

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Infectologia e Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
UM DERIVADO DE CLOROQUINOLINA  
CONTRA ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*  
CAPAZES DE CAUSAR LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR E VISCERAL**

Tauane Gonçalves Soyer

**Belo Horizonte**

**Junho de 2019**

Soye, Tauane Gonalves.  
SO731a Avaliao da atividade Antileishmanial In Vitro e In Vivo de um derivado de Cloroquinolina contra espécies de Leishmania capazes de causar Leishmaniose Tegumentar e Visceral [manuscrito]. / Tauane Gonalves Soye. - - Belo Horizonte: 2019.  
57f.: il.  
Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho.  
Coorientador (a): Luciana Maria Ribeiro Antinarelli; Luísa Helena Perin de Melo.  
rea de concentrao: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertao (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Leishmaniose. 2. Tratamento Farmacológico. 3. Toxicidade. 4. Cloroquinolinis. 5. Dissertao Acadmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Antinarelli, Luciana Maria Ribeiro. III. Melo, Luísa Helena Perin de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Infectologia e Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UM  
DERIVADO DE CLOROQUINOLINA CONTRA  
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* CAPAZES DE  
CAUSAR LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E  
VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre junto ao referido Programa.

**Orientador:**

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz  
Coelho

**Co-Orientadoras:**

Dra. Luciana Maria Ribeiro  
Antinarelli-UFMG

Dra. Luísa Helena Perin de Melo-  
UFMG

**Belo Horizonte**

**Junho de 2019**



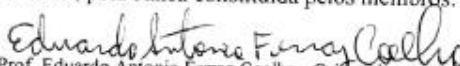
## FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL IN VITRO E IN VIVO DE UM  
DERIVADO DE CLOROQUINOLINA CONTRA ESPÉCIES DE LEISHMANIA  
CAPAZES DE CAUSAR LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL"

**TAUANE GONÇALVES SOYER**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 11 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador  
UFMG

  
Dra. Lourená Emanuele Costa  
UFMG

  
Dra. Ana Thereza Chaves  
UFMG

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITORA:** Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

**VICE-REITOR:** Prof. Alessandro Fernandes Moreira

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Fábio Alves da Silva Júnior

**PRÓ-REITORA DE PESQUISA:** Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Prof. Humberto José Alves

**VICE-DIRETOR:** Profa. Alamanda Kfoury Pereira

**COORDENADOR:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**SUBCOORDENADOR:** Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

### **CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

**COORDENADOR:** Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

**VICE-COORDENADOR:** Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

#### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO:**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Unaí Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Grasiele de Sousa Vieira Tavares – Representante Discente

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Eduardo pela orientação, por ter sido tão atencioso e por ter me recebido tão bem acreditando no meu potencial. Agradeço as minhas co-orientadoras Dra. Luciana Antinarelli e a Dra. Luísa Perin por toda contribuição prestada para realização deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório quero agradecer um por um então:

A Débora Mendonça, que hoje é mais que uma “amiga de laboratório”, agradeço por todo ensinamento, por toda a paciência e em especial por todo o carinho retribuído a mim.

A Danniele Vale pela amizade na pesquisa e na vida, principalmente pelo apoio nos dias em que eu me encontrava distante da minha família.

A Grasielle Tavares, por ter sido tão amorosa e prestativa sempre.

Ao casal, Daniel e Patrícia, por todos os momentos compartilhados juntos.

A Daniela Pagliara por ter me ensinado cada mínimo detalhe do laboratório, por ser sempre prestativa e disposta a me ajudar.

A Patrícia Silveira, pelos risos e por toda ajuda.

A Vivian que eu conheci a pouco tempo mas que já possuo grande consideração.

E ao Guilherme por ter se tornado um grande amigo.

Eu não poderia deixar de agradecer aos meus amigos de Barra do Garças- Mato Grosso que amo muito e sinto saudades sempre (Maicam, Morgana, Andressa, Nei, Karol, Kellen, Thays, Carolzinha ‘caio’, Bruks) e as minhas amigas de Governador Valadares-Minas Gerais (Carol’s e Kamila).

Por fim aos meus pais, Regiane e Dim, por todo o amor retribuídos a mim, mesmo diante de toda saudade e as dificuldades enfrentadas sempre estiveram ao meu lado. A minha avó Vitória e aos meus irmãos Matheus e Thiago, por todo o apoio que me deram até aqui. A minha família de BH, tia Daniela, minhas primas Barbara e Jéssica meu mais sincero obrigada . Aos meus sobrinhos (Daniel e Manu) e ao meu afilhado Arthur, meu muito obrigada. Amo vocês. A Deus eu agradeço imensamente por ter colocado tantas pessoas lindas no meu caminho, por ter me concedido saúde mental e física, e principalmente por ter cuidado de mim nesse ambiente novo de trabalho, de cidade, e que por fim se tornou mais um lar .

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.OBJETIVOS.....	22
4. METODOLOGIA E RESULTADOS.....	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6. CONCLUSÃO .....	50
7. PERSPECTIVAS .....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
9. ANEXOS.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem ser transmitidas ao homem e a diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (SARAVIA, 1989; AMATO et al., 1998; ALTAMIRANOENCISO et al., 2003). Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção e que dois milhões de novos casos ocorram anualmente em diversos países no mundo (OMS, 2016).

As principais manifestações clínicas das leishmanioses incluem a forma cutânea, mais frequente e que pode curar espontaneamente, a forma mucosa, caracterizada por lesões debilitantes devido à replicação descontrolada do parasito, levando à mutilação e morbidade do paciente; e a forma visceral, que pode causar sintomas como febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, podendo ser fatal se aguda e não tratada (KEVRIC et al., 2015).

O tratamento contra as leishmanioses tem sido baseado no uso de antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B (AmpB) e sua formulação lipossomal, paramomicina, miltefosina, dentre outros. Apesar de eliminar os parasitos, estes compostos são tóxicos e/ou apresentam custo elevado. Além disso, a resistência do parasito aos medicamentos disponíveis vem aumentando (GHORBANI et al., 2018; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015; ULIANA et al., 2017). A pesquisa por novos fármacos para as leishmanioses não têm sido promissora, uma vez que essa é uma doença negligenciada, ou seja, que afeta países pobres e subdesenvolvidos no mundo, representando assim pouco ou nenhum mercado viável financeiramente para a indústria farmacêutica.

Além do mais, a pesquisa por novos medicamentos é considerada um processo caro, que requer anos de estudos e de investimentos para identificar, caracterizar e desenvolver novos fármacos (HUGHES et al., 2011; RENSLO & MCKERROW 2006). Neste aspecto, há a necessidade urgente de procura por novos fármacos que sejam promissores para o desenvolvimento de produtos de menor custo, atóxicos e que tenham eficácia contra o parasito.



De forma ideal, o tratamento contra as leishmanioses deve curar o paciente, eliminando os riscos de recidiva e a capacidade de desenvolvimento de parasitos resistentes, além de causar pouco ou nenhum efeito colateral (OMS, 2010). As pesquisas por produtos naturais para fins terapêuticos têm aumentado, visto que podem ser encontrados na natureza e que podem ser sintetizados em laboratório (NEWMAN & CRAGG; CHEUKA et al., 2016; PINTO et al., 2014).

Assim, produtos naturais da classe de quinolinas foram identificados como novos alvos que exibem atividades antimalárica, antibacteriana, anticancerígena e antipsicótica (KALLANDER et al., 2005; SILVA et al., 2009; WANG & WAM, 2010). A quinolina foi extraída pela primeira vez do alcatrão de carvão mineral (ou alcatrão de hulha) em 1834 por Friedlieb Ferdinand Runge. O alcatrão de hulha continua a ser a principal fonte de quinolina comercial. A substância apresenta alta solubilidade em água, e é utilizada como um intermediário na fabricação de medicamentos e para produção de produtos químicos (MACEDO, 2014; SUN et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017).

Muitos estudos demonstraram que, além dessas propriedades já citadas, as quinolinas apresentam também atividade antileishmanial (SOLOMON & LEE, 2011; PINTO et al., 2014; AFZAL et al., 2015; ANTINARELLI et al., 2015; CHEUKA et al., 2016; DUARTE et al., 2016; LAGE et al., 2016; MENDONÇA et al., 2018; TAVARES et al., 2018). O exemplo mais importante é sitamaquina, um 8-aminoquinolina, onde em um estudo realizado com pacientes na Índia, foram observadas uma taxa de cura de 89% com doses abaixo de 2 mg/kg por dia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Outro exemplo é a Tafenoquina, que em alguns estudos já demonstrou além da propriedade antimalárica, atividade antileishmanial em modelo experimental murino, podendo representar um tratamento alternativo para as leishmanioses (YARDLEY et al., 2010). Trabalhos desenvolvidos por grupos de pesquisa identificaram que derivados de 7-cloroquinolinas apresentam atividade antileishmanial *in vitro* promissora (CARMO et al., 2011; COIMBRA et al., 2013; ANTINARELLI et al., 2015,). No entanto, apesar de tais candidatos terem mostrado ação antileishmanial satisfatória, até o momento, tais compostos não atingiram a fase clínica de pesquisa no campo das leishmanioses.

Estes resultados, associados à indiscutível necessidade da busca de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses, incentivaram o estudo de moléculas derivadas de cloroquinolinas para o tratamento de infecções causadas por parasitos do gênero

*Leishmania*. Assim, neste trabalho, após a síntese de derivados de cloroquinolinas, obteve-se a, 2- (7-cloroquinolin-4-il) oxi) -3- (3-metilbut-2- en- 1- il) naftaleno-1,4-diona, ou GF1059. Desse modo, nosso objetivo foi avaliar a atividade antileishmanial e o mecanismo de ação *in vitro* de um derivado de cloroquinolina, 2- (7-cloroquinolin-4-il) oxi) -3- (3-metilbut-2- en- 1- il) naftaleno-1,4-diona, ou GF1059, no tratamento da infecção causada por parasitos da gênero *Leishmania*. O mecanismo de ação da molécula e sua eficácia terapêutica *in vivo* em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* foram também analisados.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças endêmicas em mais de 98 países (ALVAR et al., 2012), estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (OMS, 2016). Em 2017, 94% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, sendo que nas Américas, no período de 2001 a 2017 foram reportados 940.396 casos novos de Leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) e 59.769 casos de Leishmaniose visceral (LV).

A LV pode ser antroponótica ou zoonótica, sendo a primeira causada por *L. donovani* e é encontrada no subcontinente indiano (Índia, Bangladesh, Nepal) e África, tendo os humanos como o principal reservatório de transmissão. A LV zoonótica é causada por *L. infantum* e encontrada no Mediterrâneo, no Oriente Médio e no Brasil, sendo o cão doméstico o hospedeiro mais importante (MAGILL, 1993; DESJEUX, 2004; OLIVEIRA et al., 2004). No Brasil, a LV é encontrada em todos os estados brasileiros, com maior número de casos notificados nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Da mesma forma, a dispersão geográfica segue ocorrendo no Paraguai e Argentina, nas fronteiras com o Brasil e Uruguai (OPAS, 2017).

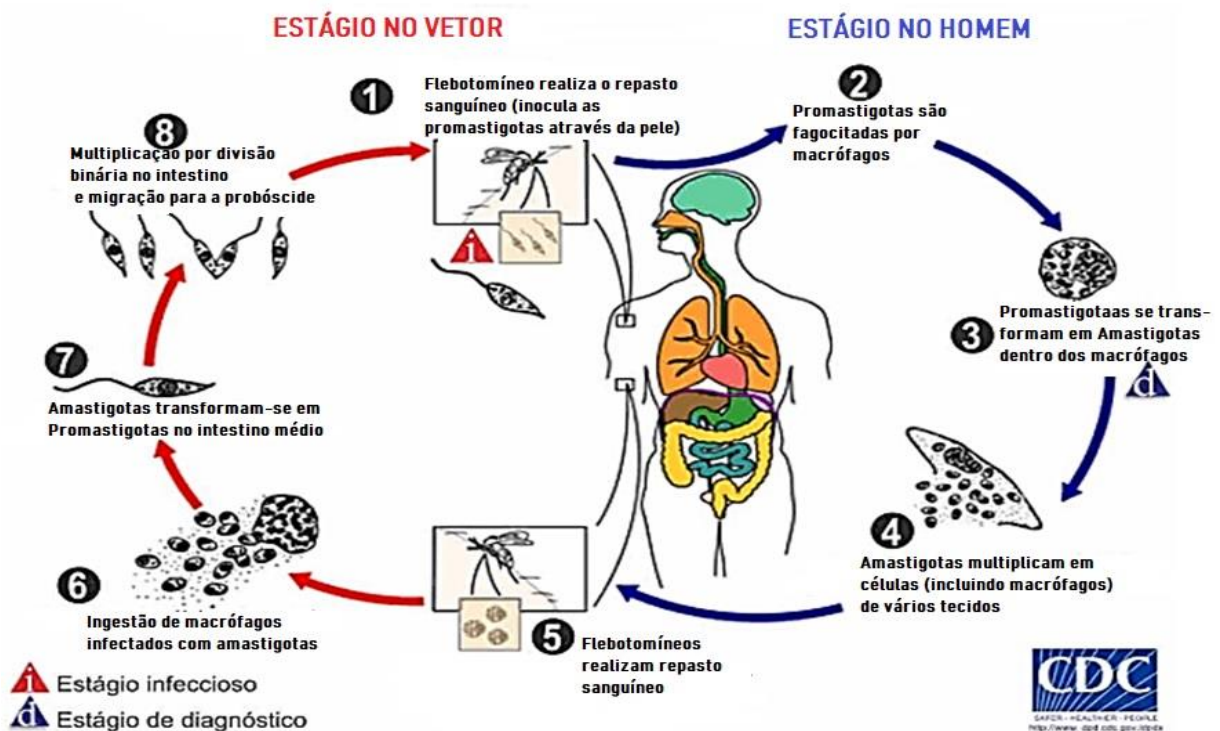
Nas Américas, 12 espécies dermatrópicas de *Leishmania* são reconhecidas como causadoras da doença humana e oito espécies são descritas somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Vianna* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017; OMS, 2017).

A epidemiologia da LC nas Américas é complexa, uma vez que as interações do parasito com reservatórios e hospedeiros ainda não são totalmente elucidadas, pois há múltiplas espécies circulantes de *Leishmania*, sendo considerados reservatórios quaisquer animais que garantam a circulação das mesmas na natureza e, além disso, as manifestações clínicas e a resposta terapêutica podem variar (BRASIL, 2017; OPAS, 2019). Dessa forma, a epidemiologia das leishmanioses depende não só da espécie do

parasito, mas também de um balanço ecológico, uma vez que diferentes espécies do vetor estão envolvidas no ciclo de transmissão (ALVAR et al., 2012).

### 2.3. Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania*

O vetor das leishmanioses é comumente conhecido como flebotomíneo, esses são dípteros hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Américas), pertencentes à família Psychodidae (BASANO & CAMARGO, 2004). A hematofagia é restrita as fêmeas, sendo de suma importância para maturação dos seus ovários (BARATA et al., 2005). Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 µm e flagelo livre. As amastigotas têm corpo ovoide, medindo entre 2,1 e 3,2 µm (PÊSSOA & MARTINS, 1982). Na **figura 1**, é demonstrado o estágio do parasito no inseto vetor e o estágio do parasito no homem.



**Figura 01-** Ciclo biológico do parasito *Leishmania*.

Dessa forma, a transmissão vetorial é dada pelas fêmeas de flebotomíneos que se infectam ao sugar o sangue de humanos ou mamíferos infectados. Assim, as formas amastigotas ao atingirem o intestino médio do inseto se transformam em promastigotas, se replicam e transformam-se em promastigotas infectantes. Durante o repasto sanguíneo, os parasitos são inoculados no hospedeiro vertebrado (definitivo) na forma promastigota metacíclica (com flagelo longo), que é fagocitada por diferentes células do sistema fagocítico mononuclear onde as promastigotas se transformam e replicam como amastigotas, com flagelo rudimentar, que infectam macrófagos localmente ou em tecidos distante estabelecendo assim a infecção (GOTO & LINDOSO, 2012; KLING & KORNER, 2013; BRASIL, 2017).

## **2.2. Manifestações clínicas das leishmanioses**

As manifestações clínicas é resultantes das interações de vários fatores como: espécie do parasito, local de inoculação e resposta imune do hospedeiro. As leishmanioses apresentam-se sobre as formas: cutânea, mucosa, cutâneo-difusa, visceral e cal-azar (GARNIER & CROFT, 2002; DESJEUX, 2004; GOTO & LINDOSO, 2012; OMS, 2017).

A LC é causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, caracteriza-se por feridas na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo, local onde o flebotomíneo consegue ter acesso. Ocorre o desenvolvimento de nódulos que evoluem para lesões ulcerativas com bordas elevadas, endurecidas e o fundo com tecido de granulação grosseira. Em alguns casos, a lesão pode progredir através de disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito, surgindo lesões nas mucosas (GONZÁLEZ et al., 2008; BRASIL, 2017).

A Leishmaniose mucosa (LM) caracteriza-se por lesões destrutivas que acometem mucosas e cartilagens como nariz, faringe, boca e laringe. Por ser considerada de difícil tratamento, esta forma apresenta alto risco de deformidades permanentes, podendo levar o paciente a morte (GOMES et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2008; BRASIL, 2017).

Existe também a forma disseminada da LC, uma manifestação incomum que pode ser observada em até 2% dos casos. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, embora a maioria dos casos

relatados na literatura seja infecção por *L. braziliensis*. Essa forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. O número de lesões pode chegar a centenas (GOTO & LINDOSO, 2012; BRASIL, 2017).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil, é causada pela *L. amazonensis*, caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele, porém contém grande quantidade de amastigotas. Constitui uma forma clínica rara e grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência de especificidade na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (GOTO & LINDOSO, 2012; BRASIL, 2017).

Nas Américas, a LV é causada por *L. infantum*. A mesma pode ser dividida em três períodos: inicial, estado e final. No período inicial a sintomatologia pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (BRASIL, 2006; ASHKAN & RAHIM, 2008; SEGATTO et., al 2012).

O período de estado se caracteriza por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia, com um quadro clínico geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral (BRASIL, 2006; ASHKAN & RAHIM, 2008; SEGATTO et., al 2012).

Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Neste período há desnutrição e edema dos membros inferiores. Outras manifestações importantes incluem hemorragias, epistaxe, gengivorragia, petéquias, icterícia e ascite (BRASIL, 2006; ASHKAN & RAHIM, 2008; SEGATTO et., al 2012).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma complicação bem reconhecida da leishmaniose visceral. Foi descrito desde o início do século XX tanto na Ásia como na África, em áreas onde *L. donovani* é o parasito causador. A condição é caracterizada pela ocorrência de uma erupção cutânea após um episódio de LV; a erupção é geralmente no rosto, a partir do qual pode ou não se espalhar para outras partes do corpo (RAMESH et al., 2007; OMS, 2018).

## 2.4. Imunologia das leishmanioses

As infecções por *Leishmania* levam a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4<sup>+</sup>, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER et al., 2006; REIS et al., 2006).

A resposta do tipo Th1 é mediada por células natural killer (NK), polimorfonucleares (neutrófilos), macrófagos e pela produção de citocinas como: interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12). A importância das células NK no controle da infecção deve-se tanto à sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de IFN- $\gamma$ , pois este regula a resposta inflamatória, ativando macrófagos e outras células. Os macrófagos elevam a produção de TNF- $\alpha$  que auxiliam na eliminação do parasito por apoptose. A IL-2 é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T. A IL-12 estimula a síntese de NK além de aumentar a produção de IFN- $\gamma$ , é considerada a principal indutora das células para resposta do tipo Th1, estando associada a resolução e a resistência a doença (SANTOS-GOMES et al., 2002; PINHEIRO, 2004; PIRES et al., 2012).

Quando há entrada do protozoário na pele do hospedeiro vertebrado através da picada do vetor infectado, há uma reação inflamatória local, onde as formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção. Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção, de modo que os parasitos intra-macrófagos podem ser eliminados através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio e produção de óxido nítrico, ou podem se proliferar e manter a infecção (PINHEIRO, 2004; BACELLAR & CARVALHO, 2005; PIRES et al., 2012). Os macrófagos quando estimulados com IFN- $\gamma$  e IL-12 tornam-se ativados e expressam níveis elevados da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), essa enzima é responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), e este é essencial para a eliminação do parasito intra-macrófago. Na ausência de NO, pode haver uma resposta exacerbada ocasionando lesões ulcerativas e não cicatrizantes (DRAPIER et al., 1988).

Se a resposta for do tipo Th2, haverá uma elevada produção de IL-4 e IL-10, que medeiam a imunidade humoral. A IL-4 é considerada citocina supressora de linfócitos Th1, e está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4. A IL-10 está relacionada com a inibição da produção de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\beta$ , inibindo então a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2 (COFFMAN & CARTY, 1986; COFFMAN et al, 1988, PIRMEZ et al., 1993; ROMÃO et al., 2012).

Além do tipo de resposta Th1 ou Th2 estabelecido em reação aos antígenos da *Leishmania*, outros fatores, como variação genética e condição nutricional, podem influenciar a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção.

## **2.5. Diagnóstico das leishmanioses**

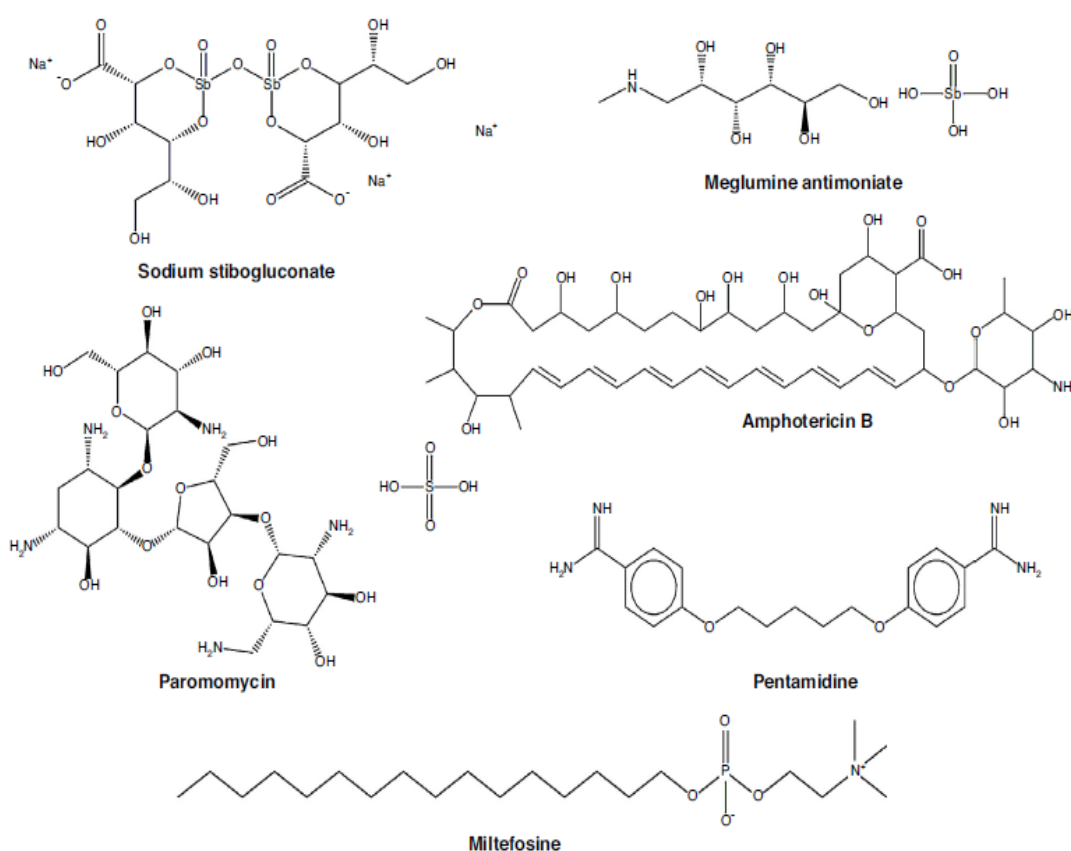
O diagnóstico laboratorial das leishmanioses constituem fundamentalmente de três grupos de métodos: Exames parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRASIL, 2006; BRASIL 2017), sendo que em todos eles, tem-se a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose (GONTIJO & CARVALHO, 2003). As metodologias diferem basicamente quanto à sensibilidade e à especificidade, à sua aplicação prática nas condições de campo e à disponibilidade de reagentes (MARTINS & LIMA, 2013).

Diante disso, não existe um padrão ouro para o diagnóstico, e este é imprescindível para o reconhecimento e identificação da doença, assim leva-se em consideração as características clínicas e aspectos epidemiológicos para um melhor diagnóstico (DOURADO et al., 2007; GOMES et al., 2014).



## 2.6. Tratamento das leishmanioses

A eficácia do tratamento depende não só da espécie de *Leishmania*, mas também da resposta do paciente ao parasito e de fatores como a imunidade. A resposta clínica é variável aos tratamentos, seja pela toxicidade dos fármacos ou resistência aos mesmos (GARNIER & CROFT, 2002). O tratamento contra as leishmanioses tem sido baseado no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B (AmpB) e sua formulação lipossomal, miltefosina, paramomicina e pentamidinas (**Figura 02**) (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2014; ULIANA et al., 2017; GHORBANI et al., 2018).



**Figura 02-** Estruturas químicas dos medicamentos para leishmanioses.

O tratamento convencional é baseado na utilização de antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>) como o N-metil-glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) (BRASIL, 2017). Os antimoniais foram introduzidos para esse fim há mais de 50 anos, e continuam a ser eficazes para algumas formas de leishmaniose, pois promove uma regressão rápida do número dos parasitos presentes nos tecidos e no sangue (PINHEIRO, 2004; LIMA et al., 2007). Entretanto, os antimoniais não são devidamente metabolizados, com as doses repetidas, nota-se que aumenta os níveis de

retenção do mesmo, grande parte do que foi retido fica concentrado no fígado e no baço. A retenção do antimônio nos tecidos é responsável pelos efeitos tóxicos (BRASIL, 2017), podendo ocorrer um ou mais efeitos tóxicos, como artralgia, mialgia, náuseas, pancreatite e insuficiência renal aguda (IRA). Por isso, deve se ter uma atenção maior com idosos, além do que os antimoniais são contraindicados para gestante (GASSER ET AL., 1994; SAMPAIO & MARSDEN, 1997; DEPS ET AL., 2000; DIETZE, 2003; NEVES ET AL., 2011; BRASIL, 2017).

A AmpB, é considerada um medicamento de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses. Em 1955, a AmpB foi isolada pela primeira vez a partir de culturas de *Streptomyces nodosus*, sendo portanto um antifúngico da classe dos polienos que apresenta uma região hidrofílica e outra hidrofóbica (LEMKE et al., 2005; FALCI & PASQUALOTTO, 2015). A AmpB tornou-se comercialmente disponível como Fungizone® (Bristol-Myers-Squibb, EUA) em 1960, onde sua solubilidade aquosa é adquirida através da formulação com deoxicolato de sódio (VYAS & GUPTA, 2006).

A AmpB apresenta um perfil de efeitos colaterais tóxicos que inclui: reações à infusão, hipocalcemia, miocardite, além de ser hepatotóxica e nefrotóxica, sendo que este último, envolve alterações na filtração glomerular e disfunção tubular, o que ocasiona a permanência hospitalar prolongada do paciente, aumentando o custo terapêutico (ROMERO & MORILLA, 2008; SUNDAR & SINGH, 2015). A fim de reduzir o efeito nefrotóxico, diversos estudos apontam que a administração de carga salina após a infusão da AmpB com o objetivo de impedir ou amenizar a diminuição do fluxo sanguíneo renal, sendo assim, capazes de prevenir de modo significativo a nefrotoxicidade (HEIDEMANN et al., 1983). Outra estratégia para reduzir os efeitos tóxicos consiste em modificar nas características físico-químicas da AmpB, assim surgiram as formulações lipídicas como AmBisome®, complexo lipídico de AmB (Abelcet®) e dispersão coloidal de AmB (Amphocil) (VYAS & GUPTA, 2006).

Todas essas formulações apresentam eficácia semelhante (GOTO & LINDOSO, 2010) e diferem quanto à estrutura, forma, tamanho, composição e conteúdo de AmpB. Entretanto o uso mais abrangente das formulações lipídicas comerciais é limitado pelo seu alto custo de produção, além do mais, essas formulações devem ser mantidas refrigeradas para conservar a estabilidade da molécula, outro fator que torna o custo do

tratamento ainda mais elevado (COPELAND E & ARONSON, 2015; CUNHA et al., 2015; FRÉZARD & DEMICHELI, 2010).

Outro medicamento existente para o tratamento das leishmanioses, mas que ainda não é disponibilizado pelo Ministério da saúde do Brasil para o tratamento de humanos, é a miltefosina (hexadecilfosfolina) de uso oral. Este medicamento foi originalmente desenvolvido para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários e posteriormente, em estudos realizados na Índia, descobriu-se a eficácia terapêutica no tratamento das leishmanioses (HILGARD et al., 1993; VERMA & DEY, 2004). Entretanto, a miltefosina tem limitações, incluindo distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepática e renal, além do mais é teratogênica, sendo contraindicada na gravidez e para as mulheres em idade fértil (CROFT & COOMBS, 2003; SOTO et al., 2004).

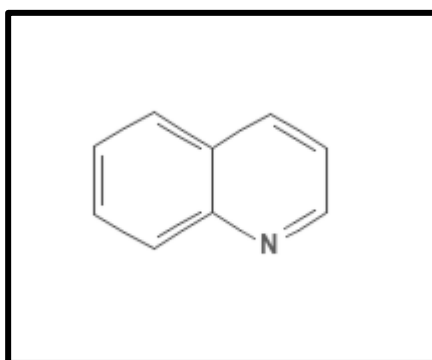
A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, administrado por via intramuscular. Foi desenvolvida na década de 1960 como um agente leishmanicida, mas permaneceu negligenciada até a década de 1980. Apresenta efeitos adversos como: ototoxicidade, hepatotoxicidade e toxicidade renal (CROFT & COOMBS, 2003; ALMEIDA & SANTOS, 2011). As pentamidinas são de uso parenteral exclusivo e podem ser administradas por via endovenosa ou intramuscular, sendo completamente absorvido após administração. O fator limitante do uso do isotionato de pentamidina deve-se à toxicidade, com alterações cardiológicas e renais, além do efeito diabetogênico que pode se manifestar a partir da administração da dose total de 1 grama por dia, que parece ser acumulativo e dose dependente, e atinge 5% dos pacientes tratados (JHA, 1983; COSTA, 1993; AMATO, 1997; PAULA et al., 2003; RATH et al., 2003).

Diante das dificuldades enfrentadas pelos pacientes nos tratamentos preconizados, além do abandono ou da interrupção do mesmo, a resistência dos parasitos aos fármacos utilizados está aumentando; e tem se observado em diversas regiões do mundo o aumento do número de casos de recidiva à doença (ESCOBAR et al., 2001; CROFT & COOMBS, 2003; CROFT et al., 2006; VÉLEZ et al., 2009). Dessa forma, tem-se uma busca contínua por novos compostos que apresentem baixa toxicidade, a fim de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo para o tratamentos das leishmanioses. Os estudos têm se baseado em reposicionamento de fármacos, onde o

principal objetivo é utilizar fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças, ou em isolar substâncias de plantas e de microrganismos (SANTOS et al., 2008; GUIDO et al., 2010).

## 2.7 Quinolinas

Os produtos naturais têm desempenhado um papel importante na descoberta de medicamentos, dentre eles destacam-se a quinolina e seus derivados. As quinolinas são compostos heterocíclicos, que são caracterizadas por apresentar uma estrutura de anel duplo que contém um anel de benzeno fundido com piridina em dois átomos de carbono adjacentes (**Figura 03**) (KALLANDER et al., 2005; SILVA et al., 2009; WANG & WAM, 2010).

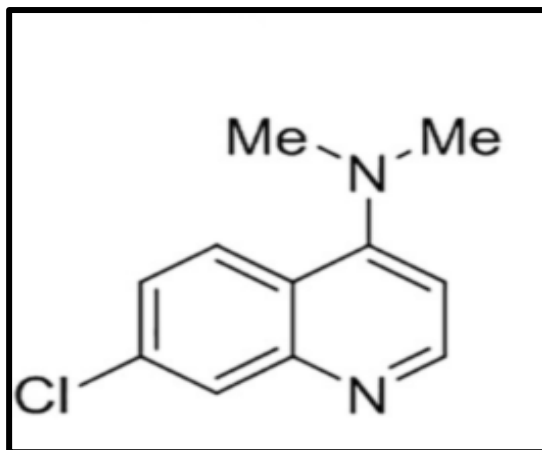


**Figura 03-** Estrutura química da Quinolina.

Por apresentarem atividades biológicas diversificadas, dentre elas, antimalárica, antimicrobiana, antipsicótica, anticancerígena, além de uma estrutura relativamente simples com versatilidade sintética que permite a geração de um grande número de derivados estruturalmente diversos, estas moléculas têm atraído o olhar da comunidade científica, especialmente, de pesquisadores envolvidos na química dos produtos naturais e químicos orgânicos interessados na obtenção de drogas promissoras. Os derivados de quinolinas vêm apresentando uma ampla gama de uso farmacológico contra *Leishmania* (SOLOMON & LEE, 2011; PINTO et al., 2014; AFZAL et al, 2015; CHEUKA et al., 2016; DUARTE et al., 2016; LAGE et al., 2016; MENDONÇA et al., 2018; TAVARES et al., 2018). No entanto, apesar de tais candidatos terem apresentado uma ação

antileishmanial satisfatória e seletiva, até o momento, poucos compostos atingiram a fase clínica de pesquisa no campo da leishmaniose.

Neste contexto, no presente estudo, a atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo* de um derivado de cloroquinolina, a saber, 2-(7-cloroquinolin-4-il) oxi)-3-(3-metilbut-2-en-1-il) naftaleno-1,4-diona, ou GF1059 (**Figura 04**) foi avaliado contra *L. infantum* e *L. amazonensis*.



**Figura 04-** Estrutura química do GF105.

A citotoxicidade em macrófagos murinos e o potencial hemolítico em eritrócitos humanos, bem como a eficácia de GF1059 no tratamento de macrófagos infectados e na inibição da infecção por parasitos pré-tratados, foram investigados. O mecanismo de ação do GF1059 e a eficácia terapêutica *in vivo* em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* também foram analisados.

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo* e o mecanismo de ação *in vitro* de uma molécula derivada de cloroquinolina, 2- (7-cloroquinolin-4-il) oxi) -3- (3-metilbut-2- en- 1- il) naftaleno-1,4-diona, ou GF1059, contra diferentes espécies de *Leishmania* para o desenvolvimento de um tratamento a ser empregado contra as leishmanioses.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antileishmanial do GF1059 contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*;
- Avaliar a toxicidade em macrófagos murinos e hemácias humanas;
- Verificar o uso de GF1059 na inibição da infecção por macrófagos contra promastigotas de *Leishmania*;
- Avaliar o mecanismo de ação do GF1059 em *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, por meio da análise da carga parasitária a partir de órgãos dos animais tratados e de parâmetros bioquímicos nos animais infectados e tratados com GF1059.

#### 4. METODOLOGIA E RESULTADOS

As seções de Metodologia, Resultados e discussão dessa dissertação serão apresentadas sob a forma de um artigo científico publicado na *Experimental Parasitology* em janeiro de 2019 (Exp Parasitol. 2019 Apr;199:30-37. doi: 10.1016/j.exppara.2019.02.019. Epub 2019 Feb 25.).

##### **Title**

Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of a chloroquinolin derivative against *Leishmania* species capable of causing tegumentary and visceral leishmaniasis

##### **Authors**

Tauane G. Soyer<sup>a</sup>, Débora V.C. Mendonça<sup>a</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Daniel S. Dias<sup>a</sup>, Patrícia A.F. Ribeiro<sup>a</sup>, Luisa Perin<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>a</sup>, Vinicio T.S. Coelho<sup>a</sup>, Andreza C.G. Ferreira<sup>b</sup>, Pedro H.A.S. Neves<sup>b</sup>, Guilherme F. Matos<sup>b</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>a</sup>, Elaine S. Coimbra<sup>c</sup>, Guilherme R. Pereira<sup>b</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,d,\*,#</sup>, Luciana M.R. Antinarelli<sup>a,\*</sup>

##### **Affiliations**

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup> Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Departamento de Física e Química, Instituto de Ciências Exatas e Informática, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

## # Corresponding author

**Address:** Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone and fax number: +55 31 3409 4983. E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.

## Abstract

The treatment against leishmaniasis presents problems, since the currently used drugs are toxic and/or have high costs. In addition, parasite resistance has increased. As a consequence, in this study, a chloroquinolin derivative, namely 2-(7-chloroquinolin-4-yl)oxy)-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)naphthalene-1,4-dione or GF1059, was *in vitro* and *in vivo* tested against *Leishmania* parasites. Experiments were performed to evaluate *in vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity, as well as the treatment of infected macrophages and the inhibition of infection using pre-treated parasites. This study also investigated the GF1059 mechanism of action in *L. amazonensis*. Results showed that the compound was highly effective against *L. infantum* and *L. amazonensis*, presenting a selectivity index of 154.6 and 86.4, respectively, against promastigotes and of 137.6 and 74.3, respectively, against amastigotes. GF1059 was also effective in the treatment of infected macrophages and inhibited the infection of these cells when parasites were pre-incubated with it. The molecule also induced changes in the parasites' mitochondrial membrane potential and cell integrity, and caused an increase in the reactive oxygen species production in *L. amazonensis*. Experiments performed in BALB/c mice, which had been previously infected with *L. amazonensis* promastigotes, and thus treated with GF1059, showed that these animals presented significant reductions in the parasite load when the infected tissue, spleen, liver, and draining lymph node were evaluated. GF1059-treated mice presented both lower parasitism and low levels of enzymatic markers, as compared to those receiving amphotericin B, which was used as control. In conclusion, data suggested that GF1059 can be considered a possible therapeutic target to be tested against leishmaniasis.

**Keywords:** Leishmaniasis; chemotherapy; toxicity; amphotericin B; chloroquinolin; natural compounds.



## 1. Introduction

Leishmaniasis is a disease complex that is considered to be endemic in 98 countries around the world, with approximately 350 million people at risk of contracting infection by the *Leishmania* parasite, coupled with an annual incidence of 58,000 cases of visceral leishmaniasis (VL) and 220,000 cases of tegumentary leishmaniasis (TL) (Alvar et al., 2012; Araújo et al., 2017; WHO, 2018). Different parasite species can cause TL, such as *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis*, and *L. amazonensis*. VL is caused mainly by *L. donovani* and *L. infantum* species (Ullah et al., 2016). The main clinical manifestations of TL include cutaneous leishmaniasis, the most frequent form, which can be cured spontaneously, and mucosal leishmaniasis, which is characterized by debilitating lesions due to the uncontrolled parasite replication leading to patient mutilation and morbidity. VL can cause symptoms, such as prolonged fever, splenomegaly, hypergammaglobulinemia, and pancytopenia, and the disease can be fatal if acute or left untreated (Kevric et al., 2015).

Treatment against leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonials, pentamidine, amphotericin B (AmpB) and its liposomal formulation, paramomycin, miltefosine, among others. However, in spite of the success against the parasites, these compounds are toxic and/or present high costs. In addition, parasite resistance has increased (Ghorbani et al., 2018; Sundar and Chakravarty, 2015; Uliana et al., 2017). However, the research for new drugs is not considered attractive, since it is an expensive process, requiring many years to occur and an investment of more than \$1.0 billion to identify, characterize, and develop new antileishmanial agents (Hughes et al., 2011; Renslo and McKerrow 2006). In this aspect, there is an urgent need to search for new compounds, such as those identified in plants, which could be promising leads for the development of novel and non-toxic therapeutics.

AmpB is a known antileishmanial drug; however, the side effects, such as renal, hepatic, and cardiac toxicity have limited its application in large scale. AmpB-containing lipid-based formulations have presented higher efficacy and lower toxicity, as compared to the use of free drugs; however, their high cost is a limiting factor (Copeland and Aronson, 2015; Cunha et al., 2015; Frézard and Demicheli, 2010). On the other hand, natural compounds have been considered a valuable source of new products with effective biological action (Cheuka et al., 2016; Pinto et al., 2014). The

interest in plant-derived compounds has increased in recent years, and new antileishmanial agents have been identified (Duarte et al., 2016; Lage et al., 2015; Mendonça et al., 2018). However, although such candidates have presented a satisfactory and selective antileishmanial action, to date, few compounds have reached the clinical development in the field of leishmaniasis.

Host-directed immunotherapeutics have the major advantage of reducing the potential emergence of drug resistance, as well as interfering in the mechanisms of immune evasion which *Leishmania* parasites can perform, aiming to promote their survival within the phagolysosome of infected macrophages. One such evasion mechanism is the parasite's ability to reduce macrophage activation by manipulating their cell membranes (Masihi, 2000). As a consequence, the use of compounds able to display protective effects, when explored for its prophylactic potential, is desirable. Mechanistically, the previous contact of macrophages or parasites with these candidates could result in the inhibition of infection in these cells, either due to the increased production of hydrogen peroxide and phagosome maturation of the macrophages or by reducing the infectivity of pre-treated parasites (Parihar et al., 2016).

The high potential of quinoline-based natural products and their derivatives in medicinal chemistry has led to the identification of novel targets exhibiting antibacterial, anti-HIV, and anticancer activities (Kallander et al., 2005; Silva et al., 2009; Wang & Wam, 2010). These compounds are among the most biologically active class of heterocyclic products, presenting a wide range of pharmacological use, such as against *Leishmania* (Duarte et al., 2016; Lage et al., 2016; Mendonça et al., 2018; Tavares et al., 2018). In this context, in the present study, the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of a chloroquinolin derivative, namely 2-(7-chloroquinolin-4-yl)oxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)naphthalene-1,4-dione, or GF1059, was evaluated against *L. infantum* and *L. amazonensis*. The cytotoxicity in murine macrophages and the hemolytic potential in human red blood cells, as well as the efficacy of GF1059 for the treatment of infected macrophages and in the inhibition of the infection using pre-treated parasites, were investigated. The mechanism of action of GF1059 and the *in vivo* therapeutic efficacy in *L. amazonensis*-infected BALB/c mice were also analyzed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Synthesis of GF1059

For the synthesis of GF1059, 300 mg lapachol, 40 mg sodium hydride, and 3 mL anhydrous dimethylformamide were added in a round-bottomed flask, which remained under constant stirring for 15 min at room temperature. After, the flask was placed in a cooling bath using ice, until the temperature reached 4°C. Subsequently, solid commercial 4,7-dichloroquinoline was added, and the mixture was heated for 24 h at 120°C. The reaction was confirmed by thin layer chromatography (dichloromethane/methanol 95:5 volume/volume). Afterwards, 0.1 M NaOH and dichloromethane were added and the organic phase was filtered and purified in a silica gel chromatography column by using dichloromethane/methanol (95:5 volume/volume). The solution was dried on a rotary evaporator, and its yield was 93.0%. The synthesized compound (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O, molecular weight: 327.81 g/mol) was characterized by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, and mass spectrometry. AmpB (molecular weight 924.08 g/mol; Cristália<sup>®</sup>, São Paulo, São Paulo, Brazil) was resuspended (1 mg) in methanol/DMSO (9:1 volume/volume) solution and maintained at -80°C.

### 2.2. Parasites and mice

*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) and *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) were kindly provided by Dr. Maria Norma Melo (Department of Parasitology, ICB, UFMG, Brazil). Before use, parasites were kept frozen in liquid nitrogen. Promastigotes were grown at 25°C in 100 mL erlenmeyer flasks containing 5 mL of complete Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which consisted of the medium added with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA) and 20 mM L-glutamine, at pH 7.4. Passages were made at 5-day intervals by transferring 250 µL aliquots of the liquid medium to new erlenmeyer flasks containing fresh complete medium (Coelho et al., 2003). To obtain the axenic amastigotes, previous titration curves were performed to determine the best temperature and time of conversion of the promastigotes in amastigote forms, according to the distinct *Leishmania* species in the *in vitro* cultures (data not shown). The technical protocol was adapted from Doyle et al. (1991) by Mendonça et al. (2018). Briefly, 10<sup>9</sup> *L. amazonensis* and *L. infantum* stationary promastigotes were washed three times in sterile phosphate buffer saline (PBS 1x) at pH 7.4, and incubated in 5 mL FBS for 48 h

and 72 h, respectively, at 37°C. The parasites were then washed in cold PBS 1x pH 7.4, and cell density was estimated by counting in a Newbauer chamber. The conversion of the parasites was evaluated after staining by Giemsa, and the percentage of converted parasites to amastigote forms was >90% in both *Leishmania* species. BALB/c mice (female, 8 weeks old) were purchased from the UFMG Institute of Biological Sciences. Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of the animals. The study was approved by the Committee for the Ethical Handling of Research Animals (protocol number 085/2017) and by the UFMG Human Research Ethics Committee (protocol number CAAE–32343114.9.0000.5149).

### **2.3. *In vitro* antileishmanial activity**

Previous titration curves were performed to determine the best time of inhibition of *Leishmania* growth and the concentration of the compounds to be used in the experiments (data not shown). The inhibition of *Leishmania* growth was evaluated by incubating promastigotes and axenic amastigotes ( $10^6$  each) in the presence of GF1059 (0 to 30.5  $\mu\text{M}$ ) in 96-well culture plates (Nunc, Nunclon, Roskilde, Denmark) for 24 h and 48 h at 24°C. AmpB (0 to 1.08  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich, USA) was used as the control. Cell viability was assessed by measuring the cleavage of 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA). The optical density (OD) values were read in an ELISA microplate spectrophotometer reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 570 nm. The compound concentration needed to inhibit 50% of the *Leishmania* viability ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated by applying sigmoidal regression of dose-response curves (Mendonça et al. 2018).

### **2.4. *In vitro* cytotoxicity and hemolytic potential**

Previous titration curves were performed to determine the best time of inhibition of macrophage viability and the concentration of the compounds to be used in the experiments (data not shown). The 50% inhibition of the macrophage viability ( $\text{CC}_{50}$ ) was evaluated by incubating cells ( $5 \times 10^5$ ) in the presence of GF1059 (0 to 1,525  $\mu\text{M}$ ) or AmpB (0 to 10.8  $\mu\text{M}$ ) in 96-well plates (Nunc) for 48 h at 37°C. The cell viability was analyzed by the MTT method. The selectivity index (SI) was calculated by the ratio between the  $\text{CC}_{50}$  and  $\text{IC}_{50}$  values. The hemolytic potential was evaluated in human red blood cells as previously described (Tavares et al., 2018). Briefly, GF1059 (0 to 1,525  $\mu\text{M}$ ) or AmpB (0 to 10.8  $\mu\text{M}$ ) were incubated with a 5% red blood cells (human O type)

suspension for 1 h at 37°C. Suspension was centrifuged for 10 min at 1,000 x g, and the cell lysis percentage was determined spectrophotometrically at 570 nm.

## **2.5. Treatment of infected macrophages**

Previous titration curves were performed to determine the minimum time incubation of parasites with the macrophages and the concentration of the compounds to be used in the experiments (data not shown). Macrophages ( $5 \times 10^5$  cells) were then plated on round glass coverslips inside the wells of 24-well culture plates (Nunc) for cell attachment, by using RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, at pH 7.4. After 24 h of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, stationary promastigotes were added to the wells ( $5 \times 10^6$  cells), and cultures were incubated for 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Next, free parasites were removed by extensive washing with RPMI 1640 medium, and infected macrophages were treated with GF1059 (0 to 30.5 µM) or AmpB (0 to 1.08 µM), for 48 h at 24°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed in RPMI 1640 and incubated with 4% paraformaldehyde for 15 min, at which time they were treated with 70% ethanol in an ice-bath for 4 h, and again washed three times with sterile PBS 1x pH 7.4. After, macrophages were stained with Giemsa, and the percentage of infection and the number of recovered amastigotes were determined by counting 200 cells, in triplicate, using an optical microscope (Mendonça et al. 2018).

## **2.6. Inhibition of infection using pre-treated parasites**

Previous titration curves were performed to determine the minimum time incubation of parasites and the concentration of the compounds to be used in the experiments (data not shown). Promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells) were incubated with GF1059 (0 to 30.5 µM) or AmpB (0 to 1.08 µM) for 1 h at 24°C. Cells were washed and added with macrophages (at a ratio of 10 parasites per cell), for 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. They were then washed three times in RPMI 1640 medium and stained with Giemsa, when the percentage of infection using pre-treated parasites and the number of recovered amastigotes were determined by counting 200 cells, in triplicate, in an optical microscope (Mendonça et al. 2018).

## **2.7. *In vivo* antileishmanial activity in a murine model**

BALB/c mice (n=8 per group) were subcutaneously infected in the base of the tail with  $10^6$  *L. amazonensis* stationary promastigotes. Fifty days post-infection, they were separated into groups according to lesion size, aiming to ensure a similar average lesion diameter between the groups. The animals then received subcutaneous injections near the site of infection, once a day and during 10 days, with one of the following regimens: (a) saline group (control): mice received PBS 1x pH 7.4 (50  $\mu$ L); (b) AmpB group: mice received a solution containing 1 mg/kg body weight of AmpB (50  $\mu$ L), and (c) GF1059 group: mice received a solution containing 5 mg/kg body weight of GF1059 (50  $\mu$ L). One-day after the treatment, animals were euthanized, and infected tissue, spleen, liver, and draining lymph node (dLN) were collected for evaluation of the parasite load by limiting dilution technique (Coelho et al., 2003). Briefly, tissue and organs were weighed and homogenized using a glass tissue grinder in sterile PBS 1x. Tissue debris were removed by centrifugation at  $150 \times g$ , and cells were concentrated by centrifugation at  $2,000 \times g$ . The pellet was resuspended in 1 mL of complete Schneider's medium. Log-fold serial dilutions were performed in Schneider's medium with a  $10^{-1}$  to  $10^{-12}$  dilution, and each sample was plated in triplicate and read 7 days after the beginning of the culture at  $24^\circ\text{C}$ . Results were expressed as the negative log of the titer (*i.e.*, the dilution corresponding to the last positive well) adjusted per milligram of tissue or organ.

## **2.8. Toxicological studies**

To evaluate the *in vivo* toxicity of the compounds, blood samples were collected from the treated and infected animals, analyzing the hepatic function through doses of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), while the renal function was evaluated by doses of blood urea nitrogen and serum creatinine, as previously described (Mendonça et al., 2016). Experiments were developed using commercial kits (Labtest Diagnostica<sup>®</sup>, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and an auto-analyzer apparatus (Thermo Plate TP analyzer<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil).

## **2.9. Evaluation of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi\text{m}$ )**

Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were incubated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu\text{M}$ , corresponding to one and two times the  $\text{IC}_{50}$  value, respectively) for 6 and 24

h, at 25°C. Afterward, cells were stained with JC-1 (10 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA) for 30 min in the dark at 37°C. After having been washed twice with Hanks balanced salt solution (HBSS), they were added into a 96-well plate, and the fluorescence intensity was measured in a spectrofluorometer (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), at 528 nm and 600 nm. Parasites incubated with FCCP [1.0 µM; carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone] for 10 min were used as the control. The  $\Delta\psi_m$  value was calculated by the ratio between the readings performed in 600 nm and 528 nm, respectively (Antinarelli et al., 2015).

### **2.10. Production of reactive oxygen species (ROS)**

Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were incubated with GF1059 (7.53 and 15.07 µM) for 6 and 24 h, at 25°C. Cells were then harvested, washed with PBS 1x pH 7.4, and incubated with 20 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA, Sigma-Aldrich, USA), for 30 min in the dark at room temperature. The ROS production was detected using a spectrofluorometer at 485 nm and 528 nm. Parasites incubated with miltefosine (22.1 µM) were used as the control.

### **2.11. Phosphatidylserine (PS) externalization and cell membrane integrity**

Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were incubated with GF1059 (7.53 and 15.07 µM) for 24 h, at 25°C. Cells were then washed with PBS 1x pH 7.4, and stained with Annexin V-FITC (Invitrogen, USA) for 20 min in the dark at room temperature. Afterward, they were stained with propidium iodide (1.0 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA) for 15 min. The analyses were performed using a FACsCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA), with FITC channels (for Annexin V FITC) and PE (for propidium iodide), in which 10,000 events were acquired (Stroppa et al., 2017). Propidium iodide-stained cells were also analyzed in a spectrofluorometer at 540 nm and 600 nm (Antinarelli et al., 2015). Promastigotes were treated with miltefosine (44.2 µM) and used as the control.

### **2.12. Cell cycle and the accumulation of autophagic vacuoles**

Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were incubated with GF1059 (7.53 and 15.07 µM) for 24 h, at 25°C. Cells were then fixed with 70% ethanol for 1 h at 4°C, and incubated with Ribonuclease A (200 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA), for 1 h at 37°C. After, they were stained with propidium iodide (7.0 µg/mL) for 20 min and in the dark

at room temperature. The analyses were performed using a FACsCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA), with FITC channels (for Annexin V FITC) and PE (for propidium iodide), in which 10,000 events were acquired (Stroppa et al., 2017). Parasites were also labelled with monodansylcadaverin (100  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, USA) for 1 h in the dark at 25°C. Subsequently, they were evaluated in a spectrofluorometer at 335 nm and 460 nm.

### **2.13. Statistical analysis**

The  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$ , and  $RBC_{50}$  values were calculated by applying sigmoidal regression of dose-response curves, which were generated by GraphPad Prism 5.03. The one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's test were used for comparisons between the groups. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Data shown here are representative of three independent experiments, performed in triplicate.



### 3. Results

#### 3.1. *In vitro* antileishmanial activity, cytotoxicity, and hemolytic potential

Initially, the *in vitro* antileishmanial activity of GF1059 against *L. infantum* and *L. amazonensis* was evaluated. Results showed IC<sub>50</sub> values of 4.23±0.34 and 7.53±1.04 μM, respectively, against *L. infantum* and *L. amazonensis* promastigotes, and of 4.73±1.09 and 8.75±1.10 μM, respectively, against amastigotes (Table 1). AmpB showed IC<sub>50</sub> values of 0.17±0.05 and 0.26±0.04 μM, respectively, against promastigotes, and of 0.29±0.12 and 0.25±0.11 μM, respectively, against amastigotes. The CC<sub>50</sub> values found were of 650.66±47.12 and 2.38±0.23 μM, respectively, for GF1059 and AmpB; while the RBC<sub>50</sub> values were of 1,666.43±64.75 and 11.63±1.03 μM, respectively. The SI values were also calculated, and higher selectivity was found when GF1059 was used (Table 1).

**Table 1.**

Compound	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			
GF1059	650.66±47.12			
Amphotericin B	2.30±0.23			
Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>			
	Promastigotes		Axenic amastigotes	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
GF1059	4.21±0.34	7.53±1.04	4.73±1.09	8.75±1.10
Amphotericin B	0.17±0.05	0.26±0.04	0.29±0.12	0.25±0.11
Compound	Selectivity index (SI) <sup>c</sup>			
	Promastigotes		Axenic amastigotes	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
GF1059	154.6	86.4	137.6	74.3
Amphotericin B	13.3	8.9	7.9	9.3

**Table 1. *In vitro* antileishmanial activity, cytotoxicity, and selectivity index.** The antileishmanial activity of GF1059 and amphotericin B was evaluated against *L. infantum* and *L. amazonensis*. Results are showed as mean ± standard deviation. The concentration needed to inhibit 50% of the *Leishmania* (IC<sub>50</sub>)<sup>a</sup> or macrophage (CC<sub>50</sub>)<sup>b</sup> viability, as well as the selectivity index (SI)<sup>c</sup>, which was calculated by the ratio between the CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values, are shown here.

#### 3.2. Treatment of infected macrophages and inhibition of infection

The therapeutic effect was evaluated in *Leishmania*-infected macrophages, which were treated with the compounds. Results showed a reduction in the infection percentage in the order of 79.0% and 80.0%, respectively, when *L. amazonensis*-

infected cells were treated with GF1059 or AmpB (30.5 and 1.08  $\mu$ M, respectively). The reduction in the percentage of recovered amastigotes was 96.0% and 77.0%, respectively (Table 2).

**Table 2.**

Compound	Concentration ( $\mu$ M)	Percentage of infection after treatment		Number of amastigotes after treatment	
		<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
GF1059	30.5	14.2 $\pm$ 1.4	18.9 $\pm$ 1.5	0.1 $\pm$ 0	0.3 $\pm$ 0.1
	15.25	26.5 $\pm$ 1.7	31.2 $\pm$ 4.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3
	7.63	48.7 $\pm$ 2.5	55.4 $\pm$ 3.3	0.4 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.4
	0	71.2 $\pm$ 3.7	92.2 $\pm$ 4.4	4.3 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.7
Amphotericin B	1.08	16.6 $\pm$ 3.2	17.8 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.3
	0.54	23.4 $\pm$ 2.5	28.5 $\pm$ 3.5	1.5 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.7
	0.11	44.5 $\pm$ 6.5	46.7 $\pm$ 3.8	2.8 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.4
	0	71.2 $\pm$ 3.7	92.2 $\pm$ 4.4	4.3 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.7

**Table 2. Treatment of infected macrophages.** Murine macrophages were infected with *L. infantum* or *L. amazonensis* and later treated with GF1059 or amphotericin B. The percentage of infection after treatment and the number of recovered amastigotes were calculated by counting 200 cells, in triplicate. Results are showed as mean  $\pm$  standard deviation. Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.

With *L. infantum*, the reduction in the infection percentage was 80.0% and 76.0%, respectively, while the reduction in the percentage of recovered amastigotes was 97.0% and 88.0%, respectively. The prophylactic action of GF1059 was evaluated by pre-incubating parasites with the compound, and later using them to infect macrophages. With *L. amazonensis*, the reduction in the infection percentage was of 88.0% and 74.0%, respectively, when parasites were pre-treated with GF1059 or AmpB (30.5 and 1.08  $\mu$ M, respectively). The reduction in the percentage of recovered amastigotes was 98.0% and 83.0%, respectively. With *L. infantum*, the reduction in the infection percentage was 79.0% and 77.0%, respectively, while the reduction in the percentage of recovered amastigotes was 94.0% and 84.0%, respectively (Table 3).

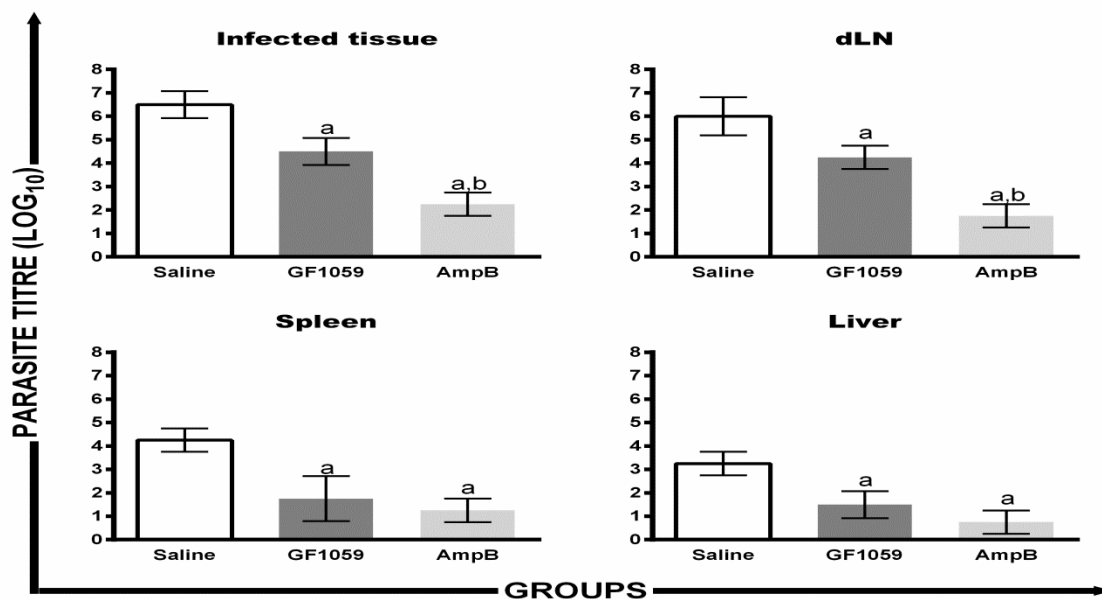
**Table 3.**

Compound	Concentration (μM)	Percentage of infection using pretreated parasites		Number of amastigotes per macrophage	
		<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
GF1059	30.5	13.2±0.9	9.9±1.0	0.2±0.1	0.1±0
	15.25	22.1±2.5	18.6±2.6	0.5±0.2	0.6±0.3
	7.63	34.4±4.5	28.8±3.0	1.0±0.3	1.5±0.4
	0	63.3±4.2	85.5±5.4	3.7±0.6	5.6±1.0
Amphotericin B	1.08	14.5±2.6	22.3±1.8	0.6±0.2	0.9±0.3
	0.54	20.3±2.5	31.1±3.6	0.8±0.4	1.5±0.1
	0.11	31.1±3.7	46.6±4.7	1.5±0.3	2.6±0.3
	0	63.3±4.2	85.5±5.4	3.7±0.6	5.6±1.0

**Table 3. Inhibition of the infection using pre-treated parasites.** The inhibition of infection of promastigotes, which were first treated with GF1059 and amphotericin B, and thus used to infect macrophages, was evaluated by determining the percentage of infection using pre-treated parasites and by number of recovered amastigotes, which were calculated by counting 200 cells, in triplicate. Results are showed as mean ± standard deviation. Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.

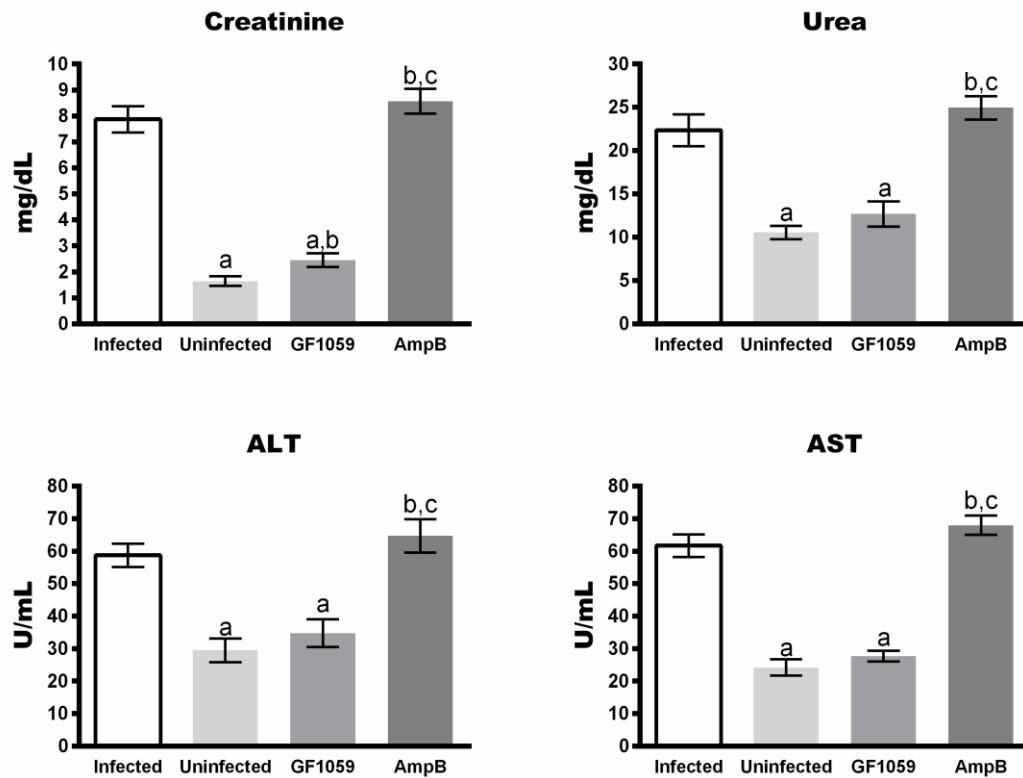
### 3.3. *In vivo* therapeutic action against *L. amazonensis*

Aiming to evaluate the *in vivo* therapeutic effect of GF1059 against *Leishmania*, BALB/c mice were experimentally infected with *L. amazonensis* stationary promastigotes. Fifty days after infection, these were separated into groups that received saline or were treated with GF1059 or AmpB. One-day after the treatment, animals were euthanized and the infected tissue, liver, spleen, and dLN of the animals were collected, at which time the parasite load was evaluated by a limiting dilution technique. Results showed significant reductions in the parasite load in the treated animals, as compared to those that received saline (Fig. 1). When the comparison between the treated groups was performed, animals receiving GF1059, as compared to the AmpB group, showed more significant reductions in parasitism in the infected tissue, spleen, liver, and dLN, in the order of 50.0%, 29.0%, 50.0%, and 59.0%, respectively.



**Fig. 1. Evaluation of the parasite load in treated and infected mice.** BALB/c mice were subcutaneously infected at the base of the tail with  $10^6$  *L. amazonensis* stationary promastigotes. Fifty days post-infection, animals (n=8 per group) received saline or were treated for 10 days, once a day, with GF1059 (5 mg/kg body weight per day) or AmpB (1 mg/kg body weight per day). One day after treatment, the parasite load was evaluated by a limiting dilution technique in the animals' infected tissue, liver, spleen, and draining lymph node. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation. (a) and (b) indicate a statistically significant difference in relation to the saline and GF1059 group ( $P < 0.001$ )

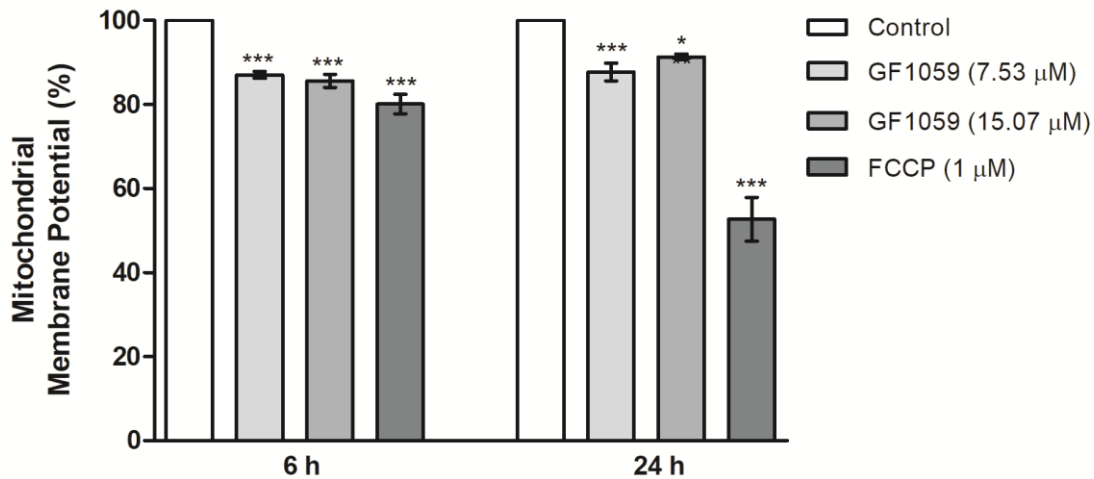
In an attempt to evaluate the *in vivo* toxicity, doses of AST, ALT, urea, and creatinine were performed in blood samples of treated and infected mice. Results showed that GF1059-treated mice presented lower levels of these enzymatic markers, as compared to those treated with AmpB or receiving saline (Fig. 2), thus demonstrating that our compound did not cause renal and hepatic damage in the studied mammalian model.



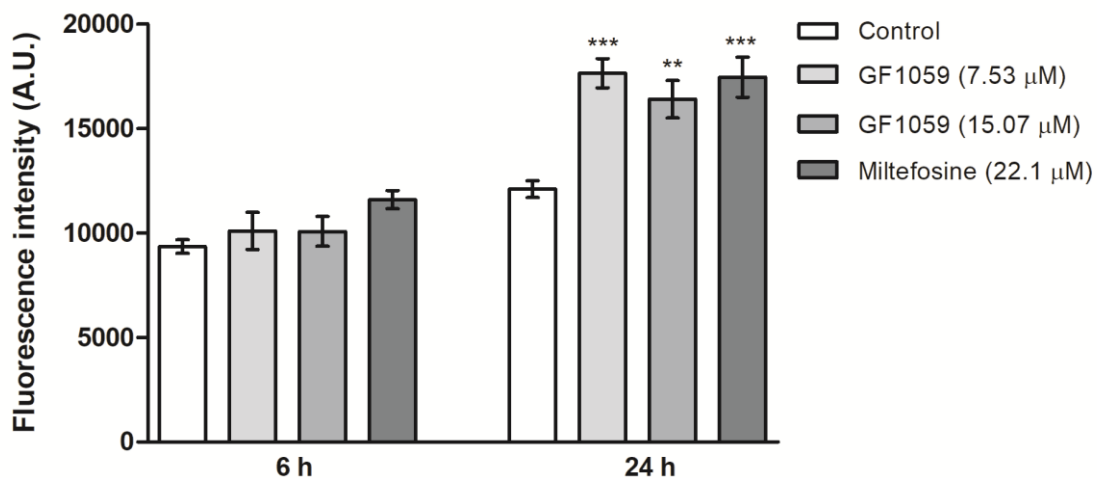
**Fig. 2. *In vivo* toxicity.** Levels of creatinine, urea, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were evaluated in the sera samples of treated and infected animals (n=8 per group), one day after treatment. Sera of naive (non-treated and non-infected) mice (n=8) were used as the control. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation. (a), (b), and (c) indicate a statistically significant difference in relation to the infected, uninfected, and GF1059 groups ( $P < 0.001$ ).

### 3.4. Mechanism of action in *L. amazonensis*

The mitochondrial function of GF1059-treated parasites was evaluated by means of mitochondrial transmembrane electric potential and ROS production. Results showed that GF1059 caused a significant decrease in the  $\Delta\psi_m$  after the treatment of the parasites, indicating a process of mitochondrial damage (Fig. 3). In addition, higher ROS production was found in treated parasites (Fig. 4).

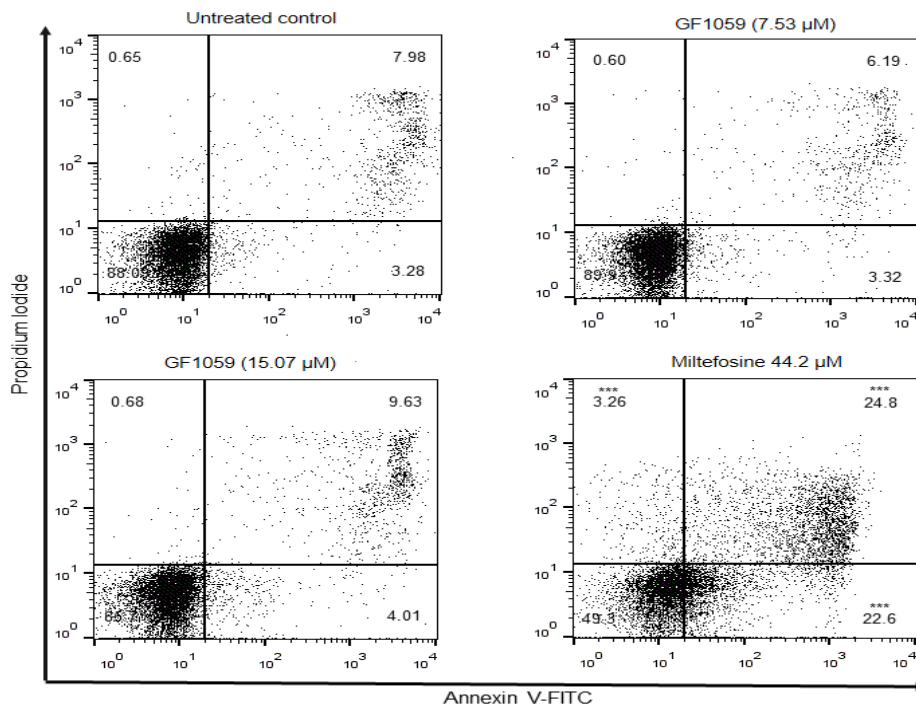


**Fig. 3. Evaluation of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ).** Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were untreated (control) or treated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu\text{M}$ , corresponding to one and two times the  $\text{IC}_{50}$  value, respectively) for 6 h and 24 h. FCCP (1.0  $\mu\text{M}$ ) was used as the control. Results were expressed as the reduction percentage of  $\Delta\psi_m$  in relation to the control. (\*) and (\*\*\*) indicate statistically significant differences in relation to the control ( $P < 0.01$  and  $P < 0.0001$ , respectively). Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.

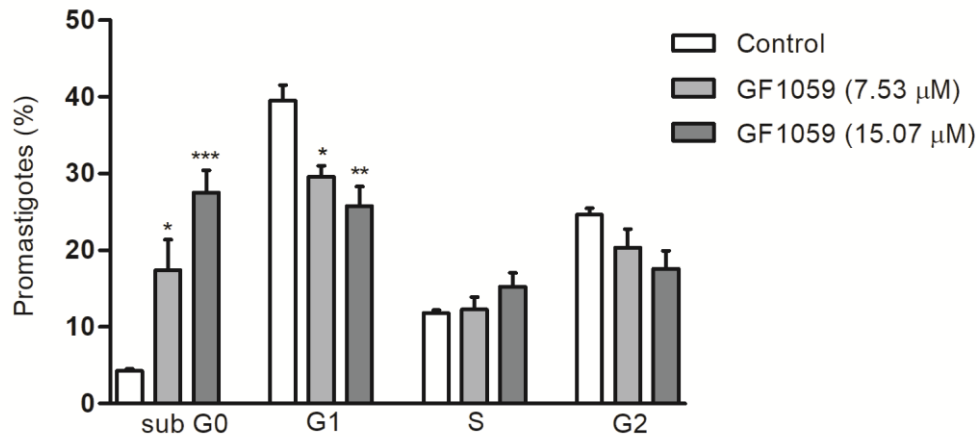


**Fig. 4. ROS production in *L. amazonensis*.** Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were untreated (control) or treated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu\text{M}$ ) for 6 h and 24 h, when they were probed with  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Miltefosine (22.1  $\mu\text{M}$ ) was used as the control. Results were expressed as the fluorescence intensity in arbitrary units (A.U.) of three independent experiments. (\*\*) and (\*\*\*) indicate statistically significant differences in relation to the control ( $P < 0.001$  and  $P < 0.0001$ , respectively). Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.

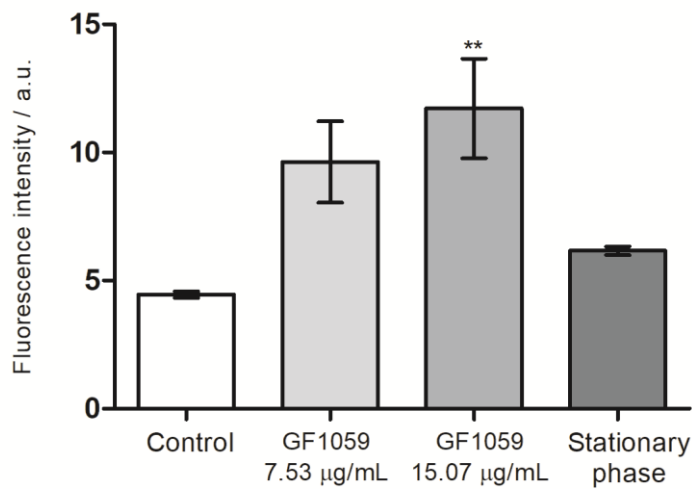
The PS exposure and cell membrane integrity were also evaluated, but results showed no significant alteration in the treated parasites (Fig. 5). When alterations in the GF1059-treated *Leishmania* cell cycle were evaluated, results showed that GF1059 induced a significant increase in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> population, in the order of 4.1 and 6.5 times, respectively, as compared to the control, associated with the decrease in the G<sub>1</sub> population (Fig. 6). The activation of the parasite's autophagy pathway was also investigated, and results showed that the treatment with GF1059 stimulated a significant increase in the formation of autophagic vacuoles, as compared to the values found in the control (Fig. 7).



**Fig. 5. Phosphatidylserine exposure on the *L. amazonensis* surface.** Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were treated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu$ M) for 24 h, and double-stained with Annexin V-FITC and propidium iodide. Miltefosine (44.2  $\mu$ M) was used as the control. Analyses were performed by flow cytometry, and 10,000 events were acquired. (\*\*\*) indicates a statistically significant difference when compared to the control ( $P < 0.01$ ). Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.



**Fig. 6. Cell cycle progression in *L. amazonensis*.** Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were treated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu\text{M}$ ) for 24 h and later stained with propidium iodide, at which time the DNA content was evaluated by flow cytometry. The promastigote percentage in each cell cycle phase is shown. (\*), (\*\*), and (\*\*\*) indicate statistically significant differences in relation to the control ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.0001$ , respectively). Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.



**Fig. 7. The accumulation of autophagic vacuoles in *L. amazonensis*.** Stationary promastigotes ( $1 \times 10^7$  cells) were treated with GF1059 (7.53 and 15.07  $\mu\text{M}$ ) for 24 h, and the autophagic vacuole formation was evaluated after labeling with MDC. The fluorescence intensity was measured by using a spectrofluorometer. (\*\*) indicates a statistically significant difference in relation to the control ( $P < 0.001$ ). Data were expressed as the means of three independent experiments, which were performed in triplicate.

#### 4. Discussion

Treatment against leishmaniasis has used compounds that cause serious adverse effects and can be expensive. Moreover, they are often ineffective or present low cure



rates. Consequently, greater attention should be paid to the research from new antileishmanial agents derived from known medicines and/or novel delivery methods, which could be applied in the improvement of therapeutic conditions. In this context, and due to the high biological potential of quinoline derivatives against distinct *Leishmania* species, such as *L. donovani* (Upadhyay et al., 2018), *L. braziliensis* (Coimbra et al., 2016), *L. amazonensis* (Tavares et al., 2018), *L. infantum* (Stevanović et al., 2018), and *L. major* (Dardari et al., 2004), the present study aimed to investigate the antileishmanial action from a chloroquinolin derivative against parasite species able to cause tegumentary and visceral leishmaniasis worldwide. Results obtained showed that GF1059 was highly effective against *L. amazonensis* and *L. infantum* promastigotes and amastigotes, and presented low toxicity in mammalian cells, in addition to the absence of hemolysis in human red blood cells. The treatment of infected macrophages also showed that this compound was effective in reducing parasitism. In addition GF1059 inhibited the infection of these cells, when parasites were pre-incubated with it.

AmpB is a polyene employed in the treatment of leishmaniasis, presenting effective biological action against distinct parasite species, such as *L. infantum* (Lage et al., 2015) and *L. amazonensis* (Valadares et al., 2012). However, the clinical use of this compound has been hindered due to its high toxicity, including nephrotoxicity, hemolysis, and liver damage (Annaloro et al., 2009; Serrano et al., 2013). Although they do present high efficacy and low toxicity, liposomal formulations are also quite expensive (Chávez-Fumagalli et al., 2015). In the present study, we decided to use AmpB as a control for the *in vivo* experiments, since this drug has been employed as a comparative factor in relation to other antileishmanial agents, also presenting significant reductions in the parasite load of the treated and infected animals (Lage et al., 2016; Mendonça et al., 2016). Our data showed that GF1059 presented higher antileishmanial activity, when compared to the AmpB, although this quinoline derivative presented toxicity about 100 times lower in comparison to the values obtained by using AmpB. The hemolytic activity also illustrated that GF1059 induced no hemolysis in human red blood cells, as compared to values obtained when using AmpB. Similar findings were also described when other quinoline derivatives were tested against human red blood cells (Coimbra et al., 2016; Duarte et al., 2016; Tavares et al., 2018).

In our study, other antileishmanial drugs, such as miltefosine and paramomycin, were not tested in the infected animals, in an attempt to compare their therapeutic efficacy with the results reached by using GF1059; this fact could be considered a

limitation of our work. However, due to the high and selective efficacy of GF1059 against *Leishmania*, but not against mammalian cells, as well as due to the absence of toxicity in a known murine model, we can infer about the possibility of using this quinoline derivate as an antileishmanial agent. Consequently, a combination between drugs, in comparison to a monotherapy strategy, could offer an advantage regarding the reduction of toxic effects and the duration of patient treatment.

Since the *in vitro* results using GF1059 were satisfactory, we decided to evaluate the therapeutic role of this molecule against *Leishmania* infection in a mammalian model. For this, BALB/c mice were first infected with *L. amazonensis* promastigotes, and thus treated with GF1059 or AmpB. Results showed that the parasite load in the treated and infected animals was significantly lower, when compared with the results obtained in the saline group, although the most significant reductions in parasitism have been found when animals were treated with GF1059. Although additional studies are certainly warranted in an attempt to improve the therapeutic index of GF1059 by increasing the number of doses, the duration of treatment, and/or including GF1059-carrying delivery systems, the present study's data pointed out the possibility of using this compound as an effective antileishmanial drug in other mammalian models and against other *Leishmania* species. Also corroborating with the results obtained in the parasite load, GF1059-treated mice presented lower levels of urea, creatinine, AST, and ALT, when compared to the values obtained in the AmpB and saline groups.

*Leishmania* parasites present unique mitochondria, which is characterized as an important leishmanicidal drug target (Lee et al., 2002, Mehta and Shaha, 2004, Paris et al., 2004). This organelle acts in the biosynthesis and metabolic pathways of the parasites (Vial et al., 2003); as a consequence, mitochondrial damage and/or dysfunction can cause drastic consequences for parasite survival (Smirlis et al., 2010; Souza et al., 2009). In the present study, when the mechanism of action was investigated in *L. amazonensis*, it was observed that GF1059 induced a significant depolarization of the parasite's membrane potential, causing mitochondrial stress and excessive ROS production, thus indicating that it caused a direct effect for *Leishmania* death (Jiménez-Ruiz et al., 2010). Flow cytometry experiments also revealed that GF1059 induced changes in the *Leishmania* cell cycle, which was based on parasite DNA fragmentation (Shadab et al., 2017).

As a limiting factor of the present study, other therapeutic regimens, parasitological, and immunological investigations performed at different periods of time

after treatment, and the inclusion of GF1059-carrying delivery systems were not performed. Nevertheless, we believe that the present work can be considered relevant, since GF1059 showed an *in vitro* effective antileishmanial activity, which was associated with low toxicity in murine macrophages and the absence of hemolytic potential in human red blood cells. Our compound was also effective in the treatment of *Leishmania*-infected mice, thus demonstrating the feasibility to test it as a new antileishmanial agent in other mammalian models.

### **Conflict of interest**

The authors confirm that they have no conflicts of interest in relation to this work.

### **Acknowledgments**

We thank for the Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Universidade Federal de Juiz de Fora), by the use of the FACsCanto II flow cytometer multi-user equipment facility. This work was supported by grants from CAPES, FAPEMIG (CBB-APQ-01712/15) and CNPq (APQ-408675/2018-7). EAFC, LMRA and ESC are grant recipient of CNPq.

## References

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., 2013. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 7, e35671.
- Annaloro, C., Olivares, C., Usardi, P., Onida, F., Della-Volpe, A., Tagliaferri, E., Deliliers, G.L., 2009. Retrospective evaluation of amphotericin B deoxycholate toxicity in a single centre series of haematopoietic stem cell transplantation recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 625-626.
- Antinarelli, L.M., Dias, R.M., Souza, I.O., Lima, W.P., Gameiro, J., da Silva, A.D., Coimbra, E.S., 2015. 4-Aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Chem. Biol. Drug Des.* 86, 704-714.
- Araújo, M.V., David, C.C., Neto, J.C., Oliveira, L.A., Silva, K.C., Santos, J.M., Silva, J.K., Brandão, A.V.B., Silva, T.M., Camara, C.A., Alexandre-Moreira, M.S., 2017. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Exp. Parasitol.* 176, 46-51.
- Chávez-Fumagalli, M.A., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Coelho, C.S., Mendonça, D.V., Soto, M., Tavares, C.A., Faraco, A.A., Coelho, E.A., 2015. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 235-242.
- Cheuka, P.M., Mayoka, G., Mutai, P., Chibale, K., 2016. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*. 22, E58.
- Coelho, E.A., Tavares, C.A., Carvalho, F.A., Chaves, K.F., Teixeira, K.N., Rodrigues, R.C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R.T., Fernandes, A.P., 2003. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 71, 3988-3994.
- Coimbra, E.S., Antinarelli, L.M., Silva, N.P., Souza, I.O., Meinel, R.S., Rocha, M.N., Soares, R.P., Silva, A.D., 2016. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem. Biol. Interact.* 260, 50-57.
- Copeland, N.K., Aronson, N.E., 2015. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28, 426-437.
- Cunha, M.A., Leão, A.C., Soler, R.C., Lindoso, J.A., 2015. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the New World: a retrospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 1214-1218.

- Dardari, Z., Lemrani, M., Bahloul, A., Sebban, A., Hassar, M., Kitane, S., Berrada, M., Boudouma, M., 2004. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. *Farmaco*. 59, 195-199.
- Doyle, P.S., Engel, J.C., Pimenta, P.F.P., Silva, P.P., Dwyer, D.M., 1991. *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp. Parasitol.* 73, 326-334.
- Duarte, M.C., Lage, L.M.R., 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., 2016. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 217, 81-88.
- Frézard, F., Demicheli, C., 2010. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 7 (12), 1343-1358.
- Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2017. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 25-40.
- Hughes, J.P., Rees, S.S., Kalindjian, S.B., Philpott, K.L., 2011. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239-1249.
- Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J.F., Macleod, E.T., Lüder, C.G., Fasel, N., Hurd, H., 2010. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit. Vectors.* 3, 104.
- Kallander, L.S., Lu, Q., Chen, W., Tomaszek, T., Yang, G., Tew, D., Meek, T.D., Hofmann, G.A., Schulz-Pritchard, C.K., Smith, W.W., Janson, C.A., Ryan, M.D., Zhang, G.F., Johanson, K.O., Kirkpatrick, R.B., Ho, T.F., Fisher, P.W., Mattern, M.R., Johnson, R.K., Hansbury, M.J., Winkler, J.D., Ward, K.W., Veber, D.F., Thompson, S.K., 2005. 4-Aryl-1,2,3-triazole: a novel template for a reversible methionine aminopeptidase 2 inhibitor, optimized to inhibit angiogenesis in vivo. *J. Med. Chem.* 48, 5644-5647.
- Kevric, I., Cappel, M. A., Keeling, J. H., 2015. New World and Old World *Leishmania* 501 Infections: A Practical Review. *Dermatol. Clin.* 33, 579-593.
- Lage, P.S., Chávez-Fumagalli, M.A., Mesquita, J.T., Mata, L.M., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Soto, M., Tavares, C.A., Leite, J.P., Tempone, A.G., Coelho, E.A., 2015. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 114, 4625-4635.
- Lage, L.M., Barichello, J.M., Lage, D.P., Mendonça, D.V., Carvalho, A.M., Rodrigues, M.R., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Alves, R.J., Tavares, C.A., Coelho, E.A., Duarte, M.C., 2016. An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is

- effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 115, 4083-4095.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, H.L., 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 1, 53-64.
- Masihi K.N., 2000. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int. J. Immunoph.* 22, 1083-1091.
- Mehta, A., Shaha, C., 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 11798-11813.
- Mendonça, D.V., Lage, L.M., Lage, D.P., Chávez-Fumagalli, M.A., Ludolf, F., Roatt, B.M., Menezes-Souza, D., Faraco, A.A., Castilho, R.O., Tavares, C.A., Barichello, J.M., Duarte, M.C., Coelho, E.A., 2016. Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 169, 34-42.
- Mendonça, D.V.C., Lage, D.P., Calixto, S.L., Ottoni, F.M., Tavares, G.S.V., Ludolf, F., Chávez-Fumagalli, M.A., Schneider, M.S., Duarte, M.C., Tavares, C.A.P., Alves, R.J., Coimbra, E.S., Coelho, E.A.F., 2018. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. *Parasitol. Res.* 117, 391-403.
- Parihar, S.P., Hartley, M.A., Hurdayal, R., Guler, R., Brombacher, F., 2016. Topical simvastatin as host-directed therapy against severity of cutaneous leishmaniasis in mice. *Sci. Rep.* 6, 33458.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Bréard, J., 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 852-859.
- Pinto, E.G., Santos, I.O., Schmidt, T.J., Borborema, S.E., Ferreira, V.F., Rocha, D.R., Tempone, A.G., 2014. Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships. *PLoS One.* 9, e105127.
- Renslo, A.R., McKerrow, J.H., 2006. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat. Chem. Biol.* 2, 701-710.
- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J., 2013. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int. J. Pharm.* 447, 38-46.

- Shadab, M., Jha, B., Asad, M., Deepthi, M., Kamran, M., Ali, N., 2017. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with Kalsome™10, a new liposomal amphotericin B. *PLoS One*. 12, e0171306.
- Silva, F.C., Souza, M.C., Frugulhetti, I.I., Castro, H.C., Souza, S.L., Souza, T.M., Rodrigues, D.Q., Souza, A.M., Abreu, P.A., Passamani, F., Rodrigues, C.R., Ferreira, V.F., 2009. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 373-383.
- Smirlis, D., Duszenko, M., Ruiz, A.J., Scoulica, E., Bastien, P., Fasel, N., Soteriadou, K., 2010. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors*. 3, 107.
- Souza, W., Attias, M., Rodrigues, J.C., 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2069-2080.
- Stevanović, S., Perdih, A., Senčanski, M., Glišić, S., Duarte, M., Tomás, A.M., Sena, F.V., Sousa, F.M., Pereira, M.M., Solmajer, T., 2018. In Silico discovery of a substituted 6-methoxy-quinalidine with leishmanicidal activity in *Leishmania infantum*. *Molecules*. 23, 4.
- Stroppa, P.H.F., Antinarelli, L.M.R., Carmo, A.M.L., Gameiro, J., Coimbra, E.S., da Silva, A.D., 2017. Effect of 1,2,3-Triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 3034-3045.
- Sundar, S., Chakravarty, J., 2015. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 237-252.
- Tavares, G.S.V., Mendonça, D.V.C., Lage, D.P., Granato, J.D.T., Ottoni, F.M., Ludolf, F., Chávez-Fumagalli, M.A., Duarte, M.C., Tavares, C.A.P., Alves, R.J., Coimbra, E.S., Coelho, E.A.F., 2018. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* Epub ahead of print.
- Uliana, S.R.B., Trinconi, C.T., Coelho, A.C., 2018. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 145, 464-480.
- Ullah, N., Nadhman, A., Siddiq, S., Mehwish, S., Islam, A., Jafri, L., Hamayun, M., 2016. Plants as antileishmanial agents: current scenario. *Phytother. Res.* 30, 1905-1925.
- Upadhyay, A., Kushwaha, P., Gupta, S., Dodda, R.P., Ramalingam, K., Kant, R., Goyal, N., Sashidhara, K.V., 2018. Synthesis and evaluation of novel triazolyl quinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 154, 172-181.

- 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., 2012. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 111, 1807-1816.
- Vial H.J., Eldin P., Tielens A.G., Van Hellemond J.J. Phospholipids in parasitic protozoa, *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, e154.
- Wang, X.L., Wan, K., Zhou, C.H., 2010. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 4631-4639.
- World Health Organization, 2018. Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/> 2018 (last accessed on 2 June 2018).



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O GF2059 apresentou elevada eficácia contra espécies de *Leishmania* relevantes em nosso país e mostrou baixa toxicidade em células de mamíferos, podendo assim ser considerado como um candidato à agente antileishmanial. O composto apresenta ação profilática, uma vez que houve redução na porcentagem de infecção de macrófagos infectados e posteriormente tratados, e na inibição de infecção usando parasitos pré-tratados. É importante ressaltar que GF1059 possui ação sobre a fase de maior multiplicação celular (fase G1), interrompendo assim o ciclo celular do parasito e que o mesmo não causou toxicidade hepática e renal em camundongos tratados, que apresentaram reduções significativas na carga parasitária após o tratamento com esse derivado de quinolina.

## 6. CONCLUSÃO

O GF1059 foi eficaz contra *Leishmania*, mostrou baixa toxicidade em células de mamíferos e boa eficácia no tratamento de camundongos infectados por *Leishmania*. Além disso, seu mecanismo de ação foi baseado na indução de apoptose dos parasitos, demonstrando assim a viabilidade de ser testado como um agente antileishmanial em outros modelos de mamíferos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade antileishmanial *in vivo* de GF1059 incorporado em sistemas de delivery contra infecção por *L. infantum*;
- Realizar estudo *in vivo* com outras espécies de *Leishmania*;
- Desenvolver uma formulação para uso tópico contendo GF1059;
- Desenvolver um estudo *in vivo* em outros modelos de mamíferos, tais como hamster, para avaliar a eficácia terapêutica do GF1059.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, O. et al. **A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline.** European Journal of Medicinal Chemistry. Uttar Pradesh p. 1 a 40. 2015.

ALMEIDA, M.C. et al. **Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 98(7):861-870. 2003.

ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, J.B. **Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura.** An Bras Dermatol;86(3):497-506. 2011.

ALTAMIRANOENCISO, A. J., et al. **Sobre a origem e dispersão das Leishmanioses Cutânea e Mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas.** História, Ciência e Saúde. Rio de Janeiro. V.10, n.2, p.853-882, 2003.

ALVAR, J. et al. **WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PloS One. 7, e35671. 2012.

AMATO V.S. et al. **Um caso de Leishmaniose Cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. V. 31, p. 221-4, 1998.

AMATO, V.S. **Utilização do isotionato de pentamidina para o tratamento da leishmaniose mucosa.** Resumo de Tese. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 30:529-530, nov-dez, 1997.

ANTINARELLI, L.M.R. et al. **4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents.** Chemical Biology and Drug Design, v. 86, n. 4, p. 704–714, 2015.

ASHKAN, M.M; RAHIM, K.M. **Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran.** Trop Doct.; 38 (3):186-8.2008.

BACELLAR, Olívia; CARVALHO Edgar. **Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral.** Gazeta Médica da Bahia. 2005.

BARATA, R.A. et al . **Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 38, n. 5, p. 421-425, Oct. 2005 .

BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. **Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle.** Rev. Bras. Epidemiol. São Paulo. V. 7, n. 3, p. 328-337, 2004 .

BRASIL\_ Ministério da saúde. **Manual da vigilância de Leishmaniose Visceral.** 2006.

BRASIL\_ Ministério da Saúde. **Manual da Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2017.

CHEUKA, P.M. et al. **The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases**. *Molecules*. 22, E58. 2016.

COFFMAN, R.L. et al. **IFN-g regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses**. *J. Immunol.*, v.140, p.1022-1027, 1988.

COFFMAN, R.L.; CARTY, J. A. **T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN-g**. *J. Immunol.*, v.136, p.949-954, 1986.

CDC\_CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. **Ciclo do parasito *Leishmania***. Imagem adaptada. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso: Maio de 2019.

COPELAND, N.K., ARONSON, N.E. **Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review**. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28, 426–437. 2015.

COSTA, Jackson M.L. **O USO CLÍNICO DAS PENTAMIDINAS COM ESPECIAL REFERÊNCIA NAS LEISHMANIOSES**. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 23, n. 2-3, p. 163-172. 1993.

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, Simon L. et al. **Current scenario of drug development for Leishmaniasis**. *Indian J Med Resv.* 2006.

CUNHA, M.A. et al. **Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the New World: a retrospective study**. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 1214–1218. 2015.

DEPS, P.D., et al. **Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88<sup>®</sup> no tratamento da Leishmaniose Cutânea localizada**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol. 33, n.6, p.535-543. 2000.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives**. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318. 2004.

DIETZE, R. **Leishmaniose tegumentar americana**. In: **cimerman, Benjamin; cimerman, Sergio**. *Medicina tropical*. Rev. Atheneu. Capítulo 6, p. 85-99, 2003.

DOURADO, Z.F. et al. **Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39)**. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 36 (3): 205-214. 2007.

DRAPIER, J.C. et al. **Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages.** Eur J Immunol. 18, 1587-1592.1988.

DUARTE, M.C. et al. **An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against Leishmania species causing visceral and tegumentary leishmaniasis.** Vet. Parasitol. 217, 81-88. 2016.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. **Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade.** Clinical and biomedical research. Porto Alegre. Vol. 35, n. 2, p. 65-82.2015.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.. **New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs.** Expert Opin. Drug Deliv. 7 (12), 1343–1358. 2010.

GARNIER, T.; CROFT, S.L. **Topical treatment for Cutaneous Leishmaniasis.** Current opinion in investigational drugs, 2002.

GASSER, R.A., et al. **Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis.** Clin.Infect.Dis. V. 18, p. 83-90, 1994.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. **Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?.** Drug Des Devel Ther.12:25–40.2018.

GOMES, A.C.A. et al. **Leishmaniose muco-cutânea: relato de caso clínico.** Rev. Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. 4(4):223- 228. 2004.

GOMES, C. M. et al. **Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 89, n. 5, p. 701–709. 2014.

GONTIJO, B. **Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis.** Medicina Tropical, v. 36, n. 13, p. 71–80. 2003.

González, U. et al. **Interventions for Old World cutaneous Leishmaniasis.**2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Expert Rev Anti Infect Ther, 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.

GUIDO, Rafael V. C. et al. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** Estud. av., São Paulo , v. 24, n. 70, p. 81-98. 2010 .

HEIDEMANN, H.T.H et al. **Amphotericin B nephrotoxicity in humans decreased by salt repletion.** Am. J. Med., v. 75, p. 476-81. 1983.

HILGARD, P., T. et al. **Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents.** Cancer Chemother. Pharmacol. 32:90–95.1993.

HOLZMULLER, P., D. et al. **Nitric oxide-mediated proteosomedependent oligonucleosomal DNA fragmentation in Leishmania amazonensis.** Infect. Immun. 70:3727–3735.2002.

HUGHES, J.P. et al. **Principles of early drug discovery.** Br. J. Pharmacol. 162, 1239-1249.2011.

JHA, T. K. **Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77(2), 167–170. 1983.

KALLANDER, L.S. et al. **4-Aryl-1,2,3-triazole: a novel template for a reversible methionine aminopeptidase 2 inhibitor, optimized to inhibit angiogenesis in vivo.** J. Med. Chem. 48, 5644-5647. 2005.

KEVRIC, I., et al. **New World and Old World Leishmania 501 Infections: A Practical Review.** Dermatol. Clin. 33, 579-593. 2015.

KLING, J. C.; KÖRNER, H. **Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections.** International Journal for Parasitology, v. 43, n. 6, p. 417–425. 2013.

LAGE, L.M. et al. **An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis.** Parasitol. Res. 115, 4083-4095.2016.

LEMKE A. et al . **Amphotericin B.** Appl Microbiol Biotechnol.68(2):151-62. 2005.

LIMA et al. **Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonia pentavalente.** An Bras Dermatol. 2007.

MACEDO, J.S. **Determinação de compostos nitrogenados aromáticos em alcatrão de carvão através da cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada á espectrometria de massas.** Tese. 2014.

MACHADO , et al. **Tratamento da leishmaniose disseminada com anfotericina B lipossômica.** Clin. Infectar. Dis. 61 , pp. 945 – 949.2015.

MARTINS, Glêndara A.S, LIMA, Maria D. **Leishmaniose: do diagnostico ao tratamento.** Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2559. 2013.

MENDONÇA, D.V.C. et al. **Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and its mechanism of action against L. amazonensis species.** Parasitol. Res. 117, 391-403.2018.

MESA-ARANGO, A. C. et al. **“É preciso apenas um para fazer muitos trabalhos: a anfotericina B como droga antifúngica e imunomoduladora”**. *Fronteiras em microbiologia* vol. 3 286. 2012.

NEVES, L.O. et al. **Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da Leishmaniose Cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis***. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro. V. 86, n. 6, p. 1092-1101. 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years**. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461–477. 2007.

OLIVEIRA, C.I. et al. **Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis**. *Drug Discov Today: Disease Models* 1(1): 81-86.2004.

OMS- Organização Mundial da Saúde\_ **Estado de epidemiologia das Leishmanioses de 2016**. <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em Março de 2019.

OMS\_ Organização Mundial da Saúde\_ **Controle das Leishmanioses**.2010.

OMS-Organização Mundial da Saúde\_ **Leishmaniose: Situação e tendências**. 2017. [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso em Março de 2019.

OPAS\_ Organização Pan-americana de saúde\_ **Informe Epidemiológico das Américas. Leishmanioses. Março, 2019**. Acesso em Março de 2019.

OPAS\_OMS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses, v. 2, p. 1–8, 2017**.

PAULA, C.D.R. et al . **Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 36, n. 3, p. 365-371. 2003.

PELLISSARI, D.M. et al. **Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia**. *Revista Infarma.* Vol 16.n7-8. 2004.

PINTO, E.G. et al. **Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships**. *PLoS One*. 9, e105127. 2014.

PIRES, A.M.S. et al. **Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão**. *Rev. Ciênc. Saúde*, São Luís, v.14, n.1, p. 30-39. 2012.

PIRMEZ, C. et al. **Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis**. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.1390-1395. 1993.

RAMESH, V. et al. **Comunicação breve: leishmaniose dérmica pós-kala-azar - uma avaliação**. *Trop. Med. Int. Saúde*. 12, pp. 848 – 851. 2007.

- RATH, S. et al . **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte.** Quím. Nova, São Paulo , v. 26, n. 4, p. 550-555, Aug. 2003 .
- REIS, L.C. et al. **Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana.** Rev Patol Trop.35(2): 103-115.2006.
- RENSLO, A.R.; MCKERROW, J.H.. **Drug discovery and development for neglected parasitic diseases.** Nat. Chem. Biol. 2, 701-710.2006.
- RIBEIRO, P. et al. **Caracterização da fração leve do alcatrão de hulha obtido da gaseificação do carvão mineral de Candiota/RS.** V congresso brasileiro de carvão mineral criciúma. 2017.
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. **Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question.** Expert Opinion on Drug Delivery, 5(7), 805–823.2008.
- SAMPAIO R.N.R.; MARSDEN, F.F.L.C. **Tratamento da forma Mucosa de Leishmaniose sem resposta a glucantime, com Anfotericina B liposomal.** An. Bras. Dermatol. V.30, n.2, p. 125-128.1997.
- SANTOS, D. O. et al. **Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review.** Parasitology Research, v. 103, n. 1, p. 1–10. 2008.
- SANTOS-GOMES, G.M. et al. **Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum.** Vet Immunol Immunopathol, 88, 21-30. 2002.
- SARAVIA, N.G. et al. **The relationship of Leishmania braziliensis subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis.** J. Infect. Dis. V.159, p. 725-735. 1989.
- SEGATTO, M. et al . **Genetic diversity of Leishmania infantum field populations from Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 107, n. 1, p. 39-47.2012 .
- SILVA, F.C. et al. **Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates.** Eur. J. Med. Chem. 44, 373–383.2009.
- SOLOMON, V.R.; LEE H. **Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery.** Curr Med Chem. 18(10), p. 1488-508. 2011.
- SOTO, J. et al. **Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis.** Clinical Infectious Diseases, 38(9), 1266–1272. 2004.
- SUN, Z. H. et al. **Characterization of asphaltene isolated from low-temperature coal tar.** Fuel Processing Technology, p. 6–11. 2014.
- SUNDAR S, SINGH A. **Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis.** Ther Adv Infect Dis. 2016.



SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. **Uma atualização sobre farmacoterapia para leishmaniose.** Opinião de Especialista em Farmacoterapia. 2014.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY J. **Uma atualização sobre farmacoterapia para leishmaniose.** . 2015.

TAVARES, G.S.V. et al. **Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against Leishmania infantum and Leishmania amazonensis Species.** Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2018.

TEMPONI A.O.D. **Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011.** Cad Saúde Pública. 2018.

ULIANA, S.R.B. et al. **Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges.** Parasitology. 145, 464-480. 2018.

VÉLEZ, I.D et al. **Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2009.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. **Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of Leishmania donovani.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(8), 3010–3015. 2004.

VYAS, S. P.; GUPTA, S. **Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification.** International journal of nanomedicine, v. 1, p. 417–432. 2006.

WANG, X.L., WAN, K., ZHOU, C.H.. **Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3- triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities.** Eur. J. Med. Chem. 45, 4631–4639.2010.

YARDLEY, VANESSA et al. **“Atividades antileishmanial e antitripanossoma da 8-aminoquinolina tafenoquina.”** *Agentes antimicrobianos e quimioterapia* vol. 54, 12 .2010.

## 9. ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Emprego de moléculas sintéticas no tratamento in vitro e in vivo das leishmanioses.", protocolo do CEUA: 85/2017 sob a responsabilidade de Eduardo Antonio Ferraz Coelho que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 05/06/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	20/05/2017 a 10/01/2021
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	Feminine
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c

Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/UFMG

Considerações posteriores:

05/06/2017	Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022
------------	---

Belo Horizonte, 23/09/2018. Atenciosamente,  
Sistema Solicite CEUA UFMG [https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 [www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)