



Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCC

Ana Carolina Santana Vieira

Avaliação Citotóxica e Leishmanicida *in vitro* de Derivados Sintéticos

Maceió

2017



Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCC

Ana Carolina Santana Vieira

Avaliação Citotóxica e Laishmanicida *in vitro* de Derivados Sintéticos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre
Moreira

Maceió

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

V665a Vieira, Ana Carolina Santana.
 Avaliação citotóxica e leishmanicida *in vitro* de derivados sintéticos / Ana
 Carolina Santana Vieira. – 2017.
 79 f.: il.

 Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.
 Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
 Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de
 Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

 Bibliografia: f. 73-78.

 1. Leishmaniose. 2. Leishmania. 3. Leishmania Chagasi. I. Título.

 CDU: 615.283:616.993.161



Folha de Aprovação

Ana Carolina Santana Vieira

Avaliação citotóxica e leishmanicida de derivados sintéticos.

Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Alagoas e aprovada em 03
de abril de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade - (UFAL)

Prof. Dr. Eliane Aparecida Campesatto - (UFAL)

Prof. Dr. Thiago José Matos Rocha - (UNCISAL)

Dedico a minha filha, Maria Luiza e a meu esposo, Eduardo, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Vocês são meu alicerce.

Dedico ao meu pai, Raul Vieira (in memoriam). Tenho certeza que onde estiver, está orgulhoso e feliz.

Dedico a minha mãe, Célia e aos meus irmãos, Célia Beatriz, Renata e Raul. Sei que mesmo não sabendo o que faço, torcem e admiram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades que me tem concedido;

A Universidade Federal de Alagoas, por toda minha trajetória acadêmica desde a graduação;

A professora Dra. Magna Suzana, pela oportunidade, orientação, cuidado e apoio. É um privilégio fazer parte de seu grupo de pesquisa;

A professora Dra. Eliane Campesatto, por me aceitar no Mestrado e através dele me inserir na pesquisa experimental e no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI). Serei eternamente grata;

Aos amigos Mariana Santos e Anderson Brandão, por todo ensinamento, orientação, paciência e ajuda durante o doutorado;

As Dras Aline Cavalcanti e Morgana Vital, pelas orientações e por todo ensinamento que me passaram;

A amiga Yolanda Karla Cupertino, à você minha eterna gratidão por ter me apresentado ao LaFI e pela amizade construída nesses anos;

Aos amigos Max Viana e Luiz Henrique, pelas horas de estudos que passamos durante elaboração do projeto de doutorado (BIO+18). Nunca esquecerei as vias de sinalização;

Aos amigos Lafianos (são muitos, os nomes não cabem nesta página), inclusive aos que já concluíram seus mestrados, doutorados e iniciação científica. Sem vocês eu não chegaria até aqui;

Aos professores e colegas de outros Laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) e de outras Instituições pelas sínteses, colaborações e ajudas durante os experimentos;

Aos funcionários e docentes do ICBS, pela recepção, cuidado e atenção aos alunos do PPGCC;

Muito obrigada a todos!

RESUMO

As doenças negligenciadas afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. Dentre elas, as leishmanioses, que se apresentam nas formas visceral ou tegumentar. Causadas por protozoário do gênero *Leishmania*, são endêmicas em 98 países, não possuindo ainda tratamento adequado, representando um problema de saúde pública. Os medicamentos de escolha atualmente possuem efeitos adversos, além do alto custo, sendo importante a pesquisa de novos protótipos de fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica e leishmanicida de derivados sintéticos sobre *Leishmania chagasi*. Foram avaliados derivados acil oxímicos sintetizados a partir de éteres de oxima, derivados da vanilina e adutos de Morita-Baylis-Hillman. A atividade leishmanicida foi verificada através da infecção de macrófagos por formas promastigotas e em seguida tratados com diferentes concentrações (0,1-100 μ M) dos derivados. Os resultados mostraram que todos os derivados acil oxímicos apresentaram atividade leishmanicida na concentração de 30 μ M. Os derivados acil oxímicoTB06 (IC₅₀ 27,7 \pm 1,4), TB 08 (IC₅₀ 17,3 \pm 2,0) e TB 10 (IC₅₀ 13,3 \pm 6,7) apresentaram eficácia de 100% contra formas amastigotas. Os resultados obtidos na avaliação dos adutos de Morita-Baylis-Hillman demonstram que dos compostos 1G, 5G, 7G, 9G, 11G, 13G, 14G e 16G apresentaram significativa redução do número de amastigotas na concentração de 10 μ M. Os compostos 1G e 13G também apresentaram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. chagasi*. Desta forma, conclui-se que os derivados acil oxímicos e os adutos de Morita-Baylis-Hillman são promissores para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos leishmanicidas.

Palavras-chaves: Leishmaniose. *Leishmania*. *Leishmania chagasi*.

ABSTRACT

Neglected diseases affect more than one billion people worldwide. Among them, leishmaniasis, which present in the visceral or integumentary forms. Caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, they are endemic in 98 countries and do not yet have adequate treatment, representing a public health problem. The drugs of choice currently have adverse effects, besides the high cost, being important the research of new prototypes of drugs. The objective of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of synthetic derivatives on *Leishmania chagasi*. Acyl oxymethyl derivatives synthesized from oxime ethers, vaniline derivatives and Morita-Baylis-Hillman adducts were evaluated. Leishmanicidal activity was verified by macrophages infection by promastigotes and then treated with different concentrations (0.1-100 μ M) of the derivatives. The results showed that all acyl oxymethyl derivatives showed leishmanicidal activity in the concentration of 30 μ M. The acyl oxymic derivatives TB06 (IC 50 27.7 \pm 1.4), TB 08 (IC 50 17.3 \pm 2.0) and TB 10 (IC 50 13.3 \pm 6.7) showed 100% efficacy against amastigote forms. The results obtained in the evaluation of the Morita-Baylis-Hillman adducts show that the compounds 1G, 5G, 7G, 9G, 11G, 13G, 14G and 16G showed a significant reduction in the number of amastigotes in the 10 μ M concentration. Compounds 1G and 13G also showed leishmanicidal activity on promastigote forms of *L. chagasi*. Thus, it is concluded that acyl oxymethyl derivatives and Morita-Baylis-Hillman adducts are promising for the development of novel prototypes of leishmanicidal drugs.

Keywords: Leishmaniasis. *Leishmania*. *Leishmania chagasi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.....	15
Figura 2 – Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar.....	16
Figura 3 – Distribuição mundial dos casos de leishmaniose visceral.....	19
Figura 4 – Distribuição mundial dos casos de leishmaniose tegumentar	20
Figura 5 – <i>Lutzomyia sp</i> (mosquito palha)	23
Figura 6 – Forma Amastigota (A) e Promastigota (B).....	23
Figura 7 – Ciclo de vida da leishmania.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

DN – Doenças Negligenciadas

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ICBS – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

LC – Leishmaniose Cutânea

LM – Leishmaniose Mucosa

MS – Ministério da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Leishmanioses	15
3.2 Leishmaniose Visceral	15
3.3 Leishmaniose Tegumentar	16
3.2 Epidemiologia	20
3.3 Ciclo Biológico	22
3.4 Resposta Imune	24
3.5 Diagnóstico	26
3.6 Controle e Tratamento	27
3.6.1 N-metil glucamina.....	28
3.6.2 Anfotericina B.....	29
3.6.3 Pentamidina.....	31
3.6.4 Miltefosina.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Artigo I: Synthesis, Biological Evaluation and Moleculat Docking Studies of Oxime Derivates as Potential Anti-Leishmania Adents	33
4.2 Artigo II: Leishmanicidal activity of Morita-Baylis-Hillman adducts	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as Doenças Negligenciadas (DN) afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, o que representa um sexto da população mundial e são consideradas negligenciadas pela falta de financiamento, pesquisa e preocupação pelas autoridades sanitárias. Compreendem um grupo de doenças altamente prevalentes, com alto grau de morbimortalidade, fortemente relacionadas à pobreza, concentrando-se em áreas rurais remotas ou em áreas carentes urbanas, gerando alto impacto negativo para a população mais pobre dos países afetados. Podem prejudicar o crescimento infantil e o desenvolvimento intelectual, bem como a produtividade do trabalho (ENGELMAN et al., 2016; WHO, 2010, WHO, 2015).

A OMS classificou algumas DN com subclassificações por necessitarem de condições climáticas quentes e úmidas para se proliferarem, denominadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). Apesar de serem endêmicas em 149 países e causarem imenso sofrimento em milhares de pessoas, as DTN não ocupam lugar privilegiado nas agendas nacionais e internacionais de saúde, justamente por representarem ameaça em contextos empobrecidos, trazendo consequências para os sistemas de saúde e sociedade, influenciando negativamente no desenvolvimento global (WHO, 2012; WHO, 2015).

As DTN são distribuídas de acordo com três categorias. A categoria 1 compreende as doenças emergentes e não controladas: leishmanioses, dengue e tripanossomose africana. A categoria 2 compreende as doenças que apesar das estratégias de controle estarem disponíveis, a carga da doença persiste: malária, esquistossomose e tuberculose. A categoria 3 é representada pelas doenças com eliminação planejada por conta de estratégias de controle eficazes. No Brasil, as principais DTN são: leishmanioses, malária, dengue, tuberculose, doença de chagas, esquistossomose e hanseníase (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Essas doenças afetam centenas de milhões de pessoas, mas atraem pouca atenção dos doadores, políticos e organizações de saúde pública. São reflexos de pobreza e desigualdade social, que muitas vezes culminam à incapacidade do indivíduo a longo prazo (WELBURN et al., 2015).

As DN não despertam o interesse da indústria farmacêutica, pois o maior mercado consumidor de fármacos está nos países desenvolvidos. Fato este constatado quando se avalia que apenas 13 novos fármacos foram aprovados para este grupo de enfermidades, com exceção da malária, desde a década de 70, o que representa apenas 0,9% de todos os medicamentos aprovados para uso humano (BRASIL, 2006; SOUZA, 2010).

Dentre as 17 doenças negligenciadas, destacam-se as leishmanioses, endêmicas em 98 países, que em suas várias formas, provocam cicatrizes profundas e permanentes ou destroem as mucosas do nariz, boca e faringe. Na forma mais grave, caso não tratada, pode ser fatal, pois afeta principalmente o fígado, baço e a medula óssea.

As leishmanioses classificam-se em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, estando entre as dez endemias prioritárias da OMS, por seu relevante impacto na saúde pública. Estima-se que cerca de 20.000 a 40.000 pessoas morram por ano em decorrência das leishmanioses e que 400 milhões estão sob risco de desenvolver a doença (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015)

A OMS recomenda algumas estratégias para prevenção e controle das DTN: prevenção por meio de vacinas, intensificação na gestão de casos, controle dos vetores, provimento de água limpa, saneamento e higiene, além da saúde pública animal. O envolvimento da indústria farmacêutica e ações de organizações não governamentais (ONGs) melhoram o acesso de milhares de pessoas a medicamentos gratuitos, porém, esses esforços nos últimos anos foram apenas em algumas doenças como HIV/AIDS, tuberculose, dengue e febre amarela (WHO, 2015).

As leishmanioses não possuem um tratamento adequado e representam uma preocupação sanitária tanto pela expansão geográfica, quanto pela crescente urbanização. No Brasil a doença avança na região urbana e já se encontra na periferia das grandes cidades do Nordeste e do Centro-Oeste (SOUZA, 2007; WHO, 2010).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes são os fármacos de escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose, seguidos da anfotericina B e da pentamidina. Como outras alternativas também se encontram disponíveis a miltefosina oral e a anfotericina B lipossomal (DA-CRUZ, 2002; PIRMEZ et al., 1999; WHO, 2015). Porém, estas terapias são de alto custo, insatisfatórias e apresentam diversos efeitos indesejáveis (SINGH, 2006).

Os esforços no controle e tratamento das DTN ainda são insuficientes e o investimento em pesquisas para desenvolvimento de novos medicamentos é uma das ações que precisam de fomento para o alcance de metas estabelecidas. Dentre as prioridades de pesquisas elencadas pela Academia Brasileira de Ciências, o *screening* em larga escala de novos fármacos e desenvolvimento pré-clínico de substâncias com atividade antiparasitária estabelecida (SOUZA, 2010; WHO, 2010).

Segundo a OMS (2015), o acesso a medicamentos essenciais livres e bem planejados é uma das formas de melhorar o acesso à saúde das populações menos favorecidas. A pesquisa por novas alternativas para o tratamento se faz necessária frente ao panorama exposto,

principalmente com maior eficácia, menores efeitos adversos e melhores formas farmacêuticas.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida de compostos sintéticos na busca de novos protótipos de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade citotóxica e leishmanicida de duas séries de derivados sintéticos

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o potencial citotóxico dos compostos contra células hospedeiras (macrófagos J774A.1);
- Avaliar o potencial citotóxico de compostos sintéticos contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi*;
- Investigar a ação dos compostos sintéticos sobre macrófagos infectados *in vitro* com *L. chagasi*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças de notificação compulsória que apresentam crescimento do número de casos nas últimas décadas, de ambas as formas clínicas. Essas antropozoonoses representam um importante problema de saúde pública e estão entre as doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância, atingindo 12 milhões de pessoas em mais de 98 países com uma estimativa de 400.000 novos casos da doença anualmente. A transmissão ao homem ocorre pela picada do flebotomíneo fêmea infectada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (CANTACESSI et al., 2015; WHO, 2015).

A característica dos membros desta ordem ocorre pela presença de uma mitocôndria modificada, distribuída por toda a célula de *Leishmania*, que possui uma estrutura chamada cinetoplasto (do inglês “kinetoplast”), de onde provém o nome da ordem. O cinetoplasto é uma região especializada dentro desta mitocôndria, localizado na base do flagelo do parasita, rico em uma rede de DNA circular característica desses microorganismos (GRIMALDI JR; TESH, 1993).

São conhecidas cerca de 30 espécies de *Leishmania*, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo Mundo. Dentre todas estas espécies, especula-se que aproximadamente 20 infectam o homem podendo ocasionar doenças (ROBERTS; JANOVYJR, 1996; SHAW, 1994). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Taxonomia da *Leishmania*.

<i>Leishmania</i>		<i>Viannia</i>	
Complexo	Espécie	Complexo	Espécie
<i>L. donovani</i>	<i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. brasiliensis</i> <i>L. peruviana</i>
<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	<i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i>
<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. laisoni</i>	<i>L. laisoni</i>
<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. venezuelensis</i>	-	-

Fonte: adaptado de Bourée et al. (2014).

As leishmanioses apresentam evolução crônica e uma série de sintomas clínicos que vão desde cutâneos, mucocutâneos a viscerais. De acordo com a diversidade clínica, as leishmanioses são agrupadas em duas principais categorias: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) (WHO, 2015).

3.1.1 Leishmaniose Visceral

A LV, forma mais grave da doença, é endêmica em mais de 80 países e conhecida também como barriga d'água, calazar, esplenomegalia tropical ou febre dundun. Caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado, e anemia. É uma doença grave, crônica, de alta letalidade, cuja mortalidade pode chegar a 90% nos casos não tratados (MELO, 2004; WHO, 2015).

Mais de 90% de todos os novos casos estão presentes em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Se não for tratada adequadamente, a LV é fatal em mais de 95% dos casos em cerca de 2 anos após o início da doença (WHO, 2015).

No Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV (BRASIL, 2006; GARCIA et al., 2005).

Figura 1- Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.



Fonte: Brasil (2006).

Na América Latina, a LV foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na Região Nordeste. Ocorre mais frequentemente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos, fato relacionado à imaturidade imunológica celular, o que pode ser agravado pela desnutrição, ainda comum em algumas áreas endêmicas. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado, cerca de 60% (BRASIL, 2006).

Após a infecção, ocorre um período de incubação silencioso com tempo variável, entre dois meses a um ano, com alterações clínicas lentas. A apresentação clínica dependerá da espécie do parasito e de fatores do hospedeiro (GAY et al., 2015).

A LV se divide em três períodos: inicial, de estado e final. Durante o período inicial, ou fase aguda, a sintomatologia varia entre os pacientes. Os sintomas podem se apresentar como tosse e diarreia, sendo confundidos muitas vezes com outras doenças. Crianças podem apresentar hepatoesplenomegalia discreta. Durante o período de estado, que dura frequentemente mais de dois meses, o paciente apresenta comprometimento do estado geral associado à febre, emagrecimento progressivo, palidez cutânea-mucosa e hepatoesplenomegalia avançada (BRASIL, 2006).

Nos casos não diagnosticados e/ou não tratados, o paciente evolui para o período final. O paciente apresenta estado geral regular, febre contínua, desnutrição, edema nos membros inferiores, hemorragias, icterícia e ascite. O paciente pode evoluir para óbito por hemorragias secundárias a plaquetopenia ou infecções bacterianas, como piodermites, infecções respiratórias, dentre outras (BRASIL, 2014).

3.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

Registros históricos sugerem a presença da LT nos anos 400-900 d. C. (Peru e Equador) e no século I d. C. (Ásia, Europa e África). A LT já acometia a América antes da chegada dos europeus e africanos. Acredita-se que seu início tenha sido na área amazônica ocidental, posteriormente na selva alta e terras quentes nos limites da Bolívia e do Peru com o Brasil (REY, 2008; MELO et al, 2010).

A LTA está presente em 18 países nas Américas. No ano de 2012 foram registrados 52.919 casos, distribuídos em 16 países da região, sendo que, do total de casos, 82,6% (43.798) estão concentrados no Brasil e nos países da sub-região Andina. No Brasil a LTA é encontrada em todos os estados e a análise de sua evolução mostra uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas, e em 2003 todos os estados registraram autoctonia (OPAS, 2014)

A doença é considerada pela OMS um dos maiores problemas de Saúde Pública do mundo, compondo uma das seis doenças de estudo prioritário. É uma importante afecção dermatológica pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (ALVAR et al, 2014; BRASIL, 2007; WHO, 2014).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e 8 espécies descritas, somente em animais e 11 espécies causadoras da doença em humanos. No Brasil, atualmente cerca de seis espécies de *Leishmania* são causadoras da LTA: *L. (leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) brasiliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi*. Dessas espécies, as *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) brasiliensis* estão distribuídas em todo território nacional e são consideradas de maior importância médica (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007; ROCHA et al., 2015).

A LT é a forma prevalente em todo o mundo. Mais de 90% dos casos ocorrem em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. O período de incubação no homem varia de 2 meses, podendo apresentar períodos mais curtos (2 semanas) e mais longos (2 anos) após a picada do inseto infectado. Geralmente, a lesão apresenta-se como eritema, endurecimento e posteriormente lesão papular, podendo em alguns casos evoluir para nódulo (BRASIL, 2006; GAY et al., 2015).

Considerada infecciosa não contagiosa, a LTA possui uma classificação clínica baseada na fisiopatologia a partir da picada do vetor, localização e aspecto da lesão, infecção inaparente e leishmaniose linfonodal. As manifestações clínicas se apresentam de duas formas: Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucosa (LM). A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico difícil (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A LC causa lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões. A úlcera típica de LC é indolor e costuma se localizar em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras. Pode ocorrer adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. As ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e com tecido de granulação são comuns (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Na ausência de tratamento, as lesões tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior. A LC se manifesta sob duas formas clínicas: cutânea localizada e cutânea disseminada (BRASIL, 2010).

A forma cutânea localizada apresenta lesão geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla com a presença de até 20 lesões. A forma cutânea disseminada é observada em apenas 2% dos casos e apresenta múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. O número de lesões pode alcançar as centenas. O encontro do parasito nas lesões da forma disseminada é baixo, quando comparado com a forma difusa (BRASIL, 2010).

A forma cutânea difusa ocorre no Brasil através da *L. (L.) amazonensis*. Apesar de rara, é considerada grave ocorre em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Seu início é insidioso, com lesão única e má resposta ao tratamento. Posteriormente, formam-se placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimo grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente. A forma recidiva *cúttis* tem como característica a cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera,

com reativação localizada geralmente na borda da lesão. Também apresenta resposta terapêutica pobre (BRASIL, 2010).

Figura 2 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar: Leishmaniose Cutânea Localizada (A), Leishmaniose Cutânea Difusa (B), Leishmaniose Cutânea Disseminada (C) e Leishmaniose Mucocutânea (D).



Fonte: Teixeira et al. (2013).

A LM ou mucocutânea provoca lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (Figura 2). Apresenta dificuldade para tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. Está associada à *L. braziliensis*, na maioria dos casos ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Na maioria dos casos, a LM resulta de LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa (BRASIL, 2010).

As lesões mucosas podem se manifestar como úlcero-infiltrante, poliposa e terebrante. A maioria dos casos a LM acomete a mucosa nasal, com importante comprometimento do septo, seguindo-se em ordem de frequência o envolvimento da mucosa oral. Em ambos os casos, há risco de deformidades permanentes (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

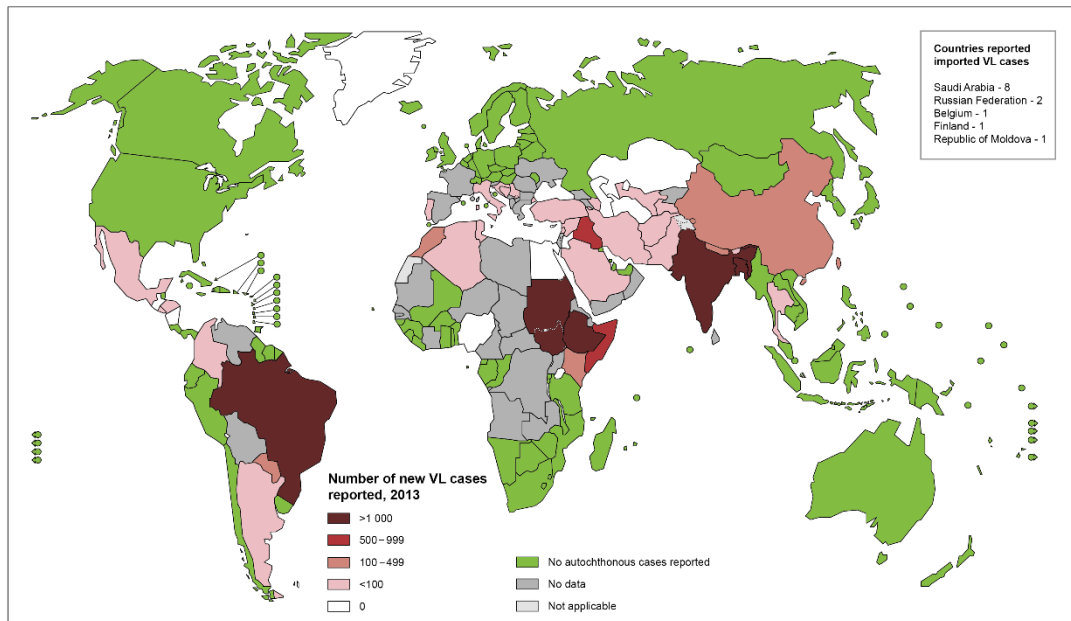
3.2 Epidemiologia

As leishmanioses são encontradas essencialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Constituem, atualmente, o segundo grupo mais comum de doenças infecciosas depois da malária, e estão entre as mais importantes doenças infecciosas tropicais. Os encargos que essas doenças trazem persistem devido à existência de grandes obstáculos técnicos, gerenciais, financeiros e políticos ao controle das mesmas, permitindo que as leishmanioses se mantenham como grave problema da saúde pública, sendo bastante onerosas para o desenvolvimento social e para a economia de vários países (WHO, 2002a; WHO, 2002b).

Apesar de possuir a maior economia da América latina, o Brasil possui a maior prevalência dos casos de leishmaniose de todo continente americano. Estima-se 65.000 novos casos da doença anualmente no país. Os processos de urbanização e desmatamento são os principais determinantes sociais que contribuem para novos casos (MOTA; MIRANDA, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), na década de noventa, o Nordeste era responsável por 90% dos casos de LV. Atualmente, após a expansão da doença para áreas urbanas e peri urbanas, a região reduziu para 77% dos casos. As modificações sociais e econômicas, a má distribuição de renda, o aumento da urbanização, o esvaziamento rural e secas periódicas são responsáveis pela expansão das áreas endêmicas e aparecimento de novos focos da doença (BRASIL, 2006; HOTEZ; FUJIWAKA, 2014; MOTA; MIRANDA, 2011).

Figura 3 - Distribuição mundial dos casos de Leishmaniose Visceral no ano de 2013.

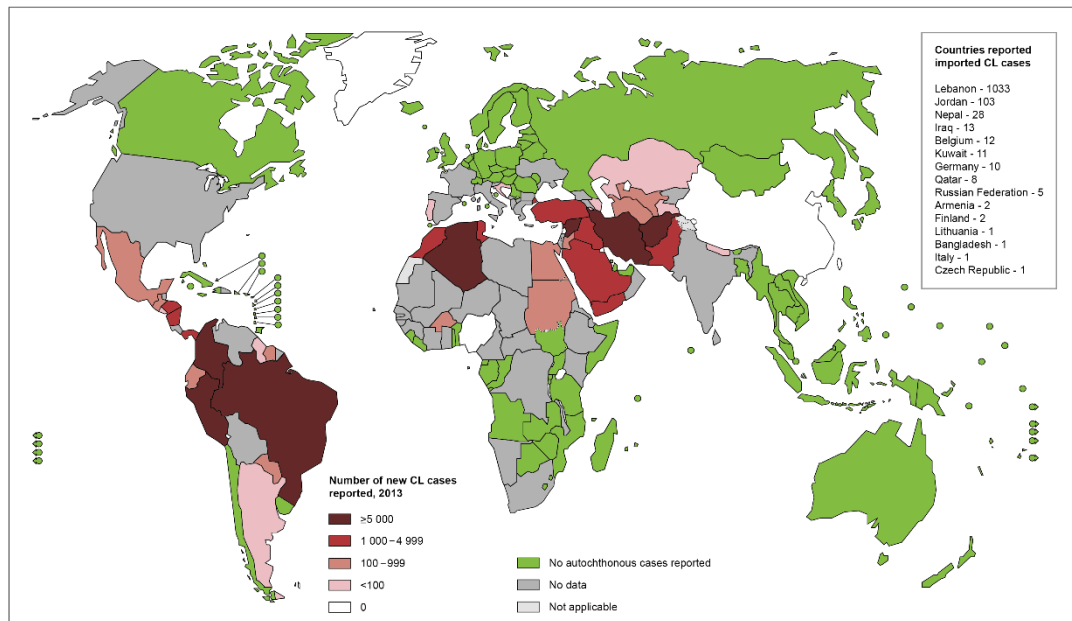


Fonte: WHO (2013).

Cerca de 80% dos casos de LT do mundo estão em quatro países: Brasil (40%), Colômbia (20%), Peru (16%) e Nicarágua (5%). O Brasil possui uma média anual de 21.000 casos novos registrados entre 2009 e 2013, ocupando o terceiro lugar no mundo, sendo superado apenas pela Síria e o Afeganistão (WHO, 2015).

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mostram que no período de 2007 a 2014, no Brasil, registrou-se um total de 996 óbitos de pacientes com LT (média anual de 124,5 óbitos) e uma letalidade total acumulada de 0,55% (0,09% por LT e 0,46 por outras causas). Desse total de óbitos, 155 (15,56%) foram por LT e 841 (84,44%) registrados como por outras causas.

Figura 4: Distribuição Mundial dos Casos de Leshmaniose Tegumentar no ano de 2013



Fonte: OMS, 2013

Segundo dados do SINAN, Alagoas registrou entre os anos de 2014 e 2015 mais de cem casos de LV por ano. Esses números são maiores quando comparados aos anos anteriores, comprovando um aumento no número de casos registrados da doença na região. Em 2015, a incidência foi de 1,3 casos/100.000 habitantes, com letalidade de 4,7% (dois óbitos registrados).

Entre os anos de 2007 e 2013 foram registrados no estado mais de 500 casos de LT no SINAN. A maioria desses casos, em pacientes do sexo masculino (67,82%). A faixa etária mais acometida foi a de 20 a 34 anos (118 casos), sendo predominante a forma cutânea, em 95,06% dos casos registrados (ROCHA et al., 2015).

3.3 Ciclo Biológico

A doença não é transmitida entre seres humanos. Nas Américas (Novo Mundo), a leishmaniose é transmitida ao homem geralmente por fêmeas do gênero *Lutzomyia*. No Velho Mundo (Europa, África e Ásia), os vetores pertencem ao gênero *Phlebotomus* (KILLICK-KENDRICK, 1990).

A infecção ocorre através da picada das fêmeas infectadas (Figura 5), insetos flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, como mosquito palha,

tatuquira, birigui, entre outros, a depender da região que é localizado. Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes (silvestres, rurais e urbanos) (BRASIL, 2007; MIRANDA; DIAS, 2011).

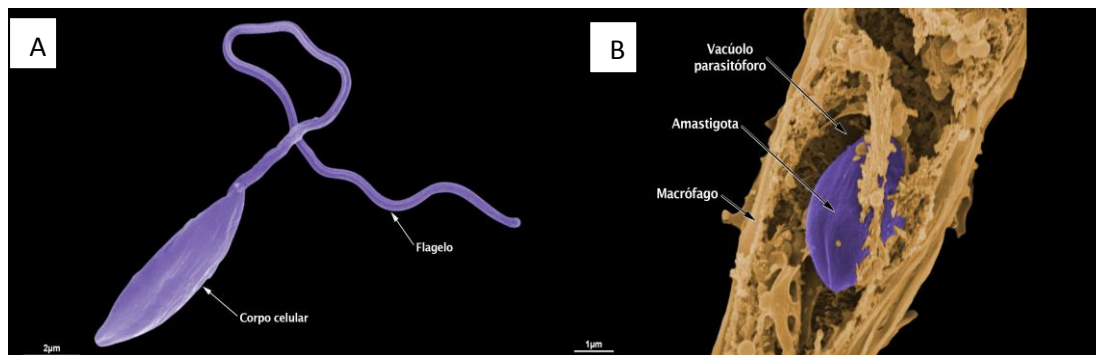
Figura 5 – *Lutzomya sp.* (Mosquito Palha).



Fonte: BRASIL (2007).

Os hospedeiros são divididos de duas formas: vertebrados (adquirindo as formas promastigota e amastigota) e invertebrados (adquirem as formas promastigota e amastigota). A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida dimórfico: promastigota e amastigota (Figura 6). As formas promastigotas estão presentes no tubo digestivo do vetor (flebotomo), infectantes. As formas amastigotas estão no hospedeiro vertebrado, representando a forma clinicamente relevante do parasito (DE ASSIS et al., 2012).

Figura 6 - Forma promastigota (A) e forma amastigota (B).

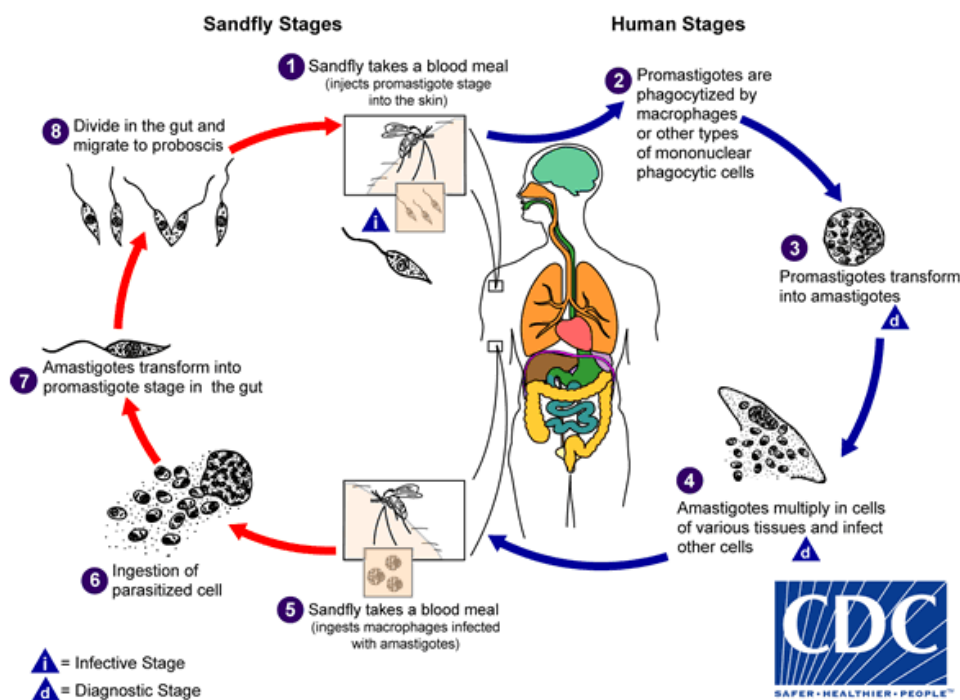


Fonte: Teixeira et al. (2013)

Durante a picada do inseto, ocorre ingurgitamento e são inoculados parasitos na forma promastigota na corrente sanguínea do hospedeiro, as quais são fagocitadas por células do

sistema imunológico, principalmente macrófagos (**Figura 7**). No ambiente intracelular, forma-se o fagossomo, local onde as formas promastigotas vão assumir as formas amastigotas (sem flagelo), iniciando assim a reprodução binária, rompendo a célula, disseminando-se e invadindo novos macrófagos (OLIVEIRA et al., 2016, CDC, 2016).

Figura 7 - Ciclo de vida da leishmania.



Fonte: CDC. (2016)

3.4 Resposta Imune

O sistema imunológico é essencial na defesa contra agentes infecciosos, representando o principal empecilho às infecções. Quando invadidos por algum agente externo, o número de indivíduos que desenvolve a doença é menor do que os que não desenvolvem, sugerindo condições para morte de microorganismo e a não progressão da doença. A imunidade atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais moleculares e celulares (JANEWAY, 2001; MACHADO et al., 2004)

Existem duas respostas imunes: a inata e adaptativa. Nas duas respostas, os macrófagos possuem a finalidade de fagocitar, matar e degradar os agentes infecciosos. Além disto, os macrófagos reconhecem os patógenos através da resposta imunitária inata e junto aos linfócitos (primeira linha da resposta imune) estabelecem a imunidade adaptativa. O

conhecimento dos principais mecanismos de defesa imune permite a compreensão da patogênese das doenças infecto parasitárias e das várias estratégias do hospedeiro e do parasita. (MACHADO et al., 2002; MACHADO et al., 2004).

A resposta imune inata é imprescindível para a eliminação rápida de patógenos invasores, e de maneira geral, se aceita que as células T e a imunidade mediada por células correspondam ao mecanismo protetor contra a LTA. Uma das habilidades dos parasitos é de evadir e subverter as respostas imunes do hospedeiro; essa característica permite que os parasitos persistam e estabeleçam infecções crônicas nos pacientes (TRUJILLO et al., 2000; SOUZA et al., 2005; GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

A resposta imune após infecção por parasitos da leishmania leva a uma ativação específica por parte do hospedeiro que irá depender de mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida. Há uma expansão de células T CD4+ que vão apresentar um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (FREITAS et al, 2013; HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006).

Após a infecção, quando os parasitos estão nos macrófagos, os antígenos apresentados às células T determinarão a resposta imune. No caso das leishmanioses, esta resposta vai depender da susceptibilidade do hospedeiro, além da espécie do parasito. Caso ocorra a resposta do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, e em quantidade suficiente, ativam os macrófagos e, conseqüentemente, levam a destruição dos parasitas. Porém, se a resposta for do tipo Th2, serão produzidas citocinas como IL-4 e IL-10, e em quantidades suficientes, irão inibir a ativação da célula hospedeira e assim, o desenvolvimento das formas clínicas de leishmanioses (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; FERREIRA; ÁVILA, 2001; REIS et al., 2006).

A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra bactérias intracelulares, protozoários e vírus. A resposta Th2 está relacionada à helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são antagônicas, pois citocinas IL-2, IFN γ , TNF- α e IL-12 modulam negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite um controle da resposta imune e conseqüentemente a homeostasia (MACHADO et al., 2002; MILLS; MCGUIRK, 2004).

Estudos experimentais com camundongos avaliam a relação parasito-hospedeiro em relação às leishmanioses. A susceptibilidade e resistência através do controle genético, assim como a resposta imune mediada por células e a relação dos macrófagos-parasitas, são alvos de investigação para uma melhor compreensão no desenvolvimento das formas clínicas das leishmanioses. A infecção de formas promastigotas de *L. major* em camundongos é o melhor

modelo para avaliação de doenças infecciosas crônicas e a ativação de células T CD4+ (HANDMAN et al., 1979; SCOTT; FARRELL, 1998).

Goto e Lindoso (2004) atribuem a resistência dos hospedeiros à leishmaniose visceral através da ativação de células Th1 e a produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Porém, a relação da resposta Th2 em animais sintomáticos ainda é controversa. Evidências apontam uma correlação entre citocinas IL-4 e IL-10 e a doença progressiva. As células citotóxicas TCD8+ também podem estar relacionadas à resistência na LV.

3.5 Diagnósticos

O diagnóstico das leishmanioses é baseado no exame clínico dos sintomas e histórico fornecidos pelo paciente. Um dos principais problemas quanto a esse diagnóstico inicial é a semelhança do quadro clínico da leishmaniose visceral com algumas doenças linfoproliferativas e com a esquistossomose mansônica associada à bacteriose septicêmica prolongada (RATH et al, 2003).

Caso o paciente resida ou esteve presente em área endêmica, é importante o diagnóstico clínico e epidemiológico. Exames laboratoriais incluem a pesquisa de parasitas e avaliação imunológica e são essenciais para o diagnóstico diferencial e o reconhecimento da espécie circulante (BRASIL, 2006; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O diagnóstico da LV pode ser realizado por meio de método imunológico ou parasitológico. O aspirado de medula óssea e do baço geralmente mostram presença de formas amastigotas do parasito. Na forma oligossintomática, a punção aspirativa de medula óssea pode ou não mostrar a presença da *Leishmania*, não sendo, a princípio, indicada a sua realização; a Intradermoreação de Montenegro pode estar positiva e a sorologia é, invariavelmente, reagentes (BRASIL, 2006).

O procedimento de primeira escolha para diagnóstico da LV é o exame parasitológico direto por conta da fácil execução e menor custo. Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. Outra alternativa é a pesquisa por isolamento *in vitro* (meios de cultivo) feito por meio de fragmentos cutâneos obtidos por biópsia da borda da úlcera. Além da pesquisa parasitológica, pode-se realizar o teste de Montenegro (intradérmico), através da visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada ou ainda, testes sorológicos que detectam anticorpos *anti-Leishmania*, além de exames moleculares por reação em cadeia de polimerase – PCR (BRASIL, 2010).

3.6 Controle e Tratamento

Apesar de apresentar grande prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. O arsenal terapêutico contra a leishmaniose ainda é muito restrito. O sucesso da prevenção das leishmanioses passa pelo controle tanto em nível dos vetores como dos reservatórios. O controle das leishmanioses se baseia no tratamento dos indivíduos infectados, na eliminação do reservatório canino e na desinsetização do domicílio e peri domicílio. O tratamento efetivo depende da infecção, da susceptibilidade do hospedeiro, da virulência da espécie infectante e da precocidade do diagnóstico (BRASIL, 2006; SUNDAR; RAI, 2002).

As estratégias de controle vão depender da situação epidemiológica de cada local. A identificação do agente etiológico circulante nas áreas endêmicas, o conhecimento dessas áreas, bem como do papel dos hospedeiros-reservatórios, são fatores importantes para definição de medidas profiláticas adequadas para a redução da incidência da doença.

A escolha dos fármacos vai depender da forma clínica, além da faixa etária, presença de gravidez, comorbidades associadas e toxicidade do medicamento. Todos os fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses são tóxicos e podem apresentar efeitos adversos. Em alguns casos, a cura só é possível após vários esquemas terapêuticos (PELLISSARI; CECHINEL; SOUZA-GOMES, 2011).

O tratamento das leishmanioses continua o mesmo desde o início do século XX. Os fármacos de primeira escolha são antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (esse último não comercializado no Brasil). Apesar da toxicidade e efeitos adversos e da via de administração, é considerado eficaz. Quando o tratamento com o antimonial pentavalente não tem resposta, os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e o isotionato de pentamidina (BRASIL, 2010; SCHUBACH et al., 2014).

3.6.1 Antimoniato de N-metil glucamina

Desde a década de 40, os antimoniais pentavalentes (Sb+5) permanecem como drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, estando disponibilizadas comercialmente duas formulações: o antimoniato-N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina) e o estibogluconato de sódio. No Brasil, o Ministério da Saúde distribui

gratuitamente o antimoníato N-metilglucamina (Glucantime®) na rede pública de saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela OMS (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

A estrutura química e o mecanismo de ação dos antimoniais não são totalmente compreendidos. Acredita-se que o antimônio pentavalente seja uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente no meio intracelular. Esta fração trivalente, apesar de ser mais tóxica para o organismo, se mostrou mais potente contra as formas promastigotas e amastigotas no interior dos macrófagos. Os antimoniais pentavalentes interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, através da inibição da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares. Além da inibição, há redução na produção de Trifosfato de Adenosina (ATP) e Guanosina Trifosfato (GTP). Em estudos *in vitro*, os antimoniais apresentam pequeno efeito sobre as leishmanias, o que contrasta com os seus resultados clínicos (ALMEIDA; SANTOS, 2011; RATH et al, 2003).

Além disto, a atividade anti-*Leishmania* do antimônio também parece ter uma ação indireta, induzindo uma melhora da imunidade celular, que pode ser explicada por um estímulo ao macrófago do hospedeiro (LIMA et al, 2007).

Dentre os antimoniais, o *N*-metil glucamina possui atividade leishmanicida, porém com mecanismo de ação ainda não estabelecido. Acredita-se na inibição seletiva de várias enzimas de *Leishmania spp*, além de uma possível inibição da fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de ATP. Pelos efeitos tóxicos, é contraindicado em pacientes com insuficiência cardíaca, renal e hepática, gestação, tuberculose pulmonar e malária (ANVISA, 2017; SES, 2007).

Uma baixa resposta em pacientes imunocomprometidos com LV tem sido associada ao antimoníato de meglumina. Neste grupo, incluem-se pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou infecção com o vírus HIV. Foi observada resposta clínica com anfotericina B em pacientes HIV-positivos com LV que não responderam ao antimoníato de meglumina (ANVISA, 2017).

Santos et al. (2002) demonstraram que crianças com menos de um ano de idade e pacientes com comorbidades ou infecções bacterianas apresentavam maior risco de resposta insatisfatória ao tratamento com antimoníato de N-metil glucamina e, por isso, necessitavam de tratamento alternativo para leishmaniose.

Estudos têm demonstrado a presença de cepas resistentes ao Glucantime®, além de casos refratários ao tratamento. Além disto, evidências apontam relação entre o sucesso da terapia e o estado imunológico do paciente. Quando já há ativação do macrófago e defesa do

hospedeiro, o Glucantime[®] não age, ou seja, pacientes imunodeprimidos podem não responder ao tratamento (ANVISA, 2017; FIOCRUZ, 2016).

N-metil glucamina é indicado no tratamento de todas as formas de leishmaniose, por vias parenteral, intramuscular ou endovenosa. Visando padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg/SbV /Kg/dia, SbV significando antimônio pentavalente (ANVISA, 2017; SES, 2007).

Durante o tratamento, o paciente pode apresentar: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, insuficiência renal aguda (IRA). Pode ainda ocorrer erupção por herpes zoster. Essas queixas são, geralmente, discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. No entanto, podem ocorrer alterações cardíacas e/ou renais que obriguem a interrupção do tratamento (BRASIL, 2010).

Alguns pacientes podem apresentar exacerbação do quadro clínico no início do tratamento, com aumento do infiltrado e eritema das lesões, aumento da secreção faríngea e nasal. Acredita-se que estas reações sejam decorrentes a uma resposta aos antígenos liberados após a morte dos parasitas (reação do tipo Jarich-Herxheimer). Desta forma, é importante o acompanhamento eletrocardiográfico e avaliação da função renal, semanalmente, especialmente em pacientes acima de 50 anos. Os exames do perfil hepático (transaminases, fosfatase alcalina) e amilase também devem ser solicitados semanalmente (BRASIL, 2010; SES, 2007).

3.6.2 Anfotericina B

Nos casos de resistência ou contra-indicação ao uso de Glucantime[®] pode ser necessário o uso de medicamentos de segunda linha, como por exemplo anfotericina B. Estes medicamentos devem ser indicados pelos clínicos dos serviços de referência (BRASIL, 2007; BRASIL, 2010, SES, 2007).

Anfotericina B é um antibiótico antifúngico poliênico derivado do *Streptomyces nodosus*. Sua ação fungistática ou fungicida depende da concentração obtida nos fluidos corporais e da sensibilidade dos fungos. Este fármaco age se ligando aos esteróis da membrana celular do microorganismo sensível, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares. As membranas dos animais superiores também contêm esteróis e isto sugere que o dano às células humanas e às de

parasitas podem ter mecanismos comuns. Trata-se do agente leishmanicida mais potente disponível comercialmente, com ação nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANVISA, 2017, BRASIL, 2011).

A administração do fármaco deve ser feita por via endovenosa, sob orientação e acompanhamento da equipe de saúde, com o paciente hospitalizado, em serviço de referência por conta da toxicidade. Durante o tratamento o paciente pode apresentar: calafrios, febre, anorexia, náuseas, vômitos, cefaleias, mialgia, artralgia e hipotensão. As funções renais e hepáticas devem ser monitoradas, pois graus variados de comprometimento renal ocorrem em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento (ANVISA, 2017; BRASIL, 2007).

A apresentação lipossomal da anfotericina B, com menos efeitos colaterais, está disponível para o tratamento de casos selecionados de leishmaniose visceral grave. Para o uso da anfotericina B lipossomal no Brasil, faz-se necessário o preenchimento de formulário específico, pois este fármaco tem a distribuição centralizada no MS. Este medicamento é recomendado apenas nos casos graves, como alternativa terapêutica (PELLISSARI; CECHINEL; SOUZA-GOMES, 2011).

A forma lipossomal atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Porém, apresenta meia vida mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações. No Brasil, é utilizada no tratamento da leishmaniose visceral. Entretanto, não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar, sendo então considerada uma droga *off label* para essa indicação (BRASIL, 2007; SES, 2007).

Estudos demonstram diferentes respostas dos fármacos a depender da área geográfica. Há relatos de resistência aos medicamentos, inclusive, em pacientes imunossuprimidos. O uso racional dos medicamentos é essencial para minimizar essas consequências. Há evidências crescentes sobre eficácia de tratamento local da LT no Velho Mundo, porém, não há estudos demonstrando esses resultados no Novo Mundo (GOTO; LINDOSO, 2012).

3.6.3 Pentamidina

A Pentamidina é considerada fármaco de segunda escolha no tratamento das leishmanioses. Seu mecanismo de ação se dá na interferência no transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucléicos e pode também preferencialmente se ligar ao DNA do cinetoplasto. São comercializadas para uso em humanos nas seguintes formulações: isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato). No

Brasil, é comercializado apenas o isotionato de pentamidina, que se apresenta em frasco-ampola contendo 300 mg/sal. (PAULA et al. 2003; SES, 2007).

A eficácia da pentamidina é inferior a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e seus efeitos colaterais maiores. Durante o tratamento o paciente pode apresentar: anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal em 25% dos pacientes, geralmente reversível e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes mellitus, em 10 a 15% dos casos. Devido ao medicamento ter ação no metabolismo da glicose, pode haver hipoglicemia seguida de hiperglicemia. (BRASIL, 2007; SES, 2007).

É importante o acompanhamento da equipe de saúde durante o tratamento e a reavaliação de exame bioquímico para a avaliação das funções renais e hepática, periodicamente, bem como dosagem da glicemia e acompanhamento eletrocardiográfico antes, durante e no final do tratamento. Deve-se avaliar mensalmente a glicemia, durante um período de 6 meses, quando a dose total ultrapassar 1g (BRASIL, 2007; SES, 2007).

Seu uso não é indicado em gestantes, pacientes diabéticos, pacientes com insuficiência hepática e/ou renal, cardiopatas e em crianças com peso inferior a 8Kg (SES, 2007).

3.6.4. Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um alquil-fosfolípídio originalmente desenvolvido como agente antineoplásico. Apresenta ação direta sobre as formas promastigotas da *leishmania*. Porém, sua ação sobre as formas amastigotas está relacionada ao seu efeito sobre os macrófagos ou sobre a resposta imune dependente da ativação das células T (ALMEIDA; SANTOS, 2012).

Com possibilidade de administração por via oral, vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano. Foi originalmente desenvolvido para tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários. Sua utilização para o tratamento das leishmanioses foi iniciada na Índia, após a realização de alguns estudos (BRASIL, 2016).

A OMS indicou a inclusão da miltefosina na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais no ano de 2010. Em 2013, a Organização PanAmericana de Saúde (OPAS), no documento “*Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento*” a recomendou como umas das opções de primeira escolha para o tratamento da LT. O fármaco foi registrado em 2014 como tratamento da LT nos Estados Unidos (EUA) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo incorporada a lista de medicamentos do Fundo Estratégico da OPAS em 2015 (BRASIL, 2016).

Durante o tratamento o paciente pode apresentar: náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. O evento adverso que deve ser considerado de maior atenção é o potencial efeito teratogênico da miltefosina, devendo por isso, ser usada com muita cautela em mulheres em idade fértil, necessitando sempre de uso concomitante de método contraceptivo (COSTA FILHO et al. 2008).

Após a finalização do tratamento, os pacientes devem ser submetidos ao acompanhamento clínico e laboratorial para avaliação da resposta e, também, para a detecção de possível recidiva após terapia inicial bem-sucedida. O critério de cura é clínico, sendo recomendado o acompanhamento regular por 12 meses (BRASIL, 2007; BRASIL, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Artigo I Derivado da Tese

Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of Oxime Derivatives as Potential Anti-Leishmania Agents.

keywords: Leishmaniasis, oxime derivatives, synthesis, molecular docking, CRK3, biological evaluation.

Authors: Marcia P. Veloso^{1,2*}, Magna S. Alexandre-Moreira³, Thiago B. de Souza⁴, Camila M. Coelho^{1,2}, Ana Carolina S. Vieira³, Thaynan A. B. Chagas², Brenda T. V. Brandão¹, Mariana B. da Silva¹, Mariana S. Santos³, Anderson B. Leite³, Aline C. de Queiroz³.

¹Laboratory of Research on Pharmaceutical Chemistry, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

²Laboratory of Computational Modeling, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

³Laboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, 57020-720, Maceió, AL, Brazil

⁴Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

*Corresponding author: Marcia Paranho Veloso, mail: mparanho@gmail.com, fone/fax number: +55-35-3299-1403

Abstract:

In the search for new compounds available for the treatment of leishmaniasis was synthesized a series of oxime derivatives and was evaluated pharmacologically. It was observed that all oxime compounds evaluated have leishmanicidal activity, although the compound **9** and **10** showed cytotoxicity as the standard drug pentamidine. Compounds **4**, **8** and **12** had better values of IC₅₀, superior to the value of IC₅₀ of pentamidine. Computational studies by molecular docking using the protein kinase from Leishmania (CRK3) were performed and was found that all oxime compounds exhibited values of affinity favorable and similar to the

standard drug, and may indicate that these compounds have a novel structural pattern to the development of new anti-leishmanial drugs.

Introduction

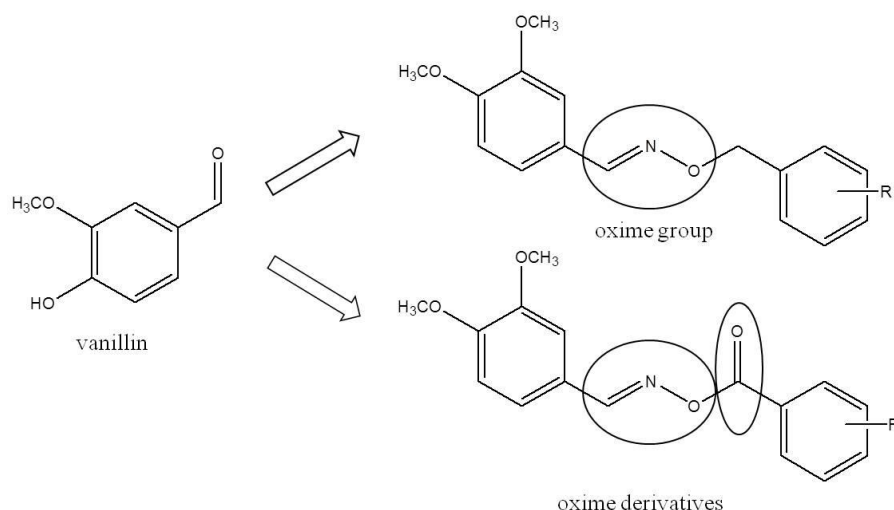
Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and it is a threat to more than 350 million people in 98 countries worldwide (1). Leishmaniasis can be divided into three major forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral. Cutaneous leishmaniasis is the most common form but sometimes progress to the mucocutaneous form that is usually refractory to therapy and may be fatal. Visceral form of leishmaniasis (Kala-azar or black fever) is the most serious form and is fatal if not ready treated. Visceral leishmaniasis is responsible for most related deaths (2-4). Mainly leishmaniasis treatments are based on the administration of amphotericin B, pentavalent antimonials, paromomycin or miltefosine, however, these drugs are highly toxic, expensive, require long periods of hospitalization (5,6).

The cyclin dependent kinase or cdc2-related protein kinase 3 of *Leishmania* (CRK3) is homologue of CDK1 and considers a molecular drug target for the treatment of leishmaniasis. CRKs belong to the group of serine/threonine protein kinases that play crucial roles in regulating the cell cycle and proliferation. CRK3 was characterized by genetic analyses as an essential protein for parasite viability and a central regulator of cell-cycle progression. Inhibition of CRK3 in *Leishmania* parasites resulted in a G2/M cell-cycle arrest, which was subsequently followed by an apoptosis-like death of the parasites (7-9).

Related oxime analogues are compounds that presents several biological and pharmacological activities including antimicrobial, anti-inflammatory, antileishmanial and analgesic activities (10-13). The increasing resistance of *Leishmania* parasites (14,15) and the toxicity of the current therapy as well as the non-existence of a human vaccine (16), generate an urgent need to discover effective, new targeted drugs for treating leishmaniasis.

In this work, we present the synthesis, molecular modeling studies and pharmacological evaluation of a new series of oxime compounds **3-12** (Figure 1) obtained from simple molecules of natural origin as the vanillin, as part of a project aimed at the discovery of new antileishmanial drug candidates.

Figure 1. Oxime compounds obtained from vanillin.



Methods and Materials

Physical measurements

Melting point of the compounds was determined on Microquímica MOAs 301 apparatus and was uncorrected. IR spectroscopy was performed on a Shimadzu a FTIR-Affinity-1 spectrometer. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra were obtained on a Bruker AC-300 spectrometer (300 MHz for $^1\text{H-NMR}$ and 75 MHz for ^{13}C spectra) in deuterated chloroform. Chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm) with reference to tetramethylsilane (TMS) as internal standard and coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz). The following abbreviations were used for the ^1H multiplicities: singlet (s), doublet (d), double doublet (dd) and multiplet (m). High resolution mass spectra (HRMS) were acquired using a LCMS-IT-TOF mass spectrometer and the samples were solubilized in MeOH + 0.1% formic acid, following manual injection. Reaction courses and product mixtures were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on commercial silica gel 60 plates. For chromatography, column grade silica gel (0.040–0.063 mm mesh size) was employed.

Synthesis

Synthesis of (*E*)-3,4-dimethoxybenzaldehyde oxime (**2**)

To a solution of 2 g (13 mmol) of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde in acetone was added 1.8 g (13 mmol) of potassium carbonate and after 20 minutes added to this suspension 1.62 mL of iodomethane (26 mmol) and the reaction was stirred for 6 hours at room temperature when was noticed its completion by TLC. After this time, the acetone was removed and was

added water (30 mL) to the mixture, which was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL) and the organic layer was dried by sodium sulfate anhydrous and concentrated affording 2 g of 3,4-dimethoxybenzaldehyde. Then, to a mixture of methanol/water (8:2, 30 mL) were added 2 g (1.2×10^{-2} mol) of 3,4-dimethoxybenzaldehyde, 16.3 g (1.2×10^{-1} mol) of sodium acetate and 8.3 g (1.2×10^{-1} mol) of hydroxylamine hydrochloride. The reaction was stirred at 80°C for 24 hours and after this time it was added water (40 mL) to the mixture, which was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The organic layer was washed with saturated sodium chloride solution (2 x 60 mL), dried by anhydrous sodium sulfate and concentrated to afford 1.8 g (82% yield) of **2**.

General procedure for synthesis of acyl oximes **3-7**

It was solubilized 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC, 1.5 equiv.) and the carboxylic acid corresponding (1.5 equiv.) in dichloromethane (15 mL) and this mixture was stirred at room temperature during 15 minutes. After this time the solution was cooled to 0°C and was added the derivative **2** (1.0 equiv.) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 0.1 equiv.), and the reaction was stirred at room temperature overnight. The mixture was washed with HCl 1M (3 x 30 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL) and water (2 x 50 mL) and the organic layer was concentrated affording the acyl oximes **3-7** which were purified by column chromatography.

(*E*)-3,4-dimethoxyphenyl-(*O*-benzoyl)oxime (**3**)

This product was obtained in 51% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 116-117°C; IR ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3066, 3029, 2972, 2936, 2842, 1734, 1595, 1570, 1510. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.47 (1H, s, oxime), 8.11 (2H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.4$ Hz, $J^4 = 1.3$ Hz), 7.63-7.57 (1H, m, Ar-H), 7.50-7.45 (3H, m, Ar-H), 7.18 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 7.39 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 3.95 (3H, s, OCH₃), 3.92 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 164.1 (1C, C=O), 156.6 (1C, C=N), 152.3 (1C, ar.), 149.4 (1C, ar.), 133.3 (1C, ar.), 129.6 (2C, ar.), 128.7 (1C, ar.), 128.5 (2C, ar.), 124.1 (1C, ar.), 122.7 (1C, ar.), 110.5 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, OCH₃), 55.9 (1C, OCH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₆H₁₅O₄N (M+H)⁺: 286.1074; found: 286.1093.

(*E*)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-chloro)benzoyl]oxime (**4**)

This product was obtained in 50% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 130-132°C; IR ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3090, 3006, 2922, 2848,

1736, 1589, 1573, 1509. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.46 (1H, s, oxime), 8.06 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.8$ Hz), 7.48-7.45 (3H, m, Ar-H), 7.18 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.6$ Hz), 6.90 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 3.96 (3H, s, OCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 163.3 (1C, C=O), 156.9 (1C, C=N), 152.4 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 139.8 (1C, ar.), 131.0 (2C, ar.), 128.9 (2C, ar.), 127.1 (1C, ar.), 124.2 (1C, ar.), 122.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, OCH_3), 55.9 (1C, OCH_3). HRMS-ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NCl}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 320.0684; found: 320.0684.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-nitro)benzoyl]oxime (5)

This product was obtained in 58% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 151-152°C; IR ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3078, 2940, 2847, 1730, 1593, 1569, 1512. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.49 (1H, s, oxime), 8.35-8.27 (4H, m, Ar-H), 7.47 (1H, d, Ar-H, $J^4 = 1.9$ Hz), 7.19 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.6$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.91 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 3.95 (3H, s, OCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162.2 (1C, C=O), 157.5 (1C, C=N), 152.6 (1C, ar.), 150.6 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 134.2 (1C, ar.), 130.7 (2C, ar.), 124.4 (1C, ar.), 123.6 (2C, ar.), 122.2 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, OCH_3), 55.9 (1C, OCH_3). HRMS-ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{N}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 331.0925; found: 331.0919.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-trifluoromethyl)benzoyl]oxime (6)

This product was obtained in 55% yield as white crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 121-122°C; IR ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3051, 2943, 2916, 1754, 1735, 1599, 1574, 1513. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.49 (1H, s, oxime), 8.23 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.8$ Hz), 7.75 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.8$ Hz), 7.48 (1H, d, Ar-H, $J^4 = 1.9$ Hz), 7.19 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.90 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 3.96 (3H, s, OCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162.9 (1C, C=O), 157.2 (1C, C=N), 152.5 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 132.0 (1C, ar.), 130.0 (3C, ar.), 125.6 (1C, ar.), 125.5 (2C, ar.), 124.3 (1C, ar.), 122.4 (1C, CF_3), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, OCH_3), 55.9 (1C, OCH_3). HRMS-ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NF}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 354.0948; found: 354.0958.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(3,5-dinitro)benzoyl]oxime (7)

This product was obtained in 48% yield as yellow crystals; m.p. 138-139°C; IR ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3113, 3096, 3013, 2920, 2848, 1760, 1598, 1575, 1534. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.28-9.24 (3H, m, Ar-H); 8.57 (1H, s, oxime), 7.47 (1H, d, Ar-H, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.93 (2H, d, Ar-H,

$J^3 = 8.3$ Hz), 3.97 (3H, s, OCH₃), 3.95 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 160.1 (1C, C=O), 158.2 (1C, C=N), 153.0 (1C, ar.), 149.6 (1C, ar.), 148.7 (2C, ar.), 132.6 (1C, ar.), 129.4 (2C, ar.), 124.7 (1C, ar.), 122.7 (1C, ar.), 121.7 (1C, ar.), 110.7 (1C, ar.), 108.8 (1C, ar.), 56.2 (1C, OCH₃), 56.0 (1C, OCH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₆H₁₃O₈N₃ (M+Na)⁺: 398.0595; found: 398.0590.

General procedure for synthesis of oxime ethers 8-12

To a solution of dimethyl sulfoxide/water (8:2) was added sodium hydroxide (13 equiv.) and the oxime **2** (1 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After this time was added the benzyl chloride corresponding (6 equiv.) and the reaction was maintained under stirring at room temperature during 30 minutes when noticed the completion of the reaction by TLC. Then it was added water (30 mL) to the mixture which was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL) and the organic layer was washed with water (2 x 20 mL), dried by anhydrous sodium sulfate and concentrated to afford the oxime ethers **8-12** which were purified by column chromatography.

(*E*)-3,4-dimethoxyphenyl-(*O*-benzyl)oxime (**8**)

This product was obtained in 82% yield as brown crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 69-70°C; IR ($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3081, 3030, 3002, 2956, 2943, 2885, 2833, 1599, 1577, 1507. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (1H, s, oxime), 7.44-7.28 (5H, m, Ar-H), 7.24 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 1.9$ Hz), 7.01 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.2$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.2$ Hz), 5.20 (2H, s, methylene), 3.91 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 150.6 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 148.8 (1C, ar.), 137.5 (1C, ar.), 128.3 (2C, ar.), 128.2 (2C, ar.), 127.8 (1C, ar.), 125.0 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 76.2 (methylene), 55.8 (2C, OCH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₆H₁₇O₃N (M+H)⁺: 294.1101; found: 294.1102.

(*E*)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-chloro)benzyl]oxime (**9**)

This product was obtained in 41% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 72-73°C; IR ($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3068, 3000, 2990, 2968, 2931, 2855, 2833, 1605, 1575, 1511. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (1H, s, oxime), 7.33 (4H, s, Ar-H), 7.21 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 1.9$ Hz), 7.00 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 5.14 (2H, s, methylene), 3.91 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 150.7 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 149.1 (1C, ar.),

136.1 (1C, ar.), 133.6 (1C, ar.), 129.5 (2C, ar.), 128.5 (2C, ar.), 124.8 (1C, ar.), 121.7 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 75.2 (methylene), 55.8 (2C, OCH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₆H₁₆O₃NCl (M+H)⁺: 306.0891; found: 306.0891.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-methyl)benzyl]oxime (10)

This product was obtained in 64% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 53-54°C; IR ($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3057, 3008, 2962, 2928, 2861, 2835, 1595, 1571, 1512. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (1H, s, oxime), 7.32 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.0$ Hz), 7.24 (1H, d, Ar-H, $J^4 = 1.9$ Hz), 7.17 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.0$ Hz), 7.00 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.4$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.4$ Hz), 5.16 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 2.35 (3H, s, methyl). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 150.6 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 136.7 (1C, ar.), 134.4 (1C, ar.), 129.0 (2C, ar.), 128.4 (2C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 76.1 (methylene), 55.8 (2C, OCH₃), 21.1 (1C, Ar-CH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₇H₁₉O₃N (M+H)⁺: 286.1438; found: 286.1439.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-methoxy)benzyl]oxime (11)

This product was obtained in 82% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 79-80°C; IR ($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3042, 3011, 2960, 2916, 2876, 2845, 1612, 1601, 1510. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.05 (1H, s, oxime), 7.36 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.7$ Hz), 7.24 (1H, d, Ar-H, $J^4 = 1.9$ Hz), 7.00 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.90 (2H, d, Ar-H, $J^3 = 8.7$ Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 5.13 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 159.4 (1C, ar.), 150.6 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 130.0 (2C, ar.), 129.5 (1C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 113.8 (2C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 75.9 (methylene), 55.8 (2C, OCH₃), 55.2 (1C, OCH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₁₇H₁₉O₄N (M+H)⁺: 324.1206; found: 324.1197.

(E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-tert-butyl)benzyl]oxime (12)

This product was obtained in 51% yield as yellow crystals after purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 69-71°C; IR ($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3078, 3029, 2998, 2947, 2901, 2877, 2840, 1599, 1573, 1508. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.07 (1H, s, oxime), 7.42-7.37 (4H, m, Ar-H), 7.25 (1H, s, Ar-H), 7.01 (1H, dd, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, $J^3 = 8.3$ Hz), 5.17 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s,

OCH₃), 1.32 (9H, s, C(CH₃)₃). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 150.9 (1C, C=N), 150.6 (1C, ar.), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 134.4 (1C, ar.), 128.2 (2C, ar.), 125.3 (2C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 76.1 (methylene), 55.8 (2C, OCH₃), 34.5 (1C, C(CH₃)₃), 31.3 (3C, C(CH₃)₃). HRMS-ESI: m/z calcd. for C₂₀H₂₅O₃N (M+Na)⁺: 350.1727; found: 350.1734.

Biological assays

Parasites

The strains of *Leishmania chagasi* [MCAN/BR/89/BA262] was maintained *in vitro* as proliferating promastigotes at 26°C in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, gentamycin (1 mg/L), *L*-glutamine (2 mM), and 2% sterile human urine.

Cytotoxicity assay J774A.1

Macrophages were seeded (3x10⁵ cells/well) in 96-well plates with 100 μL of media for the cytotoxicity assay and in 48-well plates for the intracellular amastigote assay. Cells were allowed to attach to the bottom of the well for 24 h at 37°C and then treated with 1, 10, and 100 μM of compounds 3-12 or pentamidine previously diluted in RPMI-1640 medium with dimethyl sulfoxide (DMSO). The plates were maintained in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 48 h. Cells were also cultured in media free from compounds, a vehicle (basal growth control), or media with 0.1% DMSO (vehicle control). Thereafter, the supernatant was removed and cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (100 μL/well) for 1 h in the dark at 37°C. The MTT solution was removed, cells were resuspended in 100 μL of DMSO, and the absorbance was measured using an ELISA reader at 550 nm (19).

Intracellular Amastigote Assay.

J774A.1 macrophages were seeded on glass coverslips (13 mm diameter) in 48-well plates and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 12 hours for adhesion. Macrophages were infected with *L. chagasi* promastigotes using a ratio of 1:10 at 37°C overnight in isolated experiments. Non-internalized promastigotes were removed by washing (three times) with PBS. Infected macrophages were treated with different concentrations of compounds (0.1, 1 and 100 μM) and maintained at 37°C in 5% CO₂ for 48 h. The glass coverslips were fixed with methanol,

stained with May-Grünwald-Giemsa, and intracellular amastigotes were counted (one hundred macrophages were evaluated per glass coverslip). Data was expressed as infection index (percentage of infected macrophages multiplied by the average number of amastigotes per macrophage) (20).

Statistical analysis.

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and significant differences between the treated and control groups were evaluated using ANOVA and Dunnett post-hoc tests by Graph Pad Prism 5.0 software, and the 95% confidence intervals were included.

Molecular Modeling.

All computer applications were run on Unis CentOS 5.0. Structures of compounds **3-12** and Pentamidine (standard drug) were constructed using Maestro 9.2 (Version 9.2; Schrödinger, LLC, New York, NY, USA). The software LigPrep 2.5 (Version 2.5; Schrödinger, LLC) was used for the construction and preparation of the ligands involved in this studies. The tridimensional structure of CRK3 used was obtained from previous studies by homology molecular modeling in our research group (21). Studies of molecular docking between CRK3 and the ligands were performed using the program Induced Fit Docking (Version 9.9; Schrödinger, LLC). All computer programs belong to the Schrödinger suite.

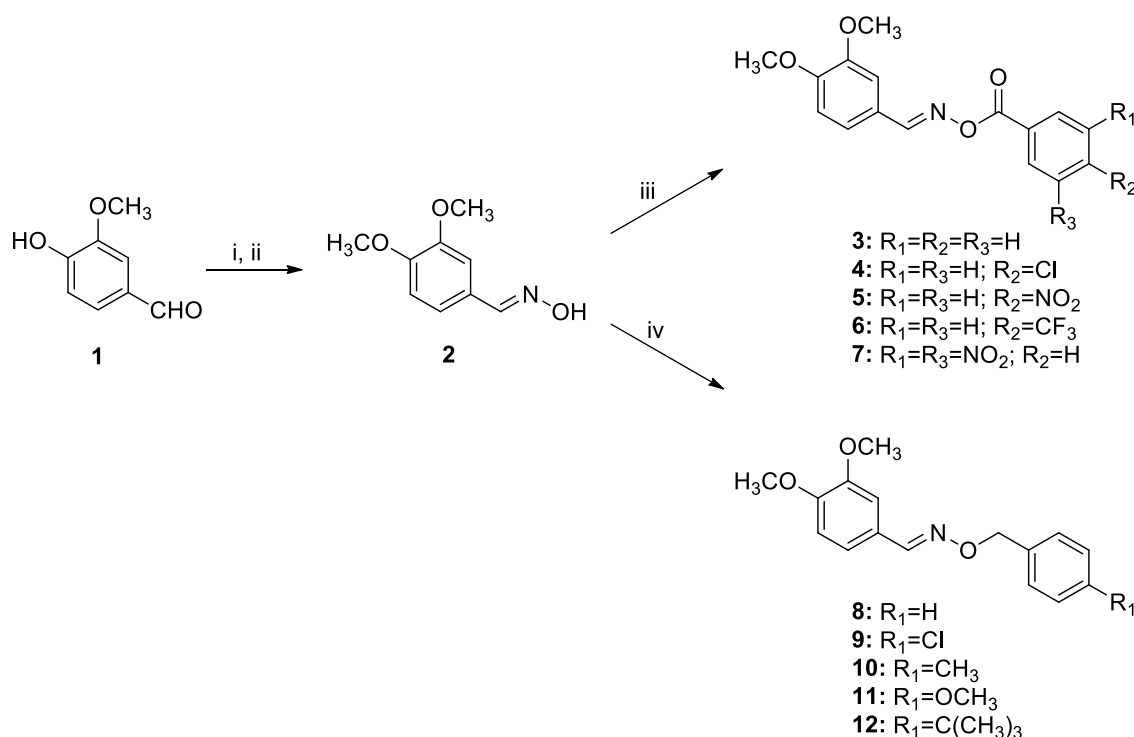
Results and Discussion

Chemistry

The acyl oximes and oxime ethers were synthesized by an objective route as shown in **Scheme 1**. Initially the hydroxyl group of commercial vanillin was methylated using iodomethane and the dimethoxy derivative obtained was subjected to a reaction with hydroxylamine hydrochloride to afford the oxime derivative **2**, a key intermediate for synthesis of proposed compounds. The reaction of **2** with different carboxylic acids in the presence of EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) generated the derivatives **3-7** while its reaction with different benzyl chlorides afforded the derivatives **8-12**. In ^1H NMR spectra of acyl oximes (**3-7**) was observed a singlet near 8.5 ppm relative to the oxime proton. The signal corresponding to the carbonyl groups was noticed between 164.1-160.1 ppm in ^{13}C NMR spectra of these compounds. For oxime ethers (**8-12**) could be

observed a singlet near 5.1 ppm corresponding to the two methylene protons, while the oxime protons were registered at 8.0 ppm in their ^1H NMR spectra.

Scheme 1: Synthesis of acyl oximes and oxime ethers derivatives



i: CH_3I , K_2CO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, r.t.; ii: $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2), 80°C ; iii: carboxylic acid corresponding, EDAC , DMAP , CH_2Cl_2 , r.t.; iv: benzyl chloride corresponding, NaOH , $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2).

Pharmacological Assays

Initially it was investigated the cytotoxicity of the compounds on J774 macrophages. The results revealed that until to $10\ \mu\text{M}$ not observed toxic effect for all the compounds in macrophage. Besides that only the compounds 3, 4, 5, 6 and 11 showed toxic effects similar to the standard drug used pentamidine with maximum cytotoxicity of $100 \pm 0.0\%$ (Table 1). The vehicle used to solubilize all substances (0.1% DMSO) showed no significant toxic effects on the cell when compared to the negative control (only cells grown in culture medium). Thus, the toxicity of substances cannot be attributed to the presence of DMSO in culture (data not shown). The cytotoxicity tests demonstrated that the derivatives 3, 4, 5, 6 and 11 did not show toxicity against macrophages at the highest concentration tested. The derivatives 7, 8, 9, 10 and 12, showed toxicity at concentration of $100\ \mu\text{M}$, however, none of

the tested derivatives showed cytotoxicity when tested at concentration of 10 μ M (Table 1). A study found toxicity in host cells when oxime ethers were evaluated against *Trypanosoma cruzi* strains, despite the high selectivity of the compounds demonstrated against the strains (22).

Table 1: Determination of the cytotoxicity of acyloximes derivatives (against macrophages (MTT assay))

Treatment	J774.A1 macrophage IC ₅₀ (μM) ^a	Maximum Cytotoxicity (%) ^b
3	>100	NA
4	>100	NA
5	>100	NA
6	>100	NA
7	>100	37.1 ± 6.3**
8	>100	42.8 ± 10.6***
9	45.3 (0.8 – 1.4)	57.1 ± 15.8***
10	0.42 (0.1 – 1.2)	50.3 ± 3.5***
11	IC>100	NA
12	IC>100	42.5 ± 12.6**
Pentamidine	54.5 ± 4.5	100.0 ± 0.0***

^aInhibitory Concentration 50% (IC₅₀) calculated by concentration-response curves toxic.

^bMean ± standard error of the mean maximum cytotoxicity in triplicates of a representative experiment. The values of maximum effect were considered significant when * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 compared to the 0.1% DMSO group; NA: Not determined Maximum Cytotoxicity to cell until the concentration of 100 μM compared to DMSO group.

Intracellular Amastigote:

The results of the evaluation of leishmanicidal activity against intracellular forms of *L. chagasi* revealed that all the derivatives presented effect in intracellular amastigote at 30 μ M (Figure 2) and 100 μ M (Table 2). The derivatives **9** (IC₅₀ 27.7 \pm 1.4 μ M), **12** (IC₅₀ 17.3 \pm 2.0 μ M) and **8** (IC₅₀ 13.3 \pm 6.7 μ M) and efficacy 100% of amastigotes death (Table 2).

Figure 2: Leishmanicidal effect of oximes derivatives against the growth of amastigotes of *L. chagasi*, according to number of amastigotes and inhibition percentage.

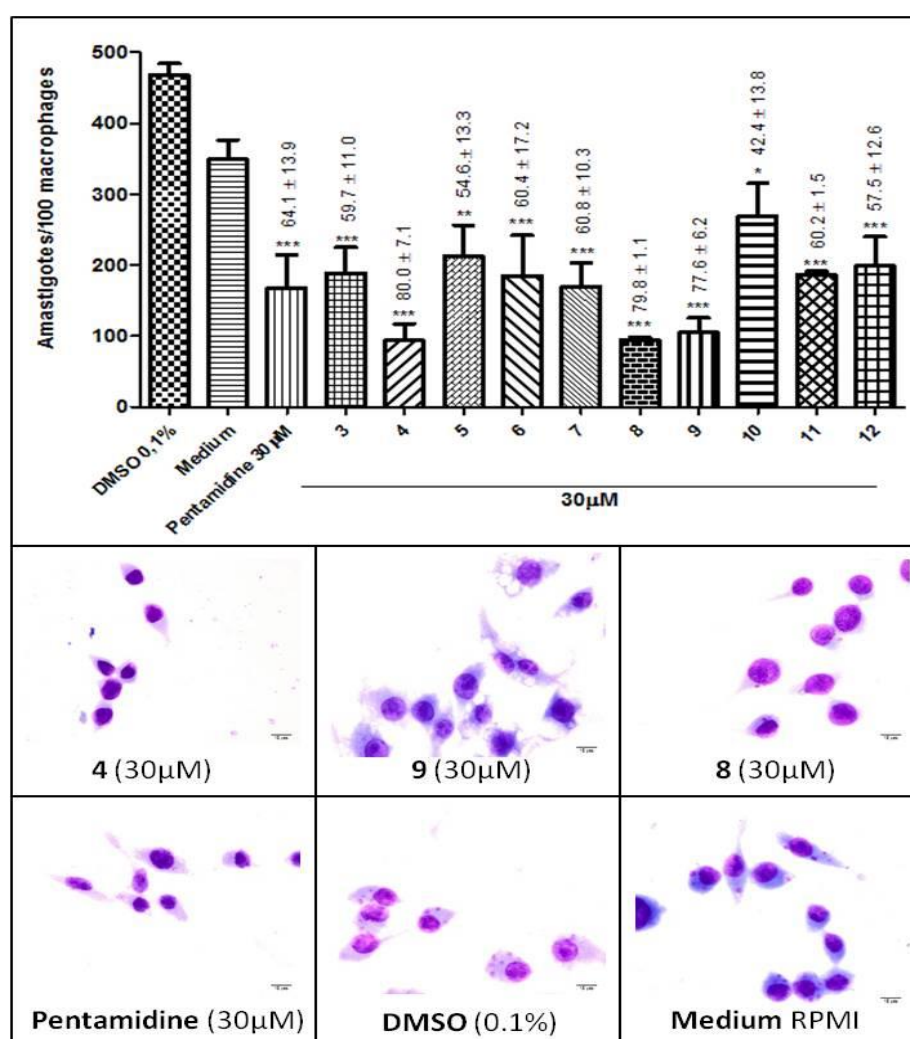


Figure 2: Leishmanicidal effect of oxime derivatives against the growth of amastigotes of *L. chagasi*, according to number of amastigotes and inhibition percentage. Bars represent the mean of amastigotes of *Leishmania chagasi* \pm standard error of the mean and the labels refer to the mean percentages of inhibition \pm SE. photomicrographs of cultures of infected macrophages and treated with substances that showed the best percentages of inhibition of series of compounds tested, as well as the controls used in the experiment (RPMI, DMSO and pentamidine) are shown.

Table 2: Leishmanicidal effect of oximes derivatives against the growth of amastigotes of *L. chagasi*.

Treatment	Amastigote IC ₅₀ (μ M) ^a	Maximal Eficácia (%) ^a
3	>100	57.3 \pm 10.1***
4	22.5 \pm 12.6	87.7 \pm 0.9***
5	>100	40.0 \pm 1.0***
6	>100	46.8 \pm 5.7***
7	62.0 \pm 5.0	54.7 \pm 0.4***
8	13.3 \pm 6.9	100.0 \pm 0.0***
9	27.7 \pm 1.45	100,0 \pm 0.0***
10	30.3 \pm 5.2	94.1 \pm 0.6***
11	37.3 \pm 0.9	100.0 \pm 0.0***
12	17.3 \pm 2.0	95.3 \pm 1.2***
Pentamidine	30.7 \pm 1.4	100.0 \pm 0.0***

^aData are reported as the mean \pm standard error of the mean, S.E.M. The efficacy values were considered significant when * p <0.05, ** p <0.01, and *** p < 0.001 compared to the 0.1% DMSO group. IC₅₀ is the concentration required to give 50% inhibition.

At first, the oximes derivatives were tested against amastigotes forms of *Leishmania chagasi* at concentration of 30 μ M. At this concentration, the derivatives **4** (80,0 \pm 7,1), **8** (79,8 \pm 1,1) and **9** (77,6 \pm 6,2) were the most actives and efficient in relation to the others (Figure 2). Later the evaluation against amastigotes forms at concentrations of 100 μ M, 10 μ M, 01 μ M and 0,1 μ M (Table 2) was performed to order to determinate the IC₅₀. As observed, all the tested derivatives presented anti-amastigote activity against *L. chagasi*, when compared to the control (DMSO 0.1%). The derivatives **8**, **9** and **11** presented highest activity (100,0 \pm 0,0), since it was not possible to see any amastigote in the slides treated with such derivatives, becoming similar to the standard drug (pentamidine). Derivatives **4**, **10** and **12** presented good results of IC₅₀ (22.5 \pm 12.6, 30.3 \pm 5.2 and 17.3 \pm 2.0 μ M, respectively) when compared to the pentamidine (30.7 \pm 1.4 μ M).

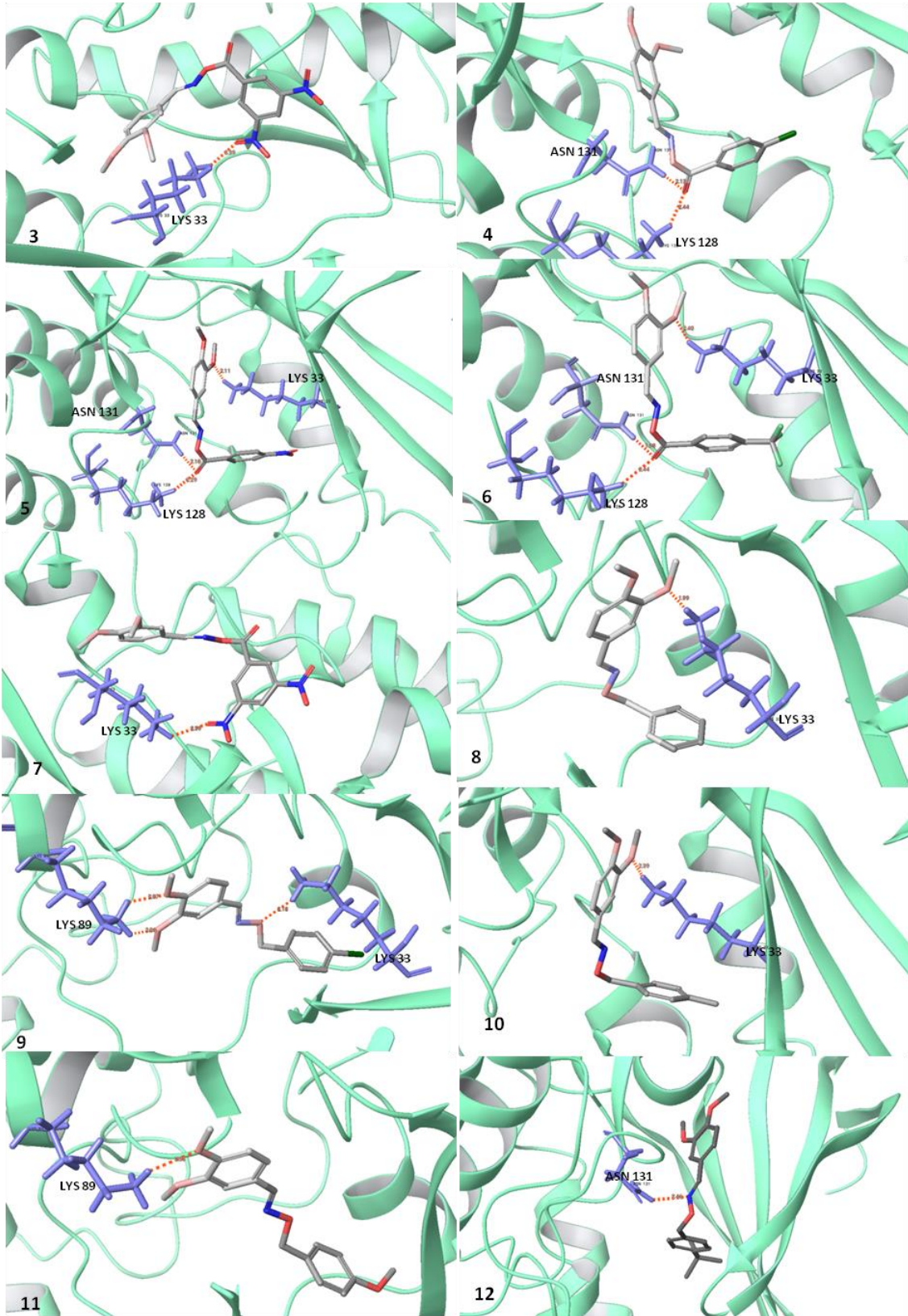
Recent studies assessed derivatives of aphidicolin as well as the oxime analog against promastigotes forms of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* (23). In this study, two compounds showed promising leishmanicidal activity but did not show cytotoxic activity against macrophages, and amastigotes and promastigotes forms of the parasite. In other study, oxime ethers compounds were tested against amastigotes and promastigotes forms of *Leishmania donovani*. Despite showing efficacy better than the standard drug (miltefosine) in the *in vitro* study, the compounds when tested *in vivo* were less active when compared to the control (24). Researchers have demonstrated through *in vivo* antiprotozoal evaluation that oxime ethers (5-nitrothiophene oxime ether derivatives) were active against *Entamoeba histolytica*, *Thichomonas vaginalis*, promastigotes of *Leishmania tropica*, *Leishmania infantu*, *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* (25). In the same study, some derivatives showed leishmanicidal activity equal to pentamidine. All those studies have demonstrated oxime ethers as promising substances against Leishmaniases.

Molecular modeling

Molecular docking of the compounds 3-12 and the standard drug pentamidine with the enzyme CRK3 presented Glide Score values between -9.535 and -7.503 kcal.mol⁻¹ (Table 1), demonstrating that the interaction can lead to the inhibition of the enzyme.

Table 1: Values of Glide Score (*GScore*), the number of interaction by hydrogen bonds (*Hbond*) and by van der Waals (*Good vdW*) between the compounds (**3-12**, standart drug pentamidine) and CRK3 enzyme (Schrödinger Suite, Induced Fit Docking Program).

Figure 3: Representation of better interaction between compounds 3-12 and CRK3 active site.



In order to check the profile of affinity of compounds synthesized with the enzymes CRK3 to propose a possible anti-leishmanial mechanism, a study of docking molecular was carried out. All compounds **3-12** exhibited Glide score favorable that can indicate affinity for enzyme comparable to the standard drug Pentamidine (Table 3). In Figure 3 are represented the best results of docking studies between the compounds **3-12** and the CRK3 enzyme of Leishmania, in which can observe the interactions by Hydrogen bond with the amino acids residues presents in the active site of CRK3. The results revealed that the compound **6** (which has the trifluoromethyl group) presented the best value of affinity for CRK3 ($-9.052 \text{ kcal.mol}^{-1}$), presents three interactions by hydrogen bond with Lys 33, Lys 128 and Asn 131 which allow to suggest an interaction profile of high stability in the enzyme (Figure 3). These results indicate that all compounds can present inhibitory activity from the CRK3 and can be considered promising prototypes of anti-leishmanial drugs.

Table 03: Values of Glide Score (*GScore*), the number of interaction by hydrogen bonds (*Hbond*) and by van der Waals (*Good vdW*) between the compounds (**3-12**, standart drug pentamidine) and CRK3 enzyme (Schrödinger Suite, Induced Fit Docking Program).

Compound	GScore (<i>kcal.mol⁻¹</i>)	Hbond	Good vdW
3	-7.842	1	335
4	-8.490	2	348
5	-8.539	3	324
6	-9.052	3	387
7	-8.211	1	399
8	-8.021	1	349
9	-8.078	3	358
10	-8.300	1	377
11	-7.503	1	366
12	-8.845	1	463
Pentamidine.	-9.535	5	342

Conclusions

This work was described the synthesis, pharmacological evaluation and molecular docking studies with the enzyme CRK3 of Leishmania. All compounds synthesized and evaluated presented anti-leishmanial activity similar or higher when compared to standard drug pentamidine, being that compounds **4**, **8** and **12** presented better profiles of anti-Leishmania (IC_{50}) and can be considered new prototypes of drugs for leishmaniasis. Future studies will be carried out in order to optimize the compounds obtained and verify the probable mechanism of action of these oxime derivatives.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMIG (APQ-01641-12), Rede Mineira de Química (RQ-MG) supported by FAPEMIG (CEX - RED-00010-14), INCT-INOVAR (grant CNPq 573.564/2008-6), CAPES, FINEP, CNPQ (479822/2013-1 and 404344/2012-7), FACEPE-FAPEAL (PRONEM 20110722-006-0018-0010) FACEPE-PRONEM (APQ-0741-1.06/14) and CENAPESQ for providing financial support for this research project.

Conflict of Interest

All authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Alvar J., Vélez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., de Boer M. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE; 7:1-12.
2. Sundar S., Singh A., Singh O.P. (2015) Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. J Trop Med;2014:646932-646939.
3. Bañuls A.L., Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. (2011) Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect;17:1451–1461.
4. Loeuillet C., Bañuls A.L., Hide M. (2016) Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. Parasit Vectors;9:144–156.
5. Chakravarty J., Sundar S. (2010) Drug resistance in leishmaniasis. J Glob Infect Dis;2:167–176.
6. Singh N., Kumar M., Singh R.K. (2012) Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med;5:485–497.
7. Naula C., Parsons M., Mottram, J.C. (2005) Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. Biochim Biophys Acta;1754:151–159.
8. Hassan P., Fergusson D., Grant K.M., Mottram J.C. (2001) The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol;113:189–198.
9. Goyal S., Dhanjal J.K., Tyagi C., Goyal M., Grover A. (2014) Novel fragment-based QSAR modeling and combinatorial design of pyrazole-derived CRK3 inhibitors as potent antileishmanials. Chem Biol Drug Des;84:54–62.

10. Chen Q.H., Rao P.N., Knaus E.E. (2006) Synthesis and biological evaluation of a novel class of rofecoxib analogues as dual inhibitors of cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs). *Bioorg Med Chem*;14:7898–7909.
11. El-Gamal M.I., Bayomi S.M., El-Ashry S.M., Said S.A., Abdel-Aziz A.A., Abdel-Aziz N.I. (2010) Synthesis and anti-inflammatory activity of novel (substituted)benzylidene acetone oxime ether derivatives: molecular modeling study. *Eur J Med Chem*;45:1403–1414.
12. Zheng L.W., Li Y., Ge D., Zhao B.X., Liu Y.R., Lv H.S., Ding J., Miao J.Y. (2010) Synthesis of novel oxime-containing pyrazole derivatives and discovery of regulators for apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*;20:4766–4770.
13. Antti Mäntylä A., Rautio J., Nevalainen T., Vepsäläinen J., Juvonen R., Kendrick H., Garnier T., Croft S.L., Järvinen T. (2004) Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorg Med Chem*;12:3497–3502.
14. Singh N., Mishra B.B., Bajpai S., Singh R.K., Tiwari V.K. (2014) Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*;22:18–45.
15. Larréché S., Launay G., Weibel Galluzzo C., Bousquet A., Eperon G., Pilo J.E., Ravel C., Chappuis F., Dupin M., Mérens A. (2013) Cluster of zoonotic cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major*) in European travelers returning from Turkmenistan. *J Travel Med*;20:400–402.
16. Srivastava S., Shankar P., Mishra J., Singh S. (2016) Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors*;9:277–292.
17. Araújo, J.D.P; Grande, C.A; Rodrigues, A.E. (2010) Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. *Chem Eng Res Des*;88:1024–1032.
18. de Souza T.B., de Oliveira Brito K.M., Silva N.C., Rocha R.P., de Sousa G.F., Duarte L.P., Coelho, L.F., Dias A.L., Veloso, M.P., Carvalho D.T., Dias D.F. (2016) New eugenol glucoside-based derivative shows fungistatic and fungicidal activity against opportunistic *Candida glabrata*. *Chem Biol Drug Des*;87:83–90.
19. Hussain R.F., Nouri A.M., Oliver R.T. (1993) A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*;160:89–96.
20. Nunes M.P., Cysne-Finkelstein L., Monteiro B.C., de Souza D.M., Gomes N.A., dos Reis G.A. (2005) Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In *Leishmania* infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Micro Infect*;7:78–85.

21. Pereira, F.S.S., Saraiva, L.A., da Silveira, N.J.F., Veloso, M.P. (2013) Modelagem molecular por homologia e validação estrutural da CRK3 de *Leishmania Mexicana*. Revista Eletrônica de Farmácia;10:42–52.
22. Holloway G.A., Parisot, J.P., Novello P.M., Watson K.G., Armstrong T., Thompson R.C.A., Street I.P., Baell J.B. (2010) Discovery of novel and potent benzhydryl-tropane trypanocides highly selective for *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Med Chem Lett;20:1816–1818.
23. Santos G.B., Almeida M.O., Cardoso I.A., Manfrim V., Chagas F.O., Toledo J.S., Pinzan C.C., de Araujo A.S., Cruz A.K., Pupo M.T., Emery F.S. (2014) The semisynthetic landscape of aphidicolin: inspiration towards leishmanicidal compounds. J Braz Chem Soc;25:1885–1899.
24. Verma A., Srivastava S., Sane S.A., Marrapu V.K., Srinivas N., Yadav M., Bhandari K., Gupta S. (2011) Antileishmanial activity of benzocycloalkyl azole oximino ethers: The conformationally constraint analogues of oxiconazole. Acta Tropica;117:157–160.
25. Delmas F., Gasquet M., Timon-David P., Madadi N., Vanelle P., Vaille A., Maldonado J. (1993) Synthesis and in vitro anti-protozoan activity of new 5-nitrothiophene oxime ether derivatives. Eur J Med Chem;28:23–27.

4.2 Artigo II derivado da Tese

Leishmanicidal activity of Morita-Baylis-Hillman adducts

Ana Carolina Santana Vieira¹, Mariana da Silva Santos¹, Anderson Brandão Leite¹, Morgana Vital Araújo¹, Gabrielle de Souza Augusto Pereira², Bárbara Viviana de Oliveira Santos², Kristerson Reinaldo de Luna-Freire², Magna Suzana Alexandre-Moreira¹

¹Laboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, 57020-720, Maceió, AL, Brazil; carola_mcz@hotmail.com (A.C.S.V.); nananoquel@hotmail.com (MSS); bioufal@hotmail.com (A.B.L.); morgana_vital@hotmail.com (M.V.A.); suzana.magna@gmail.com (M.S.A.M)

²Laboratory of Applied Organic Chemistry, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB. Brazil;

gaabriellesouza@hotmail.com (G.S.A.P.); Barbara@lft.ufpb.br (B.V.O.S.); kristerson@cbiotec.ufpb.br (K.R.L.F.)

Abstract:

Leishmaniasis is a complex of diseases, caused by different species of the genus *Leishmania*. They are among the ten priority endemics of the World Health Organization. Currently, pentavalent antimonials (Sb⁺⁵) are the drugs of choice for the treatment of all forms of leishmaniasis, followed by amphotericin B and pentamidine. All these therapies have resistance, adverse effects and varied therapeutic response. The search for new therapeutic options is a challenge for researchers nowadays. The present study aimed to evaluate the leishmanicidal activity of MBHA adducts, their O-acetylates, carboxylic acid derivatives, and 2-methyl-phenylpropanoids derivatives acids and esters in the search for new drug prototypes against the promastigote and amastigote forms of *L. chagasi*. The results showed activity *in vitro* on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*. Thus, they are strong candidates for more pharmacological studies objectifying at the treatment of leishmaniasis.

Keywords: leishmaniasis. Morita-Baylis-Hillman adducts. *L. chagasi*.

1. Introduction

Neglected Tropical Diseases (NTDs) are a group of communicable diseases that affect 149 countries, mainly the poorest ones, prevailing in tropical and subtropical regions and causing social and economic damages. Despite reaching humans for centuries, they are considered neglected by lack of funding, research, and concern by health authorities in the twentieth century (Engelman et al., 2016, WHO, 2015).

Among the 17 neglected diseases, Leishmaniasis, which is endemic in 98 countries, in its various forms causes deep and permanent scars or destroys the mucous membranes of the nose, mouth and throat. In the most severe form, if untreated it can lead to death rapidly, as it mainly affects the liver and spleen (WHO, 2013, WHO, 2014).

Leishmaniasis is a complex of diseases, classified as tegumentary or visceral, caused by different species of the genus *Leishmania*, an obligate intracellular parasite. They are among the ten priority endemics of the World Health Organization (WHO) because of their significant impact on public health. It is estimated that around 20 to 40 thousand people die each year from leishmaniasis and that 400 million are at risk of developing the disease (ALVARO et al., 2012, WHO, 2008, WHO, 2013).

Currently, pentavalent antimonials (Sb^{+5}) are the drugs of choice for the treatment of all forms of leishmaniasis, followed by amphotericin B and pentamidine salts. As a second choice in the absence of response to the treatment, or in the impossibility of its use, miltefosine and amphotericin B deoxycholate (antifungal antibiotic) are indicated. All these therapies have high cost, adverse effects and varied therapeutic response, which limits the access of the population to a quality treatment. There is no vaccine approved and available for humans at the time (Amato et al., 2007, Machado et al., 2015, WHO, 2014).

The search for new therapeutic options is a challenge for researchers nowadays. In this context, Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) have been studied as promising antiparasitic drugs, showing activity against promastigote forms of *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania chagasi*. Molecules of biological interest have been synthesized from MBHA or by the MBH reaction for the preparation of adducts with biological interest (BARBOSA et al., 2011; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

The Morita-Baylis-Hillman reaction provides polyfunctional, simple and versatile molecules through carbon-carbon bonds formation with high atom-economy. This sustainable

transformation provides highly substituted small molecules, which can be used as valuable starting materials for the syntheses of natural products, heterocyclic compounds, and drugs. (DAS et al., 2006; BASAVIAH et al., 2007; LUNA-FREIRE et al., 2011, 2014).

The low cost and availability of the reagents make the reaction advantageous and economical, since all atoms are incorporated into the product. Moreover, it is considered a green chemistry or sustainable reaction, since it can be performed in aqueous media and in the absence of solvents (Martine et al., 2006).

According to WHO (2016), access to free and well-designed essential medicines is one of the ways to improve access to health for the most disadvantaged populations. Considering the exposed scenario, the search for new treatment alternatives is needed, mainly with greater effectiveness, less adverse effects and better dosage forms. Thus, the present study aimed to evaluate the leishmanicidal activity of MBHA adducts, their O-acetylates, carboxylic acid derivatives, and 2-methyl-phenylpropanoids derivatives acids and esters in the search for new drug prototypes.

2. Material and Methods

Synthesis of Compounds

The compounds 1G–16G tested in this work (Fig.1) were synthesized according to procedures of previous works (Scheme 1) (AMARANTE et al., 2011; BASAVIAH et al., 1999; LUNA-FREIRE et al., 2011, 2014; STORK et al., 1978). The synthesis of the compounds was carried at Laboratory of Applied Organic Chemistry, Biotechnology Center, Federal University of Paraiba.

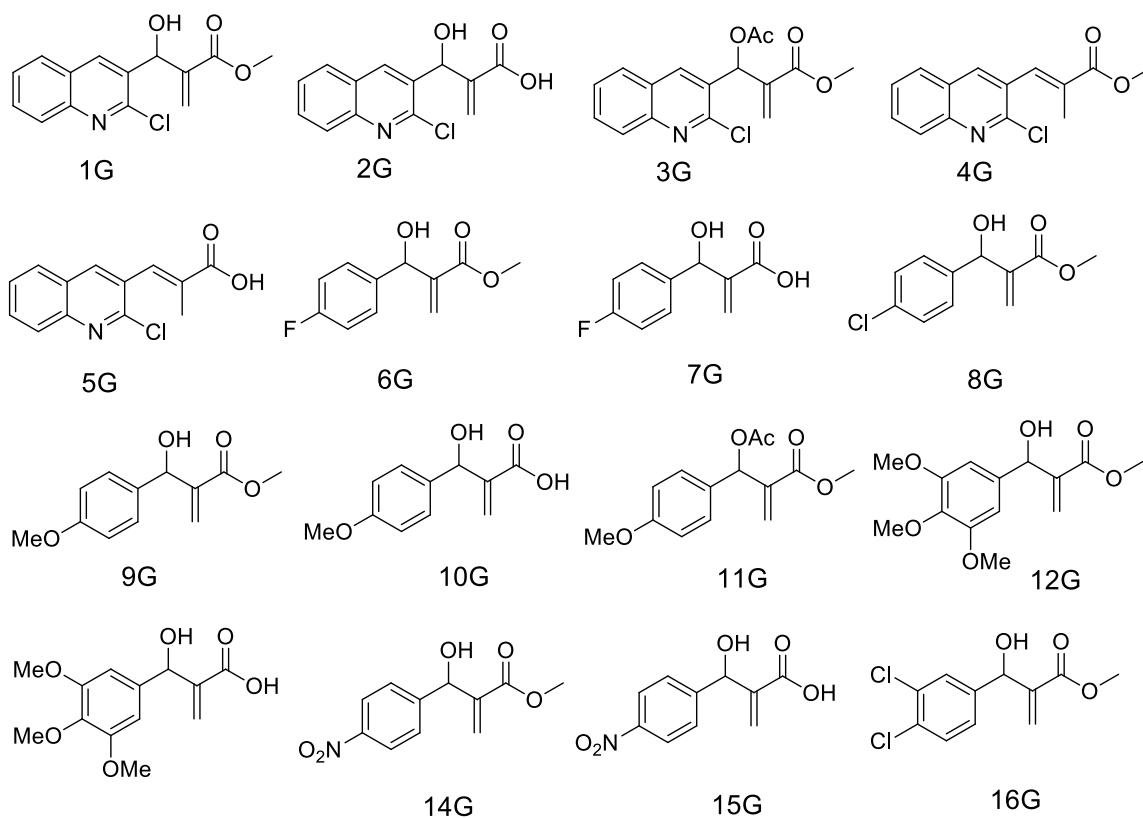
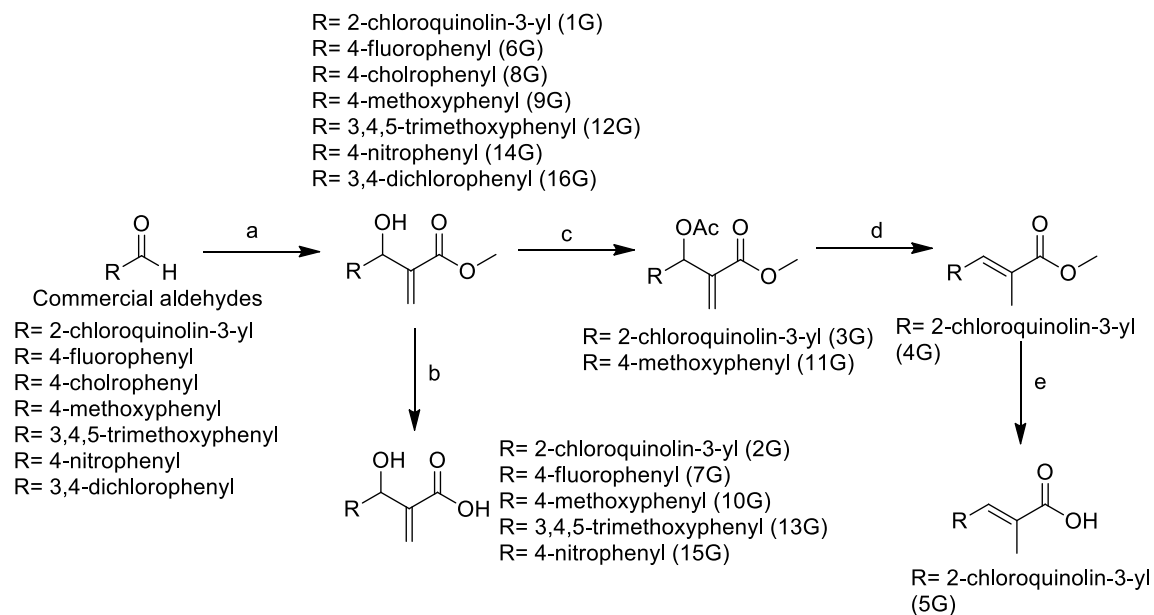


Fig. 1. Chemical structures of the antileishmanial synthetic compounds tested.



***In vitro* pharmacological tests**

Promastigote culture: The parasite of the Gonçalo Moniz - Fiocruz - BA Research Center, provided by Dr. Valéria de Matos Borges (MCAN/BR/89/BA262) was used to perform the culture of *Leishmania chagasi* promastigotes. These promastigotes were maintained in vitro in Schneider's medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2% male human urine at 27°C in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) greenhouse. For the experiments, the parasites were placed in Falcon tubes and centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes. Subsequently, the supernatant was discarded and the formed pellet was resuspended in Schneider's medium. The parasites were then counted in the Neubauer chamber for plating and thus the subsequent assays.

Macrophage culture: J774.A1 macrophages were maintained in culture bottles containing 10 ml of RPMI medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids and pyruvate. For the experiments, the cells were counted, adjusted in RPMI medium supplemented with 10% FBS and then plated on a culture dish.

Macrophage viability assay: For the study of cell viability of macrophages against acyloxymethyl derivatives, the group performed the MTT reduction method (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993). J774A.1 macrophages were plated in 96-well plates for 1 hour in (5×10^4 /well) and exposed to different concentrations of the diluted compounds in supplemented RPMI medium (0.1, 1, 10 and 100 μ M) for a period of 24 hours in a laboratory oven at 37°C with humid atmosphere containing 5% CO₂. Control wells contained cells cultured only with culture medium or cultured cells in the presence of the substance diluent (0.1% DMSO). After incubation, the supernatant was discarded and then 100 μ L of the MTT solution (5 mg/10 mL) was added. The plates were incubated again for 1 hour in a laboratory oven at 37°C and 5% CO₂, after which the supernatant was removed and 100 μ L of DMSO was added and the spectrophotometer read at 550 nm. The cell viability of the wells treated with the concentrations was compared to the death standard obtained in the control cultures.

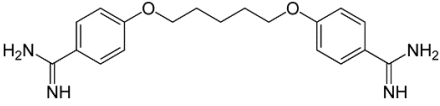
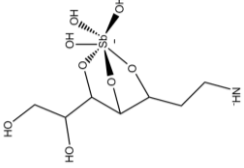
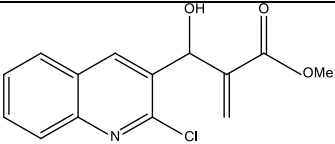
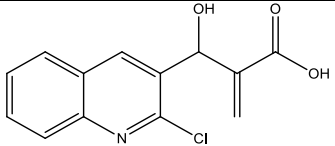
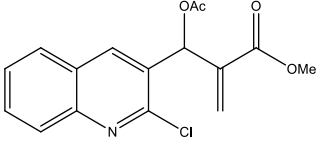
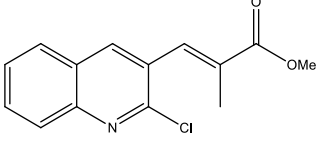
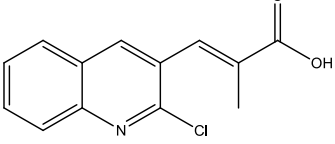
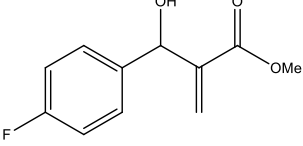
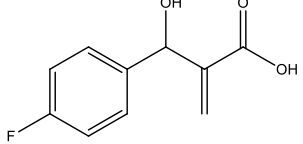
Promastigote forms viability assay: Promastigote forms of *L. chagasi* at a concentration of 1×10^6 parasites/well in a volume of 100 μ L were grown in triplicates in 96 well plates with Schneider's medium supplemented with 10% FBS, 2mM L-Glutamine and 2% human urine. Different concentrations (0.1, 1, 10 and 100 μ M) of the derivatives and controls (pentamidine, glucantime, RPMI medium and 0.1% DMSO) were added to the wells containing the promastigote forms until the final volume of 200 μ L. The plate was incubated in a BOD oven at 27°C for 48 hours. After this time, 20 μ L of MTT solution was added to the wells. The plates were then placed in a CO₂ oven for two hours and isopropyl alcohol was added to the wells. Afterwards, the parasites of *L. chagasi* were homogenized and read in a spectrophotometer at 550 nm. The cell viability of the wells treated with the concentrations was compared to the death standard obtained in the control cultures.

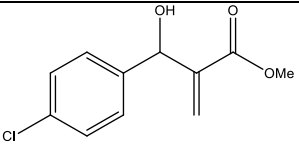
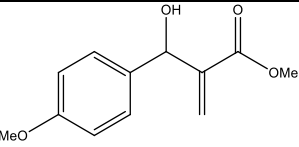
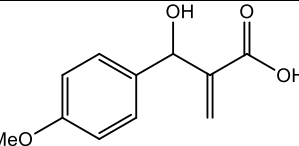
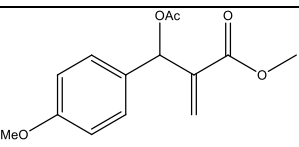
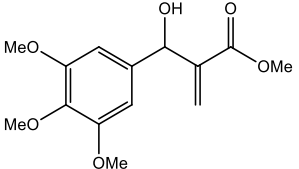
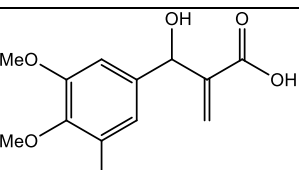
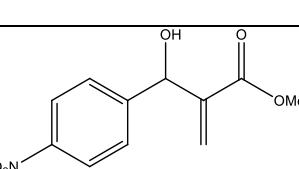
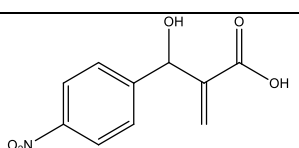
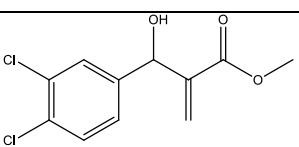
Macrophage infection with *L. chagasi* assay: Macrophages from the J774.A1 lineage were plated at the ratio of 5×10^4 cells/well in 24-well plates with coverslips for one hour with supplemented RPMI medium. Macrophages were incubated overnight and subsequently infected with promastigotes of *L. chagasi*, in a proportion of 10 parasites: 1 macrophage. The plate was incubated for 6 hours in a laboratory oven at 37°C with a humid atmosphere containing 5% CO₂. Six hours after the infection, the macrophages were "washed" with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2), to remove the non-internalized parasites. Macrophages were cultured with RPMI supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 2 mM non-essential amino acids and 2 mM pyruvate, in the presence or absence of derivatives at the concentration of 10 µM and were kept in a laboratory oven at 37°C with humid atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. After this culture period the wells containing the coverslips were washed with PBS, the cells were fixed with methanol and then stained with Giemsa-May-Grünswald and mounted on slides. The number of infected macrophages and the number of amastigotes in 100 macrophages were evaluated using an optical microscope with 100X objective (immersion) (NUNES et al., 2005).

3. Results

Firstly, the cell viability evaluation was performed through the MTT method, on macrophages of the J774A.1 lineage. The results showed that only the 2G, 4G, 5G, 7G, 9G, 10G, 13G and 15G derivatives showed no toxicity up to the maximum concentration tested (100µM). The other compounds (1G, 3G, 6G, 8G, 11G, 12G, 14G and 16G) were cytotoxic when compared to control (0.1% DMSO). When cytotoxicity was evaluated at the concentration of 10 µM, only the 9G, 11G, 14G and 16G derivatives showed a significant toxic effect against macrophages (Table 1). As expected, 0.1% DMSO had no deleterious effect when compared to the negative control (RPMI culture medium).

Table 01: Effect of the derivatives on the cell viability of J774.A1 macrophages in the MTT assay after 24 hours.

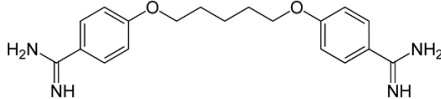
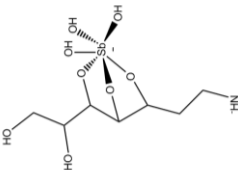
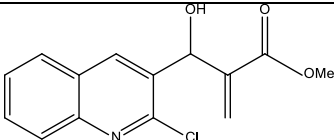
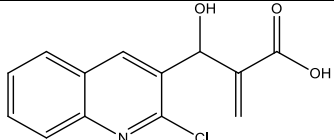
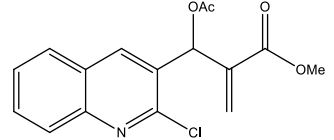
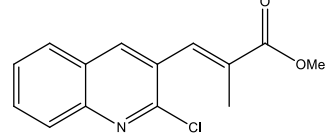
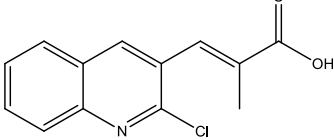
Derivatives	Structure	LC50 (μM) ^a	Cytotoxicity 10 μM (%) ^c
Pentamidine		50.0 ± 2.8	$16.4 \pm 3.7^{***}$
Glucantime		> 100	$21.1 \pm 0.2^{***}$
1G		> 100	NT
2G		> 100	NT
3G		93.3 ± 1.2	NT
4G		> 100	NT
5G		> 100	NT
6G		> 100	NT
7G		> 100	NT

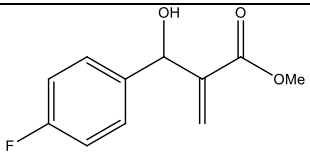
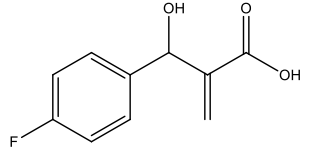
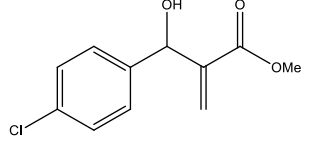
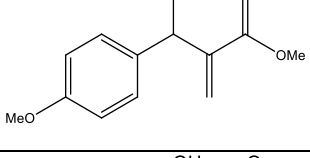
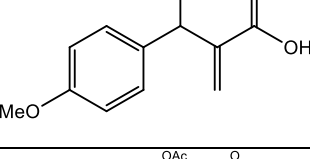
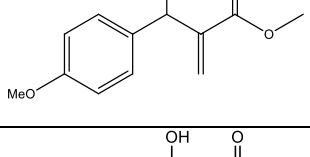
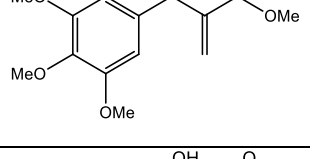
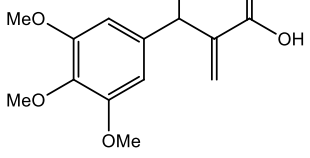
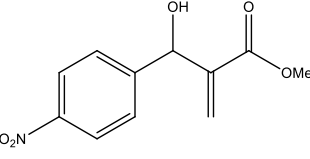
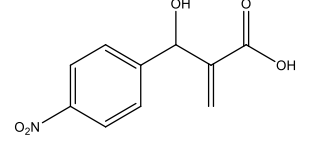
8G		> 100	NT
9G		> 100	10.2 ± 1.8*
10G		> 100	NT
11G		> 100	62.5 ± 1.1***
12G		> 100	NT
13G		> 100	NT
14G		93.3 ± 7.8	13.6 ± 1.6 **
15G		> 100	NT
16G		> 100	71.4 ± 1.3***

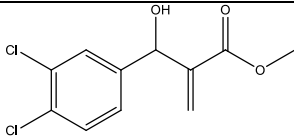
The results refer to: ^aLethal Concentration to 50% of macrophages (LC50) calculated by toxic concentration-response curves. ^bMedia ± standard error of the mean maximum cytotoxicity in triplicates of a representative experiment. ^c50% lethal concentration of promastigotes calculated through toxic concentration-response curves. ^dMedia ± standard error of the mean maximum effect in triplicates of a representative experiment. NT: substance does not present significant lethal activity for macrophages at the concentrations of 100, 10, 1 and 0.1 μM in relation to the DMSO group.

After evaluation of the cytotoxicity in macrophages, the viability of promastigote forms in the derivatives and controls was evaluated by the MTT reduction method. The results show that the 1G, 6G, 8G, 10G, 11G, 13G, 14G, 15G and 16G derivatives presented significant toxicity when compared to the control (0.1% DMSO) (**Table 02**).

Table 02: Effect of the derivatives on the viability of *Leishmania chagasi* promastigotes after 48 hours of treatment

Derivatives	Structure	LC50 (μM) ^a	Maximum Effect (%) ^b
Pentamidine		2.0 ± 1.0	$97.5 \pm 1.2^{***}$
Glucantime		2.0 ± 0.5	$51.4 \pm 0.3^{***}$
1G		0.6 ± 0.3	$61.3 \pm 2.6^{***}$
2G		> 100	NA
3G		> 100	NA
4G		> 100	NA
5G		> 100	NA

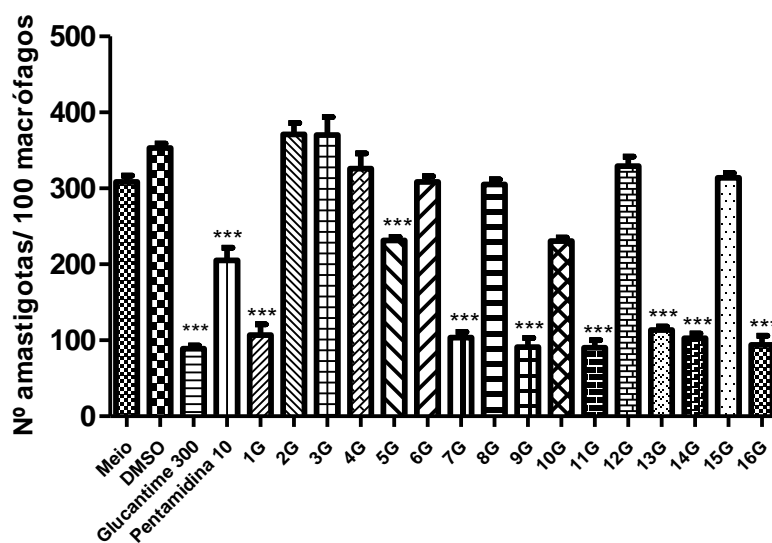
6G		66.3 ± 9.0	$62.3 \pm 2.9^{***}$
7G		> 100	NA
8G		0.6 ± 0.3	$67.0 \pm 4.1^{***}$
9G		> 100	NA
10G		> 100	$25.9 \pm 6.2^{***}$
11G		58.3 ± 3.4	$88.1 \pm 4.4^{***}$
12G		> 100	NA
13G		> 100	$16.9 \pm 3.4^{**}$
14G		> 100	$22.5 \pm 1.8^*$
15G		> 100	$22.2 \pm 1.5^{***}$

16G		4.3 ± 0.3	$77.4 \pm 1.3^{***}$
-----	---	---------------	----------------------

The results refer to: ^aLethal concentration to 50% of the promastigote forms (LC 50) calculated by toxic concentration-response curves and expressed as mean \pm standard error of the mean; ^bMaximum effect (ME) which is expressed as mean maximum toxicity \pm standard error of the triplicate mean of a representative experiment. ME values were considered significant when $***p < 0.01$ compared to the 0.1% DMSO group. NA: substance had no significant lethal activity for *L. chagasi* promastigotes at concentrations tested in relation to the DMSO group.

After evaluation of the cytotoxicity in macrophages and promastigote forms, a leishmanicidal evaluation in amastigote forms of *L. chagasi* in the concentration of 10 μ M was performed. The results obtained demonstrate that of the evaluated compounds, the compounds 1G, 5G, 7G, 9G, 11G, 13G, 14G and 16G showed a significant reduction in the number of amastigotes in 100 macrophages. On the other hand, the derivatives 2G, 3G, 4G, 6G, 8G, 10G, 12G and 15G did not present leishmanicidal activity in intracellular parasites (**Figure 01**).

Figure 1: Leishmanicidal effect of the derivatives (10 μ M) in the amastigote forms of *Leishmania chagasi*. The results refer to the mean \pm standard error of triplicates of a representative experiment. The values were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, when compared to the 0.1% DMSO group.



4. Discussion

Leishmaniasis is a complex of diseases in which the cells of the mononuclear phagocytic system serve as host as well as replication site for the parasite. The parasite in turn resists lysis by the lysosomes and resides mainly in macrophages in the spleen and liver. It is important to note that the use of pentavalent antimonials is the first choice for the treatment of leishmaniasis in Brazil. However, they present a high cost, besides hepatotoxicity and nephrotoxicity, which justifies the search for new therapeutic options (AYRES et al., 2007; Jain; Jain, 2013).

The MBH reaction proves to be efficient, to have low cost and provides highly functional derivatives. Morita-Baylis-Hillman derivatives have been studied since 1999 from the pharmacological point of view. Their activities range from antifungal, antimalarial, antineoplastic, molluscicide, antileishmania and antichagasic action (VASCONCELLOS; LIMA-JUNIOR, 2013).

Direct leishmanicidal activity of MBHA has been previously described. Barbosa et al. (2011) evaluated the in vitro leishmanicidal activity of MBHA compounds in promastigotes of *L. chagasi* and *L. amazonensis*, using the molecular hybridization strategy, but without evaluating the toxicity in macrophages.

In this study, the cytotoxicity of MBHA on macrophages J774.A1 was evaluated. The MTT assay is evaluated by the reduction of MTT to formazan, widely used for in vitro cell viability evaluation. Silva et al. (2011) evaluated the cytotoxicity of MBHA in macrophages.

Sandes et al. (2014) evaluated the action of a MBHA compound on epimastigote forms of *T. cruzi*. The group found that the 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile) adduct induce parasite cell death by necrosis, in a mitochondrial-dependent manner.

In prospecting studies of leishmanicidal compounds, this study demonstrates 1G and 13G derivatives as promising. In addition to non-toxicity against macrophages, the compounds were active against promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*.

Considering that MBHA compounds are easy to synthesize and readily available, their use becomes an advantage when compared to the current available drugs, since leishmanioses are neglected diseases and affect the less favored populations (WHO, 2016).

5. Conclusion

Based on the obtained results, it can be concluded that some MBHA compounds, their O-acetylates, carboxylic acid derivatives, and 2-methyl-phenylpropanoids derivatives acids and esters possess leishmanicidal activity in vitro on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*. 1G and 13G derivatives, which showed activity against promastigotes and amastigotes, showed no toxicity against macrophages of the J774A.1 lineage. Thus, they are strong candidates for more pharmacological studies aimed at the treatment of leishmaniasis.

Acknowledgements

UFAL, CAPES, CNPq, INCT.

References

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671

AMARANTE, G. W.; CAVALLARO, M.; COELHO, F.; Highlydiastereoselective total synthesis of the anti-tumoral agent (\pm)-Spisulosine (ES285) from a Morita–Baylis–Hillman adduct. **Tetrahedron Letters**, vol. 51, n.19, p. 2597, 2010.

AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–274, ago. 2007.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C. GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on leishmania amazonensis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.102, n.2, p. 115-20. May. 2007.

BARBOSA et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. *Bioorg. Med. Chem.*, Oxford, v. 19, p. 4250-4256, 2011.

BARBOSA et al. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. *Eur. J. Med. Chem., Paris*, v. 44, p. 1726-1730, 2009.

BASAVAIAH, D.; KRISHNAMACHARYULU, M.; HYMA, R.S.; SARMA, P. K. S.; KUMARAGURUBARAN, N.; A facile one-pot conversion of acetates of the Baylis-Hillman adducts to [E]- α -methylcinnamic acids. **Journal Organic Chemistry**, vol. 64, p. 1197-1200, 1999.

BASAVAIAH, D. et al. The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. *Chem. Soc. Rev., London*, v. 36, p. 1581-1588, 2007.

DAS, B. et al. Synthetic Applications of Baylis-Hillman Chemistry: An Efficient and Solely Stereoselective Synthesis of (E)- α -Methylcinnamic Acids and Potent Hypolipidemic Agent LK-903 from Unmodified Baylis-Hillman Adducts. *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, v. 54, p. 1725-1727, 2006.

ENGELMAN, D. FULLER, L. C., SOLOMON, A. W., MCCARTHY, J. S., HAY, R. J., LAMMIE, P. J., STEER, A. C., STEER, A. Opportunities for Integrated Control of Neglected Tropical Diseases That Affect the Skin. **Trends in Parasitology**. Volume 32, Issue 11. p843-854, November 2016

HANDMAN, E. et al. Murine cutaneous Leishmaniasis: Disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *The Australian journal of experimental biology and medical Science*. v.57, n. 1, p. 9-29, 1979.

HUSSAIN, R.F.; NOURI, A.M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**. v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

LENARDÃO JE, FREITA GRA, DABOUB MJ, BATISTA ACF, SILVEIRA CC 2003. Green Chemistry - os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova* 26: 123.

LIMA-JUNIOR, C. G.; FÁBIO, P. L. SILVA; RAMON, G. DE OLIVEIRA; FERNANDA, L. SUBRINHO; NATÁLIA, G. DE ANDRADE; MÁRIO, L. A. A. VASCONCELLOS. Microwave Irradiation or Low Temperature Improved Synthesis of Antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 22, No. 11, 2220-2224, 2011

LUNA-FREIRE, K. R.; TORMENA, C. F.; COELHO, F. Heck Reaction on Morita-Baylis-Hillman Adducts: Diastereoselective Synthesis of Pyrrolizidinones and Pyrrolizidines. *Synlett* (2011), (14), 2059-2063.

LUNA-FREIRE, K. R.; SCARAMAL, J. P. S.; RESENDE, J. A. L. C.; TORMENA, C. F.; OLIVEIRA, F. L.; APARICIO, R.; COELHO, F. An asymmetric substrate-controlled Morita-Baylis-Hillman reaction as approach for the synthesis of pyrrolizidinones and pyrrolizidines. *Tetrahedron* (2014), 70(20), 3319-3326.

MARCELLI T, VANMAARSEVEEN JH, HIEMSTRA H. Cupreines and Cupreidines: An Emerging Class of Bifunctional Cinchona Organocatalysts. *Angew Chem Int Ed* 45: 7496–7504, 2006.

NUNES, M. P. et al. Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In Leishmaniainfected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Micro Infect.** v.7, n. 1, p. 78-85, 2005.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Educação Médica Continuada.* v. 79, n.6, p. 647-664, 2004.

MACHADO, P. R. ROSA, M. E. GUIMARÃES, L. H.; et al. Treatment of Disseminated leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases.* 2015: 61:945.

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

STORK, G.; TAKAHASHI,T.; KAWAMOTO,I.; SUZUKI, T.; Total synthesis of prostaglandin F2 α by Chirality Transfer from D-glucose. *Journal of the American Chemical Society.* vol 100, n. 26, p. 8272-8273, 1978.

SANDES, J. M., FONTES, A., REGIS-DA-SILVA, C. G. CASTRO, M. C. A. B., LIMA-JUNIOR, C. G. SILVA, F. P. L. Trypanosoma cruzi Cell Death Induced by the MoritaBaylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4- Nitrophenylpropanenitrile). *Plos One.* V. 9, p. 1-9, 2014.

VASCONCELLOS, M. L. A. A., LIMA-JUNIOR, C. G. Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* v.20, p. 3954-3971, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Research to support the elimination of visceral leishmaniasis*. 2008.

WHO. Control of leishmaniasis. WHO Technical Report Series. Geneve: WHO; 2010. 949. Pág 1–186. OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases*. 2013.

WHO, Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third who report on neglected tropical diseases, 2015.

BARBOSA et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. *Bioorg. Med. Chem.*, Oxford, v. 19, p. 4250-4256, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a atividade farmacológica de compostos oxímicos contra formas amastigotas de *L. chagasi*. Todos os compostos avaliados apresentaram atividade leishmanicida semelhante ou superior quando comparados ao fármaco padrão. Destaque para os compostos 4, 8 e 12, por apresentaram melhor IC₅₀ (22.5 ± 12.6 , 13.3 ± 6.9 e 17.3 ± 2.0 , respectivamente).

Além dos derivados oxímicos, também foram avaliados compostos derivados adutos de Morita-Baylis-Hillman. Ressalta-se a atividade leishmanicida do composto 1G, pela atividade *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* (IC₅₀ de $0,6 \pm 0,5$ contra formas promastigotas).

Novos estudos são necessários para avaliação de possíveis mecanismos de ação dos derivados, assim como ensaios *in vivo*, otimizando assim o desenvolvimento novos protótipos fármacos leishmanicidas.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulário Eletrônico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

ALVAR, J., et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.7, n.5. 2012.

BAIOCCO et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **Journal Medicine Chemical**. v. 52, n. 8, p.2603-12. Apr. 2009.

BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, 2004.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan., 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.– (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 182 p. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em 30 de novembro de 2016}.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Miltefosina para o Tratamento da Leishmaniose Tegumentar: Relatório de recomendação.** Disponível em http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio_Miltefosina_Leishmaniose_Tegumentar_CP_40_2016.pdf. Acesso em 26 de janeiro de 2017.

CABALLERO, A. B. et al. Metal-Based Therapeutics for leishmaniasis. INTECH open Science. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/metal-based-therapeutics-for-leishmaniasis>

CANTACESSI, C. et al. The past, present and future of Leishmania genomics and transcriptomics, **Trends Parasitology**. v. 31, p. 100-108, 2015.

CDC. Life Cycle of *Leishmaniasis*. Disponível em : <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acessado em: 28 de novembro de 2016.

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

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 72, n. 2, p. 132-141, April 2002.

DA-CRUZ, A. M., et al. T-Cell-Mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, p. 251-256, 2002.

DE ASSIS, R. R., et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1820, p. 1354–1365. 2012.

ENGELMAN, D. et al. Opportunities for Integrated Control of Neglected Tropical Diseases That Affect the Skin. **Trends in Parasitology**. v. 32, n. 11, p. 843–854, November 2016.

FERREIRA, A. W; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.443. 2001.

FIOCRUZ. **As Leishmanioses**. Disponíveis em:
<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm>. Acesso em 15 de dezembro de 2016.

FREITAS, J. C. C. et al. Canine Visceral Leishmaniasis: Structural and Immune-Inflammatory Changes. **Acta Scientiae Veterinariae**. n.41, p. 01-10, 2013.

COSTA FILHO, A. V.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 41, n. 4, p. 424-427, jul-ago, 2008.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: Antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection Genetics and Evolution**. v. 5, n. 2, p. 109-116, April, 2005.

GAY, E., et al. Les leishmanioses humaines: parasitoses importées et autochtones. **Revue francophone des laboratoires**. n. 477. Décembre 2015.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

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

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, p. 230-250, 1993.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, 2015.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**. v. 132, p. S19-S32, London, 2006.

HOTEZ, P. J.; FUJIWAKA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**. v. 6, n. 8, p. 601-606. August, 2014.

JANEWAY, C. A. JR. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**. v. 3, p. 1167-1171. 2001.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**. v.4, p.1-24. 1990.

Lima EB, Porto C, Motta JCO, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. V.82, n.2, p. 111-24, 2007.

LINDOSO, J. A., LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 247-253, September-October, 2009.

MACHADO, P., et al. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Dermatology**. v. 12, p. 449-451, 2002.

MELO M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 23, n. 1, p. 41-45, 2004.

MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. **Vetores das leishmanioses nas Américas**. In: Barral A e Costa J. *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. Salvador. CYTED. p. 55-65. 2011.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**. v. 15, n. 3, p. 376-381, Jul/Ago/Setembro – São Paulo – Brasil, 2011.

MILLS, K. H; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**. v. 16, p. 107-117, 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu. 11ª edição. São Paulo, 2010.

OPAS – Organização Panamericana de Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. v. 2, p. 1-4, 2014.

PAULA, C. D. R. et al. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/ dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36, n. 3, p. 365-371, mai-jun, 2003.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUZA-GOMES, M. L. Treatment of Visceral Leishmaniasis and American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.20, n. 1, p. 107-110, jan-mar 2011.

PIRMEZ, C., et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p.1819-23. 1999.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n.4, 2003.

REIS, L. C., et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, São Paulo, maio-ago. 2006.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Gunabara Koogan. 4ª edição. Rio de Janeiro, 2008.

ROCHA, T. J. M., et al. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 6, n.4, Ananindeua dez. 2015.

ROBERTS, L. S.; JANOVY-JR, J. Kinetoplastida: Trypanosomes and... In: **Foundations of Parasitology**. 5 ed. Wm C Brown, 1996.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**. v. 123, p. 311- 330, 2006.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471–478, 1994.

SOUZA, W. **Doenças Negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, 2010.

SCOTT, P., FARRELL, J. P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *leishmania Major*. **Chemical Immunology**. n. 70, p.60-80, 1988.

SCHUBACH, A. O., CONCEIÇÃO-SILVA, F. **Estado da Arte no Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p.439-2, 2014

SES. Secretaria estadual de Saúde de Mato Grosso. **Manual de Vigilância e Controle das Leishmanioses**. Cuiabá, 2007. Disponível em: [http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/50/manual-leishmaniose-\[50-151009-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/50/manual-leishmaniose-[50-151009-SES-MT].pdf). Acessado em: 29 de dezembro de 2016.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 2, p. 137-41, 2005.
Sco

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, n.5, p.951-8. Sep, 2002.

TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: ciclo de vida da leishmania. Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology letters*, v. 70, n. 3, p. 203-209, 2000.

WELBURN, S. C., et al. The neglected zoonoses—the case for integrated control and advocacy. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 21, n. 5, p. 433-443. May 2015.

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. In: Organization WHO, editor. Geneva: WHO Technical Report Series; 2010. p. 186p. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

WHO. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. WHO, 2012.

WHO. World Health Organization. Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). Disponível em
<http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png>. Acesso em 22 de jan. 2017.

WHO, **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Third who report on neglected tropical diseases, 2015.

WHO. Tropical Diseases Research (TDR). **Strategic Direction for Research: Leishmaniasis. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. February 2002a. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/. Acesso em: 05 de agosto de 2016.

WHO. **Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis**=Urbanisation: facteur de risque croissant pour la leishmaniose. *Weekly epidemiological record=Relevé épidémiologique hebdomadaire*. Geneva=Genève, v. 77, n. 44, p. 365–372. 2002b. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/en/>. Acesso em: 08 de novembro de 2016.

