

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

JÉSSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA
MOLÉCULA DERIVADA DE CLOROQUINOLINA CONTRA DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Belo Horizonte

2019

JESSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA
MOLÉCULA DERIVADA DE CLOROQUINOLINA CONTRA DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Infectologia e Medicina Tropical.

Área de Concentração: “Clínica, diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e tropicais”.

Orientador: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho.

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

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

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Humberto José Alves

VICE-DIRETORA: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Eli Iola Gurgel
Andrade

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS DO COLEGIADO

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Mariângela Carneiro

Profa. Mariana Costa Duarte

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

Grasiele de Sousa Vieira Tavares – Representante Discente

JESSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA
MOLÉCULA DERIVADA DE CLOROQUINOLINA CONTRA DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo Viana Leite
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Mário da Silva Giusta
Centro Universitário UNA

Profa. Dra. Vívian Tamietti Martins
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua
Universidade Federal de Minas Gerais

Sousa, Jéssica Karine Távora de.
SO725a Atividade biológica antileishmanial *in vitro* e *in vivo* de uma molécula derivada de cloroquinolina contra diferentes espécies de *leishmania* [manuscrito]. / Jéssica Karine Távora de Sousa. -- Belo Horizonte: 2019.
90f.: il.
Orientador (a): Vandack Alencar Nobre Júnior.
Coorientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Antiprotzoário. 2. Leishmaniose. 3. Terapêutica. 4. Toxicidade. 5. Dissertação Acadêmica. I. Nobre Júnior, Vandack Alencar. II. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecária responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



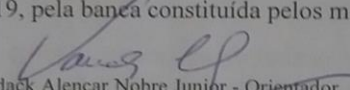
FOLHA DE APROVAÇÃO

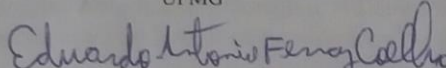
ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTILEISHMANIAL IN VITRO E IN VIVO DE UMA
MOLÉCULA DERIVADA DE CLOROQUINOLINA CONTRA DIFERENTES
ESPÉCIES DE LEISHMANIA

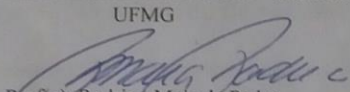
JÉSSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

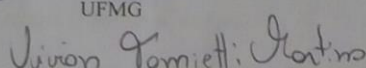
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, área de concentração INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

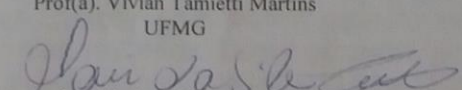
Aprovada em 23 de setembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

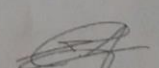

Prof(a). Vandaack Alencar Nobre Junior - Orientador
UFMG


Prof(a). Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Coorientador
UFMG


Prof(a). Rodrigo Maia de Padua
UFMG


Prof(a). Vivian Tamietti Martins
UFMG


Prof(a). Mario da Silva Giusta
UNA-BH


Prof(a). Joao Paulo Viana Leite - participação por videoconferência
Universidade Federal de Viçosa

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2019.

À minha mãe e meu padrasto, Rosilene Távora e Célio Pacheco.
Que sempre acreditaram em meus sonhos e me apoiaram.
Meus exemplos de alegria e disposição.
Certamente cada sorriso e momentos juntos estão gravados em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade que Ele me proporciona.

À minha mãe pelo apoio, amor e carinho.

Aos meus queridos amigos, Assmaa, Laura, Anneleike, Leila e Tiana, que se preocupam comigo, pelo cuidado de forma tão atenciosa e especial.

À toda minha família e amigos, por se orgulharem de todas as minhas conquistas.

Ao professor Vandack Alencar Nobre a minha gratidão pela confiança, responsabilidade, compromisso. Definitivamente sua contribuição, sensibilidade e paciência nessa jornada foram inestimáveis.

Ao professor Eduardo Antônio Ferraz Coelho por sua preocupação, empenho e dedicação inestimável nesse trabalho. Meus agradecimentos por sua permanente solicitude nas etapas da escrita dessa tese, bem como pelo o cuidado e diligência. Agradeço ainda pela oportunidade de ter me recebido no laboratório, paciência e orientação.

Aos professores Simone Gonçalves dos Santos e Cristina Dutra Vieira por terem me acompanhado ao longo de uma grande jornada, seu o apoio e incentivo foram inestimáveis.

Aos colaboradores desse trabalho, pela valiosa contribuição.

Aos amigos de laboratório, pela alegria, pelo ambiente agradável de cooperação, pela amizade e por toda ajuda. Devo dizer-lhes que aprendi muito vocês, a solidariedade, a disposição e o carinho foram indispensáveis nesse período.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher” (Cora Coralina)

RESUMO

A melhoria das condições de tratamento contra as leishmanioses é necessária, uma vez que os fármacos disponíveis atualmente são tóxicos e/ou apresentam alto custo, fazendo com que a busca por opções farmacêuticas mais seguras, eficazes e seletivas seja requerida. Esforços adotados para o desenvolvimento de novos candidatos a fármaco baseados em análogos de moléculas com função biológica conhecida tem sido uma estratégia interessante. Nesse contexto, derivados de quinolina têm apresentado atividade biológica contra diversas doenças. No presente estudo, um derivado de cloroquinolina, chamado de “AM1009” [N1-(7-chloroquinolin-4-yl)-N3-cyclohexylpropane-1,3-diamine], foi testado *in vitro* contra duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*, que podem causar leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, respectivamente. As concentrações inibitórias sobre 50% de formas promastigotas de *Leishmania* (EC₅₀), de macrófagos murinos (CC₅₀) e de hemácias humanas (RBC₅₀) foram avaliadas. Além disso, o tratamento de macrófagos infectados e a inibição da infecção em parasitos pré-tratados foram também avaliados. Na análise dos resultados, a molécula foi altamente efetiva contra os parasitos, não apresentou toxicidade significativa, além de ter sido efetiva no tratamento de macrófagos infectados e na inibição da infecção dessas células. Um efeito terapêutico *in vivo* foi observado em camundongos BALB/c que foram previamente infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente, tratados com AM1009. Na avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos nos animais infectados e tratados, os resultados mostraram uma maior atividade da AM1009 no tratamento dos camundongos infectados, quando comparados aos valores obtidos nos grupos controle, dentre os quais a anfotericina B; de forma que animais tratados com AM1009 apresentaram diâmetro médio da lesão e carga parasitária significativamente menor no tecido infectado e órgãos avaliados, quando comparado aos demais grupos. Também, uma resposta imunológica do tipo Th1 foi encontrada nesses animais, que também apresentaram baixa toxicidade renal e hepática. Em conclusão, os resultados sugerem que o AM1009 poderia ser considerado como um possível candidato a ser avaliado em estudos futuros para o tratamento contra as leishmanioses.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antileishmanial; cloroquinolina; tratamento; leishmaniose; toxicidade; hospedeiros mamíferos.

ABSTRACT

The identification of new candidates for the treatment against leishmaniasis is necessary, since drugs currently available are toxic and/or expensive; making the search for safer, more effective and selective pharmaceutical options necessary. Efforts to develop new candidates based on known biological function molecule analogues have been an interesting strategy. In this context, quinoline derivatives have shown biological activity against distinct diseases. In the present study, a chloroquinoline derivative, namely “AM1009” [N1- (7-chloroquinolin-4-yl) -N3-cyclohexylpropane-1,3-diamine], was *in vitro* tested against two *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *L. amazonensis*, which are capable of causing visceral and integumentary leishmaniasis, respectively. Inhibitory concentrations on 50% of *Leishmania* promastigotes (EC₅₀), murine macrophages (CC₅₀) and in human red blood cells (RBC₅₀) were evaluated. In addition, the treatment of infected macrophages and the inhibition of infection using pretreated parasites were also investigated. In the results, the molecule was highly effective against both parasite species, showing no significant toxicity, as well as it was also effective in the treatment of infected macrophages and in the inhibition of the infection by such cells. An *in vivo* therapeutic effect was found in BALB/c mice, which were previously infected with *L. amazonensis* promastigotes, and later treated with AM1009. In the evaluation of parasitological and immunological parameters in the infected and treated animals, results showed higher activity of AM1009 in the treatment of infected mice, when compared to data obtained in the control groups, among which amphotericin B was used; since AM1009-treated animals presented lower lesion mean diameter and parasite load in the infected tissue and organs, when compared to the other groups. In addition, a Th1-type immune response was found in such animals, which also presented low renal and hepatic toxicity. In conclusion, results suggest that AM1009 could be considered as a possible therapeutic target to be evaluated in future studies for the treatment against leishmaniasis.

KEYWORDS: Antileishmanial activity; chloroquinoline; treatment; leishmaniasis; toxicity; mammalian hosts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> sp.	23
Figura 2	Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> sp.	24
Figura 3	Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	24
Figura 4	Representação da estrutura química dos compostos.....	34
Figura 6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em parasitas tratados com AM1009.....	49
Figura 7	Produção de espécies reativas de oxigênio em <i>L. amazonensis</i> tratada com AM1009.....	49
Figura 8	Ação do AM1009 no ciclo celular de <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 9	Formação de vacúolos autofágicos em parasitos tratados com AM1009.....	50
Figura 10	Eficácia terapêutica dos compostos testados <i>in vivo</i>	51
Figura 11	Resposta imune nos camundongos infectados e tratados.....	52
Figura 12	Toxicidade <i>in vivo</i> nos camundongos infectados e tratados.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade antileishmanial, citotoxicidade e índice de seletividade.....	46
Tabela 2	Tratamento de macrófagos infectados.....	47
Tabela 3	Inibição da infecção de macrófagos utilizando parasitos pré-tratados.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AQ	Amodiaquina
AST	Aspartato aminotransferase
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
CQ	Cloroquina
DAT	Teste de aglutinação direta
dLN	Linfonodo drenante
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle médium</i>
DMSO	Dimeltisufóxido
ELISA	Teste de imunoadsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
FCCP	Carbonil Cianeto p-Trifluormetoxifenil Hidrazona
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GPI	Glicosil-fostatidil-inositol
HBSS	<i>Hanks' Buffered Salt Solution</i>
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7' - diclorodihidrofluoresceína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-	Interleucina
IS	Índice de seletividade
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' -tetracloro1,1',3,3' -tetraetilbenzimidazolcarbocianina
IM	Intramuscular
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LDL	Leishmaniose difusa-localizada
<i>Ldmt</i>	<i>L. donovani miltefosine transporter gene</i>
LM	Leishmaniose mucosa

LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MCR	Reações multi-componentes
MDR1	<i>Multi-drug resistance gene</i>
MST	<i>Montenegro Skin Test</i>
NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PA	Para análise
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
rDT	<i>Rapid diagnostic test performance</i>
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SLA	Extrato proteico antigênico solúvel de <i>Leishmania spp</i>
SSG	Estibogluconato de sódio
Th	Linfócito T auxiliar
TLC	Cromatografia em camada delgada
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
2	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1	LEISHMANIOSES: ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA.....	21
3.2	CICLO BIOLÓGICO.....	22
3.3	ESPECTRO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES.....	24
3.4	RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE MURINA.....	26
3.5	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	27
3.6	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	28
3.7.1	Antimoniais pentavalentes.....	29
3.7.2	Anfotericina B.....	30
3.7.3	Pentamidina.....	31
3.7.4	Miltefosina.....	32
3.8	COLORQUINOLINA.....	33
3.8.1	Estrutura e aplicações terapêuticas.....	33
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	SÍNTESE QUÍMICA DA AM1009.....	40
5.2	ANIMAIS E PARASITOS.....	40
5.3	ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL <i>IN VITRO</i>	41
5.4	CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS E HEMÁCIAS HUMANAS.....	41
5.5	TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS E INIBIÇÃO DA INFECÇÃO.....	41
5.6	MECANISMO DE AÇÃO EM <i>Leishmania amazonensis</i>	42
5.6.1	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	42
5.6.2	Produção de espécies reativas de oxigênio.....	42
5.6.3	Análise do ciclo celular e formação de vacúolos em autofagia.....	43

5.7	ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL <i>in vivo</i>	43
5.7.1	Infecção e tratamento.....	43
5.7.2	Carga parasitária nos animais tratados e infectados.....	44
5.7.3	Resposta imune.....	44
5.7.4	Toxicidade orgânica.....	45
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1	ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL, CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE	46
6.2	TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS E INIBIÇÃO DA INFECÇÃO.....	47
6.3	MECANISMO DE AÇÃO.....	48
6.4	ESTUDOS TERAPÊUTICOS <i>IN VIVO</i>	51
6.5	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	59
8	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO.....	73

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A princípio, a proposta inicial do autor seria em outra linha de pesquisa, ao avaliar a formação do biofilme em cateter venoso central de pacientes com infecção de corrente sanguínea. O interesse nessa abordagem surgiu a partir de resultados promissores obtidos durante o mestrado e no ano anterior, envolvendo outros dispositivos médicos tais como pinças cirúrgicas e cateteres impregnados com antimicrobianos. A intenção era expandir os testes que eram realizados *in vitro* na detecção do biofilme para o estudo clínico. Entretanto, foram encontrados problemas relevantes, que dificultaram a continuidade do estudo. O ritmo de inclusão de pacientes vinha sendo menor do que o necessário para atingirmos o tamanho amostral previsto, além disso, o financiamento estava comprometido.

O despertar para a pesquisa em doenças infecciosas e medicina tropical deveu-se ao interesse pela temática desde a graduação, particularmente, em estudos sobre toxoplasmose e leishmanioses. Inicialmente, foi um desafio o processo de transição entre linhas de pesquisas diferentes, aprender sobre conceitos, técnicas, mecanismo de resposta imune entre outros, contudo essa foi uma experiência única. A escolha pela linha de tratamento das leishmanioses me fez lembrar projetos de pesquisa desenvolvidos ainda na graduação com o mesocarpo do babaçu, uma planta nativa da minha região, no tratamento de lesões ulcerativas de leishmaniose. Acredito que esse foi um dos primeiros estudos que me impulsionou a seguir a carreira acadêmica. O ambiente acolhedor e apoio dos colegas do laboratório coordenado pelo professor Eduardo foram essenciais e encorajadores nesse processo.

Este foi um estudo que exigiu uma nova forma de pesquisa, pois foi o primeiro nesta perspectiva. É oportuno, neste ponto, compreender a importância que as pesquisas sobre as leishmanioses representam no país. O Brasil está entre os países que mais reportam casos de leishmaniose visceral e tegumentar no mundo, mostra-se, mais do que nunca, imprescindível para a comunidade a socialização e publicitação da pesquisa educacional produzida. Dada a crise que permeia e ameaça as instituições voltadas para a produção de conhecimento na prática científica, particularmente as universidades públicas.

O presente trabalho partiu da necessidade de novas opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses. Diante do atual cenário, os fármacos utilizados são limitados devido ao alto custo, toxicidade e efeitos colaterais. Além disso, a resistência dos parasitos aos fármacos tem causado a recidiva de casos. Considerando esses fatores e o contexto em que as

doenças negligenciadas estão inseridas, concluímos que uma abordagem diferencial e testes com novos compostos representariam um avanço na terapia antileishmanial

Ainda em 2017, a aprovação do projeto de pesquisa pela Universidade Federal de Minas Gerais intitulado “Emprego de moléculas sintéticas no tratamento *in vitro* e *in vivo* das leishmanioses” impulsionou as pesquisas e testes pelo grupo de tratamento das leishmanioses. Desde então, vários trabalhos foram publicados destacando a atividade biológica desses compostos. Os estudos dos derivados de quinolina, como a cloroquinolina, o clioquinol, desenvolvidos nesse período, contribuíram para compreensão do mecanismo de ação dessas moléculas bioativas, bem como a sua eficácia terapêutica.

O desenvolvimento deste trabalho contou com a colaboração dos autores na execução dos experimentos, em especial nos testes *in vivo* que requerem participação de uma grande equipe. Em um primeiro momento, os testes *in vitro* demonstraram os resultados sobre a inibição do crescimento das espécies de *Leishmania*, na presença e ausência da molécula AM1009. Da mesma forma, a citotoxicidade em macrófagos e hemácias humanas foram avaliadas com a finalidade de identificar se houve toxicidade celular nessas células. O teste de inibição da infecção em macrófagos infectados foi fundamental para a verificar a eficácia do regime terapêutico adotado. Finalizamos o trabalho como a avaliação do mecanismo de ação do composto na biologia do parasito e o estudo *in vivo*.

É preciso ressaltar a inestimável contribuição de nossos colaboradores para que algumas análises fossem realizadas. Nesse sentido, destacamos os testes realizados para avaliar o mecanismo de ação, ou seja, a interação bioquímica da molécula testada contra a *Leishmania*. A compreensão desse processo é fundamental para a elegibilidade de um composto.

Nesse contexto, o trabalho tem formato de análises experimentais que visa avaliar a atividade de um derivado de cloroquinolina contra duas importantes espécies de *Leishmania* e almeja por meio deste estudo contribuir na busca por novos candidatos para o tratamento das leishmanioses.

2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Comumente, encontram-se distribuídas em regiões com clima subtropical e tropical do mundo, em partes da Ásia, Oriente Médio, Sul da Europa e África. No hemisfério ocidental, as leishmanioses são endêmicas em regiões do México, América Central e América do Sul (CDC, 2018)

A Organização Mundial de Saúde considera as leishmanioses como uma das seis mais importantes doenças tropicais e negligenciadas, responsável por 350 milhões de pessoas em risco e cerca de 12 milhões de infectados em 98 países. Estima-se também que ocorram anualmente 2 milhões de casos novos (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017 ; WHO,2018). Nas Américas, em 2017, 17 países reportaram 49.959 casos de leishmaniose tegumentar (LT). Dentre eles, o Brasil (17.526), a Colômbia (7.764), a Nicarágua (4.343) e o Peru (6.631) representaram 72,6% dos casos. Por outro lado, no mesmo período foram registrados 59.769 casos de leishmaniose visceral (LV), cerca de 96% dos casos (57.582) reportados pelo Brasil, Colômbia, Paraguai e Venezuela (OPAS/OMS, 2019). No Brasil, cerca de oito espécies de *Leishmania* são patogênicas ao homem: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainson*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenbergi* (STEVERDING, 2017; ANVERSA et al., 2018).

A infecção humana ocorre pela picada do flebotomíneo fêmea infectado, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. As manifestações clínicas e a severidade da doença podem variar de acordo com a condição imunológica do hospedeiro e a espécie infectante do parasito, podendo apresentar evolução aguda ou crônica (TORRES-GUERRERO et al., 2017). As principais formas clínicas são: LT e LV. Na LT, o parasito é tomado por macrófagos residentes no local da picada do inseto vetor. Desta forma, quando a célula do hospedeiro está repleta de parasitos ela entra em apoptose e libera amastigotas que serão fagocitadas por macrófagos e darão continuidade a infecção (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Dependendo do parasito, a LT pode progredir para manifestações clínicas mais graves, tais como, a leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose difusa localizada (LDL). As lesões cutâneas podem apresentar evolução lenta, de a 3 a 18 meses, entretanto, podem formar cicatrizes, lesões desfigurantes e incapacitantes.

Na LV, o parasita é tomado por células do sistema fagocítico-mononuclear. Ao realizar a repasto sanguíneo, o flebótomo transmite a doença ao inocular formas promastigotas na pele do mamífero. Os parasitas são internalizados por células dendríticas e macrófagos da derme, se

transformando em formas amastigotas. A partir disso, ocorre a multiplicação e disseminação através dos sistemas linfático e vascular, infectando outros monócitos e macrófagos do sistema retículo-endotelial (CHAPPUIS et al., 2007; SUNDAR, 2016).

A evolução da LV pode ocorrer de modo assintomático, agudo ou crônico. Os casos assintomáticos são comuns em área endêmicas. Por outro lado, os casos agudos apresentam sintomas e sinais de infecção como febre prolongada, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso (ASHFORD, 2000). A forma crônica de LV, também conhecida como kalazar, apresenta sinais de infecção sistêmica persistente como febre intermitente, geralmente associada a rigor e calafrios, aumento dos linfonodos e hepatoesplenomegalia. A fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, que é causada pelo estado inflamatório persistente e pelo hiperesplenismo seguida por sangramento. Nesses casos, se não tratada, a LV pode evoluir para a morte (CHAPPUIS et al., 2007; KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2016).

O diagnóstico da LV é complexo devido às características clínicas similares com doenças mais comuns, tais como malária e tuberculose (SUNDAR, 2002). O diagnóstico laboratorial envolve testes sorológicos e parasitológicos. Os testes sorológicos comumente utilizados são o DAT (teste direto de aglutinação) e o teste de diagnóstico rápido (RDT) rK39 dipsticks – Inbios® e DiaMed – IT LEISH®, também conhecido como Opti-Leish. Por outro lado, o teste parasitológico é baseado na identificação do parasito através da microscopia do espécime corado, geralmente obtida de aspirados de linfonodos, medula óssea ou baço (ARONSON et al., 2017).

Em geral, os casos clinicamente confirmados de LV e LT devem ser tratados, sendo considerado como de primeira escolha o uso de antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). A forma lipossomal da anfotericina B administrada pela via parenteral é utilizada no Brasil como fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV. Apesar de ser menos tóxica que a forma convencional (anfotericina desoxicolato), o tratamento prolongado e custo elevado são ainda um desafio no regime terapêutico. Além das formulações de anfotericina B, existem outras opções disponíveis, tais como a pentamidina, paromicina e mitelfosina. A indicação dessas opções depende de fatores individuais, como a tolerância, recidiva/ou resistência, o estado imunológico e a co-infecção com o vírus HIV. Embora existam opções disponíveis para o tratamento das leishmanioses, problemas relacionados à sua toxicidade, alto custo e desenvolvimento de cepas resistentes limitam a eficácia dessas terapias. A administração prolongada destes compostos pode causar efeitos colaterais, como toxicidade renal, hepática e cardíaca; desta forma, a busca

por novos compostos, tais como produtos naturais e/ou sintéticos, podem melhorar o cenário atual contra a doença.

Algumas classes de moléculas, tais como flavonoides, terpenoides, quinolinas, dentre outras; mostram graus variáveis de sucesso como agentes antileishmaniais (BEER et al., 2016; GERVAZONI; GONÇALVES-OZÓRIO; ALMEIDA-AMARAL, 2018; LIMA et al., 2015). Neste aspecto, derivados de quinolina têm sido testados como importante classe de fármacos, apresentando potente atividade antitumoral, antiprotozoária, antimicrobiana e anti-inflamatória; sem causar toxicidade significativa aos hospedeiros mamíferos (ABDELWAHID et al., 2019; NQORO; TOBEKA; ADERIBIGBE, 2017; TEJERÍA et al., 2019).

Estudos têm mostrado a atividade antileishmanial seletiva dos compostos à base de quinolina contra espécies diferentes de *Leishmania* (ANTINARELLI et al., 2018; DUARTE et al., 2016; SOYER et al., 2019). Um dos derivados de quinolina, o clioquinol (5-cloro-7-iodoquinolin-8-ol), apresentou alta eficácia contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, sem causar toxicidade em macrófagos murinos. Além disso, o composto foi eficaz no tratamento de macrófagos infectados e na inibição da infecção dessas células usando parasitas pré-tratados (TAVARES et al., 2018). Em outro estudo, o clioquinol foi incorporado a um sistema de entrega baseado em Poloxâmero 407, e a formulação mostrou-se eficaz no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* (MENDONÇA et al., 2019). Nesse contexto, o presente estudo propôs avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* de um novo derivado de cloroquinolina, AM1009 [N1-(7-cloroquinolin-4-il)-N3-ciclohexilpropano-1,3-diamina], contra as espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*, capazes de causar LT e LV no Brasil, respectivamente. Os resultados obtidos nesse trabalho poderão contribuir para a identificação de novos compostos com maior atividade biológica e seletividade para o tratamento contra as leishmanioses; informação relevante no cenário atual de resistência e toxicidade dos agentes antileishmaniais disponíveis.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEISHMANIOSES: ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. Apresentam uma distribuição global, principalmente, na África, Ásia e Américas, com incidência anual estimada de 1,5 a 2,0 milhões de novos casos, sendo entre 1,0 e 1,5 milhão referentes à LT, e cerca de 0,5 milhões de casos de LV (WHO,2018).

Segundo Alvar et al. (2012), como parte de um esforço liderado pela Organização Mundial da Saúde para atualizar os dados sobre os casos de leishmanioses nos últimos anos, 98 países em 5 continentes foram considerados endêmicos para as leishmanioses. Estima-se que mais de 90% dos casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil; enquanto que 75% dos casos de LT são concentrados em Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru.

Na África, a doença é endêmica em países, tais como Nigéria, Mali, Senegal e Sudão do Sul. A distribuição da doença é variável, porém, os casos de LV têm se tornados recorrentes em comunidades do leste africano (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) com alta morbidade e mortalidade (WHO, 2018). Um estudo recente no Sudão do Sul demonstrou que a migração forçada em decorrência da guerra civil no país, além dos fatores já conhecidos como a pobreza, difícil acesso à saúde, falta de coleta de lixo e esgoto; foram responsáveis pelo aumento da epidemia de LV no país (AL-SALEM; HERRICKS; HOTEZ, 2016).

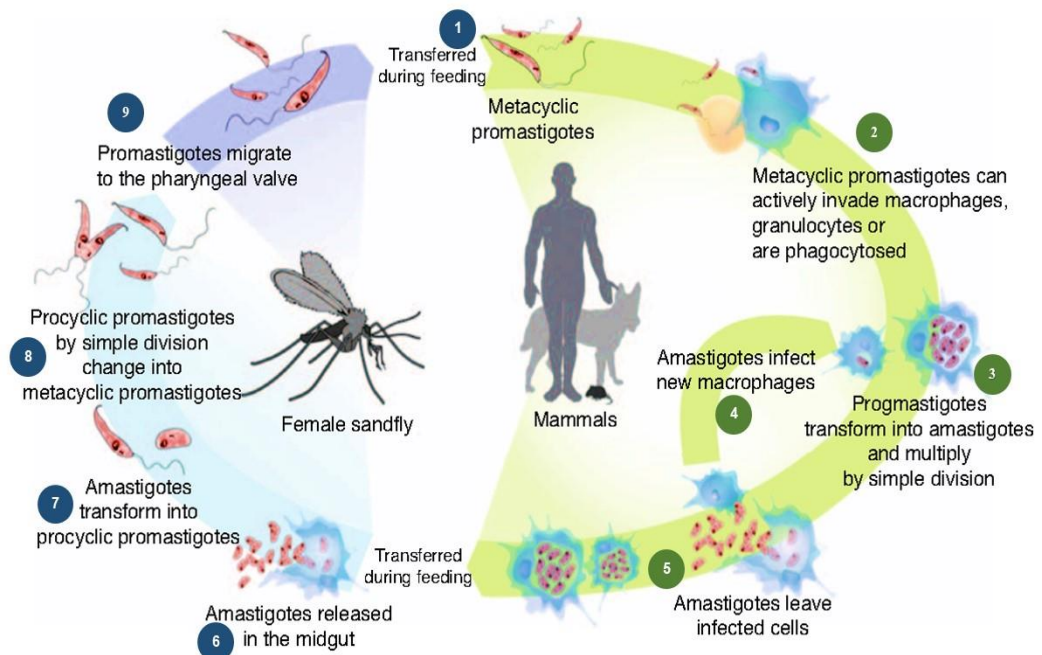
Na Ásia, a LV é um problema de Saúde Pública, principalmente, em Bangladesh, Índia, Butão e Nepal (RIJAL et al., 2019) Em colaboração com a Organização Mundial da Saúde, o Programa Regional de Eliminação do Kalazar trouxe progresso no combate à doença, com enfoque no controle de vetores, na melhoria da vigilância para reduzir a transmissão e melhor notificação dos casos (WHO, 2017). Com base nos casos notificados no subcontinente indiano, houve um declínio na incidência da doença observada em Bangladesh e no Nepal. Entretanto, na Índia, a incidência aumentou em 2010 com maior número de casos sendo relatado nos distritos de “North Bihar” e “Muzaffarpur” (WHO,2012). Os casos notificados de LV no Subcontinente Indiano estão relacionados à espécie *Leishmania donovani* (KARUNAWEEERA; FERREIRA, 2018; KATAKURA, 2009). Por outro lado, nos casos de LT, as espécies relatadas são *Leishmania major* e *Leishmania tropica* (AKTER et al., 2016).

Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países e, no período de 2001 e 2017, foram registrados 59.769 novos casos, com uma média de 3.516 casos por ano. Cerca de 96% (57.582) dos casos foram reportados no Brasil, seguido por Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela; que também apresentam um número elevado de registros de casos. Para LT, um total de 940.396 novos casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) foram reportados em 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001 a 2017, com média anual de 55.317 casos (OPAS/WHO, 2019).

Embora o número de casos seja expressivo em todo mundo, plano de ações que visem a fortalecer a vigilância e o controle das leishmanioses foram realizados na Américas, um instrumento que consolida linhas de ação até 2022. No Brasil, o SINAN (Sistema de Notificação de Agravos) é uma plataforma útil para notificação, com cálculos dos principais indicadores epidemiológicos utilizados para a avaliação local, municipal, estadual e nacional. A partir dessas informações, será possível a adoção de ações que permitam planejar e adotar medidas de prevenção e controle das leishmanioses (SINAN,2019).

3.2 CICLO BIOLÓGICO

A transmissão para hospedeiros mamíferos ocorre pela picada do vetor flebotomíneo, principalmente, do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. Como muitos parasitos protozoários, a *Leishmania* tem um ciclo de vida digenético envolvendo hospedeiros e insetos vetores (Figura 1) (BATES, 2018). No hospedeiro mamífero, o parasito apresenta morfologia celular de amastigota, caracterizada por formas esféricas ou ovais (Figura 2A), com multiplicação no interior das células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro vertebrado. Uma vez que as fêmeas dos flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, tornam-se infectadas se ingerirem sangue e/ou linfa intersticial contendo macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* (ANVERSA, 2018; SUNTER; GULL, 2017).

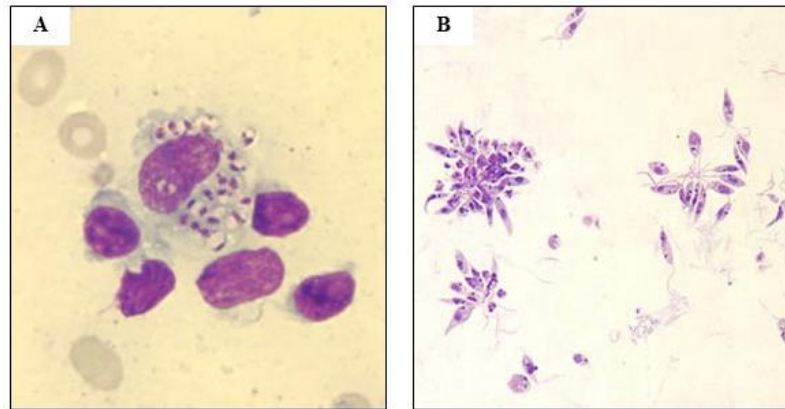


Fonte: Harhay et al. (2011a) figura adaptada

Figura 1 – Ciclo biológico do parasita *Leishmania* spp. Os flebotomíneos infectados injetam as formas promastigotas metacíclicas durante a hematofagia (1). A partir de então, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas (2). No interior dessas células, o parasita se diferencia na forma amastigota (3), se multiplica, infectando novos macrófagos (4), e disseminando a infecção (5). O vetor, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, ingere formas amastigotas que são liberadas em seu intestino (6). As formas amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas (7) e, em seguida, em promastigotas metacíclicas (8). As formas promastigotas infectantes migram para a válvula faríngea, onde poderão ser injetadas quando de novo repasto sanguíneo (9).

No trato digestivo do vetor, as formas amastigotas são diferenciadas em promastigotas, caracterizadas por serem alongadas, flageladas e móveis (Figura 2B). Ainda no trato digestivo do vetor, promastigotas passam por vários estágios até alcançar a forma infectante para o hospedeiro vertebrado, denominada de promastigota metacíclica (ANVERSA, 2018; SUNTER; GULL, 2017). A forma promastigota metacíclica é inoculada na derme do hospedeiro mamífero e os parasitos são fagocitados por células do sistema fagocítico do hospedeiro, onde se diferenciam em formas amastigotas e multiplicam-se, infectando novos macrófagos e disseminando a infecção (BATES, 2018). Um estudo recente demonstrou que a estratégia de transmissão de *Leishmania* depende do potencial de transmissão das formas promastigotas e da composição do inóculo, ou seja, a proporção de promastigotas transferidas durante o repasto sanguíneo (GIRAUD et al., 2019). A doença pode ser causada por cerca de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Tanto fatores relacionados ao hospedeiro quanto aqueles relacionados ao parasita contribuem para a infecção. No hospedeiro vertebrado, destacam-se os

riscos ambientais e o estado imunológico que influenciarão nas manifestações clínicas da doença.



Fonte: CDC www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html

Figura 2 – Formas morfológicas de *Leishmania* spp. A - Formas amastigotas de *Leishmania* spp. em raspagem de tecido corado com Giemsa; B - Formas promastigota de *Leishmania* spp. de cultura.

3.3 ESPECTRO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES

A LT é caracterizada por um espectro de manifestações clínicas variadas: lesões ulcerativas na pele localizadas no sítio da picada do flebotomíneo (LCL), formação de múltiplos nódulos não ulcerativos (LCD) e inflamação destrutiva cutâneo e mucosa (LM) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).



Fonte: Zerpa et al. (2018,p.181) figura adaptada.

Figura 3 – Formas clínicas de Leishmaniose tegumentar. A-Leishmaniose cutânea localizada; B-Leishmaniose cutâneo-difusa; C- Leishmaniose mucosa.

Na LCL, o primeiro sinal de infecção é um pequeno eritema que se desenvolve num período após a picada pelo flebótomo infectado. Em aproximadamente 2 a 6 meses esse eritema forma uma pápula e progressivamente uma úlcera (Figura 3A). O grau de severidade e comprometimento cutâneo varia de acordo com o tamanho da lesão, a aparência clínica (forma clássica, disseminada ou recidivante) e o tempo de cura espontânea (REITHINGER, 2007).

Diferentemente da LCL, a LCD possui difícil tratamento e a maioria dos pacientes não evoluem para a cura espontânea. Essa forma da doença é rara, o parasito cresce incontrolavelmente no interior das lesões não ulcerativas e difusas (Figura 3B). Um estudo realizado por Christensen et al. (2018) demonstrou a ausência de resposta imunológica protetora nos pacientes com LCD frente às células coletadas de biópsias de lesões. Nesse caso, os macrófagos do hospedeiro não conseguem destruir o parasito e conter a infecção, contribuindo para a natureza difusa de doença.

A LM é caracterizada pela capacidade do parasito em se desenvolver progressivamente no tecido mucoso nas vias linfática ou hematogênica. Normalmente, inicia-se com uma inflamação no nariz que evolui para ulceração e perfuração do septo nasal (Figura 3C). Outras áreas podem ser sítios comuns das lesões, tais como lábios, bochechas, palato mole, faringe ou laringe (em casos mais graves). A cicatrização espontânea não ocorre e o tratamento é difícil, principalmente, devido à recorrência de infecções secundárias que podem ser fatais ou causar morbidade (REITHINGER, 2007).

As espécies de *Leishmania* geralmente envolvidas em acometimentos mucosos são: *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. tropica* e *L. braziliensis* (GUERRA et al., 2011; HU et al., 2012; FINK et al., 2016). Na América do Sul, a espécie *L. braziliensis* pode causar complicações sérias e desfigurantes conhecidas como espundias (OLIVEIRA et al., 2000; GONTIJO et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2016; MEMBRIVE et al, 2017). Algumas espécies podem também causar lesões cutâneas, como *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *L. major* (MCILWEE; WEIS; HOSLER, 2018; VAN HENTEN et al., 2019).

A LV é a forma clínica mais grave da doença, geralmente, os indivíduos podem apresentar febre, mal-estar, perda de peso, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. Se não realizado o tratamento adequado, os casos agudos podem progredir para a morte por infecções secundárias e/ou por anemia severa. A doença apresenta modos de evolução diferentes: agudo, assintomático ou crônico. A forma de evolução aguda é comum em crianças até 2 anos de idade, caracterizada por febre persistente e aumento moderado do baço. Harhay et al. (2011b) demonstraram o perfil demográfico e nutricional dos afetados por LV, aproximadamente, 45% das crianças nepalesas e indianas com menos de 5 anos apresentaram desnutrição severa,

entretanto, é difícil de avaliar se a desnutrição constitui um fator de risco ou se seria um resultado da LV em tal população (ZACARIAS et al., 2017).

Os casos assintomáticos ocorrem entre 6 a 18 meses após a infecção. A forma crônica da doença, também conhecida como “kalazar”, pode perdurar de 2 ou mais anos após a infecção, sendo esse período intercalado por uma recuperação quase completa, porém, ainda com esplenomegalia. A evolução da doença é prolongada causando febre irregular, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, cefaleia, dores musculares, dentre outros sintomas. O nome “kalazar” foi descrito no final do século XIX, derivado da palavra indiana “kala-azar” que significa “febre negra”. A denominação se refere à descoloração acinzentada da pele dos pacientes, quando do curso da infecção (STEVERDING, 2017).

Casos de co-infecção por HIV e *Leishmania* tem sido estudados devido aos desafios e impactos na imunopatogênese, manifestações clínicas, diagnóstico e resposta terapêutica, especialmente, no que se refere à toxicidade e falha da terapia, recidiva, poucas opções de tratamento e difícil prognóstico (JARVIS; LOCKWOOD, 2013; LINDOSO et al., 2018). Além disso, a LV afeta negativamente a resposta aos antirretrovirais (MACQUARRIE. et al., 2015; SONG; GUI; GUAN, 2014; WELAY; ALENE; DACHEW, 2016). As espécies relacionadas com casos de LV são: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. amazonensis* (READY, 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

3.4 REPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE MURINA

A eliminação do parasito depende de uma ação coordenada mediada pela resposta imune inata (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e adaptativa (células T). A imunidade adaptativa promove a produção de citocinas que ativam a atividade antiparasitária dos macrófagos e contribuem na resposta a infecção. As células T CD4⁺ diferenciam-se em células Th1 e Th2, a produção de IFN- γ pelas células Th1 são essenciais na resolução da infecção, ao induzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos e controlar a multiplicação do parasito. Por outro lado, as células Th2 estão associadas a produção de citocinas como, IL-4, IL-13 que nesse caso não conferem proteção, mas susceptibilidade (NYLÉN, GAUTAM, 2010; ROBERTS, 2006).

Em modelos experimentais murinos, os camundongos BALB/C apresentam susceptibilidade á infecção por *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. infantum*, ou seja, a infecção progride espontaneamente para a fase crônica da doença sem eliminação total dos parasitos (LIPOLDOVA et al, 2000; PADIGEL et al, 2003; SACKS, NOBEN-TRAUTH 2002). Esse

modelo de infecção, geralmente é adotado para avaliar os efeitos de um novo tratamento e antígenos vacinais. Entretanto, a resposta imune nos animais infectados experimentalmente pode variar de acordo com o inóculo dos parasitos utilizados, o tempo de infecção e a via de administração.

Cabezas et al 2019 demonstram o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 em camundongos BALB/c infectados com *L. infatum* e aumento de anticorpos do tipo IgG1 gradativamente com o curso da infecção. Estudos de modelos distintos de camundongos podem ser representativos do espectro da doença variando entre aqueles que provavelmente desenvolverão a doença, casos assintomáticos e aqueles que são capazes de resolver a infecção.

Outras linhagens de camundongos, tais como SV/129, C57BL/6, C57BL/10 apresentam resistência a infecção por *L. donovani* e *L. major*, respectivamente (CABEZAS et al 2019, LOEUILLET et al, 2016). A resistência ou suscetibilidade dos camundongos a infecção é condicionada por determinantes genéticos. As linhagens geneticamente resistentes apresentam o gene *Scll 1a1*, como os camundongos CBA, que confere o controle da carga parasitária pelo fígado e baço.

3.5 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

O diagnóstico da LT é baseado em características clínicas e nos testes laboratoriais, que incluem a pesquisa direta do parasito (microscopia, histopatologia e cultura), testes sorológicos diretos ou indiretos ou diagnóstico molecular. O teste parasitológico é considerado padrão-ouro no diagnóstico da doença devido à sua elevada especificidade. Basicamente, é realizado a partir da avaliação histopatológica de tecidos com lesões suspeitas ou de culturas *in vitro*. A microscopia direta permite a identificação de formas amastigotas da lesão coradas com Giemsa, em amostras provenientes de esfregaços de biopsias e raspagens (GOTO; LINDOSO, 2010).

Embora testes sorológicos, tais como ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática), Western Blot, teste direto de aglutinação estejam disponíveis, tais métodos são pouco utilizados para o diagnóstico da LT, devido à baixa resposta humoral e conseqüente pouca sensibilidade para detectar casos positivos (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). O teste de Montenegro (MST) era usado no diagnóstico da LT, porém a produção do antígeno foi descontinuada no Brasil. Basicamente, trata-se de um marcador de resposta imune celular, que traduz uma resposta de hipersensibilidade tardia mediada por células T. O teste consiste na administração intradérmica de 0,1 mL (o volume padrão utilizado) do antígeno (promastigotas mortas por fenol) no antebraço do indivíduo. Após 48 ou 72 h, a leitura deve ser realizada e o resultado é

considerado positivo quando a induração (inflamação, eritema ou erupção cutânea) for igual ou maior que 5 mm. O MST é fácil, acessível e não necessita de equipamentos sofisticados, entretanto, sua produção foi descontinuada no Brasil (BRAZ, 2019; JOSÉ et al., 2001). Novas metodologias e combinações de testes têm sido então aprimoradas. Um estudo no Irã desenvolvido por Pagheh et al. (2014) demonstrou alta sensibilidade e rapidez no método de micro-cultura quando comparado com o diagnóstico molecular por PCR (reação em cadeia de polimerase) e o teste de esfregaço, como um método não invasivo no diagnóstico da LT.

No diagnóstico da LV, o teste parasitológico também é adotado para a identificação do parasito em amostras de aspirados do baço ou medula óssea. As formas amastigotas podem ainda ser encontradas em biopsias hepáticas e aspirados dos linfonodos. As técnicas de PCR e ELISA são ferramentas molecular e sorológica, respectivamente, úteis no diagnóstico da LV. O diagnóstico baseado em PCR demonstrou alta especificidade e sensibilidade em vários estudos, a partir do uso de *primers* desenhados para amplificar sequências conservadas do kDNA de *Leishmania* (BENSOUSSAN et al., 2006; HOSSAIN et al., 2017). Apesar dos crescentes progressos realizados nos últimos anos, a PCR ainda está distante de uma aplicação rotineira em áreas endêmicas, especialmente, devido aos custos com reagentes e equipamentos que dificultam a transição da pesquisa básica para a prática clínica (GALLUZZI et al., 2018).

O ELISA possui sensibilidade de 100% e 96% respectivamente, porém, a especificidade depende do antígeno (SRIVASTAVA, et al., 2012). A proteína rK39 tem sido utilizada no sorodiagnóstico da LV, por estar relacionada com a doença na fase aguda e ter potencial para monitorar a terapia, além de ser capaz de prever recidivas clínicas (SUNDAR; RAI, 2002; MNIOUIL et al., 2018). Uma revisão sistemática de meta-análise comparando o antígeno rK39 e outras metodologias no diagnóstico sorológico da LV demonstrou que a proteína utilizada em fita, ELISA ou DAT (teste de aglutinação direta) representa uma boa escolha para a implementação do teste. Os autores sugeriram que em áreas endêmicas, o uso do teste imunocromatográfico e DAT sejam realizados antes de iniciar o tratamento antileishmanial, quando a demonstração do parasito em biópsias de medula óssea ou aspirados de baço não estiver disponível (MAIA et al., 2012). Outros estudos usando amostras de urina e saliva também mostraram resultados promissores de tal antígeno (KHAN et al., 2010; SINGH et al., 2013; VAISH et al., 2012).

3.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Para o tratamento da LT, a escolha do fármaco, a dose e duração da terapia devem ser feitas de forma individual. Além disso, a espécie do parasito e fatores relacionados ao hospedeiro devem ser considerados. De fato, não existe um tratamento universalmente aplicável, o regime terapêutico pode variar em terapia sistêmica com anfotericina B desoxicolato ou com sua formulação lipossomal; além do uso de antimônio pentavalente e pentamidina. As opções de tratamento oral incluem a miltefosina e antifúngicos do grupo azóis, como fluconazol e cetoconazol (ARONSON et al., 2017).

Outras alternativas têm se mostrado promissoras no tratamento da LT, tais como a injeção intralesional com antimônio de meglumina, que é realizada pelo Instituto Nacional de Doenças Infecciosas no Rio de Janeiro, particularmente, em pacientes sem comprometimento de mucosa e contraindicação de tratamento sistêmico (DUQUE et al., 2016; PIMENTEL et al., 2017). Outros estudos demonstraram também melhores resultados com o sódio estibuglonato no tratamento intralesional (SOMARATNE et al., 2019).

O tratamento da LV, por outro lado, continua sendo um motivo de preocupação e desafio no regime terapêutico da doença. O tratamento disponível é limitado à terapia sistêmica com anfotericina B desoxicolato ou lipossomal, antimônio pentavalente ou a pentamidina, que possuem elevada toxicidade hepática e renal, além dos efeitos colaterais, falha terapêutica e/ou resistência dos parasitas. Apesar de fácil administração por via oral e do tratamento domiciliar, a miltefosina apresenta efeito teratogênico e persistência residual no organismo por longo período, desta forma, é contraindicada para mulheres em idade fértil (SINGH et al., 2016).

Alguns avanços foram adquiridos no tratamento contra as leishmanioses, mas duas tendências merecem ser destacadas: o reconhecimento da toxicidade sistêmica associada ao tratamento com antimônio e o avanço em estudos com terapias alternativas, tais como a crioterapia com nitrogênio líquido em tratamento combinado ou não, terapias tópicas com paromomicina e estudos com novas formulações mais acessíveis e com baixa citotoxicidade (BRITO; RABELLO; COTA, 2017; PARVIZI et al., 2017; SHADDEL et al., 2018).

3.7.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimônios têm sido usados no tratamento contra as leishmanioses em vários países. O primeiro registro do uso do antimônio trivalente para tratamento da LT foi descrito por Gaspar Viana, em 1912. Após a descoberta, outros estudos foram desenvolvidos em países como Índia e Itália, que confirmaram a atividade, porém, os efeitos tóxicos (dor torácica,

depressão) conduziram à suspensão do uso. A partir de então, o primeiro composto de antimônio pentavalente foi sintetizado por Brahmachari contra o “kalazar” na Índia, em 1920 (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Atualmente, existem duas formulações de antimoniais pentavalentes usadas como primeira escolha no tratamento das leishmanioses: o estibogluconato de sódio - SSG (Pentostan) e o antimoniato de meglumina (Glucantime). Ambas as composições são a primeira escolha no tratamento da LC, LM e LV. A via de administração é intramuscular ou endovenosa, tanto para as formas de LT quanto de LV.

Por outro lado, a terapia intralesional oferece uma opção de tratamento viável e menos tóxica. Nesse caso, a administração subcutânea de antimoniais pentavalentes, em particular, o (Glucantime) tem demonstrado ser segura e bem tolerável no tratamento da LT (SILVA et al., 2018; PIMENTEL et al., 2017; SHIN et al., 2013). O Glucantime é recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para um tratamento por 20 dias contra as formas cutâneas localizadas e disseminadas. Se não houver cicatrização completa das lesões em três meses após o término do tratamento, o esquema deve ser repetido por um período de 30 dias. Caso a falha terapêutica persista, a terapia de segunda escolha deve ser usada (LIMA et al., 2007).

Um dos primeiros ensaios clínicos realizados no Brasil comparando as duas formulações (Glucantime e Pentostan), mostrou que pacientes tratados com SSG apresentaram efeitos colaterais graves e por vezes, houve a necessidade de interrupção do tratamento (SALDANHA et al., 1999). O efeito cumulativo do fármaco e a toxicidade provocavam dores musculoesqueléticas, anorexia, dor abdominal e cefaleia na segunda metade do tratamento. Apesar dos efeitos colaterais do SSG e da necessidade de monitorar a toxicidade, ele tem sido usado com sucesso em países como Sudão, Quênia e Etiópia (ATIA et al., 2015; KIMUTAI et al., 2017).

O mecanismo de ação dos antimônios ainda não foi completamente elucidado, acredita-se que existem várias vias envolvidas, entretanto, muitas evidências reforçam que o SSG interage com *Leishmania* para inibir sua sobrevivência. O aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e de superóxido, descrita por Rais et al. (2000), foi capaz de aumentar a morte de fagócitos e a supressão intracelular de *Leishmania*. Além disso, o aumento da produção de citocinas, tais como a IL-12 e IFN- γ induziram atividade antileishmanial através de um aumento da capacidade oxidativa dos macrófagos.

Sereno et al. (2000) combinaram diversas técnicas de biologia molecular ao investigar o tipo de morte celular induzida pelo antimônio e os resultados demonstraram que a morte celular das formas amastigotas de *L. infantum* foram associadas à atividade da enzima

endonuclease, responsável pela fragmentação do DNA, que ocorre em decorrência da apoptose. O aumento da incidência de falha terapêutica e resistência ao tratamento com os antimoniais pentavalentes foi reportado ainda no século 20. Um estudo realizado com 312 pessoas na Índia demonstrou falha no regime terapêutico com o SSG e recidiva em alguns casos (SUNDAR et al., 1994). Em uma revisão sobre o mecanismo de resistência aos antimoniais pentavalentes, algumas hipóteses relacionadas ao caráter multifatorial da resistência foram levantadas: a pressão seletiva pelo metal pesado e a diminuição da concentração do fármaco no interior do macrófago por aumento do fluxo ou inativação do fármaco por metabolismo ou sequestro (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007).

3.7.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por micoses sistêmicas. No tratamento da LV no Brasil, a anfotericina B é utilizada como fármaco de segunda escolha em casos de resistência aos antimônios pentavalentes, em pacientes menores de seis meses de idade e acima de 65 anos, nos casos com manifestações clínicas graves e em casos de co-infecção com o vírus HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Existem duas formulações disponíveis: a anfotericina B desoxicolato (Fungizone®) e a formulação lipídica (AmBisome®). O Fungizone é altamente tóxico e necessita de infusão intravenosa lenta por 2 a 4 horas (FREITAS et al., 2012). A introdução do AmBisome® trouxe melhor difusão tecidual e doses inferiores, reduzindo assim sua toxicidade (MOORE, LOCKWOOD; SUNDAR et al., 2010)

Wijnant et al. (2017) compararam em modelo murino a farmacocinética e farmacodinâmica entre as duas formulações de anfotericina B e demonstraram que a atividade antileishmanial da formulação lipídica foi maior e dose-dependente que o Fungizone, com uma concentração plasmática e intralesional elevada no tratamento da LT. Uma revisão sobre estudos clínicos utilizando o AmBisome® mostrou que o fármaco foi altamente eficaz no tratamento de mais de 8000 indivíduos com LV no sul da Ásia (BALASEGARAM et al., 2012).

De forma geral, a anfotericina B se liga ao ergosterol presente na membrana celular de *Leishmania*, resultando na formação de poros e perda da permeabilidade da membrana, consequentemente a morte celular (KIP et al., 2018). Embora o fármaco possua afinidade pelo ergosterol, muitos dos seus efeitos tóxicos são atribuídos a capacidade de ligação inespecífica ao colesterol presente na membrana celular de mamíferos. A resistência à anfotericina B é rara. No entanto, com o uso crescente, especialmente das formulações lipídicas que possuem meia-

vida mais longa, a possibilidade de resistência não pode ser ignorada (CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2010). Khan et al. (2016) demonstraram o desenvolvimento de cepas resistentes à anfotericina B produzidas em laboratório por pressão seletiva contínua em estudos *in vitro*, que também apresentaram resistência com o itraconazol.

O mecanismo de resistência é multifatorial e pode variar entre espécies ou por diferentes vias. Purkait et al. (2012) observaram que o mecanismo de resistência à anfotericina B em *L. donovani* foi relacionado principalmente com a composição alterada dos esteróis (presença de colest-5,7,24-trien-3 β -ol, em vez de ergosterol nas cepas resistentes), que aumentou a permeabilidade da membrana, deixando-a menos ordenada. Desta forma, a afinidade de ligação entre a anfotericina B e a membrana foi comprometida, assim como sua absorção. Outro fator mencionado seria a super-expressão do gene MDR1 envolvido no fluxo do fármaco. Como resultado, o conteúdo intracelular da cepa resistente apresentou menor concentração de anfotericina B após a auto-oxidação, tendo uma menor quantidade de ROS sido gerada.

3.7.3 Pentamidina

A pentamidina é um composto diamidino aromático que foi introduzido para o tratamento das leishmanioses. Em casos de falha terapêutica com os antimônios pentavalentes, a pentamidina pode ser indicada como regime terapêutico alternativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Gadelha et al. (2015) demonstraram que doses únicas intramusculares (7 mg/kg) de isotionato de pentamidina foi tão eficaz quanto o regime proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil (3 injeções IM, 4 mg/kg a cada 2 dias) para pacientes com LT causada por *L. guyanensis*. Um relato de caso recentemente publicado reforça a boa resposta da pentamidina no tratamento da LT, diante de recidiva, falha terapêutica com anfotericina livre e interrupção do tratamento com anfotericina lipossomal devido à toxicidade (TERCEIRO et al., 2019). Em casos de recidiva em pacientes com LV e co-infectados por HIV, uma melhor resposta foi também encontrada usando a pentamidina, entretanto, em pacientes com deficiência imunológica, outras opções terapêuticas devem ser consideradas (DIRO et al., 2015).

O mecanismo de ação antileishmanial da pentamidina envolve a interrupção da função mitocondrial, ou diretamente no kDNA do parasita, ou ainda pode interferir na função de proteínas associadas com a replicação de kDNA (YANG et al, 2016). Formas promastigotas de *L. mexicana* apresentaram o fenótipo de resistência quando houve mudanças no potencial de membrana mitocondrial, aparentemente, as cepas resistentes acumulam a pentamidina

intracelularmente em baixas quantidades. Desta forma, o fármaco não se acumula rapidamente na mitocôndria, mas permanece livre no citosol. Além disso, as bombas de fluxo parecem operar na remoção da pentamidina citosólica e associada à membrana celular (BASSELIN et al., 2002).

3.7.4 Miltefosina

A miltefosina foi recentemente reconhecida para o tratamento oral das leishmanioses, originalmente, o fármaco era usado como antineoplásico em metástase cutânea de câncer de mama e em tumores sólidos (SMORENBURG et al. 2000). Em 2002, foi introduzido na Índia para o tratamento da LV humana. Nos Estados Unidos, o fármaco foi registrado somente em 2014, com muitos embargos principalmente devido ao custo elevado e baixa acessibilidade (BERMAN,2008; SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018).

No Brasil, a introdução da miltefosina para uso humano está em andamento desde outubro de 2018, o Ministério da Saúde por meio da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias-CONITEC elaborou um manual sobre as recomendações e a incorporação do fármaco no tratamento da LT pelo Sistema Único de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Vários estudos clínicos têm demonstrado um aumento na taxa de cura e melhor adesão à terapia, facilitada principalmente pela administração oral e meia vida longa da miltefosina (MACHADO et al., 2010; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ; SARAVOLATZ, 2015). No entanto, a implementação do tratamento enfrenta alguns desafios. A toxicidade reprodutiva da miltefosina exige que mulheres em idade fértil evitem a gravidez durante e pelo menos 3 meses após o tratamento. Nesse caso, a triagem de gravidez pré-tratamento e o uso do anticoncepcional são necessários afim de garantir a segurança da mulher (SUNDAR; OLLIARO, 2007; SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018).

Os efeitos adversos comumente reportados são sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e dor epigástrica (SAMPAIO et al., 2019). Pouco é conhecido sobre a sua farmacodinâmica, porém, estudos *in vitro* mostraram uma relação entre a eficácia da miltefosina e a perturbação no metabolismo do éter-fosfolípido (componente principal da membrana). Além disso, existem evidências de modificações na biossíntese do glicosil-fostatidil-inositol (GPI), uma importante molécula de superfície da *Leishmania* e que está envolvida nos mecanismo de virulência (DORLO et al., 2012). Outros estudos sugerem que a miltefosina também é capaz de interferir em proteínas carreadoras e canais de Ca^{2+} , levando à depleção de nutrientes essenciais e aumento da concentração desse íon, respectivamente; tendo sido, em

ambos, a morte celular como desfecho (FERNANDES et al., 2017; PINTO-MARTINEZ et al., 2018; VERMA; DEY, 2004)

Embora a meia vida do fármaco seja elevada (7 dias) e o sucesso no regime terapêutico ter sido demonstrado em ensaios clínicos, existe o risco do desenvolvimento de cepas resistentes (DORLO et al., 2008; KIP et al., 2018). Srivastava et al.(2017) relataram dois casos clínicos de seleção *in vivo* de clones de *L. donovani* resistentes à miltefosina. Neste estudo, os autores identificaram a presença de uma mutação no gene que codifica a proteína LdMT (proteína de membrana responsável pela absorção). Desta forma, devido às alterações conformacionais nas proteínas e mudanças na membrana plasmática, a absorção da miltefosina pelo parasita foi comprometida, levando conseqüentemente à resistência.

Em uma revisão Pérez-Victoria et al. (2006) descreveram duas principais vias até então conhecidas envolvidas no fenótipo de resistência à miltefosina: a menor absorção da droga causada pela inibição e/ou inativação de qualquer uma das proteínas responsáveis pela captação (LdRos3 ou LdMT), e o aumento do fluxo do fármaco mediado pela super-expressão da glicoproteína P do transportador ABC. O gene MDR é responsável pela expressão da glicoproteína P170, que atua com bomba de fluxo na membrana celular do parasita (PRAMANIK et al., 2019).

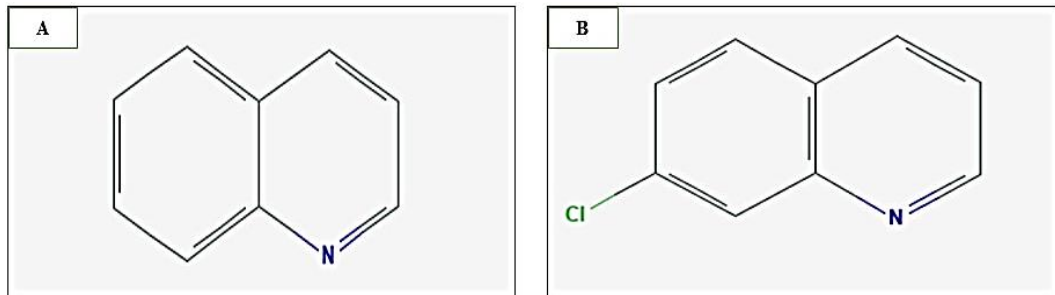
3.8 CLOROQUINOLINA

3.8.1 Estrutura e aplicações terapêuticas

As quinolinas são uma classe de compostos heterocíclicos cuja unidade estrutural possui um anel benzênico e um anel piridínico, por isso, são também conhecidas como benzopiridinas. Inicialmente, foi identificada por Friedlieb Ferdinand Runge em 1834, a quilonina foi extraída do alcatrão do carvão e sua fórmula molecular é C_9H_7N (JOSHI et al., 2016). Alguns de seus derivados estão presentes em uma variedade de ativos farmacológicos e compostos naturais com atividade biológica; sendo também amplamente utilizado pela indústria em antifúngicos, antibióticos, corantes, agentes aromatizantes, antibacterianos, dentre outros (SHIRI et al., 2016).

A síntese de novos compostos derivados da quinolina, como a cloroquinolina, tem-se expandido na indústria farmacêutica, principalmente, com finalidade terapêutica (Figura 4). Ghorab et al. (2016) descreveram o resultado promissor na síntese de um novo composto, ao

incorporar a cloroquinolona a uma molécula biologicamente ativa de benzeno-sulfonamida no tratamento de câncer de pulmão e colo-retal.



Fonte: Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Figura 4. Representação da estrutura química dos compostos. **A-** Quinolona; **B-** Cloroquinolona.

Os recentes avanços no estudo das quinolinas permitiram o conhecimento das suas diversas atividades, como antimalárica, antimicrobiana e antileishmanial (ABDELWAHID et al., 2019; NQORO; TOBEKA; ADERIBIGBE, 2017). Uma das contribuições promissoras que a síntese desses derivados tem mostrado se trata da combinação de dois alvos importantes em um único composto contra a doença de Alzheimer (DUARTE et al., 2019). Além disso, os efeitos antineoplásicos demonstrados *in vitro* em células humanas de câncer de mama sinalizam novas opções para um futuro desenvolvimento de fármacos (VISWAS; PUNDIR; LEE, 2019).

A introdução de análogos sintéticos derivados de cloroquina (CQ) e amodiaquina (AQ) é decorrente do aumento da resistência e/ou da resistência cruzada e hepatotoxicidade da atual opção usada no tratamento da malária. Parhizgar e Ahghighi (2017) mostraram compostos com núcleo ativo de 7-cloro-4-aminoquinolona apresentando atividade antimalárica contra cepas resistentes à CQ e com menor toxicidade.

O uso de derivados de quinolinas impulsionou também o desenvolvimento de antimicrobianos, um estudo de revisão mostrou derivados da hidrazona quinolona, como um produto potente no tratamento da tuberculose. Nesse processo, a enzima DNA girase (fundamental no processo de replicação) foi inibida, comprometendo a multiplicação bacteriana (MANDEWALE et al., 2017). Ainda nessa linha, derivados de quinolinas com atividade antimicrobiana de espectro estendido foram sintetizados a partir da combinação da estrutura da quinolona com a quinolona, sendo que essa combinação apresentou como mecanismo de ação dois alvos capazes de inibir a proteína topoisomerase IV e a proteína transportadora de lipídio LptA (FU et al., 2019)

Em vários estudos, a atividade antileishmanial desses compostos tem sido mostrada (LOISEAU et al., 2011). Tavares et al. (2018) demonstram alterações importantes na permeabilidade da membrana, funcionalidade mitocondrial e morfologia da *Leishmania* ao avaliar atividade antileishmanial do clioquinol, um derivado da quinolina. Um estudo recente mostrou que as quinolinas são capazes de inibir a GDP-manose-pirofosforilase em *Leishmania*, um sistema enzimático que produz uma variedade de glicoconjugados ricos em manose, essenciais para a sobrevivência e virulência do parasito (POMEL et al., 2019). A capacidade das quinolinas de apresentarem um potencial de ação seletivo contra um alvo tão específico faz com que seu uso seja ainda mais promissor (MAO et al., 2017).

Esses compostos podem exibir atividade antileishmanial por vias diferentes. Calixto et al. (2018) identificaram derivados de quinolinas capazes de induzir estresse oxidativo. Além disso, o composto foi capaz de inibir a autofagia, considerada um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. Essa combinação resultou em danos irreversíveis em *L. amazonensis* e morte do parasito.

A necessidade premente de novas terapias para o tratamento das leishmanioses devido à toxicidade e resistência aos tratamentos disponíveis impulsiona a busca por opções terapêuticas acessíveis. Estratégias como *scaffold*, que consiste em uma estrutura molecular com núcleo que fornece a forma básica, rigidez e flexibilidade a uma molécula, têm sido aplicadas na tentativa de se desenvolver produtos com múltiplos alvos biológicos (GARCIA-CASTRO et al., 2016; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Nesse sentido, as seções a seguir trazem a primeira etapa para a avaliação da atividade antileishmanial de um novo derivado de cloroquinolina, dado o potencial promissor dessa classe e a necessidade de desenvolvimento de fármacos elegíveis para serem empregados no tratamento contra as leishmanioses.

4 OBJETIVOS

4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo* de um novo derivado de cloroquinolina, chamado de AM1009 [N1- (7-cloroquinolin-4-il) -N3-ciclohexilpropano-1,3-diamina], contra diferentes espécies de *Leishmania*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade antileishmanial *in vitro* de um derivado de cloroquinolina (AM1009) contra formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do AM1009 utilizando macrófagos peritoneais de camundongos e hemácias humanas.
- ✓ Avaliar a eficácia do composto no tratamento de macrófagos infectados e na inibição da infecção usando parasitas pré-tratados.
- ✓ Verificar a eficácia terapêutica do tratamento com AM1009 em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.
- ✓ Avaliar a resposta imune e toxicidade nos animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com AM1009.
- ✓ Avaliar o mecanismo de ação do AM1009 sobre *L. amazonensis*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As seções de Metodologia, Resultados e Discussão serão apresentadas sob a forma de artigo científico recentemente publicado no periódico *Parasitology International* (Parasitol Int. 2019 Jul 27;73:101966. doi: 10.1016/j.parint.2019.101966. [Epub ahead of print]), conforme regem as normas deste Programa de Pós-Graduação. Cabe ressaltar que tais Seções foram traduzidas para o português, a fim de possibilitar melhor compreensão.

Artigo aceito para publicação em 26 de julho de 2019.

Title: A chloroquinoline derivate presents effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis

Jessica K.T. Sousa^{a,1}, Luciana M.R. Antinarellia^{a,1}, Débora V.C. Mendonça^{a,1}, Daniela P. Lage^{a,1}, Grasielle S.V. Tavares^{a,1}, Daniel S. Dias^{a,1}, Patrícia A.F. Ribeiro^{a,1}, Fernanda Ludolf^{a,1}, Vinício T.S. Coelho^a, João A. Oliveira-da-Silva^a, Luísa Perin^a, Bianka A. Oliveira^b, Denis F. Alvarenga^b, Miguel A. Chávez-Fumagalli^a, Geraldo C. Brandão^c, Vandack Nobre^a, Guilherme R. Pereira^b, Elaine S. Coimbra^d, Eduardo A.F. Coelho^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 30130-100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Departamento de Física e Química, Instituto de Ciências Exatas e Informática, 30535-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil e Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

5.1 SÍNTESE QUÍMICA DA MOLÉCULA AM1009

Para realizar a síntese de AM1009, adicionou-se 220 mg (0,668 mmol) de N-(3-bromopropil)-7-cloroquinolin-4-amina a um balão de fundo redondo contendo 464 mg (4,68 mmol) de ciclohexanamina, 462 mg (3,34 mmol) de carbonato de potássio e 1 mL de dimetilformamida PA. O balão permaneceu sob agitação durante 20 h a 120°C, sendo o composto misturado utilizando água destilada e diclorometano PA. O AM1009 foi purificado por filtração utilizando sílica, sendo posteriormente eluído com 50% de acetato de etilo e 50% de metanol. O filtrado foi levado a um evaporador rotativo para a precipitação da molécula e caracterização por espectroscopia por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, apresentando um rendimento estimado de 76,0%.

5.2. CAMUNDONGOS E PARASITOS

O estudo foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o número de protocolo 085/2017. Os camundongos BALB/c (fêmeas, 8 semanas de idade) foram obtidos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos em condições livres de patógenos. As cepas utilizadas foram de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) e *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46). Formas promastigotas estacionárias foram cultivadas em meio de Schneider's completo (Sigma-Aldrich, USA), composto por 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma-Aldrich, USA) e 20 mM de L-glutamina pH 7.4 e a 24°C. O extrato antigênico solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de culturas promastigotas estacionárias, conforme descrito por Coelho et al. (2003). Para a obtenção de amastigotas axênicas, promastigotas estacionárias (10^9 células) foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) e incubadas por 48h ou 72h (*L.amazonensis* e *L.infantum*, respectivamente) em 5 mL de soro fetal bovino a 37°C. Os parasitos foram então lavados três vezes com PBS e sua morfologia foi avaliada após coloração pelo método Giemsa e visualizado por microscopia.

5.3 ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL *IN VITRO*

A inibição do crescimento *in vitro* de *Leishmania* foi avaliada pela incubação de promastigotas estacionárias de *L. infantum* ou *L. amazonensis* e amastigotas axênicas (10^6 células por poço) na presença de diferentes concentrações de AM1009 (0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.49, 0.98, 1.97, 3.93, 7.87, 15.73 e 31,46 μ M) ou clioquinol (0, 0.07, 0.13, 0.26, 0.51, 1.03, 2.05, 4.09, 8.19, 16.37, e 32.73 μ M) em placas para cultura com 96 poços (Nunc, Nunclon,

Roskilde, Dinamarca), durante 48 horas a 24°C. O clioquinol foi usado como controle de molécula. A anfotericina B (0, 0.04, 0.07, 0.14, 0.27, 0.54 e 1,08; Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle de droga. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). Os valores de densidade óptica (DO) foram lidos em um espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, São José, CA, USA), a 570 nm. Os dados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0), e a concentração inibitória de 50% de *Leishmania* (EC₅₀) avaliada para promastigotas e amastigotas axênicas foram calculadas por regressão sigmoidal com curva dose-resposta (MENDONÇA et al., 2018).

5.4 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS E HEMÁCIAS HUMANAS

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos murinos (5×10^5 células), que foram incubados em diferentes concentrações de AM1009 (0 a 31,46 μM) ou clioquinol (0 a 32,73 μM), em meio RPMI 1640 usando placas de 96 poços (Nunc) por 48 h a 37°C e 5% de CO₂. A AmpB (0 a 10,8 μM) foi usada como controle. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo método de MTT. Posteriormente, os dados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0), e a concentração inibitória de macrófagos a 50% (CC₅₀) foi calculada pela regressão sigmoidal com curva dose-resposta (MENDONÇA et al., 2018). A citotoxicidade em células humanas foi determinada pela concentração inibitória para 50% de hemácias humanas (RBC₅₀). Desta forma, AM1009 (0 a 31,46 μM), clioquinol (0 a 32,73 μM) ou AmpB (0 a 10,8 μM) foram incubados com uma suspensão de 5% de hemáceas humanas de pessoas do grupo O, durante 1 h e a 37°C. A suspensão foi centrifugada a 1000 x g durante 10 min, seguida da leitura em espectrofotômetro a 570 nm para determinar a lise celular. Os controles negativos (solução salina) e positivo (água destilada) foram utilizados e os valores calculados por regressão sigmoidal com curva dose-resposta.

5.5 TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS E INIBIÇÃO DA INFECÇÃO

Para avaliar a eficácia dos compostos sobre macrófagos infectados, as células (5×10^5) foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio RPMI 1640, que foi suplementado com 20% de FBS e 20 mM de L-glutamina, pH 7,4. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 h a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, promastigotas na fase estacionária foram adicionadas aos poços e as culturas (10 parasitos por um macrófago) foram incubadas por 48

horas a 37°C em 5% de CO₂. Os parasitos livres foram removidos por lavagem com meio RPMI 1640, e os macrófagos infectados foram tratados com AM1009 ou clioquinol (0, 0,5, 1,0 e 5 µM) durante 48 h a 24°C em 5% de CO₂. A AmpB (0, 0,11, 0,54 e 1,08) foi usada como controle.

Para avaliar a inibição da infecção utilizando parasitos pré-tratados, promastigotas (5 x 10⁶ células) foram incubadas com AM1009, clioquinol ou AmpB nas mesmas concentrações descritas anteriormente, durante 4 h a 24°C. Em seguida, as células foram lavadas por três vezes com meio RPMI 1640, quantificadas e adicionadas para infectar macrófagos murinos (10 parasitos por um macrófago), durante 24 h a 37°C em 5% de CO₂. Em ambos os experimentos, depois da fixação com paraformaldeído a 4%, as células foram lavadas e coradas com Giemsa. A porcentagem da infecção e o número de amastigotas recuperadas por célula infectada foram determinados pela contagem de 200 células, em triplicata, usando microscópio óptico.

5.6 MECANISMO DE AÇÃO EM *Leishmania amazonensis*

5.6.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Promastigotas estacionárias (10⁷ células) foram cultivadas na ausência ou presença de AM1009 (2,41 e 4,84 µM, correspondendo à uma e duas vezes os valores de EC₅₀, respectivamente), por 24 h e a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com o reagente JC-1 (10 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA), por 30 min e no escuro. Após duas lavagens com HBSS, as células foram adicionadas a uma placa de 96 poços e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi mensurado em espectrofluorômetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 528 e 600 nm, usando 485 nm como comprimento de onda de excitação. Promastigotas incubadas com FCCP (1,0 µM) foram usadas como controle. Os valores de $\Delta\psi_m$ foram calculados pela razão entre a leitura a 600 nm e 528 nm, conforme descrito por Antinarelli et al. (2015).

5.6.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

Promastigotas estacionárias (10⁷ células) foram cultivadas na ausência ou presença de AM1009 (2,41 e 4,84 µM), durante 24 h a 25°C. Em seguida, os parasitos foram incubados com o reagente H₂DCFDA (20 µM; Sigma-Aldrich, USA), por 30 min no escuro à temperatura ambiente. Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorômetro (Varioskan® Flash, Thermo Scientific,

USA), a 485 e 528 nm para excitação e emissão, respectivamente. Promastigotas tratadas com miltefosina (22,1 μM) foram usadas como controle (ANTINARELLI et al., 2015).

5.6.3 Análise do ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos

Para avaliar o ciclo celular, promastigotas (10^7 células) foram cultivadas na ausência ou presença de AM1009 (2,41 e 4,84 μM) por 24 h a 25°C. Em seguida, os parasitos foram fixados com etanol a 70% por 1 h a 4°C e incubados com ribonuclease A (200 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich, USA) por 1 h a 37°C. As células foram coradas com iodeto de propídio (7,0 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich, USA) por 20 min no escuro à temperatura ambiente. Para cada amostra, 10.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA), que foi equipado com o software DIVA (Joseph Trotter, Instituto de Pesquisa Scripps, La Jolla, CA, USA), conforme descrito por Tavares et al. (2018).

Para investigar a formação de vacúolos autofágicos, os parasitos tratados foram incubados com o reagente monodansilcadaverina (100 μM ; Sigma-Aldrich, USA) por 1 h em ambiente escuro a 25°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e 200 μL da suspensão adicionado a uma placa com 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofluorômetro, utilizando 335 nm e 460 nm para excitação e emissão, respectivamente (STROPPIA et al., 2017).

5.7 ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL *in vivo*

5.7.1 Infecção e tratamento

Para avaliar a eficácia terapêutica *in vivo* da AM1009, clioquinol e AmpB no tratamento de camundongos BALB/c, animais (n=8 por grupo) foram infectados por via subcutânea na base da cauda com promastigotas estacionárias de *L. amazonensis* (10^6 células). Cinquenta a 60 dias após a infecção, os camundongos foram separados em grupos, com o objetivo de garantir um diâmetro médio de lesão semelhante entre eles. Em seguida, receberam injeções subcutâneas próximas ao sítio da infecção, uma vez ao dia e durante 7 dias, usando salina (PBS 1x pH 7,4), AmpB (1 mg/kg de peso corporal), clioquinol (5 mg/kg de peso corporal) ou AM1009 (5 mg/kg de peso corporal). Após o tratamento, o diâmetro da lesão foi mensurado por paquímetro eletrônico (modelo 799-6/150, Starrett®, Brasil). Após 15 dias, os camundongos foram eutanasiados para as avaliações parasitológicas e imunológicas.

5.7.2 Carga parasitária em animais infectados e tratados

A lesão infectada, baço, fígado e linfonodos drenantes do sítio de infecção (dLN) dos animais infectados e tratados foram coletados e a carga parasitária foi avaliada pela técnica de diluição limitante. Para isso, o tecido e os órgãos foram macerados com um macerador usando PBS 1x estéril. Os fragmentos do tecido foram removidos por centrifugação a 150 x g e as células concentradas por centrifugação a 2.000 x g. O pellet foi suspenso em 1 mL de meio Schneider completo e as diluições seriadas realizadas em 10^{-1} a 10^{-12} de meio de Schneider's. Cada amostra foi plaqueada em triplicata e a leitura foi realizada 7 dias após o início da cultura a 24°C. Os resultados foram demonstrados com base no log negativo do título, que é a diluição correspondente ao último poço positivo, ajustado por miligrama do tecido ou órgão.

5.7.3 Resposta Imune

A resposta celular foi avaliada nas células esplênicas dos animais infectados e tratados. Desta forma, esplenócitos (5×10^6 células) foram plaqueados em duplicata em placas de 24 poços (Nunc) e incubados em DMEM completo (meio), composto por meio mais 20% de FBS e 20 mM de L-glutamina pH 7,4, ou estimulada com SLA de *L. amazonensis* (25,0 µg/mL), por 48h a 37°C, 5% de CO₂. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF foram medidos no sobrenadante celular por ELISA de captura (BD Pharmingen®, San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A produção de nitrito foi também avaliada no sobrenadante pelo método de Griess (STROPPA et al., 2017). A resposta humoral foi investigada pela determinação dos níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-parasita. Para isso, o SLA foi adicionado em placas de ELISA (1,0 µg por poço), as amostras de soro foram diluídas a 1:100 em PBS-T (PBS 1x mais Tween 20 a 0,05%) e os anticorpos anti-IgG1 e IgG2a conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich) foram usados na diluição de 1:10.000 em PBS-T. As reações foram realizadas usando H₂O₂, ortho-fenilenodiamina, tampão citrato-fosfato em pH 5,0, por 30 min e no escuro. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2 N, e os valores de DO foram medidos em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), a 492 nm.

5.7.4 Toxicidade orgânica

Para verificar se os compostos foram tóxicos para animais infectados e tratados, as funções hepática (AST e ALT) e renal (uréia e creatinina) foram avaliadas em amostras de soro

dos animais, por meio do uso de kits comerciais (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte). Amostras de soro de animais não-tratados e não-infectados (n=4) foram utilizadas como controle.

5.8 Análise estatística

Os valores de EC₅₀, CC₅₀ e RBC₅₀ foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e calculados por curvas dose-resposta, que foram plotadas no GraphPad Prism 5.03. Os resultados foram analisados pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett para comparação entre os grupos. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Foram realizados três experimentos independentes, que apresentaram resultados semelhantes e as diferenças foram consideradas significantes com $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL, CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A atividade antileishmanial *in vitro* da AM1009 foi avaliada em promastigotas estacionárias de *L. amazonensis* e *L. infantum*. O clioquinol e AmpB foram usados como controles de molécula e fármaco, respectivamente. Os valores de EC₅₀ para AM1009, clioquinol e AmpB foram 2.41±0.28, 7.90±0.65 e 0.13±0.04 µM, respectivamente, contra *L. amazonensis* e 0.38±0.13, 4.45±0.98 e 0.09±0.02 µM, respectivamente, contra *L. infantum*.

A citotoxicidade em macrófagos murinos mostrou valores de CC₅₀ de 148.94±10.12, 613.27±20.53 e 0.85±0.16 µM para AM1009, clioquinol e AmpB, respectivamente (Tabela 1). Enquanto os valores de RBC₅₀ para esses compostos foram de 1.739,69±79.69, 1.409,85±64.35 e 13.93±1.95 µM, respectivamente. Os valores do índice de seletividade foram calculados e os resultados foram de 61.80, 77.63 e 6.54 para AM1009, clioquinol e AmpB, respectivamente, contra *L. amazonensis*, e de 391.95, 137.81 e 9.44, respectivamente, contra *L. infantum*.

Compostos	Atividade antileishmanial EC ₅₀ (µM)			
	<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Promastigotas	Amastigotas Axênicas	Promastigotas	Amastigotas Axênicas
AM1009	2.41±0.28	1.03 ± 0.22	0.38±0.13	0.98 ± 0.15
Clioquinol	7.90±0.65	2.27 ± 0.44	4.45±0.98	3.65 ± 0.25
AmpB	0.13±0.04	0.34 ± 0.11	0.09±0.02	0.18 ± 0.05

Tabela 1: Atividade antileishmanial em promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Parasitos (10⁶ células) e macrófagos (5 x 10⁵ células) foram incubados com AM1009 (0 a 31,46 µM), clioquinol (0 a 32,73 µM) ou AmpB (0 a 1,08 µM), por 48h h 24°C (parasito). A viabilidade celular foi analisada pela reação de MTT. As concentrações inibitórias de 50% de *Leishmania* foram avaliadas para cada estágio do parasito e calculadas por regressão sigmoidal com curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Compostos	CC ₅₀ (μ M)	RBC ₅₀ (μ M)	Índice de seletividade (IS)			
			<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
			Promastigotas	Amastigotas Axênicas	Promastigotas	Amastigotas Axênicas
AM1009	148.94 \pm 10.12	1,739.6 9 \pm 79.69	61.80	144.60	391.95	152.0
Clioquinol	613.27 \pm 20.53	1,409.8 5 \pm 64.35	77.63	270.16	137.81	168.0
AmpB	0.85 \pm 0. 16	13.93 \pm 1 .95	6.54	2.50	9.44	4.7

Tabela 2: Avaliação da citotoxicidade e índice de seletividade. Macrófagos murinos (5×10^5 células) foram incubados com AM1009 (0 a 31,46 μ M), clioquinol (0 a 32,73 μ M) ou AmpB (0 a 1,08 μ M), por 48h h 24°C (parasito). A viabilidade celular foi analisada pela reação de MTT. A citotoxicidade foi avaliada em células humanas e a inibição de 50% das hemácias foi determinada pela incubação com AM1009, clioquinol e AmpB, nas mesmas concentrações descritas anteriormente, com 5% de suspensão de hemácias humanas (tipo O⁺) por 1 horas a 37°C. Os valores do CC50 E RBC50 foram calculados por regressão sigmoidal com curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

6.2 TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS E INIBIÇÃO DA INFECÇÃO

O tratamento dos macrófagos infectados foi avaliado e os resultados mostraram que o regime terapêutico reduziu a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas recuperadas. A partir dos valores obtidos, a redução da infecção e o número de amastigotas por macrófagos foram calculados. Os resultados mostraram que AM1009 e clioquinol foram os compostos que apresentaram maior redução no parasitismo das células tratadas, quando comparados ao tratamento com a AmpB. Quando foi feita a comparação entre os grupos AM1009 e clioquinol, o AM1009 apresentou o melhor resultado, uma vez que foi encontrado menor carga parasitária nos macrófagos infectados com *L. infantum* ou *L. amazonensis* e tratados com AM1009 (Tabela 3).

Compostos	Concentração (µM)	Redução da Infecção (%)		Número de amastigotas recuperadas por macrófago infectado	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
AM1009	5.0	91.7 ± 5.5	89.9 ± 6.7	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0
	2.5	72.9 ± 4.6	70.3 ± 5.2	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	1.0	53.4 ± 3.8	52.4 ± 4.9	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.4
	0.5	28.9 ± 2.9	24.5 ± 3.3	2.9 ± 0.7	2.5 ± 1.0
	0	(-)	(-)	6.8 ± 1.6	4.7 ± 0.5
Clioquinol	5.0	80.9 ± 5.1	67.7 ± 4.0	2.0 ± 0.6	1.5 ± 0.6
	2.5	53.2 ± 4.7	40.8 ± 2.7	2.8 ± 0.9	1.9 ± 0.7
	1.0	28.7 ± 3.3	18.9 ± 3.4	3.5 ± 1.7	2.6 ± 1.0
	0.5	18.8 ± 2.5	10.4 ± 1.6	4.4 ± 1.1	3.5 ± 0.8
	0	(-)	(-)	6.8 ± 1.6	4.7 ± 0.5
AmpB	1.08	89.1±3.1	85.8±2.5	1.7 ± 0.5	1.3 ± 0.4
	0.54	79.2±4.2	71.8±3.0	2.2 ± 0.6	2.0 ± 0.7
	0.11	65.2±5.4	51.7±2.7	3.7 ± 1.2	3.1 ± 1.2
	0	(-)	(-)	6.5 ± 1.4	4.7 ± 0.5

Tabela 3: Tratamento de macrófagos infectados. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (10 parasitas por macrófago) e tratados com AM1009 ou clioquinol (0, 0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 µM) por 48h a 24°C em 5% de CO₂. A AmpB (0. 0.11, 0,54 e 1,08 µM) foi usada como controle. A redução da infecção e porcentagem de amastigotas tratadas e macrófagos infectados foi determinada após contagem de 200 células, em triplicata. Os resultados foram calculados em média ± desvio padrão.

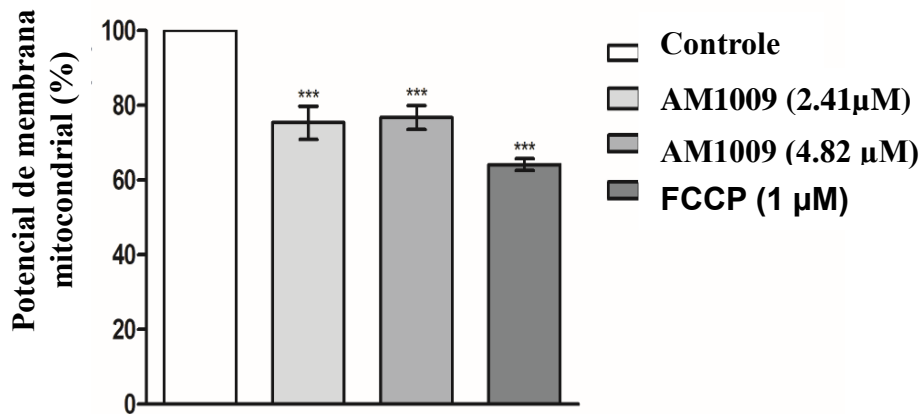
A inibição da infecção em macrófagos utilizando parasitas pré-tratados mostrou também que a terapêutica reduziu a infecção e o parasitismo. Entretanto, o uso de AM1009 foi responsável pelas maiores reduções tanto na porcentagem de infecção quanto no número de amastigotas recuperadas por célula infectada (Tabela 4).

Compostos	Concentração (µM)	Porcentagem da infecção utilizando parasitas pré-tratados		Número de amastigotas recuperadas por macrófago infectado	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
AM1009	5.0	10.2 ± 1.7	11.3 ± 2.0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	2.5	21.2 ± 3.5	24.3 ± 2.5	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.3
	1.0	48.5 ± 4.3	45.5 ± 5.0	2.3 ± 0.9	2.0 ± 0.6
	0.5	66.5 ± 5.7	58.8 ± 4.4	3.5 ± 0.9	3.1 ± 1.1
	0	85.5 ± 3.4	63.3 ± 3.2	6.5 ± 1.4	1.3 ± 0.3
Clioquinol	5.0	23.6 ± 3.3	26.2 ± 2.7	1.5 ± 0.8	1.3 ± 0.3
	2.5	51.5 ± 3.8	49.7 ± 6.0	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.6
	1.0	64.3 ± 4.4	52.6 ± 4.9	3.6 ± 0.7	2.7 ± 1.0
	0.5	73.5 ± 5.3	58.6 ± 3.4	4.1 ± 1.3	3.6 ± 0.7
	0	85.5 ± 3.4	63.3 ± 3.2	6.5 ± 1.4	4.5 ± 0.3
AmpB	1.08	15.5 ± 1.6	17.7 ± 2.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2
	0.54	29.8 ± 3.2	26.7 ± 1.8	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2
	0.11	45.5 ± 4.2	41.2 ± 3.2	2.8 ± 0.5	2.3 ± 0.6
	0	85.5 ± 3.4	63.3 ± 3.2	6.5 ± 1.4	4.5 ± 0.6

Tabela 4: Inibição da infecção em macrófagos utilizando parasitas pré-tratados. Células (5×10^6) foram incubadas com AM1009 ou clioquinol (0, 0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 µM) por 1 h a 24 °C. A AmpB (0.011, 0.54 e 1.08 µM) foi usada como controle. Os parasitos foram lavados, quantificados e incubados com macrófagos (10 parasitos por macrófago), por 24 horas a 37 °C em 5% de CO₂. A porcentagem da infecção usando parasitos pré-tratados e o número de amastigotas recuperados por macrófago infectado foram determinadas após a contagem de 200 células em triplicata. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. 200 células em triplicata

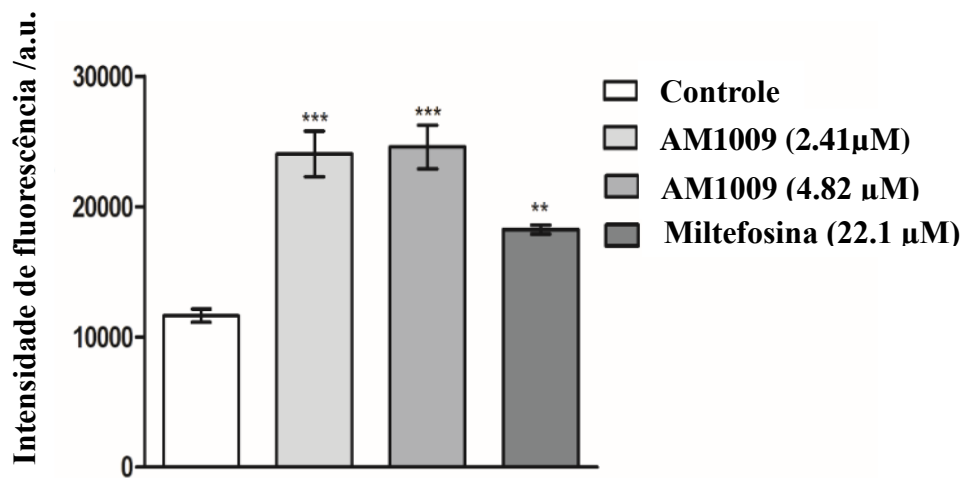
6.3 MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação do AM1009 em *Leishmania* foi avaliado na espécie *L. amazonensis*. A avaliação de $\Delta\Psi_m$ mostrou que o tratamento com a molécula induziu uma despolarização significativa na membrana do parasita em aproximadamente 24,6% dos parasitas, quando 2,41 µM de AM1009 foi utilizado. O controle positivo apresentou a redução de 35,9% de $\Delta\Psi_m$ (Figura 6). A produção de ROS foi também avaliada como indicador de estresse oxidativo, e os resultados mostraram que parasitas tratados com AM1009 apresentaram maior produção dessa molécula, quando comparados ao controle (Figura 7).



Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

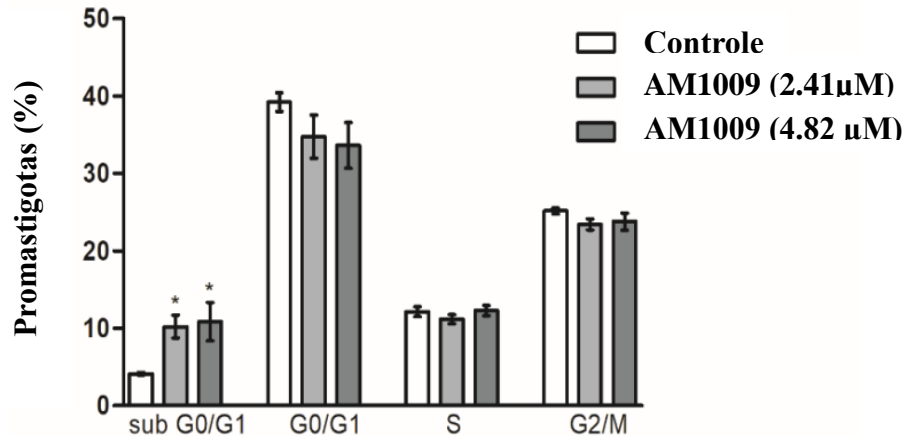
Figura 6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em parasitas tratados com AM1009. As promastigotas de *L. amazonensis* (células 10^7) foram tratadas com 2,41 e 4,84 μM de AM1009 (correspondendo a uma e duas vezes os valores de EC_{50} , respectivamente) por 24 h, quando foram sondados com o reagente JC-1. As promastigotas tratadas com FCCP (1 μM) foram usadas como controle positivo. A análise de marcação foi realizada por um leitor de microplaca. Os dados foram calculados por média \pm desvio padrão dos grupos. (***) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$).



Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

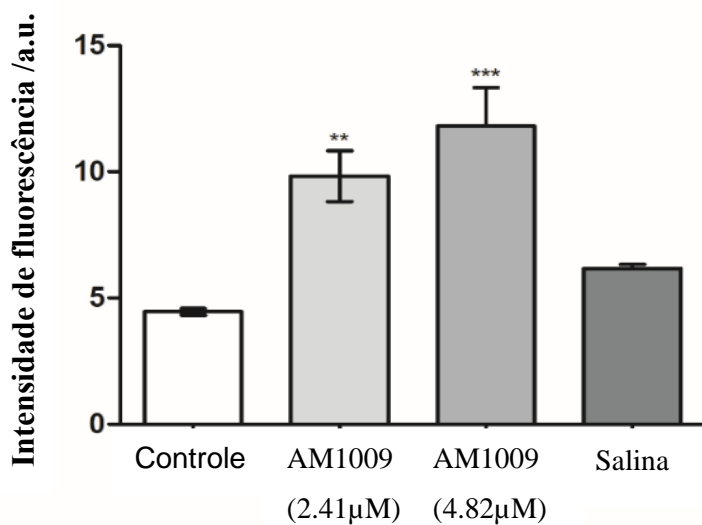
Figura 7. Produção de espécies reativas de oxigênio em *L. amazonensis* tratada com AM1009. As promastigotas (10^7 células) foram tratadas com AM1009 (2,41 e 4,84 μM , correspondendo a uma e duas vezes os valores EC_{50} , respectivamente) e não tratadas (controle negativo) por 24 h. Posteriormente, foram sondadas com o reagente H2DCFDA. As promastigotas tratadas com miltefosina (22,1 μM) foram usadas como controle positivo. A intensidade de fluorescência foi avaliada por leitor de microplaca. Os dados foram expressos por média \pm desvio padrão dos grupos. (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Os parasitas tratados com AM1009 apresentaram também alterações significativas no ciclo celular, devido à ocorrência de células na fase sub-G0/G1 (Figura 8), como pela formação de vacúolos autofágicos, indicando assim apoptose celular (Figura 9).



Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

Figura 8. Ação do AM1009 no ciclo celular de *L. amazonensis*. Os parasitos (10^7 células) foram incubados sem (células não tratadas) ou com AM1009 (2,41 e 4,84 μM , correspondendo a uma e duas vezes os valores EC_{50} , respectivamente) por 24 h, em seguida foram corados com iodeto de propídio e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. A porcentagem de promastigotas em cada fase do ciclo celular foi calculada e os resultados demonstrados. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).



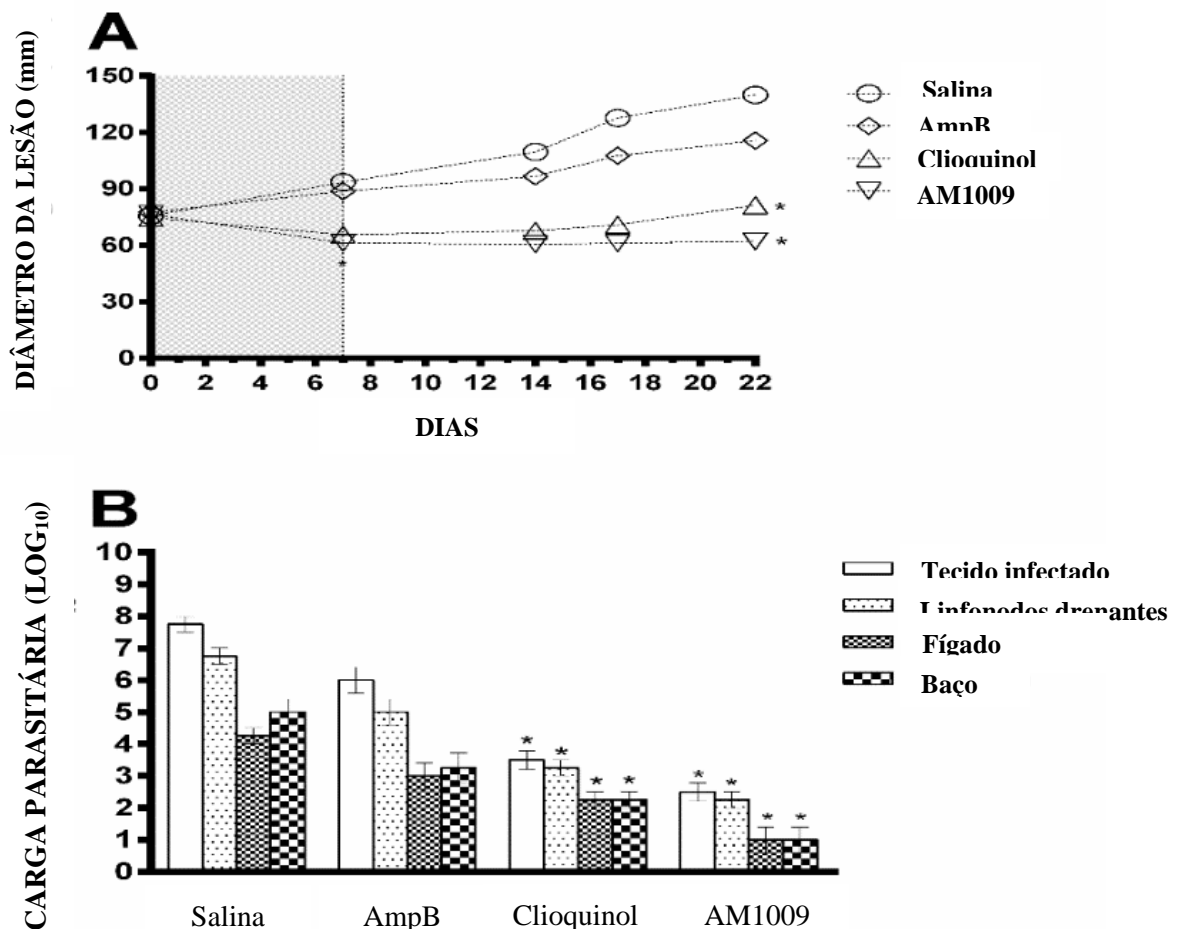
Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

Figura 9. Formação de vacúolos autofágicos em parasitas tratados com AM1009. A formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com AM1009 foi avaliada por fluorimetria, após incubação com AM1009 (2,41 e 4,84 μM , correspondendo a uma e duas vezes os

valores de EC₅₀, respectivamente) por 24 h. As promastigotas não tratadas foram usadas como controle positivo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos. (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significante em relação ao controle ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente).

6.4 ESTUDOS TERAPÊUTICOS *IN VIVO*

Para avaliar o efeito terapêutico *in vivo* dos compostos contra a infecção por *Leishmania* em modelo mamífero, camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*. Desta forma, entre 50 a 60 dias após a infecção, eles foram separados em grupos e receberam salina ou foram tratados com AM1009, clioquinol ou AmpB. Em seguida, a eficácia terapêutica foi avaliada pela medição do diâmetro médio da lesão e da carga parasitária no tecido infectado, fígado, baço e dLN dos animais. Os resultados mostraram reduções significativas na média do diâmetro das lesões e na carga parasitária dos camundongos tratados, quando comparados ao grupo salina (Figura 10).



Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

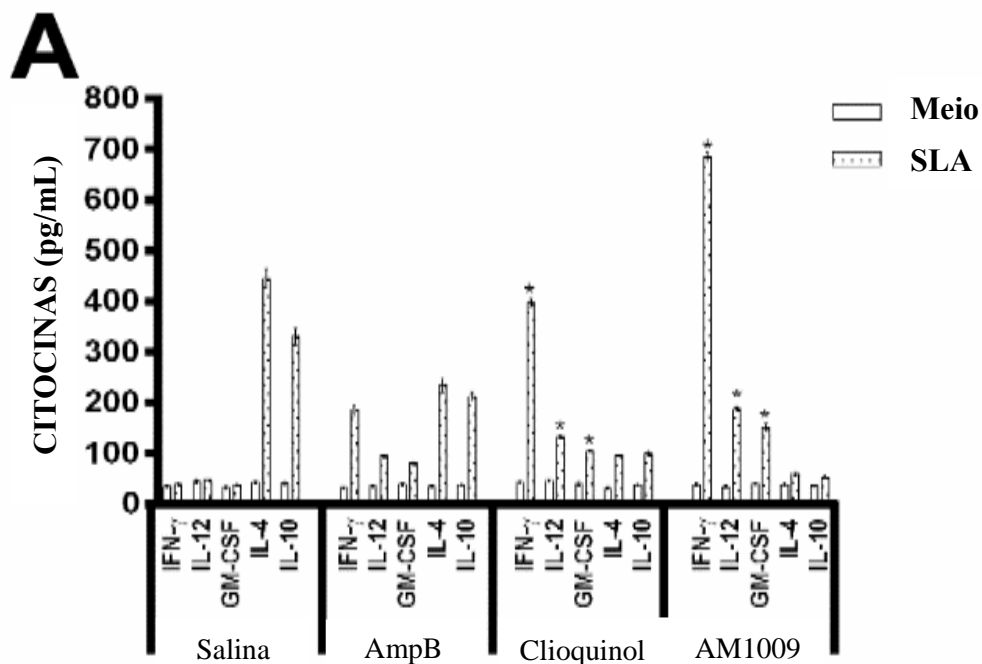
Figura 10. Eficácia terapêutica dos compostos testados *in vivo*. Para avaliar a ação terapêutica do AM1009, clioquinol e anfotericina B (AmpB) em um modelo mamífero, os camundongos BALB/c

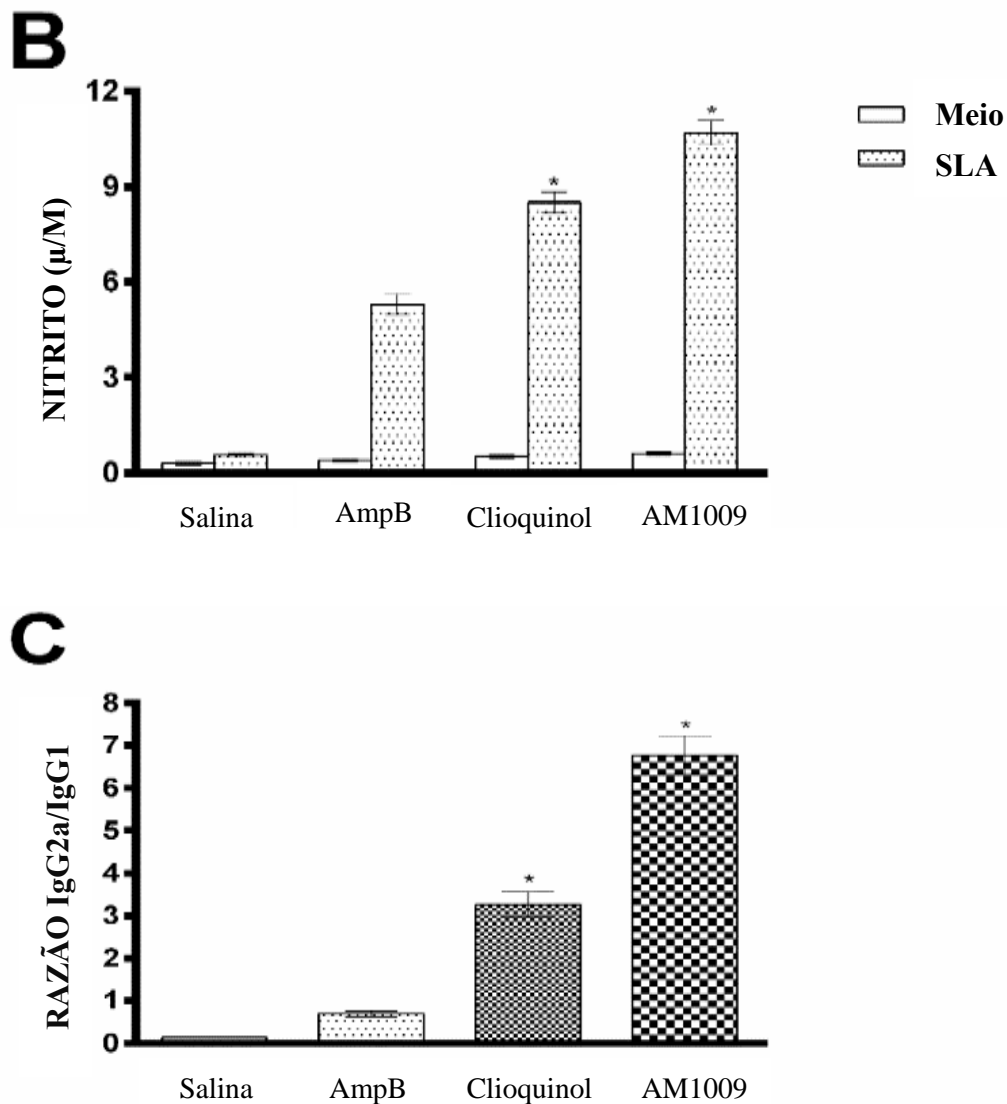
foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis* e em 50 a 60 dias após a infecção, foram divididos em grupos (n=8 por grupo). Um grupo recebeu solução salina, outro foi tratado com AmpB, clioquinol e último tratado com AM1009. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente, 15 dias após o tratamento, a carga parasitária foi avaliada no tecido infectado, fígado, baço e linfonodos pela técnica de diluição limitante. Os resultados mostram a média do diâmetro da lesão (A) e a carga parasitária (B) estão demonstrados em média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina e anfotericina B (AmpB) ($p < 0,0001$).

Ao comparar os resultados, os animais que receberam AM1009 apresentaram menor diâmetro de lesão (Figura 10A) e carga parasitária (Figura 10B) no local da infecção e órgãos avaliados, quando comparados aos grupos clioquinol e AmpB.

Ao investigar a resposta imune gerada nos animais, citocinas Th1 e Th2 foram dosadas no sobrenadante celular dos esplenócitos estimulados. Os resultados mostraram que camundongos tratados com clioquinol ou AM1009 apresentaram uma resposta Th1 mais polarizada, com produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, associados à menor produção de IL-4 e IL-10 (Figura 11).

O tratamento com AmpB induziu também a produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, no entanto, em níveis mais baixos quando comparados aos valores obtidos nos outros grupos (Figura 11A). Além disso, os camundongos tratados com AM1009 apresentaram maior produção de IFN- γ e quantidades inferiores de IL-4 e IL-10 em comparação ao grupo clioquinol, apesar de nenhuma diferença significativa ter sido encontrada entre eles.





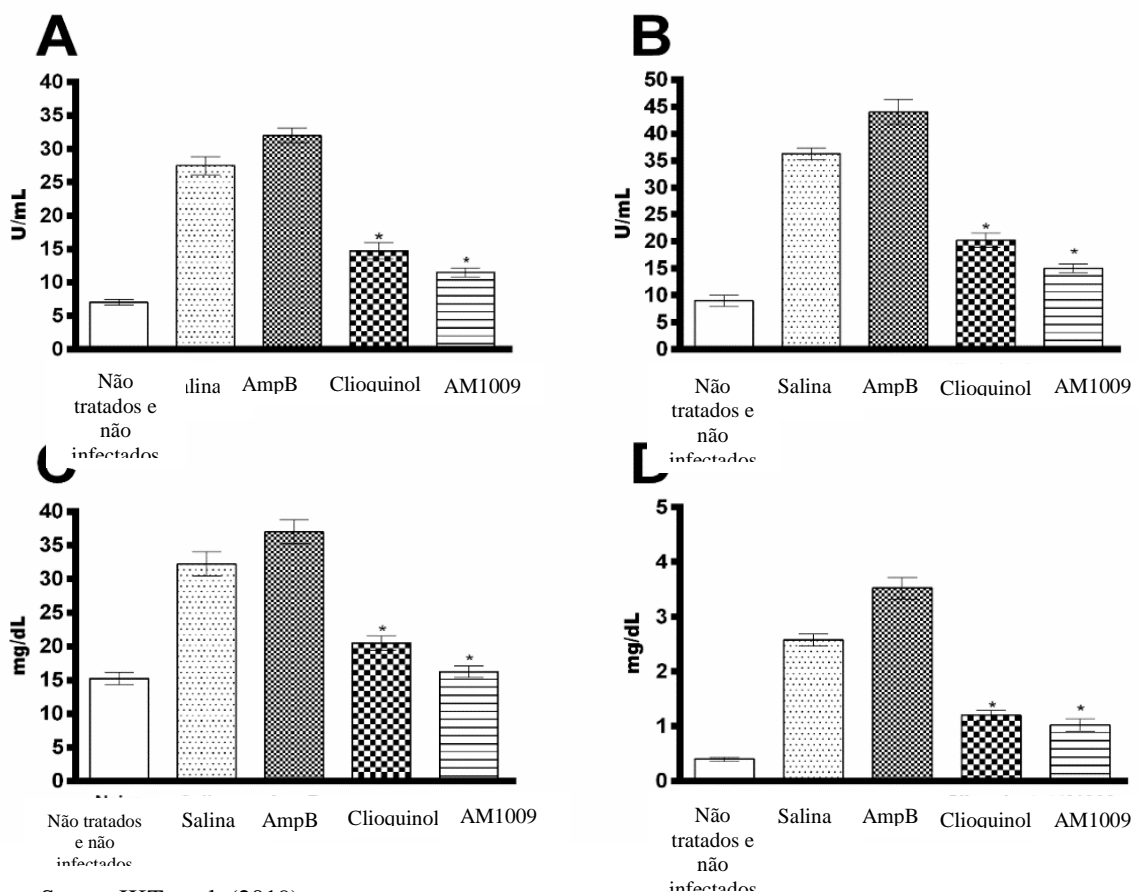
Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

Figura 11. Resposta imune nos camundongos infectados e tratados. Os esplenócitos de animais infectados e tratados foram coletados 15 dias após o tratamento, e as células foram desestimuladas (meio) ou estimuladas com SLA de *L. amazonensis* (25,0 µg/mL), por 48 h a 37°C em 5% de CO₂. Os níveis de IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF (em A) foram dosados no sobrenadante celular utilizando kits comerciais. A produção de nitrito também foi avaliada nos sobrenadantes pela reação de Griess (em B). Além disso, as amostras de soro também foram coletadas dos animais e os níveis de isotipos específicos dos parasitas IgG1 e IgG2a foram avaliados por ELISA indireto. A razão entre os valores de IgG2a / IgG1 foi calculada e está demonstrada (em C). As barras representam a média ± desvio padrão dos grupos.

Na tentativa de se avaliar a ativação específica do parasita em macrófagos nos grupos tratados, a presença do nitrito no sobrenadante da cultura foi avaliada como um indicador de produção de NO. Os resultados mostraram que a produção do nitrito foi maior nos animais infectados e tratados com AM1009, quando comparados aos demais grupos (Figura 11B).

Para caracterizar a resposta humoral desencadeada pelo tratamento, analisamos o perfil dos isotipos IgG1 e IgG2a específicos de parasitas. Os resultados mostraram que os animais tratados apresentaram níveis superiores de IgG2a, em comparação com a produção de IgG1 e, conseqüentemente, apresentaram maior relação IgG2a/IgG1, quando comparado aos valores obtidos no grupo salina (Figura 11C). Os camundongos tratados com AM1009 foram os que apresentaram maior razão dos isotipos de anticorpos quando comparados aos outros grupos.

A toxicidade orgânica mostrou que os camundongos tratados com a AmpB apresentaram níveis elevados de marcadores de dano renal e hepático, quando comparados aos demais grupos (Figura 12). Similarmente ao encontrado na avaliação imunológica, os camundongos tratados com AM1009 foram aqueles que apresentaram níveis mais baixos dessas enzimas, quando comparados aos demais grupos.



Fonte: Sousa, JKT et al. (2019)

Figura 12. Toxicidade *in vivo* nos camundongos infectados e tratados. Para avaliar a toxicidade orgânica induzida pela terapêutica foram medidos os níveis de alanina aminotransferase (A), aspartato aminotransferase (B), uréia (C) e creatinina (D) nas amostras de soro coletadas de animais infectados e tratados (n = 8 por grupo), 15 dias após o tratamento. As amostras dos animais não tratados (não tratados e não infectados) (n = 4) foram usadas como controle. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina e anfotericina B (AmpB) ($p < 0,0001$).

6.5 DISCUSSÃO

Avanços na pesquisa bioquímica aplicada em estudos parasitológicos e imunológicos *in vitro* e/ou *in vivo* têm sido desenvolvidos com o objetivo de se identificar novos produtos com potencial atividade antileishmanial, não-tóxicos e de baixo custo para serem usados no tratamento contra as leishmanioses (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

O atual regime terapêutico ainda apresenta problemas como os efeitos colaterais decorrentes do tratamento, como artralgia, mialgia, febre, fraqueza, além da toxicidade renal, hepática e cardíaca, bem como alto custo e/ou baixa acessibilidade. Além disso, a resistência do parasita contra medicamentos vem aumentando (SUNDAR; SINGH, 2016). Como consequência, a necessidade por novos compostos antileishmaniais, que apresentem baixa toxicidade, menor custo e melhor eficácia contra *Leishmania* torna-se urgente (MENDONÇA et al., 2019).

No presente estudo, um derivado da cloroquinolina foi testado com essa finalidade. Os resultados mostraram que a ação antileishmanial *in vitro* foi altamente eficaz contra duas importantes espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, em ambos os estágios do parasito. A molécula exibiu baixa toxicidade em macrófagos murinos e em eritrócitos humanos, mostrando resultados satisfatórios no índice de seletividade. O efeito da AM1009 contra amastigotas intracelulares foi observado no tratamento de macrófagos infectados; esse composto reduziu em níveis significativos a porcentagem de infecção e o número de amastigotas recuperadas, quando as células infectadas foram tratadas.

O derivado de cloroquinolina também apresentou potencial para inibir a infecção de macrófagos; o pré-tratamento dos parasitas induziu menor grau de infecção em células murinas, além de menor carga parasitária quando determinado o número de amastigotas. No presente trabalho, outro derivado de cloroquinolina, o clioquinol, foi utilizado como controle de molécula, enquanto a AmpB foi utilizada como controle de fármaco. Em ambos os casos, a atividade antileishmanial foi encontrada contra as duas espécies de *Leishmania*, com menor toxicidade em macrófagos murinos e em células humanas. Entretanto, os resultados obtidos com AM1009 foram mais significativos em termos de ação contra o parasita e na manutenção da integridade das células de mamíferos, demonstrando a maior eficácia no tratamento de macrófagos infectados.

Quinolinas são compostos heterocíclicos encontrados em famílias de plantas e podem ser sintetizados quimicamente. Esses compostos são utilizados na medicina popular e tradicional com diversa atividade biológica, como antimicrobiana, anticancerígena e

antileishmanial (POHLIT et al., 2013). Em geral, as modificações estruturais em moléculas definidas são um caminho mais acessível para se encontrar novos compostos com atividade biológica (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Neste aspecto, derivados de quinolina têm sido produzidos e caracterizados como compostos com propriedades antileishmanial, embora a maioria dos estudos tenha realizado experimentos *in vitro*; poucos são testados *in vivo* em hospedeiros infectados (MENDONÇA et al.; TAVARES et al., 2019). Não menos importante, também são necessárias comparações entre os resultados obtidos usando essas moléculas em modelos de mamíferos, principalmente, quando parâmetros imunológicos e parasitológicos são avaliados, visando selecionar os melhores candidatos para futuros estudos em cães ou no homem para o tratamento da doença.

Como o objetivo deste estudo foi identificar novos alvos com atividade antileishmanial a serem aplicados futuramente na prática clínica, foram desenvolvidos experimentos *in vivo* utilizando modelo murino. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e, posteriormente, tratados com a molécula AM1009 pura. O clioquinol e AmpB foram também utilizados como controles. A eficácia dos compostos foi avaliada por meio de parâmetros parasitológicos e imunológicos, que foram investigados 15 dias após o tratamento nos camundongos cronicamente infectados. Os resultados mostraram que o AM1009 foi o mais efetivo contra a infecção por *L. amazonensis*, tendo as análises parasitológicas demonstrado reduções significativas na carga parasitária no tecido infectado, baço, fígado e dLN dos animais infectados e tratados, quando comparados aos demais grupos.

Embora o clioquinol e a AmpB tenham também apresentado reduções no parasitismo em comparação ao grupo salina, os valores foram maiores em relação aos obtidos com AM1009 nos animais infectados. Resultados semelhantes foram encontrados quando moléculas naturais ou sintéticas, incluindo derivados da quinolina, foram testados em modelos murinos contra a infecção por *Leishmania* (DUARTE et al., 2016; WIJNANT et al., 2017).

A resposta imune foi avaliada nos animais infectados e tratados, e mostrou o desenvolvimento de uma resposta Th1 nos animais tratados com AM1009, que foi baseado em níveis elevados de IFN- γ , IL-12, GM-CSF, além de nitrito; bem como a presença de anticorpos do isotipo IgG2a específicos ao parasita. Sabe-se que a produção de nitrito por macrófagos ativado desempenha um papel importante na eliminação de *Leishmania* (KHEIRANDISH et al., 2018). Os dados demonstrados neste estudo sugerem a ativação de macrófagos nos animais tratados com AM1009, com base nos níveis elevados de nitrito que foram encontrados; relacionando-se assim com o baixo parasitismo encontrado em tecidos e órgãos infectados desses animais.

Os camundongos tratados com clioquinol ou AmpB e infectados mostraram também resposta Th1 antileishmanial, apesar das células esplênicas terem produzido níveis mais baixos de IFN- γ e nitrito, bem como maiores níveis de IL-4 e IL-10, quando comparados ao grupo tratado com AM1009. O grupo tratado com salina apresentou resposta Th2 polarizada, que foi caracterizada por níveis elevados de IL-4, IL-10 e de anticorpos do isotipo IgG1, confirmando o perfil de susceptibilidade encontrado quando essa linhagem de camundongo é infectada com *L. amazonensis* (LAGE et al., 2016; ROSAS et al., 2005)

Uma limitação no estudo foi a não avaliação da eficácia em tempos e esquemas de doses diferentes, assim como a incorporação da molécula em sistemas de entrega. No entanto, os resultados apresentados permitem inferir sobre uma ação leishmanicida efetiva *in vitro* e *in vivo* do AM1009, bem como a menor toxicidade encontrada em dois tipos distintos de células de mamíferos. Desta forma, pode-se considerar essa molécula com potencial atividade antileishmanial para estudos futuros contra a doença.

A toxicidade induzida em camundongos BALB/c tratados e infectados foi avaliada e os resultados mostraram que AM1009 ou clioquinol não causaram toxicidade nos animais, uma vez que os marcadores renal e hepático foram encontrados próximos aos valores obtidos nos animais não-tratados e não-infectados. Por outro lado, camundongos tratados com AmpB apresentaram níveis elevados de AST, ALT, ureia e creatinina; demonstrando assim a toxicidade deste fármaco quando usado em mamíferos (GERSHKOVICH et al., 2010; MISHRA et al. 2013) Embora a AmpB seja considerada um agente imunomodulador, podendo induzir a produção de IL-1, TNF- α e óxido nítrico, também é considerado potente nefrotóxico, capaz de provocar toxicidade aguda, febre, calafrios, náusea, vômito, diarreia e cefaleia nos pacientes (ASAD et al., 2015; KATO et al., 2018)

O mecanismo de ação do AM1009 foi avaliado em *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que a molécula induziu despolarização de $\Delta\Psi_m$, estimulou a produção de ROS e promoveu alterações no ciclo celular da *Leishmania* pelo aumento da população de células da fase sub-G0/G1. A produção de ROS é considerada relevante para os organismos, uma vez que regula as vias de sinalização e proliferação celular. No entanto, em níveis elevados, pode causar estresse oxidativo e morte celular. Além disso, pode induzir efeitos deletérios na membrana mitocondrial da célula, levando à despolarização $\Delta\Psi_m$ e à morte celular (MONZOTE, GILLE et al., 2010). Alterações no ciclo celular da fase sub-G0/G1 indicam estresse parasitário, com a presença de subpopulação celular apresentando baixo conteúdo de DNA, o que é compatível com a degradação celular (VERÇOZA et al., 2017). Em conclusão, os achados sugerem que a mitocôndria foi a organela alvo nos parasitas tratados com AM1009. Outros derivados de

quinolina também mostraram mecanismo de ação semelhante em *Leishmania*, como a 4-hidrazinoquinolina (ANTINARELLI et al., 2018), QuinDer1 (COIMBRA et al., 2016) e Flau-A (MENDONÇA et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que o novo derivado de cloroquinolona, AM1009, apresentou ação seletiva contra duas importantes espécies de *Leishmania*, não causando toxicidade em células de mamíferos, e tendo sido eficaz no tratamento de camundongos infectados com *Leishmania*. Como consequência, o presente estudo sugere o AM1009 como um novo candidato para ser testado em estudos futuros para o tratamento contra as leishmanioses em outros hospedeiros mamíferos.

8 PERSPECTIVAS

- Testar a AM1009 incorporada em sistemas de entrega.
- Desenvolver uma formulação tópica contendo AM1009.
- Realizar estudo *in vivo* avaliando a AM1009 contra a leishmaniose visceral e em outros modelos de mamíferos, como o hamster.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, B. F. et al. 2-Chloroquinoline-3-carbaldehydes: Synthesis, reactions and applications. **Arkivoc**, v. 2012, n. 1, p. 211–276, 2012.
- ABDELWAHID, M. A. S. et al. Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of certain quinoline-4-carboxylic acids. **Journal of Chemistry**, v. 2019, n.1, p.1-10, 2019.
- ABOELNAGA, A.; EL-SAYED, T. H. Click synthesis of new 7-chloroquinoline derivatives by using ultrasound irradiation and evaluation of their biological activity. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 11, n. 3, p. 254–263, 2018.
- AKTER, S. et al. Molecular and serological evidence of leishmania infection in stray dogs from visceral leishmaniasis-endemic areas of Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 795–799, 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.
- AL-SALEM, W.; HERRICKS, J. R.; HOTEZ, P. J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- 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.
- ANTINARELLI, L. M. R. et al. Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: Induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 195, p. 78–86, 2018.
- ANVERSA, L. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Rev Assoc Med Bras**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ARONSON, N. et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 24–45, 2017.
- ASAD, M. et al. Therapeutic and immunomodulatory activities of short-course treatment of murine visceral leishmaniasis with KALSOMETM10, a new liposomal amphotericin B. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
- ASHFORD, R W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 143–153, 2007.
- ATIA, A. M. et al. Sodium stibogluconate and paromomycin for treating visceral leishmaniasis under routine conditions in eastern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 12, p. 1674–1684, 2015.
- AZEREDO, S. O. F.; SALES, E. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Synthesis, three-

dimensional structure, conformation and correct chemical shift assignment determination of pharmaceutical molecules by NMR and molecular modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 975–984, 2017.

BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493–510, 2012.

BASSELIN, M. et al. Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 46, n.12, p. 3731-3738, 2002.

BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018.

BATISTA, V. F.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Synthesis of Quinolines: A Green Perspective. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 8, p. 4064–4078, 2016.

BEER, M. F. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satereiifolia* var. *satureiifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 2188–2195, 2016.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.

BERMAN, J.J. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. **Experts Opin Drug Metab Toxicol**, v.4, n.9, p.1209-1216, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leishmanioses visceral: recomendações clínicas para redução de letalidade [recurso eletrônico] / – Brasília: Ministério da Saúde, 78p.2011. Data de acesso: 10/08/2019, disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] – Brasília: Ministério da Saúde, 189 p.2017. Data de acesso: 10/08/2019, disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências e Tecnologias e Insumos Estratégico. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Miltefosina para tratamento da leishmaniose tegumentar: relatório de recomendação, 30p, 2018. Data de acesso: 10/08/2019, disponível em:

http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf

BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, p. 1-3, 2019.

BRITO, N. C.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p.1-29, 2017.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151,

p. 951–970, 2018.

CALIXTO, S. L. et al. Novel organic salts based on quinoline derivatives: The in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 141–151, 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Review Article New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–23, 2018.

Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2018, Data de acesso: 27/07/2019, disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>

COELHO, E. A. F. et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.

COIMBRA, E. S. et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50–57, 2016.

COOKS, R. G.; YAN, X. Mass Spectrometry for Synthesis and Analysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–28, 2018.

COSKUN, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

DIRO, E. et al. Use of Pentamidine As Secondary Prophylaxis to Prevent Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients, the First Twelve Months of a Prospective Cohort Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2015.

DORLO, T. P. C. et al. Pharmacokinetics of miltefosine in old world cutaneous leishmaniasis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2855–2860, 2008.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DUARTE, M. C. et al. Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. **Parasitology International**, v. 65, n. 6, p. 728–736, 2016.

DUARTE, Y. et al. Novel Coumarin-Quinoline Hybrids: Design of Multitarget Compounds for Alzheimer's Disease. **Chemistry Select**, v. 4, n. 2, p. 551–558, 2019.

DUQUE, M. C. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6,

p. 774–776, 2016.

FERNANDES, K. S. et al. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 1–9, 2017.

FINK, C. et al. Effective treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* with topical photodynamic therapy. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 14, n. 8, p. 836–838, 2016.

FREITAS, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.

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

FU, H. G. et al. Synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as a novel class of broad-spectrum antibacterial agents. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1–11, 2019.

GADELHA, E. P. N. et al. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: A pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 807–813, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

GARCIA-CASTRO, M. et al. Scaffold Diversity Synthesis and Its Application in Probe and Drug Discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 27, p. 7586–7605, 2016.

GERSHKOVICH, P. et al. Biodistribution and tissue toxicity of amphotericin B in mice following multiple dose administration of a novel oral lipid-based formulation (iCo-009). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2610–2613, 2010.

GERVAZONI, L. F. O.; GONÇALVES-OZÓRIO, G.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. 2'-Hydroxyflavanone activity in vitro and in vivo against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1–18, 2018.

GHORAB, M. M. et al. Novel chloroquinoline derivatives incorporating biologically active benzenesulfonamide moiety: Synthesis, cytotoxic activity and molecular docking. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2016.

GIRAUD, E. et al. Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 25–28, 2019.

GONTIJO, C. M. F. et al. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 751–753, 2002.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GUERRA, J. A. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical**

Diseases, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2011.

GUIMARÃES, L. H. et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2016.

HAMAMA, W. S. et al. Recent advances in the chemistry of 2-chloroquinoline-3-carbaldehyde and related analogs. **RSC Advances**, v. 8, n. 16, p. 8484–8515, 2018.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011a.

HARHAY, M. O. et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 543–550, 2011b.

HOSSAIN, F. et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. 1-16, 2017.

HU, R. V. P. F. et al. Case report: First case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Suriname. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 825–827, 2012.

JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 1–9, 2013.

JOSÉ, F.F. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro Evaluation of the ability of Montenegro skin test to induce specific immune response. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537–542, 2001.

JOSHI, S. D. et al. QUINOLINE: A PROMISING AND VERSATILE SCAFFOLD FOR FUTURE. **American Journal of Pharmaceutical Research**, v.6, n.4, p.5033-5044, 2016.

KARIMI, A.; ALBORZI, A.; AMANATI, A. Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p.1- 10, 2016.

KARUNAWEEERA, N. D.; FERREIRA, M. U. Leishmaniasis: Current challenges and prospects for elimination with special focus on the South Asian region. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 425–429, 2018.

KATAKURA, K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 126–130, 2009.

KATO, H. et al. The evaluation of frequency of nephrotoxicity caused by liposomal amphotericin B. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 9, p. 725–728, 2018.

KHAN, I. et al. Attenuation and production of the amphotericin B-resistant leishmania tropica strain. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 6–11, 2016.

KHAN, M.G.M. et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasites & Vectors**, v.3, n. 114, p.1-4, 2010.

KHEIRANDISH, F. et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract alters the cytokine profile of *Leishmania major*-infected macrophages: New insight into the underlying mechanism. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 4, p.0–3, 2018.

KIMUTAI, R. et al. Safety and Effectiveness of Sodium Stibogluconate and Paromomycin Combination for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: Results from a Pharmacovigilance Programme. **Clinical Drug Investigation**, v. 37, n. 3, p. 259–272, 2017.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KORCZ, M. et al. Synthesis, structure, chemical stability, and in vitro cytotoxic properties of novel quinoline-3-carbaldehyde hydrazones bearing a 1,2,4-triazole or benzotriazole moiety. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1-23, 2018.

KUMAR, S.; JYOTIRMAYEE, K.; SARANGI, M. Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 18, n. 1, p. 126–132, 2013.

LAGE, L. M. DOS R. et al. An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 11, p. 4083–4095, 2016.

LEFEVRE, J. W.; OSWEGO, S. Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Identify an Unknown Compound. **Modular laboratory program in Chemistry**, v. 711, n. Chemical Education Resources, Inc, p. 1–16, 2000.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–123, 2007.

LIMA, G. S. et al. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1133–1137, 2015.

LINDOSO, J. A. L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193–201, 2018.

LOISEAU, P. M. et al. In vitro activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1777–1780, 2011.

LU, Y.; CHEN, W. Application of Mass Spectrometry in the Synthesis and Characterization of Metal Nanoclusters. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 21, p. 10659–10667, 2015.

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

MACQUARRIE, S. et al. Relapse of visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient successfully treated with a combination of miltefosine and amphotericin B. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 325–329, 2015.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2012.

MANDEWALE, M. C. et al. A review on quinoline hydrazone derivatives as a new class of potent antitubercular and anticancer agents. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 354–361, 2017.

MAO, W. et al. Biochemical analysis of leishmanial and human GDP-Mannose Pyrophosphorylases and selection of inhibitors as new leads. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.

1–14, 2017.

MASSOUD, M. A. M. et al. 2-Chloroquinoline-3-carbaldehydes : synthesis and reactions (2012-2017). **Journal of Organic Chemistry**, v.1,n.1, p. 244–287, 2018.

MCILWEE, B. E.; WEIS, S. E.; HOSLER, G. A. Incidence of endemic human cutaneous leishmaniasis in the United States. **JAMA Dermatology**, v. 154, n. 9, p. 1032–1039, 2018.

MEMBRIVE, N. A. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v.1, n.39, p. 2–5, 2017.

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. **Parasitology Research**, v. 117, n. 2, p. 391–403, 2018.

MENDONÇA, D. V. C. et al. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic ® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n.2019, p. 779–787, 2019.

MISHRA, J. et al. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. **Indian J Med Res**, v.137, n.4, p.767-776, 2013.

MNIOUIL, M. et al. Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. **Acta tropica**, v.182, p. 185-189, 2018.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; SARAVOLATZ, L. D. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: Drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398–1404, 2015.

MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a promising antiparasitic target. **Curr Clin Pharmacol**, v.5, n.1, p.55-60, 2010.

MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.2, n.2, p.151-158, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NQORO, X.; TOBEKA, N.; ADERIBIGBE, B. A. Quinoline-based hybrid compounds with antimalarial activity. **Molecules**, v. 22, n. 12, p.1-22, 2017.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Mucosal leishmaniasis (“espundia”) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime®) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 6, p. 321–325, 2000.

Organização Pan Americana de Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan Americana de Saúde, 2019, disponível em <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>

PAGHEH, A. et al. An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 38, n. 4, p. 347–351, 2014.

- PARHIZGAR, A. R; AHGHIGHI, M. S. A. Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. **Iran J Med Sci**, v.42, n.2, p. 115-128, 2017.
- PARVIZI, M. M. et al. Efficacy of cryotherapy plus topical *Juniperus excelsa* M. Bieb cream versus cryotherapy plus placebo in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: A triple-blind randomized controlled clinical trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–23, 2017.
- PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 1–2, p. 26–39, 2006.
- PIMENTEL, M. I. F. et al. Intralesional treatment with meglumine antimoniate in three patients with new world cutaneous leishmaniasis and large periarticular lesions with comorbidities. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p. 269–272, 2017.
- PINTO-MARTINEZ, A. K. et al. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2018.
- POHLIT, A. M. et al. Amazonian plant natural products: Perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219–9240, 2013.
- POMEL, S. et al. GDP-Mannose Pyrophosphorylase: A Biologically Validated Target for Drug Development Against Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 186, p. 1–7, 2019.
- PRAMANIK, P. K. et al. Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 1–11, 2019.
- PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 2012.
- RAIS, S. et al. Sodium Stibogluconate (Pentostam) Potentiates Oxidant Production in Murine Visceral Leishmaniasis and in Human Blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.9, p.2406-2410, 2000.
- RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, 2018.
- READY, PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- RIJAL, S. et al. Eliminating visceral leishmaniasis in South Asia: The road ahead. **BMJ (Online)**, v. 364, 2019.
- ROSAS, L. E. et al. Genetic background influences immune responses and disease outcome

of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. **International Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1347–1357, 2005.

SALDANHA, A. C. R. et al. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88R e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: I. Eficácia e segurança. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 383–387, 1999.

SAMPAIO, R. N. R. et al. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 2019.

SARAIVA, M. T. et al. 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxylates: Organocatalytic synthesis and antioxidant properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 41–53, 2016.

SERENO, D. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.7, p.2064-2069.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. SINAN, 2017. Data de acesso: 01/08/2019, disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>

SHADDEL, M. et al. Cryotherapy of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major in BALB/C mice: A comparative experimental study. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 1, p. 42–46, 2018.

SHIN, J. Y. et al. New world cutaneous leishmaniasis treated with intralesional injection of pentavalent antimony. **Annals of Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 80–83, 2013.

SHIRI, M. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Quinoline Derivatives as Antibacterial and Antifungal Agents. **Organic Chemistry Research**, v.2, n.2, p.113-119, 2016.

SILVA, R.E. et al. Towards a standard protocol for antimony intralesional infiltration technique for cutaneous leishmaniasis treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.113, n.2, p. 71-79, 2018.

SINGH, D. et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 222–226, 2013.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 19, p.1-15, 2016.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.

SMORENBURG, CH et al. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. **Anticancer drugs**, v.11, n.10, p.825-828, 2000.

SONG, S.; GUI, X.; GUAN, L. Co-infection of visceral leishmaniasis and HIV-1: A surviving case in China and review of treatment strategies. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2014.

SOYER, T. G. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antileishmanial activity of a

chloroquinolin derivative against *Leishmania* species capable of causing tegumentary and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 30–37, 2019.

SOMARATNE, V.N. et al. Randomized, double-blind study on intralesional metronidazole versus intralesional sodium stibogluconate in *Leishmania donovani* cutaneous leishmaniasis. *J Dermatologic Treat*, v.30, n.1, p-87-91, 2019.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2012.

SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

STROPPA, P. H. F. et al. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

SUNDAR, S. et al. Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala - azar. **Bmj**, v. 308, n. 6924, p. 307, 1994.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733–740, 2007.

SUNDAR, S. et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N England J Med**, v.362, n.6, p.504-512, 2010.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 3–4, p. 98–109, 2016.

SUNDAR S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. v. 9, n. 9, p. 951–8, 2002.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017.

SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Why miltefosine - A life-saving drug for leishmaniasis-is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, p. 1–10, 2018.

TAVARES, G. DE S. V. et al. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 123, n. 3, p. 236–246, 2018.

TAVARES, G. S. V. et al. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology International**, v. 68, n. 1, p. 63–72, 2019.

TEJERÍA, A. et al. Antileishmanial activity of new hybrid tetrahydroquinoline and quinoline derivatives with phosphorus substituents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.15, n.162, p. 18–31, 2019.

- TERCEIRO, B. R. F. et al. Good response to pentamidine isethionate in a case of mucosal leishmaniasis caused by leishmania (*Viannia*) *Braziliensis* that was difficult to treat: Case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–4, 2019.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n.1, p. 750, 2017.
- VAISH, M. et al. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 598–600, 2012.
- VAN HENTEN, S. et al. Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania aethiops*. **EClinicalMedicine**, v. 6, p. 69–81, 2019.
- VERÇOZA, B. R. F. et al. KH-TFMDI, a novel sirtuin inhibitor, alters the cytoskeleton and mitochondrial metabolism promoting cell death in *Leishmania amazonensis*. **Apoptosis**, v. 22, n. 9, p. 1169–1188, 2017.
- VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.
- VISWAS, R. S.; PUNDIR, S.; LEE, H. Design and synthesis of 4-piperazinyl quinoline derived urea/thioureas for anti-breast cancer activity by a hybrid pharmacophore approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 620–630, 2019.
- VRIES, H. J. C. D.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.
- WELAY, G. M.; ALENE, K. A.; DACHEW, B. A. Visceral leishmaniasis treatment outcome and its determinants in northwest Ethiopia. **Epidemiology and Health**, v. 39, p. 1-6, 2016.
- WIJNANT, G. J. et al. Efficacy of paromomycin-chloroquine combination therapy in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1–8, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Elimination of Kala-azar. Report of Fourth meeting of the Regional Technical Advisor Group, 2012. Data de acesso: 27/07/2019, disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_India/en/
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Accelerated plan for Kala-azar elimination, 2017. Data de acesso: 27/07/2019, disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/resources/Accelerated_plan_for_Kala-azar_Elimination_2017/en/
- World Health Organization, Leishmaniasis, 2018, Data de acesso: 27/07/2019, disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
- ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, 2017.
- YANG, G.; CHOI, G.; NO, J. H. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.11, p.6828 - 6836, 2016.

ZERPA, O.; PANDRÓ-NIEVES, M.; PONTE-SUCRE, A. American Tegumentary Leishmaniasis. **Drug resistance in *Leishmania* parasites**, p.177-191, 2018.

ANEXO

- ✓ Certificado de aprovação do projeto de pesquisa junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CUSA) da UFMG.

- ✓ Artigo científico publicado no periódico **Parasitology International** no ano de 2019, intitulado “A chloroquinoline derivate presents effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis”

Eduardo Antonio Ferraz Coelho
Pesquisador



CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais



[Manual do Solicitante](#) / CEUA: 3409-4516 / Suporte Técnico: desenvolvimento-sistemas@prpq.ufmg.br

Solicitações Sair

Solicitações

[Nova](#)

<u>Protocolo CEUA</u>	<u>Título</u>	<u>Situação atual</u>	<u>Opções</u>
85 / 2017	Emprego de moléculas sintéticas no tratamento in vitro e in vivo das leishmanioses.	Decisão Final - Aprovado	Solicitação / Histórico

Anterior || Próximo

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP : 31270-900

© Universidade Federal de Minas Gerais

