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 1993, 61(7):2952-2959.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM.** Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(1):79-82.
- Antinarelli LM, Carmo AM, Pavan FR, Leite CQ, Da Silva AD, Coimbra ES, Salunked DB.** Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Org Med Chem Lett.*2012. **2**:1-8.
- Antinarelli LM, Dias RM, Souza IO, Lima WP, Gameiro J, da Silva AD, Coimbra ES.** 4-Aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Chem Biol Drug Des.*; 2015; 86:704-714.

Antinarelli LM, Souza IO, Glanzmann N, Almeida AD, Porcino GN, Vasconcelos EG, da Silva AD, Coimbra ES. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*. 2016; 171:10-16.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(5):536-546.

Ben Salah A1, Buffet PA, Morizot G, Ben Massoud N, Zâatour A, Ben Alaya N, Haj Hamida NB, El Ahmadi Z, Downs MT, Smith PL, Dellagi K, Grögl M. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(5):e432.

Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, Lee PW, Tang Y. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model*. 2012;52(11):3099-105.

Coimbra ES, Antinarelli LM, da Silva AD, Bispo ML, Kaiser CR, de Souza MV. 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: a promising and potent class of antileishmanial compounds. *Chem Biol Drug Des*. 2013; 81(5):658-65.

Coimbra ES, Antinarelli LM, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, Soares RP, da Silva AD. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interact*. 2016;260:50-57.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011, 17(10):1478-83.

Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Goncalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol*. 2003;18(4):1059-65.

Da Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, do Canto-Cavaleiro MM, da Silva AJ, Costa PR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(7):1555-9.

De Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras OS. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:815023.

Detoni ML, Fessel MR, Maia AC, Porcino GN, Quellis LR, Faria-Pinto P, Marques MJ, Juliano MA, Juliano L, Diniz VA, Côte-Real S, Gonçalves-da-Costa SC, Souza CS, Vasconcelos EG. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. *Parasitol Res.* 2013; 112(8):2773-82.

Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49; Suppl 1:37–41.

Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004442.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A, Torres De Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(11):2447-51.

Gamboa-Leon R, Vera-Ku M, Peraza-Sanchez SR, Ku-Chulim C, Horta-Baas A, Rosado-Vallado M. Antileishmanial activity of a mixture of Tridax procumbens and *Allium sativum* in mice. *Parasite.* 2014;21:15.

Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002, 3(4): 538-44.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993, 6(3): 230-250.

Hadgraft J, Pugh WJ. The selection and design of topical and transdermal agents: a review. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1998;3(2):131-5.

Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. In vitro and in vivo effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod.* 2013; 25;76(10):1993-6.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3–26.

Marinho Fde A, Gonçalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(4):507-9.

Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(6):e249.

Montrieux E, Perera WH, García M, Maes L, Cos P, Monzote L. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res.* 2014;113(8):2925-32.

Moreno E, Schwartz J, Fernández C, Sanmartín C, Nguewa P, Irache JM, Espuelas S. Nanoparticles as multifunctional devices for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(4):579-97.

Oliveira JC, da Silva AC, Oliveira RA, Pereira VR, Gil LH. In vivo near-infrared fluorescence imaging of *Leishmania amazonensis* expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice. *J Microbiol Methods.* 2016, 130:189-195.

Polonini HC, Dias RM, Souza IO, Gonçalves KM, Gomes TB, Raposo NR, da Silva AD. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23:4506-4510.

Queiroz DP, Carollo CA, Kadri MC, Rizk YS, Araujo VC, Monteiro PE, Rodrigues PO, Oshiro ET, Matos Mde F, Arruda CC. In vivo antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from *Selaginella sellowii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016, 111(3):147-54.

Ribeiro TG, Franca JR, Fuscaldi LL, Santos ML, Duarte MC, Lage PS, Martins VT, Costa LE, Fernandes SO, Cardoso VN, Castilho RO, Soto M, Tavares CA, Faraco AA, Coelho EA, Chávez-Fumagalli MA. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. *Int J Nanomedicine.* 2014, 19(9):5341-53.

Rossi-Bergmann B., Pacienza-Lima W., Marcato P.D., De Conti R., Duran N. Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous Leishmaniasis. *J Nano Res.* 2012; 20:89–97.

Rostamian M, Sohrabi S, Kavosifard H, Niknam HM. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2015, pii: S1684-1182.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016, 16(9):581-92.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis, *Parasite Immunol.* 2009. 31:423-431.

Singh OP, Singh B, Chakravarty J, Sundar S. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infect Dis Poverty*. 2016; 8;5:19.

Soares RR, Antinarelli LM, Souza IO, Lopes FV, Scopel KK, Coimbra ES, da Silva AD, Abramo C. In Vivo Antimalarial and In Vitro Antileishmanial Activity of 4- Aminoquinoline Derivatives Hybridized to Isoniazid or Sulfa or Hydrazine Groups. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2017, 14, 1-8.

Soares RR, da Silva JM, Carlos BC, da Fonseca CC, de Souza LS, Lopes FV, de Paula Dias RM, Moreira PO, Abramo C, Viana GH, de Pila Varotti F, da Silva AD, Scopel KK. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*; 2015; 25:2308-2313.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2004;38(9):1266-72.

Valadares DG, Duarte MC, Ramírez L, Chávez-Fumagalli MA, Lage PS, Martins VT, Costa LE, Ribeiro TG, Régis WC, Soto M, Fernandes AP, Tavares CA, Coelho EA. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*. 2012;111(4):1807-16.

Van Bocxlaer K, Yardley V, Murdan S, Croft SL. Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(7):862-72.

4 DISCUSSÃO

É inegável a necessidade de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses. Nesta perspectiva, a descoberta de uma droga que seja seletiva para o parasito, ou seja, que atue sobre vias bioquímicas e metabólicas exclusivas do parasito ou com pouca ação no hospedeiro humano e que atue sobre diferentes alvos simultaneamente tem se mostrado uma excelente estratégia para o tratamento da doença (SINGH et al., 2012).

Dentre as classes de compostos heterocíclicos com atividade biológica, as quinolinas são reconhecidas pela ampla atividade antiprotozoária, incluindo a leishmanicida, a qual já foi amplamente descrita por diferentes grupos de pesquisa, dentre eles o nosso (TEKWANI; WALKER, 2006; CARVALHO et al., 2010, 2011; COIMBRA et al., 2010, 2011; CARMO et al., 2011; ANTINARELLI et al., 2012, NAGLE et al., 2014).

Na primeira etapa do presente trabalho, avaliou-se a atividade *in vitro* de uma série de dez derivados de 4-aminoquinolinas (AMQ) em formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* (Capítulo 1) e *L. amazonensis* (Capítulo 2). A série de dez compostos híbridos de 4-AMQ avaliados no presente trabalho foi elaborada a partir da conjugação do núcleo 4-aminoquinolínico baseado na estrutura da amodiaquina com três diferentes grupos farmacofóricos: derivados da hidrazina, hidrazida e sulfonamida. Os derivados da hidrazina e hidrazida são uma classe de compostos com ampla atividade biológica descrita, incluindo leishmanicida, antibacteriana e antitumoral (KHAN et al., 2003; KUMAR; NARASIMHAN 2013; SOARES et al., 2015). As sulfonamidas constituem um grupo de drogas com amplo perfil farmacológico, sendo utilizadas no tratamento de diversas infecções bacterianas e na terapia combinada para o tratamento da malária e toxoplasmose (SMITH; JONES, 2008; ANDREWS et al., 2014). Estudos já demonstraram a atividade destes compostos em *Leishmania* (PEIXOTO; BEVERLEY, 1987). A estratégia de hibridização de dois grupos farmacofóricos distintos em uma única estrutura química é uma ferramenta atualmente muito utilizada para otimizar a descoberta de novos agentes terapêuticos e tem o objetivo de ampliar o espectro de ação das drogas e contornar a resistência parasitária, uma vez que a molécula

formada tem o potencial de atuar sobre múltiplos alvos simultaneamente (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; KAUR et al., 2010; SRIVASTAVA; LEE, 2015).

É importante ressaltar que as espécies de *Leishmania* utilizadas neste trabalho como modelos para os ensaios de quimioterapia são os dois principais agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil. As infecções causadas por *L. amazonensis* causam mais frequentemente lesões cutâneas ulcerosas que se caracterizam pela presença de bordas infiltradas e repletas de parasitos (SILVEIRA et al., 1991). Está também associada a quadros clínicos de maior gravidade e de resistentência à terapia convencional como a forma anérgica cutânea difusa, a forma cutâneomucosa e a forma cutânea disseminada (LAINSON; SHAW, 1987; CARVALHO et al., 1994; SILVEIRA et al., 2009). Embora raro, infecções com *L. amazonensis* já foi também associada a casos de leishmaniose dérmica pós-Kalazar e manifestações viscerais em humanos e cães (BARRAL et al., 1986, ALEIXO et al., 2006, TOLEZANO et al., 2007). A *Leishmania braziliensis* é a espécie associada a LTA de maior prevalência no Brasil e o principal agente etiológico da leishmaniose cutâneomucosa, manifestação caracterizada pela latência, cronicidade e desenvolvimento de lesões desfigurantes na região da boca e nasofaringe, e refratariedade ao tratamento convencional (SILVEIRA et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Um aspecto importante na triagem *in vitro* de novas drogas leishmanicidas é o estágio evolutivo do parasito a ser utilizado nos ensaios. A forma promastigota extracelular tem sido extensivamente utilizada pela facilidade de manutenção dos parasitos em cultura axênica, permitindo uma triagem rápida, reprodutível e de baixo custo. Da mesma forma, ensaios com amastigotas axênicas são amplamente realizados em função da facilidade de cultivo do parasito na ausência da célula hospedeira. Outro ponto importante é que no ensaio com as formas promastigotas e amastigotas axênicas o parasito é exposto diretamente à ação do composto (TEMPONE et al., 2011; REGUERA et al., 2014). Em contrapartida, existe uma série de questionamentos acerca da utilização das formas promastigotas e amastigotas axênicas como modelos para testes de novas drogas, uma vez que apresentam diferenças de expressão gênica e proteica e de susceptibilidade aos fármacos em relação aos amastigotas intracelulares e não representam o estágio evolutivo responsável pela infecção no hospedeiro humano (CROFT et al., 2006, HOLZER et al., 2006; GUPTA; NISHI, 2011, DE RYCKER et al., 2013; NAGLE et al., 2014).

Diante do exposto, existe um consenso de que os testes realizados em macrófagos infectados correlacionam-se melhor com a resposta *in vivo* e devem ser utilizados como “padrão-ouro” para a identificação de potenciais fármacos (FUMAROLA et al., 2004, DE MUYLDER et al., 2011; TEMPONE et al., 2011, NAGLE et al., 2014). O ensaio utilizando macrófagos infectados com a forma amastigota oferece condições ideais, uma vez que mimetiza o ambiente intracelular do vacúolo parasitóforo (VP) no interior do qual o parasito sobrevive dentro da célula hospedeira. Portanto, um composto, para ser ativo em amastigota, deve ser permeável a pelo menos três 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 (SIQUEIRA-NETO et al., 2010; REGUERA et al., 2014).

No presente trabalho, a avaliação da atividade anti-amastigota dos compostos foi realizada por duas metodologias diferentes.

Para a espécie *L. braziliensis* (Capítulo 1) utilizou-se o método clássico de contagem dos parasitos intracelulares ao microscópio óptico após coloração por giemsa. Esta técnica é mais difícil de ser executada, demorada e exige profissional treinado. No nosso trabalho, optou-se pela contagem de um total de 200 macrófagos, estando este valor dentro de uma média aceitável, que é de 50 a 500 macrófagos (BERMAN; LEE, 1984; GUPTA; NISHI, 2011; TEMPONE et al., 2011). É importante considerar também que neste ensaio tem-se a possibilidade de obter maiores informações sobre a atividade leishmanicida dos compostos, uma vez que permite avaliar não apenas o efeito sobre a carga parasitária total, mas também o número de amastigotas por macrófago infectado e a porcentagem de macrófagos infectados e não-infectados. Além disto, permite avaliar oticamente a atividade citotóxica do composto sobre a célula hospedeira (TEMPONE et al., 2011, DE RYCKER et al., 2013).

No capítulo 2 utilizou-se uma cepa de *L. amazonensis* transfectada com GFP ("green fluorescent protein"), a qual permitiu a quantificação da carga parasitária por fluorimetria. Os ensaios de avaliação da atividade anti-amastigota utilizando cepas de *Leishmania* fluorescentes são uma ferramenta promissora na triagem de novas drogas, visto ser um método semi-automatizado e, portanto, mais prático, rápido e de baixo custo. Apresenta ainda uma série de outras vantagens em relação ao

método de contagem manual, tais como: não necessita de fixação e coloração das células, elevada sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, facilidade de detecção da intensidade de fluorescência por fluorimetria ou citometria, minimizando as variações do método de contagem manual (MEHTA et al., 2008; DUBE et al., 2009; VARELA et al., 2009; ROCHA et al., 2013).

Em relação aos resultados obtidos nos ensaios de avaliação da atividade em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania*, os compostos foram mais efetivos para as formas intracelulares do parasito, para ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas. Assim como observado no presente trabalho, variações na sensibilidade a drogas entre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp têm sido amplamente descritas na literatura, inclusive com os fármacos utilizados na quimioterapia atual como os antimoniais pentavalentes e miltefosina (YARDLEY et al. 2005; MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011). Os antimoniais pentavalentes, por exemplo, são muito mais ativos em amastigotas intracelulares e, apesar de não se ter noção exata do seu mecanismo de ação, tem sido sugerido que nestas formas evolutivas o antimonial pentavalente atue como pró-droga o qual é convertido na forma ativa, antimônio trivalente (MANDAL et al., 2015).

A citotoxicidade em macrófagos é um importante parâmetro a ser avaliado na triagem por novos compostos com ação em *Leishmania*, uma vez que este é um parasito intracelular obrigatório, principalmente, de células do sistema fagocítico mononuclear. Macrófagos peritoneais de camundongos foram escolhidos como célula hospedeira para infecção com *Leishmania*, uma vez que tem sido demonstrado que a atividade leishmanicida *in vitro* de drogas é dependente do tipo celular utilizado e os macrófagos, como principais células hospedeiras são modelos ideais para este tipo de bioensaio (TEMPONE et al., 2011). Neste trabalho, convém mencionar que os derivados AMQ não foram tóxicos para macrófagos até a máxima concentração testada (30 µg/mL). Existe um consenso entre diversos pesquisadores de que o Índice de Seletividade (InSe) é um importante parâmetro a ser considerado na avaliação da eficácia de novas drogas, uma vez que correlaciona a citotoxicidade em células de mamíferos com a atividade antiparasitária (CC₅₀ em células de mamíferos/CI₅₀ em amastigotas). Entretanto, quantitativamente, o valor de InSe não é consensual. Alguns autores apontam que InSe acima de 1 é considerado satisfatório (TEMPONE et al., 2011), enquanto uma outra corrente considera como aceitáveis valores de InSe iguais ou superiores a 10 (DON; IOSET, 2014). Dentre os

compostos avaliados, a série de derivados da hidrazina e hidrazida exibiu valores de InSe acima de 10, o que demonstra a ação seletiva dos compostos para o parasito, sem causar toxicidade para a célula hospedeira.

Em um trabalho complementar realizado em nosso laboratório, a maioria destes derivados 4-AMQs foi também avaliado quanto ao seu potencial efeito tóxico para eritrócitos humanos e os resultados mostraram que nenhum dos derivados AMQs avaliados apresentaram toxidez para eritrócitos humanos até a máxima concentração avaliada (500 µg/mL) (SOARES et al., 2017). Uma importante limitação dos fármacos da classe das 8-aminoquinolinas como a tafenoquina e primaquina na terapia antimalárica está relacionada a sua toxicidade hematológica com indução de hemólise e metahemoglobinemia em humanos (LOISEAU et al., 2011).

Estudos acerca da atividade antimalárica destes derivados AMQ foram também realizados em nosso laboratório, e os compostos apresentaram efeito promissor tanto *in vitro* em *Plasmodium falciparum*, espécie implicada na maioria dos casos fatais da doença e resistente a maioria dos fármacos atualmente disponíveis quanto *in vivo* em modelo experimental com *P. berghei* (SOARES et al., 2015; SOARES et al., 2017). E assim como observado em *Leishmania*, os derivados da hidrazina apresentaram melhor perfil de atividade antimalárica. O conjunto de resultados confirmam a potencial atividade antiprotozoária desta classe de derivados e reforça a necessidade da continuidade dos estudos.

Dentre os derivados AMQ avaliados, o composto AMQ-j apresentou o efeito leishmanicida mais promissor nas diferentes espécies de *Leishmania*. O derivado AMQ-j foi ativo em *L. amazonensis* (cepa PH8) com valores de CI₅₀ de 5,9, 7.0 e 2,6 µg/mL para as formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares, respectivamente, com expressiva seletividade para as formas amastigotas intracelulares (InSe>12,0). Numa análise complementar acerca da reversibilidade do efeito de AMQ-j sobre os parasitos intracelulares, verificou-se que após tratamento por 72 horas e posterior incubação em meio de cultura na ausência do composto, os amastigotas remanescentes apresentaram reduzida capacidade de se diferenciarem em promastigotas em todas as concentrações avaliadas. A ausência de reversibilidade do crescimento do parasito sugere que a droga provoca alterações drásticas em organelas e em processos bioquímicos e celulares vitais, os quais não podem ser corrigidos pelo parasito (DUEÑAS-ROMERO et al., 2007).

O composto AMQ-j apresentou uma expressiva atividade em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* (CI₅₀ de 3,7 e 1,4 µg/mL, respectivamente), confirmando o seu potencial leishmanicida. É amplamente conhecido que as diferenças bioquímicas e metabólicas entre as diferentes espécies de *Leishmania*, e até mesmo entre as formas evolutivas do parasito, influenciam drasticamente na sensibilidade aos fármacos (CROFT et al., 2002, ESCOBAR et al., 2002; MELBY, 2002; CROFT et al., 2006). Baseando nestes resultados preliminares, a hipótese é de que o composto atue sobre alvos bioquímicos e metabólicos comuns entre as diferentes espécies e formas evolutivas da *Leishmania* sp, sendo assim, um bom protótipo para estudos de quimioterapia em leishmanioses (SIQUEIRA-NETO et al., 2010; DE MUYLDER et al., 2011; HERRERA et al., 2016).

Tendo em vista a expressiva atividade leishmanicida *in vitro* do derivado AMQ-j com seletividade para as formas intracelulares do parasito e baixa toxidez para célula de mamíferos, o composto foi selecionado para a continuidade dos estudos relacionados a seu modo de ação (Capítulos 2 e 3) e da sua eficácia *in vivo* em modelo murino de infecção com *L. amazonensis* (Capítulo 4). O composto AMQ-j é um derivado 4-hidrazinoquinolina resultante da junção dos grupos farmacofóricos do núcleo 4-aminoquinolínico e da hidrazina.

Os estudos iniciais acerca do(s) mecanismo(s) de morte desencadeado pelo composto AMQ-j foram parcialmente direcionados para a mitocôndria, visto que a organela é considerada um alvo farmacológico pontual para a ação de compostos leishmanicidas por diferentes fatores: (i) diferentemente dos eucariotos superiores os quais possuem centenas a milhares de mitocôndrias; *Leishmania*, assim como os demais tripanossomatídeos possui uma mitocôndria única e diferenciada, que apresenta papel central no controle do metabolismo energético, responsável pela produção de ATP; (ii) a manutenção do potencial de membrana mitocondrial é essencial para o correto funcionamento da organela e a permeabilização da membrana mitocondrial exerce um papel chave na ativação dos mecanismos de morte do parasito; (iii) a disponibilidade de obtenção de enzimas e frações mitocondriais purificadas para o estudo da atividade dos diferentes complexos enzimáticos da cadeia respiratória (SEN; MAJUMDER, 2008; FIDALGO; GILLE, 2011; DE SOUZA et al., 2009; SMIRLIS et al., 2010; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014); (iv) crescentes evidências apontam a mitocôndria como alvo de diversos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, como no caso da

miltefosina, anfotericina B e pentamidina (LEE et al., 2002, MEHTA; SHAHA, 2004, LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007; FIDALGO; GILLE, 2011) e em fase de desenvolvimento como, por exemplo, a sitamaquina (CARVALHO et al., 2010).

A estratégia inicial para o estudo do modo de ação do composto AMQ-j em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* consistiu na análise da indução de estresse mitocondrial mediante a avaliação de diversos parâmetros, tais como: alteração no potencial de membrana mitocondrial, produção de EROS, inibição da atividade da tripanotona redutase e acúmulo de corpúsculos lipídicos.

A disfunção mitocondrial em protozoários tem sido classicamente avaliada a partir da despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (FIDALGO; GILLE, 2011; PROTO et al., 2013; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). O $\Delta\Psi_m$ é responsável pela formação e manutenção da fosforilação oxidativa, regulando a permeabilidade da membrana mitocondrial e a transferência seletiva de substâncias (FIDALGO; GILLE, 2010). O colapso do $\Delta\Psi_m$ ocorre em função permeabilização da membrana mitocondrial que afeta a integridade da membrana interna e externa da organela, resultando na interrupção da transferência de elétrons, na diminuição na produção de ATP e liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c que ativam as caspases e, culminando, na morte celular. Portanto, a manutenção do $\Delta\Psi_m$ é uma condição essencial para a função mitocondrial e sobrevivência do parasito (SMIRLIS et al., 2011; TAYLOR-BROWN; HURD, 2013).

A análise do $\Delta\Psi_m$ em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com AMQ-j foi realizada mediante a incubação com dois marcadores fluorescentes distintos, Rodamina 123 e JC-1. Os resultados obtidos por citometria de fluxo (marcação com Rodamina 123) e por fluorimetria (marcação com JC-1) demonstraram o colapso do $\Delta\Psi_m$ em promastigotas tratadas com diferentes concentrações do AMQ-j. A disfunção mitocondrial nas formas promastigotas tratadas com AMQ-j foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que evidenciou nítidas alterações na morfologia mitocondrial que se apresentou dilatada e inchada. O composto também induziu despolarização mitocondrial nas formas amastigotas, evidenciada nos ensaios com os amastigotas intracelulares (macrófagos infectados) e com amastigotas-*like* obtidos do sobrenadante de células Vero infectadas (amastigotas axênicos). De modo interessante, não foi observado alteração no $\Delta\Psi_m$ dos macrófagos não infectados e tratados com o composto, corroborando a sua ação seletiva sobre o parasito e a baixa citotoxicidade para macrófagos determinada pela

atividade da desidrogenase mitocondrial pelo método do MTT e confirmada por microscopia ótica.

O principal sítio responsável pela produção mitocondrial de EROs é a cadeia respiratória e o comprometimento no seu funcionamento resultante do colapso mitocondrial tem como consequência um aumento na geração de EROs, sendo este também um dos mecanismos indutores de morte celular programada (ROY et al., 2008; MENNA-BARRETO et al., 2009; FIDALGO; GILLE, 2011; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). A produção excessiva de EROs mitocondrial induz a oxidação de macromoléculas essenciais como proteínas, DNA e lipídios, desencadeando um acúmulo de danos irreversíveis em estruturas celulares que são incompatíveis com a sobrevivência do parasito (KOWALTOWSKI et al., 2009; SMIRLIS et al., 2011; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013). No presente trabalho foi observado um aumento significativo nos níveis de EROs tanto em promastigotas quanto em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com AMQ-j, fornecendo mais uma forte evidência de que a mitocôndria é um alvo central para a ação do composto.

No intuito de proteger o parasito frente ao estresse oxidativo desencadeado pela produção excessiva de EROs mitocondrial, a *Leishmania* e demais tripanossomatídeos patogênicos possuem um sistema de detoxificação bem diferenciado das células de mamífero. Entre as peculiaridades do metabolismo redox destes protozoários, destaca-se a presença da Tripanotiona redutase (TriR), encontrada exclusivamente em tripanossomatídeos. A TriR é uma enzima chave na manutenção do metabolismo redox e sobrevivência do parasito, uma vez que catalisa a redução da tripanotiona dissulfeto (T[S]2) à tripanotiona ditiol (T[SH]2) numa reação dependente de NADPH, resultando numa cascata de reações que culmina na neutralização de EROs e espécies reativas do nitrogênio (VAN ASSHIE et al., 2011; LEROUX; SIEGEL, 2015; RAJASEKARAN; CHEN, 2015). Apesar da similaridade entre o ciclo redutivo da glutathiona de humanos com o da TriR dos tripanossomatídeos, ambas possuem diferenças na arquitetura dos seus sítios ativos, tendo a capacidade de discriminar entre os respectivos substratos dissulfutetos, o que configura a TriR como um alvo terapêutico valioso para a quimioterapia de tripanossomatídeos (PAL; BANDYOPADHYAY, 2012, TOMÁS; CASTRO, 2013; LEROUX; SIEGEL, 2015).

Uma vez observado o aumento expressivo nos níveis de EROs após tratamento com AMQ-j, avaliou-se a capacidade do composto de inibir a atividade da

tripanotona redutase (TriR). As análises *in silico* mostraram que o composto inibe com elevada afinidade o sítio de ligação da enzima com o cofator NADP, com uma concentração inibitória (Ki) de 17, 86 μ M. Os resultados obtidos sugerem que o AMQ-j atua como um inibidor da atividade da TriR de *L. amazonensis*, e este pode ser um dos mecanismos responsáveis pela excessiva produção de EROs mitocondrial, culminando no estresse oxidativo, colapso do $\Delta\Psi_m$ e, conseqüente, morte do parasito (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; VAN ASSHE et al., 2011). Dentre os diversos derivados de quinolinas identificados quanto a sua atividade leishmanicida, diversos já foram reconhecidos pela sua atividade inibitória sobre a TriR (PAL; BANDYOPADHYAY, 2012; LEROUX; SIEGEL, 2015; SOLA et al., 2015). Estudos apontam que a presença do átomo de nitrogênio protonável do núcleo quinolínico seja o elemento chave para a inibição da TriR, uma vez que mimetiza o substrato positivamente carregado (tripanotona dissulfido) (SOLA et al., 2015). A inibição da atividade da TriR da *Leishmania* associada ao aumento nos níveis de EROs é também um dos mecanismos de ação já descrito para os antimoniais pentavalentes (BAIOCCO et al., 2009).

Os Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas especializadas no armazenamento de lipídios neutros, incluindo triacilgliceróis e ésteres de colesterol (MELO et al., 2012). Essas estruturas estão relacionadas ao metabolismo e tráfego lipídico, sinalização celular e produção de mediadores inflamatórios, tais como eicosanoides, prostaglandinas e leucotrienos (BOZZA et al., 2009). Além disto, estudos já evidenciaram o papel dos CLs na imunoregulação na presença de doenças inflamatórias (BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2005) e em infecções com protozoários, como *T. cruzi* (D'AVILA et al., 2011) e *L. amazonensis* (PINHEIRO et al., 2009). Em protozoários, o acúmulo de CLs no citoplasma da célula hospedeira está associado a indução da produção de mediadores inflamatórios, tais como a prostaglandina E2 e inibição da resposta Th1 pelo hospedeiro, a qual favorece a multiplicação intracelular do parasito e estabelecimento da infecção (D'AVILA et al., 2011; TOLEDO et al., 2016). Estudos recentes comprovam a correlação direta entre o acúmulo de CLs no citoplasma da célula e a disfunção mitocondrial. A hipótese é de que as EROS formados sob condições de estresse mitocondrial reajam reversivelmente com os grupamentos tiol das enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, resultando no acúmulo de lipídios neutros no citoplasma das células. A formação do CLs seria, portanto, um importante marcador de estresse celular

(BOREN; BRINDLE, 2012; LEE et al., 2013). Diante destas evidências, inúmeros estudos têm descrito o acúmulo de corpúsculos lipídicos em tripanossomatídeos sob condições de estresse celular, dentre eles, o tratamento com diferentes classes de drogas (DE MACEDO-SILVA et al., 2013; GODINHO et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2015). Análises realizadas por fluorimetria após incubação com Nile Red, um marcador fluorescente específico para lipídios neutros demonstrou um aumento significativo na porcentagem de promastigotas positivamente marcados após tratamento com AMQ-j. Estas observações foram corroboradas por MET que evidenciou o acúmulo de CLs, visualizados na forma de estruturas arredondadas elétron-densas distribuídas no citoplasma dos promastigotas.

Este conjunto de resultados indicam que o mecanismo de ação do composto AMQ-j está fortemente relacionado a disfunção mitocondrial desencadeada por diferentes fatores: colapso do potencial de membrana mitocondrial, inchaço da organela, aumento na produção de EROS, inibição da atividade da tripanotiona redutase e acúmulo de CLs (FIDALGO; GILLE, 2011; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Uma vez evidenciado o drástico efeito do composto AMQ-j na mitocôndria e visto o papel central desta organela na regulação da apoptose, verificou-se se o efeito leishmanicida do composto estaria associado a indução de morte por "apoptose-like" do parasito a partir de uma série de alterações bioquímicas, morfológicas e celulares sugestivas do processo.

A apoptose pode ser bioquimicamente caracterizada a partir da alteração na composição dos fosfolipídios de membrana. Em células saudáveis, a fosfatidilserina encontra-se na porção interna da membrana plasmática. Nos estágios iniciais de apoptose, contudo, ocorre a externalização deste fosfolipídio na superfície externa da membrana plasmática (HENRY et al., 2013) A expressão deste fenótipo apoptótico é comumente evidenciada mediante o ensaio de marcação com anexina V. A anexina V é integrante de uma família de proteínas com elevada especificidade para fosfolipídios carregados negativamente como a fosfatidilserina (PS). Embora a marcação com anexina V não ocorra exclusivamente para PS, a anexina V possui elevada afinidade por este fosfolipídio, o qual é exposto numa porcentagem expressiva na superfície da membrana plasmática dos promastigotas em estágios iniciais de apoptose (RODRIGUES et al., 2002; IMBERT et al., 2012; SHADAB et al., 2017). Análises realizadas por citometria apontaram que o tratamento com AMQ-j

induziu um aumento dose-dependente na porcentagem de promastigotas positivamente marcados para anexina V.

A apoptose é também classicamente caracterizada mediante modificações drásticas na organização estrutural do núcleo e marcadas pela: (i) condensação da cromatina em massas elétron-densas revelada por meio de análises por MET; (ii) fragmentação do DNA nuclear, a qual pode ser evidenciada por microscopia de fluorescência utilizando marcadores específicos para DNA (ensaio de TUNEL) e por citometria de fluxo por meio da análise das fases do ciclo celular (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que o composto AMQ-j interage com o DNA das formas promastigotas de *L. amazonensis*, desencadeando perturbações estruturais no DNA evidenciadas pela desorganização da cromatina em massas elétron-densas condensadas revelada pela MET e alterações drásticas nas fases do ciclo celular, com aumento na população de parasitos na fase sub G0/G1, indicativa de fragmentação do DNA. A fragmentação do DNA foi também avaliada em macrófagos infectados e tratados com AMQ-j e análises por microscopia de fluorescência pelo ensaio de TUNEL revelou que o composto induziu seletivamente a fragmentação do DNA das formas amastigotas intracelulares, sem induzir degradação do DNA da célula hospedeira.

O conjunto de dados obtidos fornece fortes evidências de que o composto AMQ-j induz morte por apoptose-like em *L. amazonensis*, atuando seletivamente nos parasitos. Na literatura, estudos acerca do mecanismo de ação das quinolinas em *Leishmania* são escassos e inconclusivos, e direcionados aos derivados de 8-aminoquinolinas, tais como sitamaquina (CARVALHO et al., 2010) e tafenoquina (CARVALHO et al., 2011) e, mais recentemente, a 8-hidroxiquinolina (COSTA DUARTE et al., 2016). Os estudos sugerem que, semelhante ao observado para AMQ-j; sitamaquina, tafenoquina e 8-hidroxiquinolina induzem a morte por apoptose em *Leishmania*.

Embora a apoptose e autofagia sejam evidenciadas a partir de processos bioquímicos, moleculares e morfológicos distintos, ambas estão estritamente relacionadas a disfunção mitocondrial (FILOMENI et al., 2015). Uma vez que o composto provoca drásticas alterações na morfologia e função mitocondrial, avaliou-se a possível indução de autofagia após tratamento com AMQ-j. Nos últimos anos, a indução de morte por autofagia tem despertado interesse como um potencial alvo terapêutico para a ação de fármacos antiprotozoários (BRENNAND et al., 2011,

2012; DE MACEDO-SILVA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2015). Um método muito utilizado para avaliar a morte por autofagia é mediante a marcação com corantes acidotrópicos e, dentre estes, o MDC é considerado um marcador específico para autofagossomos (BIEDERBICK, KERN e ELSÄSSER, 1995, MIZUSHIMA, 2004).

Análises realizadas por fluorimetria e microscopia de fluorescência demonstraram a presença/acúmulo de vacúolos marcados com MDC em promastigotas tratadas com AMQ-j, as quais foram confirmadas por análises por MET. Outra observação importante é que análises por MET dos promastigotas tratados com AMQ-j revelou a localização de corpúsculos lipídicos (CLs) próximos aos vacúolos autofágicos, o que sugere que estes vacúolos possam estar atuando na remoção destes lipídios anormais, que possivelmente acumularam-se no citoplasma após tratamento com a droga. Assim como anteriormente observado por De Macedo-Silva et al. (2013) em um estudo realizado em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com os antifúngicos azólicos, itraconazol e posaconazol.

Observações por MET revelou ainda o acúmulo de corpos multivesiculares, um compartimento de natureza lisossomal, dentro de vacúolos em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas como AMQ-j. O acúmulo de corpos multivesiculares já foi demonstrado após tratamento com diferentes drogas tripanomicidas e a hipótese é de que a formação de tais estruturas esteja relacionada ao comprometimento do mecanismo de endocitose do parasito e, conseqüentemente, a absorção de íons ferro e macromoléculas, essenciais para a sua sobrevivência (VANNIER-SANTOS et al., 1995; RODRIGUES et al., 2005; MENNA-BARRETO et al., 2009; SÜLSEN et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

Outra característica indicativa de morte autofágica observada após tratamento com o composto foi o acúmulo de organelas vesiculares ácidas determinada após marcação com o corante acidotrópico laranja de acridina e também observada mediante análises por MET que revelou a presença de vesículas no citoplasma dos promastigotas tratados com AMQ-j. Estudos relacionados ao mecanismo de ação da tafenoquina em *Leishmania* e *T. brucei* e da sitamaquina em *Leishmania* também demonstraram disfunção lisossomal, bem como evidenciaram o acúmulo do fármaco dentro do acidocalcissoma, um compartimento de natureza acídica exclusivamente encontrado em tripanossomatídeos e responsável pelo armazenamento de cálcio

intracelular, dentre outras funções. O acúmulo da droga no interior do acidocalcissoma induz alcalinização da organela, levando a liberação de cálcio no citosol e o consequente colapso do potencial de membrana mitocondrial após captação do cálcio pela membrana mitocondrial (CARVALHO et al., 2010, 2011, 2015). Estas observações nos levam a especular que o composto AMQ-j, possivelmente, atua sobre o acidocalcissoma, visto sua característica favorável de base fraca e seu acúmulo no interior de compartimentos acídicos

O conjunto de dados nos permite inferir algumas hipóteses sobre as principais vias a partir da qual o composto AMQ-j induziu o processo de morte por autofagia: (i) diretamente, induzindo a morte por autofagia; (ii) indiretamente, este processo pode estar relacionado ao drástico efeito do composto na mitocôndria e um processo seletivo de autofagia (mitofagia) foi desencadeado no intuito de degradar a organela danificada e, portanto, não-funcional (BRENNAND et al., 2011; YOULE; NARENDRA, 2011; GALLUZZI et al., 2012; FILOMENI et al., 2015; SICA et al., 2015); (iii) o composto, assim como outros derivados de aminoquinolinas, como a cloroquina, sitamaquina e tafenoquina tem a propriedade de base fraca e, diretamente, a droga penetra pela membrana do parasito por difusão e é, em seguida, protonada, sequestrada, acumulando-se, em concentrações elevadas, dentro de compartimentos acídicos. Este acúmulo do composto pode resultar na alcalinização do lisossomo, interferindo na função das hidrolases lisossomais e resultando na ruptura da função lisossomal; bem como no acúmulo da droga no interior do vacúolo parasitóforo (VP), resultando no aumento do pH no interior do VP, diminuição na capacidade de aquisição de íons e macromoléculas essenciais para a viabilidade do parasito e culminando na morte do parasito (O'NEILL et al., 1998; BOYA et al., 2003; CARVALHO et al., 2011, 2015; DUSZENKO et al., 2011; BRENNAND et al., 2012).

Em paralelo a estes estudos, avaliou-se a indução de morte por necrose após tratamento com AMQ-j. Classicamente, a morte por necrose pode ser determinada pela avaliação da integridade da membrana plasmática, visto que a permeabilização da membrana plasmática ser característica exclusiva de morte por necrose (KROEMER et al., 2009; KEEP et al., 2011). A mitocôndria é também a principal reguladora da morte por necrose (KEEP et al., 2011; BERGUE et al., 2014). Uma vez que o composto induziu colapso da membrana mitocondrial, avaliou-se o possível efeito do composto sobre a integridade da membrana plasmática. A

avaliação da permeabilidade da membrana plasmática das formas promastigotas e amastigotas axênicas mediante incubação com iodeto de propídeo, um marcador impermeável à membrana plasmática íntegra; bem como observações das formas promastigotas por MET não indicaram ruptura da membrana plasmática do parasito após tratamento com o composto, descartando-se a hipótese de indução de morte por necrose.

A produção de óxido nítrico é um importante mecanismo microbicida utilizado pelos macrófagos na eliminação dos amastigotas intracelulares *in vitro* e *in vivo* (HORTA et al., 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; LIU; UZONNA, 2012). Com o intuito de avaliar o efeito imunomodulatório do composto AMQ-j, avaliou-se a produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com AMQ-j. Os resultados mostraram que não houve aumento nos níveis de produção de NO pelos macrófagos tratados com AMQ-j, mesmo incubando com concentrações mais elevadas (30,0 µg/mL) (Capítulo 2- *Chemical Biology and Drug Design*, 2015). Estes resultados sugerem que a diminuição expressiva na carga global dos amastigotas e na porcentagem de macrófagos infectados induzida pelo composto não está relacionada a ativação da produção de NO pela célula hospedeira. A principal hipótese é de que o AMQ-j penetre na célula hospedeira, acumulando-se em elevadas concentrações no vacúolo parasitóforo e atuando diretamente sobre os amastigotas intracelulares; apesar de não descartarmos a possibilidade de que outros mecanismos microbicidas, dentre eles, a produção de EROS possa estar envolvida na morte do parasito (COSTA DUARTE et al., 2016).

O conjunto de dados reunidos acerca dos processos de morte celular induzidos pelo AMQ-j apontam que o efeito do composto em *L. amazonensis* está relacionado a múltiplos alvos; afetando a tripanotona redutase (TriR), organelas e estruturas celulares chaves, como mitocôndria, membrana plasmática, núcleo e lisossoma, e induzindo uma série de alterações fenóticas compatíveis com processos de morte por autofagia e apoptose. A Figura 5 ilustra as principais alterações celulares induzidas pelo AMQ-j.

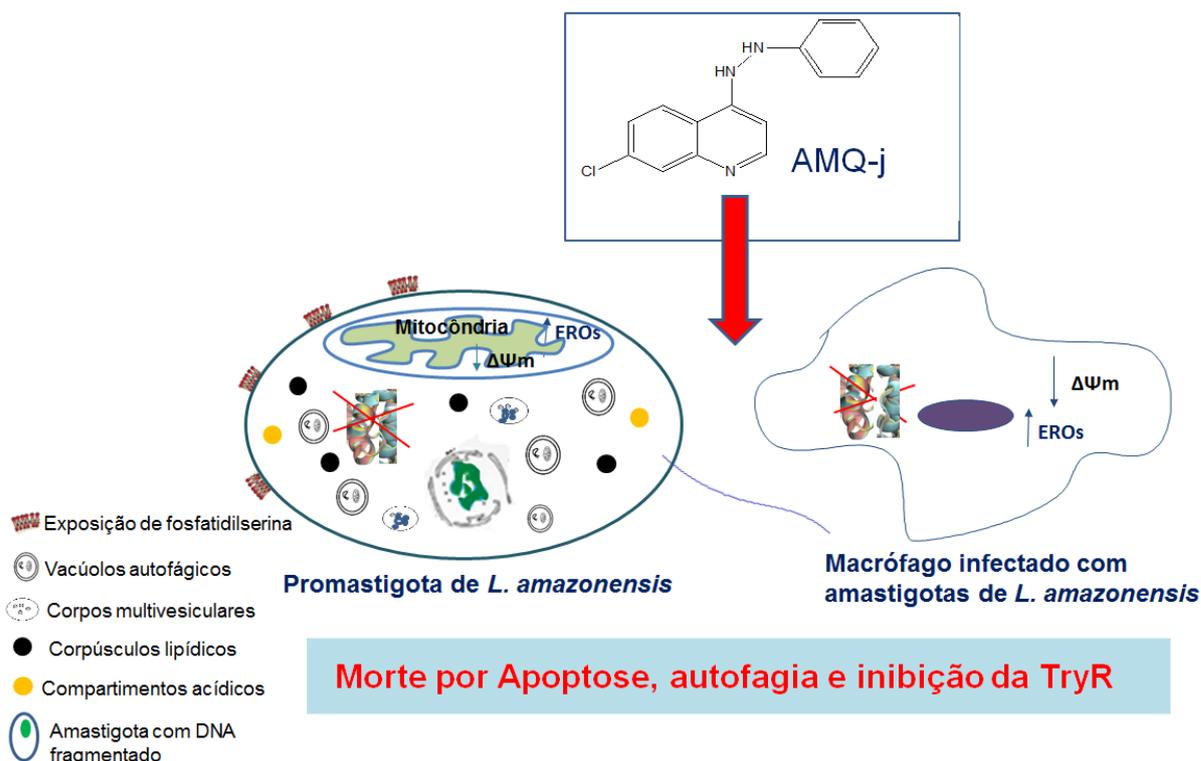


Figura 5: Representação esquemática do modo de ação do AMQ-j em *L. amazonensis*. Os resultados obtidos acerca do modo de ação do AMQ-j apontam que a mitocôndria é uma organela chave para ação do composto e evidenciada por uma série de disfunções mitocondriais, como: perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inchaço da organela, aumento na produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROS) e acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma nas formas promastigotas. Nestas formas biológicas, o tratamento com AMQ-j induziu diferentes alterações bioquímicas e celulares sugestivas de morte por apoptose como: redução do volume celular, exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, manutenção da integridade da membrana plasmática e alterações drásticas no núcleo celular (desorganização da cromatina em massas elétron-densas condensadas e fragmentação do DNA). O efeito do composto está também fortemente associado a indução de morte por autofagia e caracterizada por diferentes alterações celulares: acúmulo de vacúolos autofágicos, formação de corpos multivesiculares dentro de vacúolos, presença de vesículas citoplasmáticas e acúmulo de compartimentos ácidos no citoplasma dos promastigotas. Em macrófagos infectados, o composto reduz significativamente a carga parasitária, possivelmente desencadeando a morte por apoptose, tendo sido observado fragmentação do DNA dos amastigotas intracelulares e aumento nos níveis de EROS, sem indução da produção de óxido nítrico (ON). Estudos *in silico* sugerem que AMQ-j é um potencial inibidor da tripanotiona redutase (TriR), enzima chave na defesa antioxidante do parasito.

O conjunto de resultados obtidos acerca da atividade leishmanicida *in vitro* e do mecanismo de ação do composto AMQ-j acima descritos, além de se serem etapas fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos, nos estimularam a continuidade dos estudos com este composto. Assim, na etapa final deste trabalho, avaliou-se a atividade *in vivo* do composto AMQ-j em um modelo experimental de infecção com *L. amazonensis* (Capítulo 4: manuscrito em preparo para submissão). A infecção experimental foi realizada em camundongos BALB/c que são

extremamente susceptíveis a infecção com *L. amazonensis* e considerado um modelo altamente adequado para a avaliação da eficácia *in vivo* de drogas (MIGUEL et al., 2008; DA CUNHA-JUNIOR et al., 2011; ROSSI-BERGMANN et al., 2012; MONTRIEUX et al., 2014). A infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* é caracterizada pelo desenvolvimento de uma lesão progressiva no sítio da infecção que reproduz aspectos da infecção humana com presença de lesões ulceradas, seguido pela disseminação do parasito para a região dos linfonodos, e metástases para sítios distantes. Outro aspecto importante é o predomínio de resposta imune de perfil Th2, não-cura e evolução fatal (FOURNET et al. 1996; CUPOLILO et al. 2003; VALADARES et al. 2012, SCOTT; NOVAIS, 2016).

Neste trabalho, o efeito leishmanicida *in vivo* do composto AMQ-j foi avaliado pela via intralesional (IL) num esquema de tratamento realizado duas vezes por semana, num total de oito doses, e iniciando-se o tratamento imediatamente após a infecção, antes do estabelecimento da lesão. A escolha pela administração da droga pela via IL foi baseada em diversos critérios, dentre eles: (i) ausência de informações acerca da toxicidade *in vivo* do composto pelas vias sistêmicas (oral, intraperitoneal ou intravenosa); (ii) a via de administração IL reduz a dosagem da droga e o risco de toxicidade sistêmica, com possibilidade de redução do tempo e custo do tratamento; (iii) é uma formulação atrativa para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento tópico da LC, uma vez que a droga é administrada diretamente no sítio da infecção (MISHRA et al., 2007; GARNIER et al., 2006; MONTRIEUX et al., 2014).

Na literatura, diversos estudos *in vivo* têm relatado o uso tópico dos fármacos clinicamente utilizados, como Glucantime (SALMANPOUR et al., 2006), Estibogluconato de sódio (EL-SAYED; ANWAR, 2010), Anfotericina B lipossomal (YARDLEY; CROFT, 1997) e miltefosina (VAN BOCXLAER et al., 2016). Atualmente, uma formulação tópica da paromomicina 15% tem sido utilizada no tratamento da LC em países do Velho Mundo. Contudo, apresentou eficácia limitada em espécies do Novo Mundo (GONÇALVES et al., 2005; BEN SALAH et al., 2009).

Recentemente, a OMS recomendou a inclusão do tratamento pela via tópica e localizada dentre as alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose em países do Novo Mundo (WHO, 2010). Em 2013, o Comitê para Leishmanioses da Organização Pan-Americana de Saúde também incluiu o tratamento intralesional para o tratamento da LCL (OPS, 2013). Estudos realizados no Brasil em pacientes

com LCL demonstraram boa resposta clínica do Glucantime pela via intralesional. Contudo, os estudos apresentaram divergência cerca do regime terapêutico adotado, sobretudo, no que se refere a concentração da droga administrada, intervalo entre as doses e tempo de duração do tratamento, o que dificulta a avaliação criteriosa da eficácia do fármaco (OLIVEIRA-NETO et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2012; FERREIRA-VASCONCELLOS et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Os principais critérios para avaliação da eficácia *in vivo* de drogas em modelos experimentais de leishmaniose cutânea são a medida do tamanho lesão e a quantificação da carga parasitária pelo método da diluição limitante (LDA) (REIMÃO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016). A análise da medida do tamanho das lesões indicou que a administração intralesional do composto AMQ-j na concentração de 100 µg/kg do AMQ-j resultou em uma redução parcial, porém expressiva do tamanho da lesão. Em relação a avaliação da carga parasitária pelo método da “Limiting dilution assay” (LDA), os resultados apontaram que o tratamento com AMQ-j resultou em uma redução expressiva da carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante da lesão, demonstrando que o tratamento com uma concentração baixa da droga (100 µg/kg) foi capaz de alcançar os macrófagos infectados da derme profunda em concentrações terapêuticas. O grupo tratado com o fármaco de referência, Anfotericina B, na concentração de 250 µg/kg apresentou resolução das lesões e eliminação da carga parasitária da orelha, embora não tenha levado a cura estéril, uma vez que um número significativo de parasitos ainda permaneceu viável nos linfonodos. Dados da literatura acerca da eficácia da Anfotericina B pela via intralesional em modelos experimentais de infecção com *L. amazonensis* são escassos. Rossi-Bergmann et al (2012) também comprovaram a eficácia da Anfotericina B pela via intralesional em camundongos infectados com *L. amazonensis*, utilizando um esquema de tratamento com 2 mg/Kg da droga duas vezes por semana durante quatro semanas.

Apesar do ensaio da LDA ser o método de quantificação da carga parasitária mais utilizado em modelos experimentais de infecção com *Leishmania*, este é um processo laborioso, caro e demorado, pois requer a incubação da cultura por um tempo prolongado (7-10 dias). Outra limitação do método é a possibilidade de contaminação da cultura resultante da manipulação durante as etapas do experimento, ou em função do tempo prolongado de incubação ou até mesmo

resultante da contaminação bacteriana secundária provenientes da lesão (KOBETS et al., 2012; REIMÃO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016). Além disto, o método consegue determinar somente os amastigotas capazes de se diferenciarem em promastigotas e sobreviver em cultura após incubação com antibiótico (REIMÃO et al., 2013).

Uma alternativa ao método da LDA é a quantificação da carga parasitária por fluorimetria em cepas de *Leishmania* transfectadas com proteínas fluorescentes. As vantagens deste método são inúmeras e incluem: rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade, alta sensibilidade e permite a determinação da carga parasitária diretamente do extrato de parasitos obtidos a partir do macerado da lesão sem necessidade de incubação da cultura, minimizando os riscos de contaminação bacteriana (REIMÃO et al., 2013). No modelo experimental utilizado no presente trabalho, os ensaios *in vivo* foram realizados com uma cepa de *L. amazonensis*-GFP permitindo a quantificação da carga parasitária por fluorimetria. Os dados obtidos revelaram uma redução expressiva da carga parasitária da orelha no grupo tratado com AMQ-j, bem como a eliminação total da carga parasitária no grupo tratado com Anfotericina B, corroborando os resultados obtidos pelo método da LDA.

Numa análise comparativa dos resultados obtidos para os dois parâmetros avaliados (tamanho da lesão x carga parasitária), foi possível verificar uma redução somente parcial no tamanho da lesão (48%) após tratamento com AMQ-j, embora o tratamento tenha resultado numa inibição expressiva da carga parasitária (97,3%). Uma possível justificativa seria o fato de que o desenvolvimento da lesão é resultante não somente da multiplicação do parasito no sítio da infecção; mas também do estado de ativação do sistema imune do hospedeiro, bem como do processo inflamatório progressivo que, em muitos casos, é de difícil regressão (OLIVEIRA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; VAN BOCXLAER et al., 2016).

Embora no presente trabalho o regime terapêutico tenha sido realizado pela via IL utilizando uma dose reduzida do composto, uma concentração significativa da droga pode ser absorvida pela circulação sanguínea (ROSSI-BERGMANN et al., 2012). A reduzida toxicidade do AMQ-j para os parâmetros hepático, renal e cardíaco indica que, apesar do tratamento com múltiplas doses, o composto possui baixa absorção sistêmica, provavelmente, resultante da baixa dose administrada, bem como da taxa de liberação sistêmica mais lenta da droga. Por outro lado, o

tratamento IL com Anfotericina B resultou no aumento dos níveis das enzimas ALT e creatinina, indicativas de toxicidade hepática e renal, respectivamente. Estes resultados são condizentes com resultados previamente observados por Rossi-Bergmann et al (2012) em um modelo experimental com *L. amazonensis* utilizando tratamento pela via intralesional. O aumento nestes parâmetros de toxicidade seria compatível com a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em humanos, que são considerados um dos principais efeitos adversos induzidos pelo fármaco (YARDLEY; CROFT, 1997; DERAY, 2002; ROSSI-BERGMANN et al., 2012).

No intuito de avaliar o potencial do composto AMQ-j em modular a resposta imune do hospedeiro, quantificou-se os níveis dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a. Verificou-se que os níveis dos anticorpos IgG total e IgG2a de animais tratados com AMQ-j foram significativamente mais elevados em comparação com os animais tratados com DMSO ou Anfotericina B. Além disto, verificou-se no grupo experimental tratado com AMQ-j uma tendência para o aumento de anticorpos da subclasse IgG2a em relação a IgG1, os quais tem sido utilizados como marcadores específicos para a ativação da resposta Th1 e Th2, respectivamente. Estes resultados preliminares sugerem um redirecionamento do perfil de resposta imune do tipo Th2 para uma resposta Th1, a qual tem sido considerada mais adequada para o controle da infecção (AFONSO; SCOTT 1993, ROSTAMIAN et al., 2015). Os resultados obtidos estão em concordância com outros estudos *in vivo* de infecção com leishmaniose cutânea que também demonstraram aumento nos níveis de IgG2a após tratamento com drogas (VALADARES et al., 2012; CHARRET et al., 2013; GAMBOA-LEON et al., 2014).

Apesar do esquema de tratamento ter sido realizado pela via de administração IL, estudos computacionais (*in silico*) acerca das propriedades farmacocinéticas e físico-químicas foram conduzidos no intuito de avaliar a biodisponibilidade e toxicidade do composto para uso oral e potencial uso como fármaco. Inicialmente, realizou-se análises *in silico* das propriedades físico-químicas do composto AMQ-j baseando na "Regra de Lipinski". A regra de Lipinski ou "regra dos cinco" é um conjunto de condições empíricas inferidas por Lipinski et al. (1997) num trabalho de análise estatística de propriedades físico-químicas de fármacos conhecidos. Segundo os critérios utilizados por esta metodologia, uma molécula para ser considerada um bom fármaco não deve violar mais do que um dos seguintes parâmetros: peso molecular menor ou igual a 500, coeficiente de partição

octanol-água abaixo de 5 (log P menor ou igual a 5), presença de grupos aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e presença de grupos doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. As análises teóricas demonstraram que o composto atendeu a todos os parâmetros, uma vez que apresenta baixo peso molecular (269,07 g/mol), log P de 4,31, presença de dois grupos funcionais capazes de atuar como doadores e um grupo aceptor de hidrogênio. As análises de predição das propriedades farmacocinéticas de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) sugerem que o composto AMQ-j apresenta uma excelente biodisponibilidade pela via oral, com elevada absorção intestinal humana e permeabilidade para as células Caco-2. Em relação a toxicidade oral aguda, o composto se enquadra na categoria III de compostos com valores de dose letal (DL₅₀) superiores a 500 mg/kg. A simulação da afinidade do composto para o sítio ativo das principais isoformas do citocromo P450, um grupo de hemoproteínas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, indicou alta probabilidade da droga atuar como um inibidor promíscuo das principais enzimas do complexo CYP450 (CHENG et al., 2012; FONSECA-SILVA et al., 2016).

Os resultados demonstram a eficácia *in vivo* e baixa toxidez do composto AMQ-j pela via intralesional no modelo murino de infecção com *L. amazonensis*. Contudo, estudos ainda são necessários para a determinação da melhor dose e regime terapêutico ideal no intuito de reduzir o tempo de tratamento e otimizar sua eficácia terapêutica, assim como obter maiores informações acerca do possível efeito imunomodulatório do composto. Outro achado importante é que os estudos de predição *in silico* acerca das propriedades farmacocinéticas (ADMET) e características físico-químicas (regra de Lipinsky) demonstraram um excelente perfil do AMQ-j para ser utilizado pela via oral.

Estes resultados iniciais fornecem perspectivas para a avaliação da atividade *in vivo* do composto AMQ-j pela via oral de forma isolada ou na terapia combinada com fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, bem como avaliar a eficácia da droga em modelos de infecção com outras espécies relacionadas a leishmaniose tegumentar americana.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os derivados de 4-aminoquinolinas (4-AMQs) avaliados representam uma classe de compostos com atividade leishmanicida promissora, com destaque para a série de derivados da hidrazina e hidrazida com atividade expressiva em amastigotas intracelulares de ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas e baixa citotoxicidade para macrófagos murinos.

O derivado AMQ-j foi o mais ativo apresentando um CI_{50} de 3,7 e 1,4 $\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, respectivamente, e um CI_{50} de 5,9 e 2,6 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotas e amastigotas intracelulares *L. amazonensis* (cepa PH8), respectivamente.

Os resultados obtidos acerca do modo de ação do AMQ-j em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* apontam que a mitocôndria é uma organela chave para ação do composto e evidenciada por uma série de disfunções mitocondriais, como: colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inchaço da organela, aumento na produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) e acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma.

O efeito do AMQ-j em promastigotas está associado a diferentes alterações bioquímicas e celulares sugestivas de morte por apoptose como: redução do volume celular, exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, manutenção da integridade da membrana plasmática e alterações drásticas no núcleo celular (desorganização da cromatina em massas elétron-densas condensadas e fragmentação do DNA).

Em macrófagos infectados, o composto reduz significativamente a carga parasitária, possivelmente desencadeando a morte por apoptose, tendo sido observado fragmentação do DNA dos amastigotas intracelulares e aumento nos níveis de EROs, sem indução da produção de óxido nítrico (ON).

O efeito do composto está também fortemente associado a indução de morte por autofagia evidenciada pelo acúmulo de vacúolos autofágicos, formação de corpos multivesiculares dentro de vacúolos, presença de vesículas citoplasmáticas e acúmulo de compartimentos ácido no citoplasma dos promastigotas.

Estudos *in silico* sugerem que AMQ-j é um potencial inibidor da tripanotona redutase (TriR), enzima chave na defesa antioxidante do parasito.

Esses achados representam contribuições valiosas no entendimento do mecanismo de ação dos derivados de 4-aminquinolinas em *Leishmania*.

Os resultados da avaliação da atividade *in vivo* do AMQ-j pela via intralesional em um modelo experimental de infecção com *L. amazoensis* demonstram que o composto possui um perfil promissor com inibição expressiva da carga parasitária (97,3%) e do tamanho da lesão (48%) sem indução de toxicidade sistêmica.

As análises de predição *in silico* relacionadas às propriedades farmacocinéticas (ADMET) e características físico-químicas (regra de Lipinsky) demonstram um excelente perfil do AMQ-j para ser utilizado pela via oral e fornecem perspectivas para a avaliação da eficácia da droga em modelos de infecção com outras espécies relacionadas a leishmaniose tegumentar americana.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v.61, n.7, p.2952-2959, 1993.
- AFZAL, O.; KUMAR, S.; HAIDER, M. R.; ALI, M. R.; KUMAR, R.; JAGGI, M.; BAWA, S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, n. 2015, p. 871-910, 2014.
- AGRAWAL, S.; RAI, M.; SUNDAR, S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. *Journal of postgraduate medicine*, v. 51, n. 5, p. 53-57, 2005.
- ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n.1, p.79-82, 2006.
- ALVAR J., VÉLEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, DEN BOER, M., WHO. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n.5, p. e35671, 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, n. 1, p. 1-9, 2008.
- AMEISEN, J. C.; IDZIOREK, T.; BILLAUT-MULOT, O.; LOYENS, M.; TISSIER, J.P.; POTENTIER, A.; OUAISSI, A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation*, v. 2, n. 4, p. 285-300, 1995.
- ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n.2, p. 95-111, 2014.
- 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.
- ANTINARELLI, L. M.; SOUZA, I. O.; GLANZMANN, N.; ALMEIDA, A. D.; PORCINO, G. N.; VASCONCELOS, E. G.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 171, p.10-16, 2016.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 31, n.2, p. 109-118, 2011.

ARMIJOS, R. X.; WEIGEL, M. M.; CALVOPÍÑA, 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, n.2, p.153-160, 2004.

ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P. X.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J. C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death & Differentiation*, v. 9, n.1, p.65-81, 2002.

ASHUTOSH, SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n.Pt 2, p.143-153, 2007.

AVERSI-FERREIRA, R. A.; GALVÃO, J. D.; DA SILVA, S. F.; CAVALCANTE, G. F.; DA SILVA, E. V.; BHATIA-DEY, N.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Capítulo 5, p. 1-20, 2014.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N.J. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n.2, p. 203-211, 2007.

BAIOCCO, P.; POCE, G.; ALFONSO, S.; COCOZZA, M.; PORRETTA, G.C.; COLOTTI, G.; BIAVA, M.; MORACA, F.; BOTTA, M.; YARDLEY, V.; FIORILLO, A.; LANTELLA, A.; MALATESTA, F.; ILARI, A. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography. *ChemMedChem*, v. 8, n.7, p. 1175-1183, 2009.

BAÑULS, A. L., HIDE, M., PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, v. 1, n. 109, p. 455-458, 2007.

BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; GRIMALDI, GJR.; MOMEM, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n.4, p. 732-734, 1986.

BEATTIE, L., KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cellular Microbiology*, v. 13, n.11, p. 1659-1667, 2011.

BEN SALAH, A.; BUFFET, P. A.; MORIZOT, G.; BEN MASSOUD, N.; ZÂATOUR, A.; BEN ALAYA, N.; HAJ HAMIDA, N. B.; EL AHMADI, Z.; DOWNS, M.T.; SMITH, P. L.; DELLAGI, K.; GRÖGL, M. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2,

randomized, double blind, placebo controlled study. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 5, p. e432, 2009.

BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nature reviews. Molecular cell biology, v. 15, n. 2, p. 135-147, 2014.

BERMAN, J. D.; LEE, L. S. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. The Journal of Parasitology, v. 70, n. 2, p. 220-225, 1984.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. International Journal for Parasitology, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.

BOGDAN, de C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cellular Microbiology, v. 10, n. 6, p. 1221-1234, 2008.

BOMFIM, G.; ANDRADE, B. B.; SANTOS, S.; CLARÊNCIO, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, n. 5, p. 854-859.

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. Cell Death and Differentiation, v. 19, n.9, p. 1561-1570, 2012.

BOYA, P.; GONZALEZ-POLO, R. A.; PONCET, D.; ANDREAU, K.; VIEIRA, H.L.; ROUMIER, T.; PERFETTINI, J. L.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. Oncogene, v. 22, n. 25, p. 3927-3936, 2003.

BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 1, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1791, n.6, p. 540-551, 2009.

BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiology Letters, v. 256, n. 2, p. 209-216, 2016

BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COPPENS, I.; RIGDEN, D. J.; GINGER, M. L.; MICHELS, P. A. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 177, n.2, p. 83-99, 2011.

BRENNAND, A.; RICO, E.; MICHELS, P. A. M. Autophagy in Trypanosomatids. *Cells*, v. 1, n.3, p. 346-371, 2012.

BRUCHHAUS, I.; ROEDER, T.; RENNENBERG, A.; HEUSSLER, V. T. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends in Parasitology*, v. 23, n.8, p. 376-383, 2007.

BRUN, R.; BLUM, J.; CHAPPUIS, F.; BURRI C. Human African trypanosomiasis. *Lancet*, v. 375, n. 9709, p. 148-159, 2010.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *Journal of Infectious Disease*, v. 179, n. 6, p. 1485-1494, 1999.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRET, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 12, p. 1311-1320, 2001.

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 and Pharmacotherapy*, v. 65, n. 3, p. 204-209, 2011.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 56, n. 4, p. 315-25, 1994.

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 Chemoterapy*, v. 54, n. 12, p. 5344-5351, 2010.

CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; LÓPEZ-MARTÍN, C.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial agents and Chemoterapy*, v. 55, n.9, p. 4204-4210, 2011.

CARVALHO, L.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; PÉREZ-VICTORIA, I.; MANZANO, J. I.; YARDLEY, V.; GAMARRO, F.; PÉREZ-VICTORIA, J. M. The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n.10, p. 6151-6160, 2015.

CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E.M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 301, p. 1-9, 2012.

CASANOVA, M.; GONZALEZ, I. J.; SPRISLER, C.; ZALILA, H.; DACHER, M.; BASMACIYAN, L.; SPÄTH, G. F.; AZAS, N.; FASEL, N. Implication of different domains of the *Leishmania major* metacaspase in cell death and autophagy. *Cell Death and Disease*, v. 6, n. 10, e1933, 2015.

CASTANYS-MUÑOZ, E.; BROWN, E.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* metacaspase is a negative regulator of amastigote proliferation in mammalian cells. *Cell Death e Disease*, v. 3, p. e385, 2012.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO DA SILVA, A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in immunology*, v. 5, n. 480, p. 1-16, 2014.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 152, n. 2, p. 605-611, 1988.

CHARRET, K. S.; LAGROTA-CÂNDIDO, J.; CARVALHO-PINTO, C. E.; HOTTZ, C. F.; LIRA, M. L.; RODRIGUES, R. F.; GOMES, A. O.; BERNARDINO, A. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; LEON, L. L.; AMARAL, V. F. The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. *Experimental Parasitology*, v.133, n.2, p.201-10, 2013.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 416, p. 7-12, 2011.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, n.11, p.:3099-105, 2012.

CH'NG, J. H.; KOTTURI, S. R.; CHONG, A. G.; LEAR, M. J.; TAN, K. S. A programmed cell death pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* has general features of mammalian apoptosis but is mediated by clan CA cysteine proteases. *Cell Death and Disease*, v. 1, n. 2, p. e26, 2010.

COA, J. C.; CASTRILLÓN, W.; CARDONA, W.; CARDA, M.; OSPINA, V.; MUÑOZ, J. A.; VÉLEZ, I. D.; ROBLEDO, S. M. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 101, p. 746-753, 2015.

COIMBRA, E.S.; ANTINARELLI, L.M.; SILVA, N.P.; SOUZA, I.O.; MEINEL, R.S.; ROCHA, M.N.; SOARES, R.P.; DA SILVA, A.D. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chemical-biology Interactions*, v. 260, p. 50-57, 2016.

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 antileishmanial 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, n. 12, p. 2548-2555, 2010.

COSTA DUARTE, M.; DOS REIS LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; MESQUITA, J. T.; SALLES, B. C.; LAVORATO, S. N.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; ALVES, R. J.; TAVARES, C. A.; TEMPONE, A. G.; COELHO, E. A. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 217, p. 81-88, 2016.

COSTA DUARTE, M.; LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; CARVALHO, A. M.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; TAVARES, C. A.; ALVES, R. J.; BARICHELLO, J. M.; COELHO, E. A. Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. *Parasitology International*, v. 65, n. 6 Pt A, p. 728-736, 2016.

COSTA, J. M.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; NETTO, E. M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHÃES, A. V.; BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n.6, p. 319-323, 1986.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 89, n. 2, p. 149-159, 1997.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*, v. 19, n.11, 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, n. Suppl 1, p.S4-8, 2006.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W.; CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, v. 36, n. 16, p. 2633-2636, 1987.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection*, v. 17, n.10, p. 1478-1783, 2011.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current Scenario of Drug Development for Leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROFT, S. L., SUNDAR, S., FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p.111-126, 2006.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. Suppl 1, p. S127-S129, 2002.

CRUZ, A. K.; DE TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; KYLE, D. E.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. *Current drug targets*, v. 10, n.3, p. 178-192, 2009.

CUPOLILO, S. M.; SOUZA, C. S.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; GONCALVES DA COSTA, S. C. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histology and Histopathology*, v.18, n. 4, p. 1059-1065, 2003.

DA CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PACIENZA-LIMA, W.; RIBEIRO, G. A.; NETTO, C.D.; DO CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A. J.; COSTA, P. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; TORRES-SANTOS, E. C. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 66, n. 7, p.1555-1559, 2011.

DA CUNHA-JUNIOR, E.F. 2015. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências). Estudos pré-clínicos da pterocarpanoquinona LQB-118: toxicidade subaguda, eficácia em leishmaniose visceral experimental e mecanismo de ação. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DARDARI, Z., LEMRANI, M., BAHLOUL, A., SEBBAN, A., HASSAR, M., KITANE, S., BERRADA, M.,BOUDOUMA, M. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinolinederivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline:preliminary study. *Farmaco*, v. 59, p. 195-199, 2004.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Public Health*, v. 1, n. 165, p. 1-6, 2014.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE. N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *Journal of Infectious Disease*, v. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A.; MELO, R. C. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

DAWSON, P. A.; COCHRAN, D. A.; EMMERSON, B. T.; GORDON, R. B. Inhibition of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase mRNA by antisense oligodeoxynucleotide sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 60, n. 1, p. 153-156, 1993.

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 and Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 5, p. 977-984, 2000.

DEBRABANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 3, p. 257-267, 2003.

DE MACEDO-SILVA, S. T.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*, v. 8, n.12, p. e83247, 2013.

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, n. 22, p. 5427-5432, 2004.

DE MENEZES, J. P.; GUEDES, C. E.; PETERSEN, A. L.; FRAGA, D. B.; VERAS, P. S. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *BioMed research international*, v. 2015, p. 1-11, 2015.

DE MORAIS, C. G.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A.; DUTRA, P. M. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *BioMed research international*, v. 2015, p. 1-19, 2015.

DE MOURA, T. R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKY, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, v. 73, n.9, p. 5827-5834, 2005.

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, n. 7, p. e1253, 2011.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

DEN BOER, M.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clinical microbiology and infectious*, v. 17, n.10, p. 1471-1477, 2011.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical Journal*, v. 381, n. Pt 2, p. 405-412, 2004.

DEPONTE, M. Programmed cell death in protists. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1783, n. 7, p.1396-405, 2008.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 145, p. 1-9, 2012.

DERAY G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 49, n. Suppl 1, p. 37-41, 2002.

DE RYCKER, M.; HALLYBURTON, I.; THOMAS, J.; CAMPBELL, L.; WYLLIE, S.; JOSHI, D.; CAMERON, S.; GILBERT, I. H.; WYATT, P. G.; FREARSON, J. A.; FAIRLAMB, A. H.; GRAY, D. W. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n.7, p. 2913-2922, 2013.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

DE VRIES, H. J., REEDIJK, S. H., SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

DIETZE R.; CARVALHO S. F. G.; VALLI L. C.; BERMAN J.; BREWER T.; MILHOUS, W.; SANCHEZ J.; SCHUSTER, B.; GROGL, M. Phase II trial of WR6026, an orally administrated 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 6, p. 685-689, 2001.

DI MUCCIO, T.; SCALONE, A.; BRUNO, A.; MARANGI, M.; GRANDE, R.; ARMIGNACCO, O.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0129418, 2015.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DORLO, T. P.; VAN THIEL, P. P.; HUITEMA, A. D.; KEIZER, R. J.; DE VRIES, H. J.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, v. 52, n.8, p. 2855-2860, 2008.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 9, p. 432-439, 2009.

DUEÑAS-ROMERO, A. M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, n. 2, p. 246-252, 2007.

DUSZENKO, M.; FIGARELLA, K.; MACLEOD, E. T.; WELBURN, S. C. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends in parasitology*, v. 22, n. 11, p. 536-542, 2006.

DUSZENKO, M.; GINGER, M. L.; BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COLOMBO, M. I.; COOMBS, G. H.; COPPENS, I.; JAYABALASINGHAM, B.; LANGSLEY, G.; DE CASTRO, S. L.; MENNA-BARRETO, R.; MOTTRAM, J. C.; NAVARRO, M.; RIGDEN, D. J.; ROMANO, P. S.; STOKA, V.; TURK, B.; MICHELS, P. A. Autophagy, v. 7, n. 2, p. 127-158, 2011.

EL-HANI, C. N.; BORGES, V. M.; WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Frontiers in cellular and infectious microbiology*, v. 2, n. 96, p. 1-6, 2012.

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 American Academy of Dermatology*, v. 27, n. 2 Pt 1, p. 227-231, 1992.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 24, n. 3, p. 335-340, 2010.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

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 and Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 23, p. 5013-5023, 2003.

FERREIRA-VASCONCELLOS, E.C.; PIMENTEL, M.I.; VALETE-ROSALINO, C.M.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O. Resolution of cutaneous leishmaniasis after acute eczema due to intralesional meglumine antimoniate. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 56, n.4, p. 361-362, 2014.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, v. 22, n. 3, p. 377-388, 2015.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, e0004442, 2016.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; FUENTES, S.; TORRES, S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; MAHIOU, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, n.11, p. 2447-2451, 1996.

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-JUNIOR, 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. 28, n. 2, p11-19, 2009.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

FULDA, S.; AGORMAN, A.M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, v. 10, n. 214074, p. 1-23, 2010.

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.

GALLUZZI, L. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*, v. 16, n. 8, p. 1093-1107, 2009.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; TROJEL-HANSEN, C.; KROEMER, G. Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death, *Circulation research*, v. 111, n. 9, p.1198-1207, 2012.

GAMBOA-LEON, R.; VERA-KU, M.; PERAZA-SANCHEZ, S. R.; KU-CHULIM, C.; HORTA-BAAS, A.; ROSADO-VALLADO, M. Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice. *Parasite*. v. 21, n.15, p. 1-7, 2014.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, n. 95, p. 1-9, 2012.

GARNIER, T.; BROWN, M. B.; LAWRENCE, M. J.; CROFT, S. L. In-vitro and in-vivo studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. *The journal of pharmacology and pharmacology*, v. 58, n. 8, p. 1043-1054, 2006.

GEHRKE, S. S.; PINTO, E. G.; STEVERDING, D.; PLEBAN, K.; TEMPONE, A. G.; HIDER, R. C.; WAGNER, G. K. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 805-813, 2013.

GEIGER, A.; BOSSARD, G.; SERENO, D.; PISSARRA, J.; LEMESRE, J. L.; VINCENDEAU, P.; HOLZMULLER, P. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 212, p.1-21, 2016.

GLANS, L.; HU, W.; JÖST, C.; DE KOCK, C.; SMITH, P. J.; HAUKKA, M.; BRUHN, H.; SCHATZSCHNEIDER, U.; NORDLANDER, E. Synthesis and biological activity of cymantrene and cyrhetrene 4-aminoquinoline conjugates against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. *Dalton Transactions*, v. 41, n. 21, p. 6443-6350, 2012.

GODINHO, J. L.; GEORGIKOPOULOU, K.; CALOGEROPOULOU, T.; DE SOUZA, W, RODRIGUES, J. C. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 153-165, 2013.

GOLLOB, K.J.; ANTONELLI, L. R.; FARIA, D. R.; KEESEN, T. S.; DUTRA, W. O. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*, v. 8, n.10, p.1338-1343, 2008.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 8, p. 367-376, 2014.

GOMES-SILVA, A.; DE CÁSSIA BITTAR, R.; DOS SANTOS NOGUEIRA, R.; AMATO, V.S.; DA SILVA MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology*, v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.

GONÇALVES, G. S.; FERNANDES, A. P.; SOUZA, R. C. C.; CARDOSO, J. E.; SILVA, F. O.; MACIEL, F. C.; RABELLO, A.; FERREIRA, L. A. M. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*, v. 93, n. 2), p. 161-167, 2005.

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. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 8, n.4, p. 419-433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S., OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 30, p. 31010-31017, 2004.

GRAVES, P. R.; KWIEK, J.J.; FADDEN, P.; RAY, R.; HARDEMAN, K.; COLEY, A. M.; FOLEY, M.; HAYSTEAD, T. A. Discovery of novel targets of quinoline drugs in the human purine binding proteome. *Molecular Pharmacology*, v. 62, n. 6, p. 1364-1372, 2002.

GSK. Glaxo Smith Kline's Sitamaquine for Leishmaniasis [Internet]. 2016 [acessado em 01/10/2016. Disponível em: <http://www.globalhealthprogress.org/programs/glaxosmithklinessitamaquine-Leishmaniasis>.

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, n.12, p. 5071-5079, 2009.

GUIMARÃES, A.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *European journal of biochemistry*, v. 1, n. 9, p. 1638-1650, 2004.

GUPTA, S., NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian Journal of Medicinal Research*, v. 133, n. 1, p. 27-39, 2011.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*, v. 2011, p. 1-23.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HARTSEL, S.; BOLARD, J. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends in pharmacology sciences*, v. 17, n. 12, p. 445-449, 1996.

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry, *Methods*, v. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.

HERRERA, L.; STEPHENS, D. E.; D'AVILA, A.; GEORGE, K. G.; ARMAN, H.; ZHANG, Y.; PERRY, G.; LLEONART, R.; LARIONOV, O. V.; FERNÁNDEZ, P. L. Insights into the structural patterns of the antileishmanial activity of bi- and tricyclic N-heterocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 14, n.29, p. 7053-7060, 2016.

HILGARD, P., KLENNER, T., STEKAR, J., UNGER, C. Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 32, n. 2, p. 90-95, 1993.

HOLZER, T. R.; MCMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 146, p.198–218, 2006.

HORTA, M. F.; MENDES, B. P.; ROMA, E. H.; NORONHA, F. S.; MACÊDO, J. P.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, M. M.; VIEIRA, L. Q. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitology research*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

HUSSAINI, S. M. Therapeutic significance of quinolines: a patent review (2013-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 26, n.10, p. 1201-1221, 2016.

IMBERT, L.; RAMOS, R.G.; LIBONG, D.; ABREU, S.; LOISEAU, P.M.; CHAMINADE, P. Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 3, p. 1169-1182, 2012.

JAIN, K., JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 23-24, p. 1272-1281, 2013.

JHA, T. K.; 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, n. 6, p. 1005-1011, 2005.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 164, n. 2, p. 111-117, 2009.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasites and Vectors*, v. 3, n. 104, p. 1-15, 2010.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites and vectors*, v. 4, n. 44, p. 1-8, 2011.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1765-1773, 2000.

KAUR, K.; JAIN, M.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; SINGH, S.; SINGH, P. P.; JAIN, R. Synthesis, Antiprotozoal, Antimicrobial, β -Hematin Inhibition, Cytotoxicity and Methemoglobin (MetHb) Formation Activities of Bis(8-aminoquinolines). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 1, 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, n. 8, p. 3245-3264, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, v. 9, n.8, p. 604-615, 2011.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatologic clinics*, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KHAN, M.K.; RASHEED, M.; ZIA-ULLAH; HAYAT, S.; KAUKAB, F.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN; PERVEEN, S. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 7, p.1381-1387, 2003.

KHAN, I. Yasmin, R.; SIDIQUI, I. Chloroquine in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, v. 17, n. 2, p. 95-100, 2007.

KIEL, J.A. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v. 365, n. 1541, p. 819-830, 2010.

KINNAMON, K.E.; POON, B.T.; HANSON, W.L.; WAITS, V.B. Primaquine analogues that are potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents in a mouse model. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 90, n. 5, p. 467-74, 1996.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 10, p.1443-74, 2012.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S ; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Cell Death and differentiation, v.16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical and translation immunology*, v. 3, n.3, p. e13, 2014.

KUMAR, P.; NARASIMHAN, B. Hydrazides/hydrazones as antimicrobial and anticancer agents in the new millennium. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.13, n.7, p. 971-87, 2013.

KUMAR, S.; BAWA, S.; GUPTA, H. Biological activities of quinoline derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 14, p. 1648-1654, 2009.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n.4, p. 702-703, 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 60, p. 17-28, 2013.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; MARTINS, S. C.; RIBEIRO, F. M.; UD DIN, Z.; RODRIGUES-FILHO, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA SILVA, S. Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 2, p. 890-903, 2015.

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H.L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation*, v. 1, n. 9, p. 53–64, 2002.

LEE, S. J.; ZHANG, J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, n. 2013, p. 327167, 2012.

LEROUX, A. E.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 206, n. 1-2, p. 67-74, 2016.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIRA, R., CONTRERAS, L. M., RITA, R. M., URBINA, J. A. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 5, p. 537-546, 2001.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, n. 83, p. 1-8, 2012.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, v. 10, p. 643-649, 1964.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology*, v. 114, n. 3, p. 256-265, 2005.

LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 6, n.5, p. 539-550, 2006.

LOISEAU, P. M.; COJEAN, S.; SCHRÉVEL J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite*, v. 18, n. 2, p. 115-119, 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 Chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 4030-4036, 2008.

LÜDER, C. G.; CAMPOS-SALINAS, J.; GONZALEZ-REY, E.; VAN ZANDBERGEN, G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasites and vectors*, v. 3, n. 116, p. 1-11, 2010.

LUKES, J.; HASHIMI, H.; ZÍKOVÁ, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*, v. 48, n. 5, p. 277-299, 2005.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, p. 1327-1332, 2007.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 111, n. 1, p. 1-14, 2000.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. 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 diseases*, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MAIURI, M. C.; ZALCKVAR, E.; KIMCHI, A.; KROEMER, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 9, p. 741-752, 2007.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-8, 2010.

MANDAL, G.; MANDAL, S.; SHARMA, M.; CHARRET, K. S.; PAPADOPOULOU, B.; BHATTACHARJEE, H.; MUKHOPADHYAY, R. Species-specific antimonial sensitivity in *Leishmania* is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 2, p. e0003500, 2015.

MARINHO, F. DE 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, n. 4, p. 507-509, 2011.

MARTINEZ, M. M.; REIF, R. D.; PAPPAS, D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, v. 2, p. 996-1004, 2010.

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, n. 8, p. 368-375, 2007.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology*, v. 65, p. 543-561, 2011.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n.12, p. 11798-11813, 2004.

MEHTA, S. R.; HUANG, R.; YANG, M.; ZHANG, X. Q.; KOLLI, B.; CHANG, K. P.; HOFFMAN, R. M.; GOTO, Y.; BADARO, R.; SCHOOLEY, R. T. Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of a murine leishmaniasis model as a new tool for *Leishmania* vaccine and drug discovery. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 12, p. 1764-1770, 2008.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 15, n. 5, p. 485-490, 2002.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 7, p. e1002729, 2012.

MENDONÇA, M. G.; DE BRITO, M. E.; RODRIGUES, E. H.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *The Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n.6, p.1018-1023, 2004.

MENNA-BARRETO, R. F.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; SANTA-RITA, R. M.; SOARES, M. J.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron*, v. 40, n.2009, p. 157-168, 2009.

MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-14, 2014.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ULIANA, S. R. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 6, p. e249, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2^o edição atualizada, p. 1-183, 2013.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 5, n. 3, 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, n. 2, p. 81-90, 2009.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current medicinal chemistry*, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy The international journal of biochemical and cell biology, v. 36, n. 12, p. 2491-2502, 2004.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. Tropical Parasitology, v. 4, n.1, p. 4-9, 2014.

MONTRIEUX, E.; PERERA, W. H.; GARCÍA, M.; MAES, L.; COS, P.; MONZOTE, L. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. Parasitology Research, v. 113, n. 8, p. 2925–2932, 2014.

MORAIS-TEIXEIRA, E. D.; 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, n. 4, p. 475-478, 2011.

MOUSCADET, J. F.; DESMAËLE, D. Chemistry and structure-activity relationship of the styrylquinoline-type HIV integrase inhibitors. Molecules, v.15, n. 5, p. 3048-3078, 2010.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SAHANI, M. H.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 145, n.1, p.1-10, 2006.

MUKHERJEE, S.; PAL, M. Quinolines: a new hope against inflammation. Drug Discovery Today, v. 18, n. 7-8, p. 389-398, 2013.

MUKHOPADHYAY, R.; DEY, S.; XU, N.; GAGE, D.; LIGHTBODY, J.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B.P. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 93, n. 3, p. 10383-10387, 1993.

MUNOZ, C.; ALZOUBI, K.; JACOBI, J.; ABED, M; LANG, F. Effect of miltefosine on erythrocytes. Toxicology in Vitro, v. 27, n. 6, p. 1913-1919, 2013.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. Cellular Microbiology, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NAGLE, A.S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B., SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. Chemical Reviews, v. 114, n. 22, p.11305–11347, 2014.

NEAL, R. A.; ALLEN, S.; MCCOY, N.; OLLIARO, P.; CROFT, S. L. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. The journal of antimicrobial chemotherapy, v. 35, n. 5, p. 577-584, 1995.

NGUEWA, P. A.; FUERTES, M. A.; CEPEDA, V.; IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; VALLADARES, B.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Pentamidine is an antiparasitic and

apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. *Chemistry & Biodiversity*, v. 2, n. 10, p.1387-1400, 2005.

NOOR, S. M.; KHAN, M. M., HUSSAIN, D. Intralesional chloroquine in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, v.15, p. 18-21, 2005.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in Immunopathology*, v. 37, n.3, p. 251-259, 2015.

OLIVEIRA, F., BAFICA, A., ROSATO, A. B., FAVALI, C. B., COSTA, J. M., CAFE, V., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 1, p. 70-73, 2011.

OLIVEIRA, J. C.; DA SILVA, A. C.; OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, V. R.; GIL, L. H. In vivo near-infrared fluorescence imaging of *Leishmania amazonensis* expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice. *Journal of Microbiological Methods*, v. 130, p.189-195, 2016.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M.; DA COSTA, S.C.; PIRMEZ, C. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazilian area of *Leishmania* (V.) *braziliensis* transmission. *International Journal of Dermatology*, v. 36, n.6, p. 463-468, 1997.

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B, K. 4-Aminoquinolines--past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 77, n. 1, p. 29-58, 1998.

OPS-Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. Washington (DC): 2013. Disponível em: <http://www.paho.org/hq>. Acesso em: 02 de novembro de 2016.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n.10, p. 925-932, 2016.

PAL, C.; BANDYOPADHYAY, U. Redox-Active Antiparasitic Drugs. Antioxidants and redox signaling, v. 17, n. 4, p. 555-582, 2012.

PALIT, P.; HAZRA, A.; MAITY, A.; VIJAYAN, R. S.; MANOHARAN, P.; BANERJEE, S.; MONDAL, N. B.; GHOSHAL, N.; ALI, N. Discovery of safe and orally effective 4-aminoquinoline analogues as apoptotic inducers with activity against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 432-445, 2012.

PALOQUE, L.; VERHAEGHE, P.; CASANOVA, M.; CASTERA-DUCROS, C.; DUMÈTRE, A.; MBATCHI, L.; HUTTER, S.; KRAIEM-M'RABET, M.; LAGET, M.; REMUSAT, V.; RAULT, S.; RATHELOT, P.; AZAS, N.; VANELLE, P. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 75-86, 2012.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n.3, p. 852-859, 2004.

PEIXOTO, M. P.; BEVERLEY, S. M. In vitro activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 31, n.10, p.1575-1578, 1987.

PETERS, N.C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; MCCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815, 1992.

PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; TAKIYA, C. M.; CÔRTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 2, p. 181-190, 2009.

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

POLONINI, H. C.; DIAS, R. M.; SOUZA, I. O.; GONÇALVES, K. M.; GOMES, T. B.; RAPOSO, N. R.; DA SILVA, A. D. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 16, p. 4506-4510, 2013.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 58-66, 2013.

QUEIROZ, D. P.; CAROLLO, C. A.; KADRI, M. C.; RIZK, Y. S.; ARAUJO, V. C.; MONTEIRO, P. E.; RODRIGUES, P. O.; OSHIRO, E. T.; MATOS, M DE F.; ARRUDA, C.C. *In vivo* antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from *Selaginella sellowii*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.111, n.3, p.147-154, 2016.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 8, p. 958-968, 2015.

RAMOS, H.; VALDIVIESO, E.; GAMARGO, M.; DAGGER, F.; COHEN, B. E. Amphotericin B kills unicellular leishmania by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of Membrane Biology*, v.152, n.1, p.65-75, 1996.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, v. 58, p. 227-250, 2013.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 3, n. 6, p.147-154, 2014.

REGUERA, R. M.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ÁLVAREZ-VELILLA, R., BALAÑA-FOUCE, R. Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 3, p. 355-357, 2014.

REIMÃO, J. Q.; TRINCONI, C. T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; KALIL, S. P.; ULIANA, S. R. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *Journal of Microbiological Methods*, v. 93, n. 2, p. 95-101, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 14, n.4, p.447-455, 2010.

ROCHA, M. N.; CORRÊA, C. M.; MELO, M. N.; BEVERLEY, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; MADUREIRA, A. P.; SOARES, A. P. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 75, n. 3, p. 282-291, 2013.

ROCHA, V. P.; NONATO, F. R.; GUIMARÃES, E. T.; RODRIGUES DE FREITAS, L. A.; SOARES, M. B. Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. Pt 7, p. 1001-1010, 2013.

RODRIGUES, J. C.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 487-499, 2002.

RODRIGUES, J. C.; DE SOUZA, W. Ultrastructural Alterations in Organelles of Parasitic Protozoa Induced by Different Classes of Metabolic Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n. 9, p. 925-938, 2008.

RODRIGUES, J. C.; GODINHO, J. L.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Sub-cellular biochemistry*, v. 74, p. 1-42, 2014.

RODRIGUES, J. C.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v.111, n. 4, p. 230-238, 2005.

RODRIGUES, J. C. F.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v. 23, n. 1, p. 87-98, 2006.

RODRIGUEZ-PINTO, D.; SARAIVA, N.G.; MCMAHON-PRATT, D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *BMC infectious Disease*, v. 14, n. 108, p. 1-13.

RONET, C.; BEVERLEY, S. M.; FASEL, N. Mucocutaneous leishmaniasis and an undesired passenger. *Medecine sciences*, v. 27, n. 11, p. 924-926, 2011.

ROSSI-BERGMANN, B.; PACIENZA-LIMA, W.; MARCATO, P. D.; DE CONTI, R.; DURÁN, N. Therapeutic Potential of Biogenic Silver Nanoparticles in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Nano Research*, v. 20, p. 89-97, 2012.

ROSTAMIAN, M.; SOHRABI, S.; KAVOSIFARD, H.; NIKNAM, H. M. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 2015, S1684-1182, 2015.

ROY, A.; GANGULY, A.; BOSEDASGUPTA, S.; DAS, B.B.; PAL, C.; JAISANKAR, P.; MAJUMDER, H;K. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology*, v. 74, n. 5, p. 1292-1307, 2008.

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, n. 6, p. 73-87, 2012.

RUBINSZTEIN, D. C.; GESTWICKI, J. E.; MURPHY, L. O.; KLIONSKY, D. J. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 6, n. 4, p. 304-312, 2007.

SAHU, N.P.; PAL, C.; MANDAL, N. B.; BANERJEE, S.; RAHA, M.; KUNDU, A.P.; BASU, A.; 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, n. 6, p. 1687-93, 2002.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 53, n. 1, p. 8-16, 2016.

SALMANPOUR, R.; RAZMAVAR, M. R.; ABTAHI, N. Comparison of intralesional meglumine antimoniate, cryotherapy and their combination in the treatment of

cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*, v. 45, n. 9, p. 1115-1116, 2006.

SANTA-RITA, R. M.; LIRA, R.; BARBOSA, H. S.; URBINA, J. A.; DE CASTRO, S. L. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 780-784, 2005.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 10, p. 466-469, 2010.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, v. 138, n. 4, p. 405-425, 2011.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, v.16, n. 9, p. 581-92, 2016.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs, *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

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

SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. *Current Pharmaceutical design*, v.14, n. 9, p. 839-846, 2008.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SEYED, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Post-Genomics and Vaccine Improvement for *Leishmania*. *Frontiers in Microbiology* *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 467, p. 1-13, 2016.

SHADAB, M.; JHA, B.; ASAD, M.; DEEPTHI, M.; KAMRAN, M.; ALI, N. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLoS One*, v.12, n. 2, p. e0171306, 2017.

SHAHA C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *The indian journal of medical research*, v. 123, n. 3, p. 233-244, 2006.

SHAKYA, N.; BAJPAI, P.; GUPTA, S. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. *Journal of parasitic diseases*, v. 35, n. 2, p. 104-112, 2011.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Disease*, v. 45, n. 4, p. 255-272, 2008.

SHARMA, R.; PANDEY, A. K.; SHIVAHARE, R.; SRIVASTAVA, K.; GUPTA, S.; CHAUHAN, P. M. Triazino indole-quinoline hybrid: a novel approach to antileishmanial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 1, p. 298-301, 2014.

SHERAMOVA, I. V. Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 155, n. 4, p. 341-353, 2010.

SCHÖN, M.; SCHÖN, M. P. Imiquimod: mode of action. *The British Journal of Dermatology*, v. 157, n. Suppl 2, p. 8-13, 2007.

SHUKLA, A. K.; SINGH, B. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 8, p. 2208-2218, 2010.

SICA, V.; GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; IZZO, V.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. Organelle-Specific Initiation of Autophagy. *Molecular Cell*, v. 59, n. 4, p. 522-539, 2015.

SILVA, R. E.; TOLEDO, A. JÚNIOR.; SENNA, M. C.; RABELLO, A.; COTA, G. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. 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, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; DE SOUZA, A. A.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. R. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) Lainsoni* in Pará State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 6, p. 735-738, 1991.

SINHA, P. K., BHATTACHARYA, S. Single-dose liposomal amphotericin B: an effective treatment for visceral leishmaniasis. *The Lancet Global Health*, v. 2, n. 1, p. e7-8, 2014.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. *Parasite and Vectors*, v. 7, n. 596, p. 1-11, 2014.

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, n. 6, p. 485-497, 2012.

SINGH, K.; GARG, G.; ALI, V. Current therapeutics, their problems and thiol metabolism as potential drug targets in leishmaniasis. *Current Drug Metabolism*, 2016.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy*, v. 10, n. 6, 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, n. 5, p. e675, 2010.

SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; JIMÉNEZ-RUIZ, A., SCOUlica, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell Death. *Parasites and Vectors*, v. 3, n. 107, p. 1-15, 2010.

SMITH, D. A.; JONES, R. M. The sulfonamide group as a structural alert: A distorted story? *Current opinion in drug discovery & development*, v. 11, n. 1, p. 72-79, 2008.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOARES, R. R.; ANTINARELLI, L. M. R.; SOUZA, I. S.; LOPES, F. V.; SCOPEL, K. K. G, COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; ABRAMO, C. *In Vivo* Antimalarial and *In Vitro* Antileishmanial Activity of 4- Aminoquinoline Derivatives Hybridized to Isoniazid or Sulfa or Hydrazine Groups. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 14, p. 1-8, 2017.

SOARES, R. R.; SILVA, J. M. F.; CARLOS, B. C.; FONSECA, C. C.; SOUZA, L. S. A.; LOPES, F. V.; DIAS, R. M. P.; MOREIRA, P. O. L.; ABRAMO, C.; VIANA, G. H. R.; VAROTTI, F. P.; SILVA, A. D.; SCOPEL, K. K. G. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 11, p. 2308-2313, 2015.

SOLA, I.; CASTELLÀ, S.; VIAYNA, E.; GALDEANO, C.; TAYLOR, M.C.; GBEDEMA, S.Y.; PÉREZ, B.; CLOS, M. V.; JONES, D.C.; FAIRLAMB, A.H.; WRIGHT, C.W.; KELLY, J.M.; MUÑOZ-TORRERO, D. Synthesis, biological profiling and mechanistic studies of 4-aminoquinoline-based heterodimeric compounds with dual trypanocidal-

antiplasmodial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 16, p. 5156-5167, 2015.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious diseases*, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R.S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical Infectious diseases*, v. 33, n. 7, p. E57-61, 2001.

SRIVASTAVA, V.; LEE, H. Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel chemotherapeutic agents. *European Journal of Pharmacology*, v. 762, p. 472-86, 2015.

STAUCH, A.; DUERR, H. P.; DUJARDIN, J. C.; VANAERSCHOT, M.; SUNDAR, S.; EICHNER, M. Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony resistant *L. donovani* in Bihar, India. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 6, n. 12, p. e1973, 2013.

SÜLSEN, V. P.; FRANK, F. M.; CAZORLA, S. I.; BARRERA, P.; FREIXA, B.; VILA, R.; SOSA, M. A.; MALCHIODI, E. L.; MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 6, p. 536-543, 2011.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *The new england journal of medicine*, v. 347, n. 22, p.1739-1746, 2005.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

TAYLOR-BROWN, E.; HURD, H. The first suicides: a legacy inherited by parasitic protozoans from prokaryote ancestors. *Parasite and Vectors*, v. 6, n. 108, p. 1-14, 2013.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA P. F.; DE SOUZA, W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Current Opinion Infectious Disease*, v. 19, n. 6, p. 623-631, 2006.

TEMPONE, A. G.; DE OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, v. 77, n. 6, p. 572-585, 2011.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitology*, v.149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

TOMÁS, A.; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 19, n. 7, p. 696-707, 2013.

TOTINO, P. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; CORTE-REAL, S.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Experimental Parasitology*, v. 118, n. 4, p. 478-486, 2008.

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKOVA, P. V. Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, 2011.

VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; RAMÍREZ, L.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, P. S.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; RIBEIRO, T. G.; RÉGIS, W. C.; SOTO, M.; FERNANDES, A. P.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei Murill* against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, v. 111, n. 4, 1807-1816, 2012

VALE-COSTA, S.; COSTA-GOUVEIA, J.; PÉREZ, B.; SILVA, T.; TEIXEIRA, C.; GOMES, P.; GOMES, M. S. N-cinnamoylated aminoquinolines as promising antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n.10, p. 5112-5115, 2013.

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 and Medicine*, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VAN BOCXLAER, K.; YARDLEY, V.; MURDAN, S.; CROFT, S. L. Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, n. 7, p. 862-72, 2016.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 10, p. 700-714, 2010.

VANGAPANDU, S.; JAIN, M.; JAIN, R.; KAUR, S.; SINGH, P. P. Ring-substituted quinolines as potential anti-tuberculosis agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 10, p. 2501-2508, 2004.

VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J. A.; MARTINY, A.; NEVES, A.; DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 337-346, 1995.

VARELA, M. R.; MUNOZ, D. L.; ROBLEDO, S. M.; KOLLI, B. K.; DUTTA, S.; CHANG, K. P.; MUSKUS, C. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Experimental Parasitology*, v. 122, n. 2, p. 134-139, 2009.

VASCONCELLOS, E. C.; PIMENTEL, M. I.; SCHUBACH, A. O.; DE OLIVEIRA, R. V.; AZEREDO-COUTINHO, R. B.; SILVA, F. C.; SALGUEIRO, M DE M.; MOREIRA, J.S.; MADEIRA, M DE F.; BAPTISTA, C.; VALETE-ROSALINO, C. M. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 2, p. 257-260, 2012.

VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *The Biochemical Journal*, v. 284, n. pt2, p. 463-467, 1992.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

VIANNA G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia*, v. 1, p. 436-438, 1912.

VIEGAS-JUNIOR C, DANUELLO A, DA SILVA BOLZANI V, BARREIRO EJ, FRAGA CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 17, p.1829-1852, 2007.

VOLF, P.; HOSTOMSKA, J.; ROHOUSOVA, I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, v.15, n. 3, p. 237-243, 2008.

WANDERLEY, J. L.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M. E.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 38, n. 6, p. 807-812, 2005.

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *Journal of Immunology*, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006.

WANDERLEY, J.L.; PINTO DA SILVA, L.H.; DEOLINDO, P.; SOONG, L.; BORGES, V. M.; PRATES, D. B.; DE SOUZA, A. P.; BARRAL, A.; BALANCO, J. M.; DO NASCIMENTO, M. T.; SARAIVA, E. M.; BARCINSKI, M. A. Cooperation between

apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. PLoS One. v. 4, n. 5, p. e5733, 2009.

WANDERLEY, J. L.; THORPE, P. E.; BARCINSKI, M. A.; SOONG, L. Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. Parasite Immunology, v. 35, n. 3-4, p. 109-119, 2013.

WASUNNA, M. K., RHASHID, 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 treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 73, n. 5, p. 871-876, 2005.

WHO, 2015. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. p. 1-317, 2015. Acesso em: 01 de novembro de 2016.

WHO, 2016. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 01 de novembro de 2016.

WHO, 2016. Recommended treatment regimens for New World cutaneous Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/research/> Acesso em 28 de outubro de 2016.

WILLIAMS, R. A.; SMITH, T. K.; CULL, B.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. PLoS pathogens, v. 8, n. 5, p. e1002695, 2012.

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, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrobial Agents and chemotherapy, v. 41, n. 4, p. 752-456, 1987.

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, n. 2, p. 272-275, 2005.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. News in Physiological Sciences, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZHANG, Y.; LIAO, Z.; ZHANG, L. J.; XIAO, H. T. The utility of chloroquine in cancer therapy. Current Medical Research and Opinion, v. 31, n. 5, p. 1009-1013, 2015.

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 and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 686-695, 2007.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes and Development*, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006.

APÊNDICES: Artigos publicados

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 545038, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/545038>



Research Article

HPLC-DAD Analysis, Antileishmanial, Antiproliferative, and Antibacterial Activities of *Lacistema pubescens*: An Amazonian Medicinal Plant

Josiane Mello da Silva,¹ Luciana Maria Ribeiro Antinarelli,²
Nícolas de Castro Campos Pinto,¹ Elaine Soares Coimbra,²
Elaine Maria de Souza-Fagundes,³ Antônia Ribeiro,¹ and Elita Scio¹

¹ Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

² Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

³ Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Elita Scio; elita.scio@ufjf.edu.br

Received 13 February 2014; Revised 27 June 2014; Accepted 17 July 2014; Published 7 August 2014

Academic Editor: Fátima Ribeiro-Dias

Copyright © 2014 Josiane Mello da Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Species of the genus *Lacistema* are traditionally used by Brazilian and Peruvian indigenous communities. The present study investigated the *in vitro* antileishmanial activity against several *Leishmania* species, cytotoxicity in murine peritoneal macrophages, antiproliferative activity against HL60 and Jurkat cells, and antibacterial activities against seven bacteria strains of the aerial parts of the methanolic crude extract and fractions of *Lacistema pubescens*. In addition, their chemical profile was also evaluated. Hexane fraction showed the most significant IC₅₀ values against all promastigotes of *Leishmania* species tested, except for *L. chagasi* (IC₅₀ = 4.2 µg/mL for *L. major* and IC₅₀ = 3.5 µg/mL for *L. amazonensis*). This fraction also exhibited a strong activity against amastigotes of *L. amazonensis* (IC₅₀ = 6.9 µg/mL). The antiproliferative activity was also observed for methanolic extract and hexane fraction with IC₅₀ = 47.2 µg/mL and IC₅₀ = 39.7 µg/mL for HL60, respectively. Regarding the antimicrobial activity, the overall antibacterial activity was not very significative. Phytol and sitosterol were identified in the methanolic extract. Additionally, previous studies also revealed the presence of those compounds in the hexane fraction. Among other compounds, phytol and sitosterol were probably involved in the antileishmanial and cytotoxicity activities observed in this study.



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2015) 87(2): 733-742
 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
 Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140288>
www.scielo.br/aabc

Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*

LUCIANA M.R. ANTINARELLI¹, NÍCOLAS C. PINTO²,
 ELITA SCIO² and ELAINE S. COIMBRA¹

¹Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/ICB,
 Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário,
 Bairro São Pedro, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brasil

²Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica/ICB,
 Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário,
 Bairro São Pedro, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brasil

Manuscript received on June 11, 2014; accepted for publication on September 6, 2014

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by *Leishmania* protozoa which treatment is restricted to a limited number of drugs that exhibit high toxicity, collateral effects and are often costly. There are a variety of tropical plants distributed in Brazil, and for many poor people the therapy for several diseases is based mainly on the use of traditional herbal remedies. In this work, the cytotoxic activity of 17 plant methanol extracts was evaluated on several *Leishmania* species and murine macrophages. Among them, the extract of *Casearia sylvestris*, *Piptocarpha macropoda*, *Trembleya parviflora*, *Samanea tubulosa* and *Plectranthus neochilus* showed a promising leishmanicidal activity, exhibiting IC₅₀ values below of 20 µg/mL against at least one species of *Leishmania*. *Casearia sylvestris* showed the most expressive activity against all promastigote forms of *Leishmania* species (IC₅₀ values of 5.4 µg/mL, 5.0 µg/mL, 8.5 µg/mL and 7.7 µg/mL for *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* and *L. major*, respectively), being more effective than the reference drug miltefosine. In spite of the cytotoxic effect on macrophages (CC₅₀ value of 5.2 µg/mL), *C. sylvestris* exhibited a strong inhibition against intracellular amastigotes of *L. braziliensis* (IC₅₀ value of 1.3 µg/mL). Further studies, including bio-guided fractionation will be conducted to identify the active compounds.

Key words: Brazil, *Casearia sylvestris*, leishmanicidal activity, medicinal plants, natural products.



Full length article

The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction



Josiane Mello da Silva^{a,1}, Luciana Maria Ribeiro Antinarelli^{b,1}, Antônia Ribeiro^a, Elaine Soares Coimbra^b, Elita Scio^{a,*}

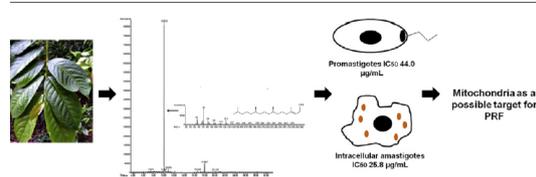
^a Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG Brazil

^b Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG Brazil

HIGHLIGHTS

- Phytol-rich hexane fraction (PRF) from the leaves of *Lacistema pubescens* was obtained and identified by GC–MS analysis.
- The antileishmanial activity of PRF was determined.
- PRF displayed leishmanicidal effects against the *Leishmania amazonensis* promastigote and intramacrophage amastigote forms.
- PRF initially causes mitochondrial dysfunction protozoan with subsequently increase of the ROS levels.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2015

Received in revised form

21 July 2015

Accepted 24 September 2015

Available online 28 September 2015

Keywords:

Lacistema pubescens

Phytol

Leishmania amazonensis

Antileishmanial activity

Mitochondrial dysfunction

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex disease caused by protozoan parasite *Leishmania* and the treatment remains a serious problem since the available drugs exhibited high toxicity and side effects. Plant-derived natural products are promising leads for the development of novel chemotherapeutics. In this work the phytol-rich hexane fraction (PRF) from the leaves of *Lacistema pubescens* was obtained and identified by GC–MS analysis. When assayed for antileishmanial effects, PRF was active against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ values of 44.0 and 25.8 µg/mL respectively). Furthermore, PRF did not show significant cytotoxicity on peritoneal macrophages being more destructive to the intracellular parasite than to mammalian cells. In addition, possible targets of PRF were investigated against *L. amazonensis* promastigotes. The results showed that PRF exerted its antipromastigote activity by marked depolarization of the mitochondrial membrane potential followed by the increase of ROS levels in *L. amazonensis* promastigotes. During these events, no rupture of the cell membrane integrity was observed. Our results indicated that PRF was effective and selective against *L. amazonensis*, and that this effect was mainly mediated by mitochondrial dysfunction associated to ROS production.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

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

Full length article

Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*



Luciana Maria Ribeiro Antinarelli ^{a,1}, Isabela de Oliveira Souza ^{b,1}, Nicolas Glanzmann ^b, Ayla das Chagas Almeida ^a, Gabriane Nascimento Porcino ^c, Eveline Gomes Vasconcelos ^c, Adilson David da Silva ^{b,2}, Elaine Soares Coimbra ^{a,*,2}

^a Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

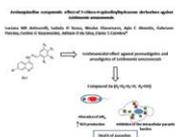
^b Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

HIGHLIGHTS

- A series of quinoline derivatives was synthesized and showed leishmanicidal effect.
- Compound **2a** presented activity against promastigotes and amastigotes *L. amazonensis*.
- Compound **2a** induces formation of ROS and a reduction of mitochondrial membrane potential.
- Compound **2a** exhibited a selective and effective leishmanicidal effect.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2016

Received in revised form

8 July 2016

Accepted 9 October 2016

Available online 12 October 2016

Keywords:

Leishmania amazonensis

4-Aminoquinoline derivatives

Quinolinylhydrazone derivatives

Mitochondrial dysfunction

ABSTRACT

In this study, we have investigated the antileishmanial activity of ten 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives. Among the compounds tested, compounds **2a** and **2j** presented activity against promastigotes (IC₅₀ values of 52.5 and 21.1 μM, respectively) and compounds **2a** and **2c** were active against intracellular amastigotes (IC₅₀ of 8.1 and 15.6 μM, respectively) of *Leishmania amazonensis*. The majority of compounds did not show toxicity against murine macrophages. Compound **2a** exhibited low cytotoxicity to human erythrocytes and induced an oxidative imbalance in promastigote forms, reflected by an increase in the formation of reactive oxygen species (ROS) and a reduction of mitochondrial membrane potential. No alteration in the plasma membrane integrity of parasites was observed. Taken together, these results suggest that compound **2a** is a selective antileishmanial agent, and preliminary observations suggest that its effects appear to be mediated by mitochondrial dysfunction.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

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

Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action



Elaine S. Coimbra^{a, **}, Luciana M.R. Antinarelli^a, Natália P. Silva^a, Isabela O. Souza^b,
Raissa S. Meinel^b, Marcele N. Rocha^c, Rodrigo P.P. Soares^c, Adilson D. da Silva^{b, *}

^a Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B., Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

^b Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

^c Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2016

Received in revised form

11 August 2016

Accepted 21 October 2016

Available online 24 October 2016

Keywords:

Leishmania

Quinolines

Oxidative stress

Mitochondrial membrane potential

ROS production

Chemotherapy

ABSTRACT

Leishmaniasis comprise a spectrum of diseases caused by protozoa parasites from the genus *Leishmania*, affecting millions of people worldwide, mainly in subtropical countries. Most antileishmanial drugs are highly toxic, present resistance issues or require long-term treatment. Consequently, new drugs are urgently needed. Quinoline-containing compounds have displayed an impressive array of biological properties over the years, including antileishmanial activity. In the present study, we report the synthesis and evaluation of novel quinoline derivatives (**QuinDer**) against *Leishmania* species and cytotoxic effect on mammalian cells. The ROS production and mitochondrial membrane potential analyses were also studied. The compound **QuinDer1** showed activity on *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes and this compound exhibited a strong inhibition of the proliferation of *L. amazonensis* amastigotes at nM concentration (IC₅₀ of 0.0911 μM), being 139 times more active than miltefosine (IC₅₀ of 12.7 μM), used as reference drug. This compound presents low cytotoxicity toward murine macrophages and human erythrocytes. In addition, promastigotes of *L. amazonensis* treated with the compound **QuinDer1** present high generation of ROS levels with low alterations in mitochondrial membrane potential and maintenance of parasite membrane integrity. No substantial NO production in infected-macrophages treated with this compound was detected. These results suggest that the compound **QuinDer 1** is a potent and selective antileishmanial agent by mitochondrial oxidative stress.

© 2016 Published by Elsevier Ireland Ltd.



What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis?

Roberta Reis Soares, Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, Clarice Abramo, Gilson Costa Macedo , Elaine Soares Coimbra and Kézia Katiani Gorza Scopel

Departement of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de fora, Brazil

ABSTRACT

Parasitic diseases, such as malaria and leishmaniasis, are relevant public health problems worldwide. For both diseases, the alarming number of clinical cases and deaths reported annually has justified the incentives directed to better understanding of host's factors associated with susceptibility to infection or protection. In this context, over recent years, some studies have given special attention to B lymphocytes with a regulator phenotype, known as Breg cells. Essentially important in the maintenance of immunological tolerance, especially in autoimmune disease models such as rheumatoid arthritis and experimentally induced autoimmune encephalomyelitis, the function of these lymphocytes has so far been poorly explored during the course of diseases caused by parasites. As the activation of Breg cells has been proposed as a possible therapeutic or vaccine strategy against several diseases, here we reviewed studies focused on understanding the relation of parasite and Breg cells in malaria and leishmaniasis, and the possible implications of these strategies in the course of both infections.

KEYWORDS

B regulatory cells; malaria; leishmaniasis; immunity; immunomodulation; protozoan infections; cytokines; immunological tolerance

ANEXOS: Comprovantes de aprovação dos projetos na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJF.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 054/2013 – CEUA sobre “Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c - lotes 2014-2015”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA, com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI e DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 144 camundongos (144 fêmeas), da linhagem Balb/c, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/02/2014 a 31/12/2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 054/2013- CEUA about “Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c - lotes 2014-2015”, under responsibility of E LAINE SOARES COIMBRA, with collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI and DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 144 mice (144 female) of the Balb/c lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/02/2014 to 31/12/2015.

Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.

Presidente
CEUA

Vice-presidente
CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 055/2013 – CEUA sobre “Manutenção da infectividade das cepas de *Leishmania* sp através de passagens em camundongos Balb/c”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA, com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI e DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 72 camundongos (72 fêmeas), da linhagem Balb/c, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/01/2014 a 31/12/2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 055/2013- CEUA about “Manutenção da infectividade das cepas de *Leishmania* sp através de passagens em camundongos Balb/c”, under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA, with collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI and DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 72 mice (72 female) of the Balb/c lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/01/2014 to 31/12/2015.

Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.

 Presidente
 CEUA

 Vice-presidente
 CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 056/2013 – CEUA sobre “Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania* sp - lotes 2014-2015”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA, com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI e DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 576 camundongos (576 fêmeas), da linhagem Balb/c, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/01/2014 a 31/12/2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 056/2013 - CEUA about “Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania* sp - lotes 2014-2015” under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA, with collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI and DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 576 mice (576 female) of the Balb/c lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/01/2014 to 31/12/2015.

Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.

Presidente
CEUA

Vice-presidente
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 046/2014 – CEUA sobre “ESTUDO IN VIVO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE NOVOS PRODUTOS SINTÉTICOS” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/03/2015. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 150 camundongos (150 fêmeas) da linhagem BALB/c de 4 a 6 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 10/03/2015 a 01/08/2016.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 046/2014 - CEUA about “ESTUDO IN VIVO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE NOVOS PRODUTOS SINTÉTICOS” under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA and collaboration of LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/03/2015. For the development of this research 150 mice (150 female) of lineage BALB/c of 4 to 6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 10/03/2015 to 01/08/2016.

Juiz de Fora, 10 de Março de 2015



Coordenadora
CEUA



Vice-coordenadora
CEUA