



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAROLINA BARBOSA BRITO DA MATTA

ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DIALQUILFOSFORILHIDRAZONAS

Maceió-AL

2016



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAROLINA BARBOSA BRITO DA MATTA

ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DIALQUILFOSFORILHIDRAZONAS

**Tese de Doutorado apresentada ao
programa de pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor**

**Área de concentração: Biotecnologia
em saúde**

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de
agentes profiláticos, terapêuticos e testes
de diagnósticos

**Orientadora: Profa. Dra. Magna
Suzana Alexandre Moreira**

Maceió-AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

M435e Matta, Carolina Barbosa Brito da.
 Estudo da atividade leishmanicida de derivados dialquilfosforilhidrazonas
 / Carolina Barbosa Britto da Matta. – 2016.
 109 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.
Maceió, 2016.

Bibliografia: f.93-107

1. Leishmaniose cutânea. 2. Leishmaniose visceral. 3. *Leishmania sp.*
5. Dialquilfosforilhidrazonas. I. Título.

CDU: 547.1:616.928.5

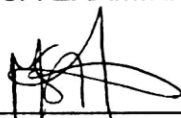
CAROLINA BARBOSA BRITO DA MATTA

"Estudo da Atividade Leishmanicida de Derivados Dialquilfosforilhidrazonas."

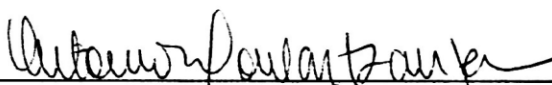
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 29/02/2015.

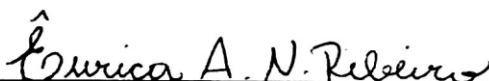
BANCA EXAMINADORA



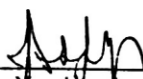
Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira, (Orientadora/Presidente),
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Antônio Elzébio Goulart Santana
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof^a. Dr^a Éurica Adélia Nogueira Ribeiro
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

*Dedico esse trabalho aos meus
pais, Flávio e Janete, pelo
amor incondicional, incentivo
e compreensão durante esta
trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar os caminhos que percorri ao longo desse trabalho.

Aos meus pais, Flávio Barbosa da Matta e Janete Barbosa de Brito, exemplos de sabedoria e honestidade. Os grandes espelhos da minha vida. Obrigada por todo amor, dedicação, incentivo e paciência em todas as horas. Palavras sempre serão muito pouco para demonstrar-lhes meus sinceros agradecimentos. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Carinne, Rafael e Gabriel, pelo carinho, paciência e compreensão. Amo vocês!

Ao meu esposo Raphael por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, companhia, paciência e compreensão. Obrigada por todo amor!

Ao meu amor maior, Sophia Brito. Por me ensinar a cada dia o real sentido da vida.

À minha querida e numerosa família: primos, primas, tios, tias e meus amados avós! Muito obrigada pela presença em minha vida. Pela confiança, amor, amizade, enfim, obrigada por ser a minha família.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, que me orientou desde a iniciação científica buscando sempre extrair o meu melhor. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, conselhos, incentivo, confiança e toda contribuição científica durante esse longo período que convivemos.

À todos os animais utilizados, simplesmente essenciais para a realização deste trabalho, dedico todo o meu respeito e agradecimento.

Aos queridos amigos, Luiz Henrique, Carla, Morgana, Thiago Matos, Karol, Renata, Débora, Elenise e Ediane, pelo carinho, conselhos, amizade, compreensão e por todos os momentos únicos que passamos juntas. Obrigada amigos!

À Aline Queiroz pela colaboração extremamente importante no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos amigos do laboratório, que se tornaram grandes companheiros do dia a dia. Agradeço-os pela amizade, auxílio nos experimentos, conhecimentos compartilhados diariamente e momentos de descontração: Yolanda Karla, Aline Queiroz, Eliane Campes, Éverton Tenório, Thays Dias, Gabriela Muniz, Mariana Santos, Amanda Evelyn, Ellym Ariane Priscilla, Anderson e Max Vianna. Cada um teve sua importância e sua participação, obrigada a todos por terem tornado esse trabalho possível.

A todos os professores da Rede Nordeste de Biotecnologia, pela valiosa contribuição em minha formação acadêmica

Aos professores Carlos Maurício R. Sant'Anna e João Batista Neves da Costa da UFRRJ pelo apoio técnico e científico na execução desse trabalho.

A todos os membros do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR).

Aos coordenadores do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)-FIOCRUZ- UFPE, Profs. Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos pelo apoio técnico e científico e por cederem tão gentilmente as estruturas do LBCM/FIOCRUZ para execução dos meus experimentos. Agradeço ainda aos colegas Ana Paula, Amanda e Gabriel e ao excelente técnico Rafael Padilha por todo auxílio na execução dos ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Prof^a Dr^a Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA e ao Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ, por gentilmente cederem cepas de *Leishmania* spp;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho;

Agradeço, dessa forma, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo parte deste caminho de crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada mundialmente com alto impacto dentre a população menos favorecida, principalmente em países em desenvolvimento. O arsenal terapêutico é restrito, ultrapassado e provoca efeitos adversos graves, podendo causar até a morte. Além disso, estudos mostram que há grande resistência do parasita ao tratamento. Nesse sentido, foram racionalmente planejados e sintetizados 18 novos derivados dialquilfosforilhidrazonas (4a - 4o) e avaliados contra espécies de *Leishmania*. Inicialmente, foi avaliado o efeito desses compostos contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis in vitro*. Observou-se que todos os compostos apresentaram atividade contra esses parasitos, exceto os compostos 4a, 4c e 4e. Para avaliar a toxicidade destes compostos contra células de mamíferos, foi realizado o ensaio de MTT em macrófagos J774. Nesse ensaio nenhum derivado apresentou citotoxicidade na concentração avaliada (100 mM), exceto 4o, que foi tóxico para aproximadamente 20% das células tratadas. Em seguida, utilizando os parâmetros de CI_{50} , E_{max} e citotoxicidade, foram escolhidos os compostos 4m e 4n para os testes subsequentes. Esses compostos foram avaliados *in vitro* no ensaio de amastigota. Nesse teste, a média do número de parasitas por macrófago, a porcentagem de macrófagos infectados e o índice de infecção dos macrófagos por *L. amazonensis* foram reduzidos de forma dependente de dose por ambos os compostos, semelhante ao fármaco padrão Miltefosina. Uma vez que estas moléculas apresentaram atividade leishmanicida *in vitro*, foi avaliado o efeito de 4m e 4n no modelo de leishmaniose cutânea em camundongos, que mimetiza a doença em humanos. O tratamento oral com ambos os compostos promoveu a cicatrização total de nódulos e úlceras nas orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis*, porém apenas o tratamento com 4n reduziu a carga parasitária no local do inóculo. Além disso, nenhum dos compostos interferiu na carga parasitária sistêmica, uma vez que eles não reduziram os níveis dos parasitas nos linfonodos drenantes. O efeito de 4m e 4n foi também avaliado contra *L. chagasi*, causadora da forma visceral da doença. Inicialmente, foram realizados ensaios *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*. Semelhante ao que foi observado anteriormente, 4m e 4n foram ativos contra ambas as formas de *L. chagasi*. Além disso, por meio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as formas promastigotas tratadas com 4m apresentaram múltiplos flagelos, formas anômalas e múltiplos septos, enquanto o tratamento com 4n induziu uma redução do corpo celular das promastigotas e a formação de múltiplos septos. No modelo de leishmaniose visceral em hamsters (*Mesocricetus auratus*), 15 dias após os tratamentos, o peso dos órgãos viscerais (fígado e baço) foi avaliado. Embora esse tratamento não tenha reduzido o peso dos órgãos, reduziu a carga parasitária no baço, o que indica um efeito oral leishmanicida dos compostos 4m e 4n contra a forma visceral. Adicionalmente, foi observado que o tratamento com 4m e 4n não induziu hepatotoxicidade nem nefrotoxicidade, uma vez que os níveis de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), ureia e creatinina não estavam elevados após o tratamento. Em conjunto, esses dados indicam que os compostos dialquilfosforilhidrazonas são ativos contra espécies de *Leishmania*, principalmente os compostos 4m e 4n, que são ativos por via oral contra leishmaniose cutânea e visceral. Indicando que estes podem ser considerados novos protótipos para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Dialquilfosforilhidrazonas; *Leishmania* sp.; Leishmaniose Cutânea; Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a worldwide neglected disease with high impact among the underprivileged population, especially in developing countries. The therapeutic arsenal is limited, outdated and causes serious side effects and can even cause death. In addition, studies show that there is great resistance of the parasite to treatment. In this regard, 18 (4a - 4o) new dialkylphosphorylhydrazones compounds were synthesized and evaluated against the parasites *Leishmania* species. Initially, we evaluated the effect of these compounds against *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes in vitro. It was observed that all of compounds showed activity against these parasite, except 4a, 4c and 4e. In order to assess a potential toxicity against mammalian cells, MTT assay were performed in J774 macrophages treated with compounds. All The compounds showed low cytotoxicity with LC₅₀ values >100 mM, except for 4o, which was toxic to approximately 20% of the treated cells. Using the EC₅₀, E_{max} and cytotoxicity parameters, 4m and 4n compounds were chosen for the subsequent tests. These compounds were tested anti-amastigote assay in vitro. In this test, the average of the number of parasites per macrophage, the percentage of infected macrophages and infection index of *L. amazonensis*-infected macrophages were reduced dose dependently by both compounds, similar to standard drug miltefosine. Since these compounds showed anti-leishmania activity in vitro, later it was tested 4m and 4n anti-leishmania effect in mouse model of cutaneous leishmaniasis, that mimics human disease. In this assay, the oral treatment with both compounds caused a complete healing of nodules and ulcers in *L. amazonensis*-infected mice ears, but the control of parasite burden at the inoculation site was reduced only in the case of treatment with 4n. On the other hand, none of two compounds interfered in systemic parasite burden, once they did not reduce parasite levels in draining lymph nodes. Thereafter, we also evaluate 4m and 4n effect in *L. chagasi*-induced visceral leishmaniasis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Firstly, in vitro assays against promastigotes and amastigotes form of *L. chagasi* were performed. Similar to observed previously, 4m and 4n were active against both *L. chagasi* forms. In addition, by scanning electron microscopy, it was observed that promastigotes treated with 4m compound presented multiple flagellae, aberrant shapes and multi-septation; while 4n treatment caused cell body shrinkage and multi-septation. In *in vivo* test, 15 days after oral treatment with 4m and 4n, it was evaluated the visceral organs weight (spleen and liver). Despite this treatment did not reduce organs weight, it reduced the parasite burden in spleen, which indicate oral effect of 4m and 4n against visceral leishmaniasis in mice. Also, it was observed that 4m and 4n treatment did not induce hepatotoxicity and nephrotoxicity, since they did not increase the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and creatinine. Taken together, these data indicate that dialkylphosphorylhydrazones compounds are active against *Leishmania* species, mainly 4m and 4n compounds, which are orally active against cutaneous and visceral leishmaniasis. This indicate that 4m and 4n could be new lead compounds therapeutically useful against leishmaniasis.

Key words: Dialkylphosphorylhydrazones compounds; *Leishmania* sp.; cutaneous leishmaniasis; visceral leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do planejamento racional dos derivados dialquilfosforilhidrazona.....	15
Figura 2 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> durante o repasto sanguíneo.....	17
Figura 3 - Formas evolutivas do protozoário <i>Leishmania</i>. A: promastigota; B: amastigota.....	19
Figura 4 - Ciclo biológico e modo de transmissão de <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 5 - Endemicidade Mundial da Leishmaniose Cutânea (A) e Visceral (B)	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E _{max}	Efeito máximo
G6P	Glicose-6-fosfato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HK	Hexoquinase
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon γ
LC	Leishmaniose cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NK	“Natural killer” (matadoras naturais)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
Th1	Célula T “helper” (auxiliar) 1
Th2	Célula T “helper” (auxiliar) 2
Th17	Célula T “helper” (auxiliar) 17
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF- β	Fator de crescimento transformador β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Leishmanioses	16
2.2 Vetores e hospedeiros	17
2.3 Agente etiológico e Ciclo de vida	18
2.4 Interações com o hospedeiro.....	20
2.5 Epidemiologia	22
2.6 Aspectos clínicos e histopatológicos das leishmanioses	25
2.6.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	25
2.6.2 Leishmaniose Visceral (LV).....	26
2.7 Arsenal Terapêutico Atual.....	27
2.7.1 Antimoniais	28
2.7.2 Anfotericina B	29
2.7.3 Pentamidina	30
2.7.4 Miltefosina.....	30
2.8 Resistência ao tratamento	31
2.9 Modelos experimentais utilizados em testes de novos fármacos para leishmaniose ..	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4 ARTIGO I DERIVADO DA TESE.....	37
5 ARTIGO II DERIVADO DA TESE	49
6 DISCUSSÃO	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A.....	106
ANEXO B.....	107

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a organização Médicos Sem Fronteiras propuseram há cerca de uma década o termo “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs), referindo-se àquelas enfermidades, geralmente transmissíveis, que apresentam maior ocorrência nas regiões tropicais dos países em desenvolvimento (WHO, 2015; DAUMERIE, DENIS; SAVIOLI, 2010). As DTNs mais importantes incluem leishmanioses, doença de Chagas, hanseníase, dengue e malária, além de diversas parasitoses (MOREL, 2006).

Estas doenças têm como características comuns a endemicidade elevada e são a principal causa de morbidade e mortalidade nas áreas rurais e urbanas menos favorecidas dos países da África, Ásia e América Latina, que concentram os maiores bolsões de pobreza do mundo. O impacto individual e coletivo das DTNs é grande: reduzem a qualidade de vida e a produtividade da população afetada, agravam a pobreza e contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade (DIAS et al., 2009). Contudo, o prejuízo causado por estas doenças não pode ser calculado considerando apenas a mortalidade. Em geral, elas causam muito mais incapacidades, gerando custos a curto e longo prazo para os governos (DAUMERIE, DENIS; SAVIOLI, 2010).

Apesar da importância econômica e social destas enfermidades pouco tem sido o progresso feito no conhecimento básico, no desenvolvimento e na descoberta de novos fármacos para estas doenças, de maneira geral as opções terapêuticas são insuficientes, foram desenvolvidas na metade do século passado e apresentam problemas como baixa eficácia e elevada toxicidade (GUIDO, OLIVA, 2009).

Além disso, as doenças infecciosas representam baixa prioridade para a indústria farmacêutica, o investimento em P&D de novos fármacos é muito alto e o retorno é baixo uma vez que essas doenças acometem uma parcela da população de pouco poder aquisitivo (TROUILLER et al., 2002). A negligência é também evidente em termos monetários, uma vez que estas doenças recebem uma proporção muito pequena dos recursos públicos para a saúde (LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

No caso particular da leishmaniose, que é uma doença que causa lesões na pele, deformações faciais e até mesmo a morte, na sua variante clínica mais grave, a terapêutica atual é composta por um arsenal restrito e ultrapassado. Os fármacos de primeira escolha são

antimoniais pentavalentes utilizados desde 1940, os quais além de apresentarem várias restrições para o uso devido aos graves efeitos colaterais possuem alto índice de resistência, dificuldades de administração e baixa adesão dos pacientes ao tratamento (RATH, 2003). Em alguns casos, outros fármacos como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são usadas como segunda opção em casos resistentes, mesmo com baixa eficácia e a alta toxicidade desses compostos para o hospedeiro (AMEEN, 2010).

Mais recentemente foi descoberta a miltefosina, inicialmente desenvolvida para o tratamento do câncer, licenciada em alguns países como primeiro fármaco oral para o tratamento da leishmaniose (KEDZIERSKI, 2009). No entanto, apesar de apresentar elevada eficácia para *L. chagasi*, também possui efeitos adversos graves como teratogenicidade e já apresenta inúmeros casos de resistência (MALTEZOU, 2009). Há também a anfotericina B liposomal que como a miltefosina apresenta alto custo e elevada toxicidade (ROY et al., 2011).

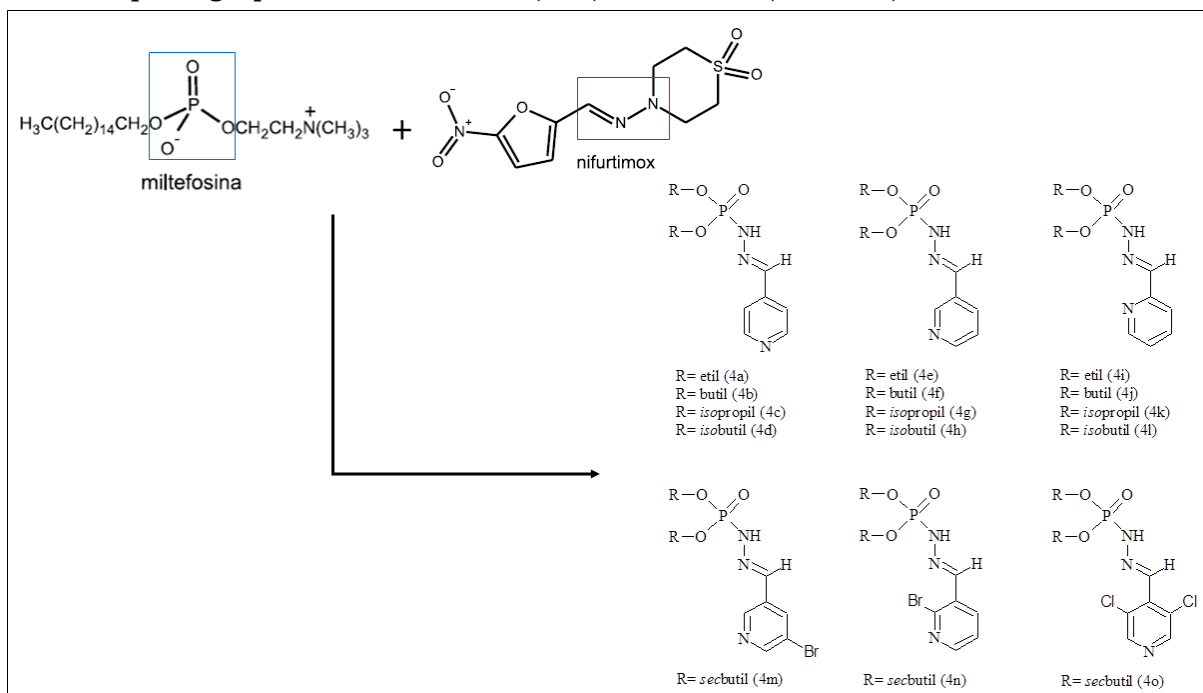
Face ao panorama exposto, fica evidente a necessidade de buscar novas opções terapêuticas para a leishmaniose. A descoberta de novos fármacos, preferencialmente de administração oral, seguros, efetivos e de baixo custo, é um desafio colocado aos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de novos protótipos de fármacos aplicáveis na quimioterapia antiparasitária.

Considerando este cenário foram desenvolvidos derivados dialquilfosforilhidrazonas para serem avaliados quanto à atividade leishmanicida. Tais moléculas foram planejadas e sintetizadas racionalmente segundo os conceitos de hibridação molecular, que é uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz para arquitetar racionalmente estruturas moleculares de novos compostos protótipos. Nesse sentido, foi conjugado o grupo funcional hidrazônico do nifurtimox, que é um antichagásico (não mais utilizado no Brasil) ativo contra tripanossomatídeos, com o grupo fosfato da miltefosina, uma droga anticâncer alquilfosfolipídica ativa contra *Leishmania*. Tais compostos foram ativos numa triagem inicial realizada por Nogueira e colaboradores (2011) contra *Leishmania amazonensis* e *Tripanossoma cruzi*. No entanto, estudos de docking indicaram a necessidade de realizar melhorias na estrutura molecular inicial. A partir daí, uma série inédita

dialquilfosforilhidrazonas foi sintetizada para serem avaliados quanto à atividade leishmanicida.

Desta forma, em continuidade aos esforços de pesquisa que o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI-UFAL) vem desenvolvendo na busca por novos protótipos imunomoduladores e antiparasitários úteis ao tratamento de doenças negligenciadas, bem como devido ao elevado potencial terapêutico de dialquilfosforilhidrazonas, realizou-se no presente trabalho a avaliação farmacológica de uma nova série de 18 derivados dialquilfosforilhidrazonas, planejados e sintetizados por pesquisadores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), visando à descoberta de novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose.

Figura 1 - Esquema do planejamento racional dos derivados dialquilfosforilhidrazonas. Em destaque os grupos funcionais fosfato (azul) e hidrazona (vermelho).



2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses abrangem um grupo de doenças que são causadas pela infecção de protozoários do gênero *Leishmania*. A doença é transmitida aos seres humanos por flebotomíneos e exibe diferentes manifestações clínicas, que vão desde infecção assintomática ou subclínica a formas desfigurantes de leishmaniose cutânea ou mucosa. Além disso, há a forma visceral que é potencialmente fatal (ROSS, 1903; REMME et al., 2002; DESJEUX, 2004a). Devido ao vasto espectro de manifestações esta doença é considerada polimórfica e os sintomas estão relacionados com a espécie do parasito, fatores eco-epidemiológicos, efeitos imuno-reguladores da saliva do mosquito, características genéticas, imunidade e estado nutricional do hospedeiro (DE CAMPOS et al., 2010; LIMA, TITUS, 1996, MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

De maneira geral, tem havido ao longo dos anos uma intensa subestimação das leishmanioses como reais problemas de saúde, agravada pelas dificuldades enfrentadas por países que possuem escassos recursos para controlar doenças infecciosas, proporcionando o avanço destas enfermidades (WHO, 2010). Por esse motivo, as leishmanioses constituem atualmente, o segundo grupo mais comum de doenças infecciosas depois da malária, e estão entre as mais importantes doenças infecciosas tropicais combatidas pela OMS (ABATH, 2000; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b). Os encargos que as leishmanioses trazem persistem devido à existência de grandes obstáculos técnicos, gerenciais, financeiros e políticos ao controle dessas doenças, permitindo que elas se mantenham como grave problema da saúde pública, sendo bastante onerosas para o desenvolvimento social e para a economia de vários países (DIAS, DESSOY, 2009; HOMEDES, 1995; WHO, 2010).

Por serem doenças negligenciadas pelas autoridades competentes, atualmente, as leishmanioses permanecem como doenças inevitáveis e incontroláveis. Para alguns autores o perfil epidemiológico está mudando para um aumento da prevalência e, portanto, novos instrumentos e abordagens para alcançar seu controle são urgentemente necessários (LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Além disso, as opções terapêuticas são insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e emergência de cepas resistentes (GUIDO, OLIVA, 2009).

2.2 Vetores e hospedeiros

A leishmaniose é transmitida, em mamíferos, principalmente por vetores da família *Psychodida*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (READY, 2010; SHUKLA et al., 2010). São insetos dípteros denominados flebotomíneos e popularmente conhecidos como mosquito-palha, asa-dura, birigui ou cangalhinha. Eles possuem coloração clara e o corpo revestido por pêlos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento (Figura 1). Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética, mas apenas as fêmeas se alimentam de sangue para o desenvolvimento de seus ovos (FORATTINI, 1973). Estes vetores se distribuem principalmente em regiões de climas quentes e temperados, apresentam atividade crepuscular e pós-crepuscular e abrigam-se durante o dia em lugares úmidos, escuros e protegidos dos ventos (BORASHI & NUNES, 2007).

Figura 2 - *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo.



Fonte: Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia>

O gênero *Lutzomyia* é responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas. Dentro deste gênero 350 espécies já foram catalogadas e se encontram distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina, das quais pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica (GILL et al., 2003). As principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar americana são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei*. Havendo, entretanto, o registro de infecção natural de outras espécies, como *Lu. neivai* e *Lu. fischeri* (PITA-PEREIRA et al., 2009; ROCHA et al., 2010). O principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*

(BASANO; CAMARGO, 2004). Algumas espécies além de estarem envolvidas na transmissão da leishmaniose, são hospedeiras de outros microrganismos, como vírus, nematoides, bactérias e fungos (SHAW et al., 2003).

Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Existem várias discussões sobre os conceitos de hospedeiros e reservatórios (ASHFORD, 1996; CHAVES et al., 2007; HAYDON et al., 2002). O termo hospedeiro é bem abrangente e diz respeito a uma espécie que abriga ocasionalmente um parasito oportunista que pode ou não comprometer sua sobrevivência (AVILA-PIRES, 2005).

De acordo com Ashford (1996), a relação reservatório-parasito é extremamente complexa, haja vista que diversos fatores ambientais podem interferir nela, tornando-a então dinâmica. Os reservatórios para a doença variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão. Pequenos roedores, marsupiais e endentados são encontrados infectados naturalmente pelo parasito (ARIAS, NAÏFFI, 1981; BRANDÃO-FILHO et al., 1994, 2003; SILVEIRA et al., 1991), assim como primatas (LAINSON, SHAW, 1998). Ao mesmo tempo, o homem e alguns animais domésticos como cães (TOLEZANO et al., 2007), equinos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003) e felinos (DANTAS-TORRES et al., 2006) são considerados hospedeiros acidentais.

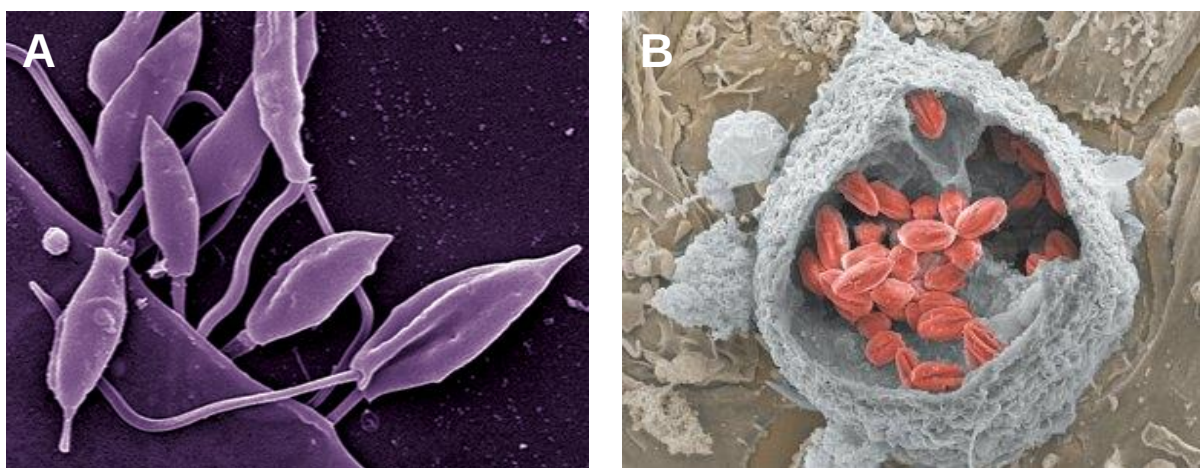
2.3 Agente etiológico e Ciclo de vida

O gênero *Leishmania* (Filo protozoa: Ordem Kinetoplastida: Família: Trypanosomatidae) descrito por Ross em 1903 é formado por protozoários unicelulares e heteróxeos, com cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 infectam o homem e causam a doença (ASHFORD, 2000). Estes parasitos são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o tipo de desenvolvimento dos flagelados no trato digestivo dos flebotomíneos (LAINSON, RYAN, SHAW, 1987). O subgênero *Viannia* possui desenvolvimento predominante no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Já os do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção suprapilária) (LAINSON, SHAW, 1998).

Durante o seu ciclo de vida digenético (heteroxênico), que inclui uma fase no tubo digestivo do vetor flebotomíneo, e outra em diferentes hospedeiros vertebrados, a *Leishmania* apresenta-se sob duas formas evolutivas: promastigotas e amastigotas (Figura 2). A primeira

caracteriza-se por ser alongada, móvel, provida de flagelo livre, se desenvolve naturalmente apenas no inseto vetor e multiplica-se por divisão binária longitudinal dentro do seu tubo digestivo. A amastigota é imóvel, arredondada, com flagelo rudimentar não exteriorizado, que se localizam em vacúolos parasitóforos de células fagocitárias de vertebrados, sobretudo macrófagos (BALANCO et al., 1998).

Figura 3 - Formas evolutivas do protozoário *Leishmania*. A: promastigota; B: amastigota.



- A. Promastigotas de *L. amazonensis* aderidas ao intestino do inseto vetor. Fonte: FIOCRUZ – Portal de Periódicos: <http://www.periodicos.fiocruz.br/pt-br/content/semana-nacional-de-controle-e-combate-%C3%A0s-leishmanioses>
- B. Amastigotas de *L. amazonensis* (em vermelho) dentro de vacúolos parasitóforos em macrófago de camundongo (cinza).
Fonte: Blog da Sociedade Brasileira de Parasitologia:
<https://blogdeparasitologia.wordpress.com/2014/05/06/parasita-da-leishmaniose-enngana-o-sistema-imunologico>

A manutenção da infecção por *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados se dá por meio da multiplicação de formas amastigotas dentro de células do sistema fagocítico mononuclear. Embora formas amastigotas possam circular no sangue dentro de células que fazem parte desse sistema, é na pele sã ou lesionada que estão presentes a maior parte das células infectadas (ALMEIDA et al., 2003; CRUZ et al., 2005).

O ciclo começa quando o inseto vetor se contamina com sangue de um hospedeiro contendo macrófagos infectados com amastigotas. Devido às peças bucais relativamente curtas dos flebotomíneos não é possível uma penetração profunda nem punção direta dos

vasos. Por isso, os vetores rasgam a pele da vítima e dilaceram os tecidos provocando uma pequena hemorragia, da qual drenam o sangue, células e linfa dos pequenos capilares rompidos. Dessa maneira, estes insetos podem ingerir amastigotas de *Leishmania* ali presentes (LEIBY, 1994; SOARES & TURCO, 2003).

As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, logo se diferenciam em promastigotas ainda no meio da massa de sangue por digerir. Tal transformação irá permitir que os parasitos sobrevivam à digestão que logo se iniciará (SACKS, KAMHAWI, 2001). A sobrevivência intracelular do parasito pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS, 1987), uma vez que estas formas se encontram melhor dotadas bioquimicamente e enzimaticamente para resistirem aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (MITTRA et al., 2013; PEARSON et al., 1983).

Durante esse processo de transformação, as promastigotas aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária. Após alguns dias transformam-se em promastigotas metacíclicos, estes são mais móveis, porém não têm a mesma capacidade de se multiplicar. As promastigotas metacíclicas, infectantes, migram para a probóscita do inseto e são inoculadas com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (SACKS; KAMHAWI, 2001).

As promastigotas sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e então infectam os macrófagos. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, local onde as promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem condições favoráveis para a sua diferenciação em amastigotas, que se dividem, lizam o macrófago parasitado e infectam novas células repetindo o ciclo (BATES, 1994; GANTT et al., 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001).

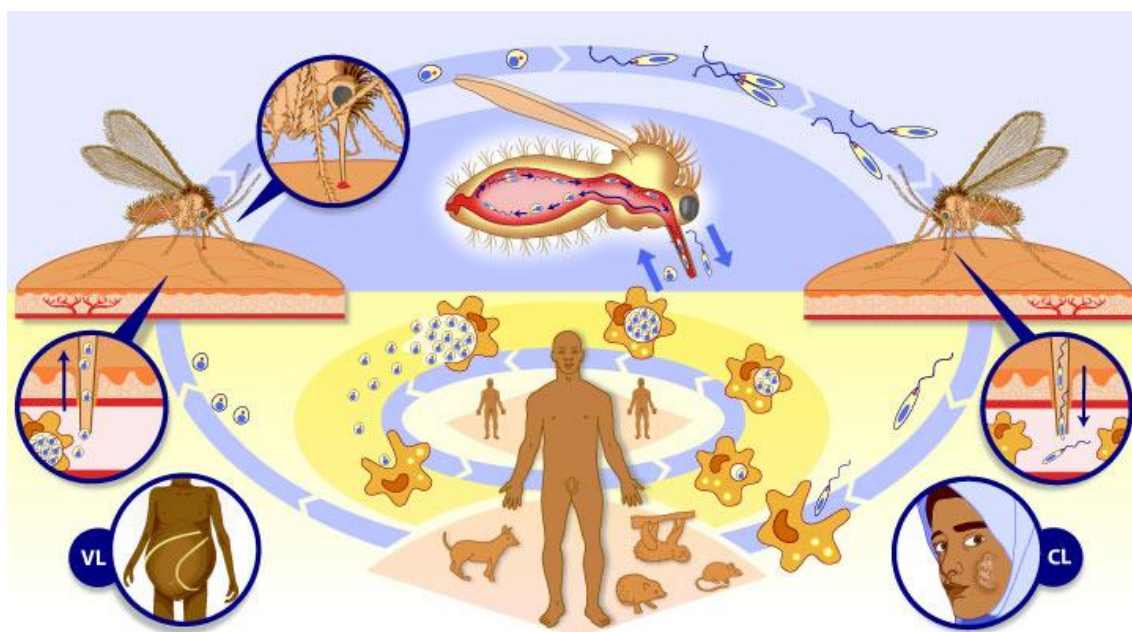
2.4 Interações com o hospedeiro

A evolução da doença infecciosa em um indivíduo envolve interações complexas de muitas moléculas (CHAKRABARTY, 1996; HICKS et al., 2000; ILG, 2000), bem como tipos celulares distintos entre os parasitas e o hospedeiro (WRIGHT; EL AMIN, 1989).

O sistema imune é capaz de responder de maneira particular e especializada a diferentes parasitas, sendo variável a magnitude e o tipo de resposta e frequentemente

determina a evolução e o prognóstico da infecção (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Diversos eventos levam ao desenvolvimento para a cura espontânea ou progressão dessas doenças (GRIMALDI JR; TESH, 1993; RIVAS et al., 2004), devendo-se salientar que a atuação dos fatores genéticos do hospedeiro vertebrado infectado são extremamente importantes durante o desenvolvimento das patologias resultantes da infecção com *Leishmania* spp. (RITTER et al., 2004; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; MURRAY et al., 2005; CABRERA et al. 1995; GRAB et al. 2004).

Figura 4 - Ciclo biológico e modo de transmissão de *Leishmania* spp - A figura mostra o repasto sanguíneo dos flebotomíneos e a aspiração de células de *Leishmania* spp. no sangue do hospedeiro infectado (humano ou animal). As células de *Leishmania* spp. se desenvolvem dentro do trato digestivo do inseto vetor até se transformarem na forma infectante. Esta forma é transmitida a outros hospedeiros durante um novo repasto sanguíneo, podendo causar as diferentes formas da doença.



Fonte: WHO: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>

Modelos de animais empregados no estudo da fisiopatologia das leishmanioses têm mostrado que essa enfermidade é mediada por imunidade adaptativa com a participação de células T. Um subtipo específico de linfócito T, denominado linfócito T auxiliar, está diretamente comprometido com a resposta imune desenvolvida contra esses parasitas. Este subtipo de linfócito T, caracteristicamente chamado de célula T $CD4^{+}$, pode ser subdividido

em duas subpopulações celulares, a Th1 e a Th2, que são de fundamental importância para a defesa e susceptibilidade do hospedeiro contra as infecções, respectivamente.

Inicialmente, as leishmanias multiplicam-se no interior dos macrófagos, podendo ser mortas no interior dessas células quando ativadas pelo interferon γ (IFN- γ) ou diretamente pelo contato com células T CD4⁺ específicas. A morte do parasito é promovida por mecanismo monoxidativos, intermediado pelo óxido nítrico e por seus metabólitos. O IFN- γ produzido pelas células Th1 ativa os macrófagos a destruir as amastigotas intracelulares. A IL-12, citocina importante produzida por células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, tem participação importante na resposta Th1 protetora, pois promove a diferenciação dos linfócitos Th1. Por outro lado, a resposta Th2, que predomina em um microambiente rico em IL-4, suprime a resposta Th1 e a respectiva ativação dos macrófagos (SILVA, 2003).

A subpopulação Th1 é capaz de eliminar os parasitas e conferir imunidade, prevenindo uma possível infecção posterior. Adicionalmente a essas, outras células especificamente envolvidas, após ativação via moléculas secretadas pelas células Th1, são as células T citotóxicas ou CD8⁺ e as “Natural Killers” (NK), que também estão envolvidas na imunidade contra as diferentes espécies de *Leishmania* (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). De maneira contrária, a subpopulação Th2 proporciona susceptibilidade à infecção e a progressão das doenças (AHMED et al., 2003; GAMA et al. 2004; GRIMALDI JR; TESH, 1993; MURRAY et al., 2005; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; SOUSSI et al., 2000).

2.5 Epidemiologia

De acordo com a OMS, as leishmanioses são um grupo de doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade, prevalentes em todos os países das regiões tropicais e subtropicais do mundo (GONTIJO & CAMARGO, 2003), exceto na Austrália, Nova Zelândia e algumas ilhas do Pacífico (Figura 4). Estima-se, para esta doença, uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, sendo que 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença em 98 países (WHO, 2014).

A leishmaniose visceral (LV) é encontrada em quase todos os continentes, com cerca de 500.000 mil casos novos registrados anualmente causam em torno de 30.000 mortes por ano. Infelizmente, esses dados são subestimados, uma vez que a afecção não é de notificação

compulsória em todos os países em que ocorre, e muitos não realizam vigilância ou outras investigações e não possuem um sistema de armazenamento de dados (ALVAR et al., 2012). Apesar disso, sabe-se que sua distribuição mundial é irregular, do total de casos mais de 90% ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014). Na América do Sul e Central, a LV ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos registrados ocorridos no continente americano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

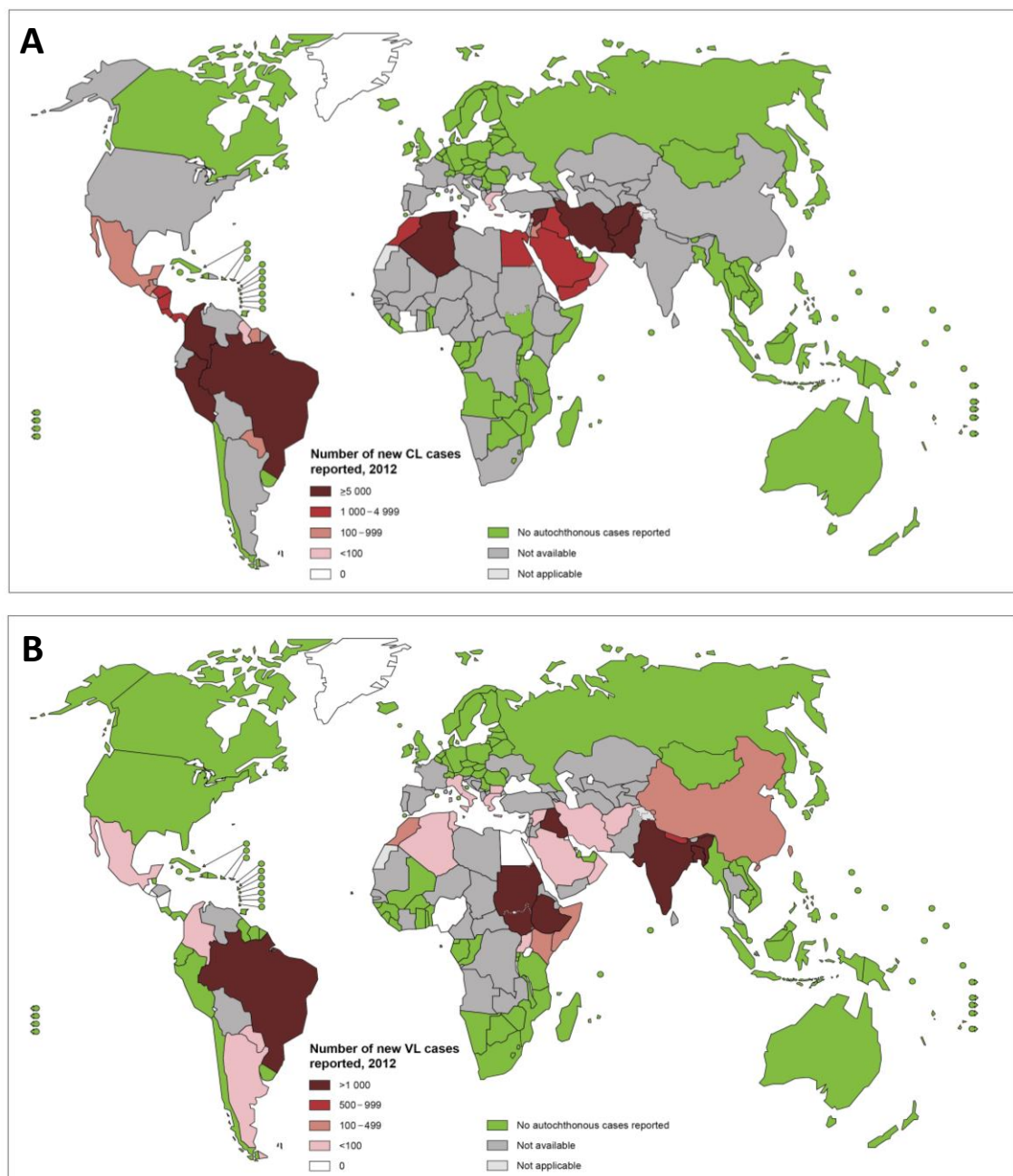
Já a forma tegumentar é mais amplamente disseminada, com cerca de 1,2 milhões de casos registrados por ano, distribuídos especialmente entre as regiões das Américas, Bacia do Mediterrâneo e a Ásia Ocidental. No entanto, dez países apresentam o maior número de casos estimados: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam 70 a 75% da incidência global estimada (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014). Apesar desta forma da doença não apresentar comumente ameaça a morte, durante a Guerra Irã-Iraque um milhão de pessoas foi infectada e os avanços do Estado Islâmico ficaram prejudicados.

Estas doenças são zoonoses em franca expansão geográfica no Brasil. Sua distribuição é assegurada em todo o território nacional com registros em todos os Estados. Devido à demora com que o paciente procura o serviço de saúde e o difícil diagnóstico por parte do próprio sistema, os números notificados talvez não traduzam a evolução destas doenças no País (BRASIL, 2000; NEGRÃO, FERREIRA, 2014). Além disso, a situação epidemiológica das Leishmanioses está mudando e se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte.

Inicialmente os estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses a caracterizavam como doenças exclusivamente rurais. Estas doenças, que eram restritas a comunidades com baixo grau de instrução, com o passar do tempo, também se tornaram comuns em áreas suburbanas e urbanas (GAMA et al., 1998; GONTIJO, C.; MELO, 2004). Essa nova distribuição resultou de problemas que envolvem aspectos ambientais, sociais e econômicos, possivelmente associados aos processos de fluxos populacionais em massa das áreas rurais para os centros urbanos, gerando um potente fator de risco para a disseminação da doença: a urbanização descontrolada (DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; GONTIJO, C.; MELO, 2004; WHO, 2010).

Dentro desse contexto, a migração tem sido a principal causa da disseminação da leishmaniose, e, na ocorrência de sérias epidemias que afetam principalmente crianças. As péssimas condições sanitárias e os inadequados serviços de saúde a disposição de indivíduos pobres ampliam o problema da desnutrição que incrementam as chances de infecção, e, consequentemente, a alta taxa de mortalidade entre os menores de 5 (cinco) anos de idade (ARIAS et al., 1996; CAMPOS JR, 1995; DYE; WILLIAMSON, 1993; REY et al., 2005).

Figura 5 - Endemicidade Mundial da Leishmaniose Cutânea (A) e Visceral (B).



Fonte: World Health Organization: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps

Outro agravante são as alterações nos perfis epidemiológicos das leishmanioses, sobretudo a LV, paralelo à epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A associação entre as enfermidades é relativamente recente e os casos têm aumentado Brasil e no mundo (ALBUQUERQUE et al., 2014). Muitos autores relatam uma superposição simultânea entre o aparecimento de indivíduos com leishmaniose e a ocorrência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) especialmente entre os usuários de drogas intravenosas (DESJEUX, 2004a; HANDMAN, 2001; HERWALDT, 1999; ROBERTS et al., 2000). Este fenômeno tem ocorrido devido a ruralização da AIDS concomitante a urbanização das leishmanioses, que indica a emergência desta doença parasitária como uma importante infecção oportunista ao HIV. O impacto epidemiológico desta coinfeção é tão significativo que a OMS cogita introduzir a LV como doença indicadora de AIDS (MALAFAIA, 2008; SOUSA-GOMES et al., 2011).

2.6 Aspectos clínicos e histopatológicos das leishmanioses

Considerando que diferentes espécies do parasito podem ser transmitidas por várias espécies do vetor, para diferentes hospedeiros vertebrados em diversos ecossistemas, a infecção pode manter-se de forma assintomática ou resultar em um leque espectral de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas que pode variar desde as formas cutâneas até a forma visceral.

2.6.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, causada por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. No Brasil, esta doença é uma das afecções dermatológicas que merece atenção, devido à sua magnitude, o risco de ocorrência de deformidades que podem produzir no ser humano e o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2007).

As manifestações clínicas da LTA são diversas e o processo infeccioso depende de fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro (GRIMALDI, TESH, 1993). A sobrevivência do parasito está relacionada à evasão deste ao sistema imune do hospedeiro, podendo causar doença assintomática ou apresentar um espectro de aspectos clínicos (SACKS, SHER, 2002; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002). A LTA pode ocorrer de forma

localizada, caracterizada por lesão única; disseminada, quando apresenta numerosas lesões em diferentes regiões do corpo; difusa, em que as lesões se apresentam de forma nodular; e na forma mucocutânea em que pode ocorrer a destruição do septo nasal e boca, resultando em deformidades severas. Há ainda a forma recidivante, com lesão ativa na área próxima a borda da lesão curada que se desenvolve com ou sem tratamento após um período de tempo variável. Na maioria dos casos, observa-se uma doença com lesão ulcerada única (GONTIJO, CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992).

A leishmaniose cutânea (LC) pode ser causada por diversas espécies do parasito. Nas Américas é freqüentemente causada pelas espécies *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*; no Velho Mundo as espécies *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* são as responsáveis por esta forma clínica (GRIMALDI, TESH, 1993; WILLIAMS, 1995).

Esta doença é caracterizada por úlceras rasas, localizadas exclusivamente na pele, com bordas elevadas em moldura, fundo granulomatoso, com ou sem exsudato e, em geral, são indolores (DA-CRUZ et al., 2002; GONTIJO, CARVALHO, 2003). Aparecem, predominantemente, nas áreas corpóreas descobertas e iniciam-se no local em que as formas promastigotas infectantes foram inoculadas. Normalmente, apresentam cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (GRIMALDI e TESH, 1993; DESJEUX, 2004). No entanto, a forma cutânea pode se tornar crônica e disseminar progressivamente afetando linfonodos e causando metástases (ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2000).

A forma cutânea-difusa é caracterizada por lesões nodulares ou papulosas sobre toda região do corpo, são graves e deformantes, ricas em parasitos. É uma enfermidade crônica, altamente resistente à quimioterapia, não existindo cura. É comum ocorrer em indivíduos com deficiência imunológica e está associada a *L. (L.) amazonensis* (BOMFIM et al., 1996; CÁCERES-DITTMAR et al., 1993). A leishmaniose mucocutânea é a forma mais agressiva e mutilante, caracterizada por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e/ou laringe. É na maioria das vezes, secundária as lesões cutâneas, surgindo por disseminação hematogênica meses ou anos após a resolução das lesões de pele. O risco de deformidades permanentes é considerável e o diagnóstico precoce é essencial para a eficácia terapêutica e para evitar sequelas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; MARSDEN, 1986; MARZOCHI, 1992).

A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se por lesões tardias, que surgem geralmente meses ou anos após a cura de uma lesão cutânea (WALTON, 1987), preferencialmente na região auricular ou nasal que se estende progressivamente aos tecidos moles com inflamação e ulceração. Posteriormente, a lesão se aprofunda para destruir o tecido em vários anos. Nestas lesões, poucos parasitas são encontrados (MARKELL et al., 2003). A espécie mais destrutiva, causadora da forma mucocutânea é a *L. brasiliensis* (ABRAMSON et al., 1995).

2.6.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Diferentes espécies de *Leishmania*, como *L. donovani* (comumente encontrada na Índia e África), *L. infantum* (observada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia) e *L. chagasi*, normalmente presente na América do Sul, apresentam tropismo pelas vísceras da cavidade abdominal dos indivíduos humanos, o que leva a alterações marcantes nas funções de órgãos vitais como baço, fígado e medula óssea (BAILY; NANDY, 1994). No Brasil esta doença é uma importante causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas, como a região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Com relação aos sintomas a LV é caracterizada principalmente por surtos irregulares de febre e esplenomegalia. Os sintomas variam, podendo ocorrer palidez, anemia, trombocitopenia, hemorragias digestivas e perda de apetite com desnutrição grave (FURTADO, 1994). O curso da doença pode ser lento durante anos ou surgir de maneira aguda, rápida e fatal (HANDMAN, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

De acordo com o Ministério da Saúde a LV pode ser classificada em cinco classes: 1) Inaparente: sem manifestações clínicas, porém com resultados sorológicos ou parasitológicos positivos; 2) Oligossintomática: com presença de febre baixa intermitente, prostração e discreta esplenomegalia, quando detectada; 3) Aguda: com manifestação súbita e febre como o primeiro sintoma, observando-se hepatoesplenomegalia, prostração, emagrecimento e hemorragia; 4) Clássica: com quadro clínico prolongado, apresentando comprometimento do estado nutricional, palidez mucocutânea, hepatoesplenomegalia acentuada, edema de membros inferiores, astenia, prostração e caquexia, além de leucopenia, plaquetopenia, hiperglobulinemia e hipoalbumemia; 5) Refratária: evolução da manifestação clássica, a qual não responde ou responde parcialmente ao tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Esta variedade de manifestações clínicas semelhantes à de outras enfermidades infectocontagiosas dificulta o diagnóstico precoce desta doença (GONTIJO, MELO, 2004).

2.7 Arsenal Terapêutico Atual

A falta de interesse das companhias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos faz com que a terapêutica da leishmaniose seja, em geral, realizada com medicamentos pouco eficazes e com alta toxicidade aguda (SHI et al., 2011). Até o presente momento, o tratamento básico é feito com fármacos de primeira geração tais como o estibogluconato sódico e o antimoniato de meglumina. Embora esses fármacos tenham sido utilizados pela primeira vez em 1912 eles têm sido até hoje a base da quimioterapia em países endêmicos, especialmente no subcontinente indiano (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

Outros fármacos como anfotericina B (convencional ou lipossomal) e miltefosina estão sendo utilizados no tratamento da doença com maior eficácia e potencial para a cura, entretanto, são comparativamente mais caros do que o antimônio genérico. Além destes, a paromomicina e a pentamidina têm mostrado alguma utilidade e podem ser um suplemento potencial no regimento de drogas, mas a sua utilização e disponibilidade em regiões endêmicas da doença são limitadas (DAVIS, KEDZIERSKI, 2005; MISHRA et al., 2009). A seguir, serão apresentados cada um destes.

2.7.1 Antimoniais

Dentre os compostos de antimoniais utilizados no tratamento da leishmaniose destacam-se os complexos de antimônio trivalentes (Sb^{III}), tais como o tartarato antimonial de potássio (Tártaro emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen[®]), tioglicolato de sódio e antimônio (RATH et al., 2003). No entanto, devido a cardiotoxicidade e intolerância gastrointestinal dos antimoniais trivalentes são os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) que apresentam maior uso terapêutico (SERENO et al., 2000). Dentre os antimoniais mais consumidos em nível mundial estão o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (RATH et al., 2003). Embora estes fármacos permaneçam a base da terapia leishmanicida há décadas, é ainda incerto o seu mecanismo de ação, a sua estrutura e até mesmo a identidade do componente biologicamente ativo (ROBERTS, RAINEY, 1993).

Alguns trabalhos sugerem que o antimônio compromete o potencial redox tiol da célula, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e inibição de tripanotona redutase (WYLLIE, CUNNINGHAM, FAIRLAMB, 2004). Além disso, segundo Chai e colaboradores (2005) o Sb^{V} forma complexos com purinas do parasito levando a eventos deletérios em toda bioquímica do DNA. Outra hipótese diz respeito à capacidade do Sb^{V} em formar complexos com nucleotídeos, inibindo a topoisomerase e interferindo no metabolismo do parasito (DEMICHELI et al., 2002).

Foi também observado que para o Sb^{V} ser ativo contra *Leishmania* é preciso entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana fagolisossomal e agir contra amastigotas intracelulares. É também muito provável que o Sb^{V} seja convertido em sua forma trivalente (Sb^{III}) para se tornar ativo, o que sugere que o Sb^{V} seja um pró-fármaco (SHAKED-MISHAN et al., 2001). No entanto, não está claro o local exato de onde ocorre esta conversão. De acordo com alguns trabalhos é possível que ocorra tanto nos macrófagos do hospedeiro como nas formas amastigotas do parasito (ROBERTS, RAINEY, 1993; SERENO et al., 1998).

Ao longo dos anos diferentes regimes de dosagens foram propostos numa tentativa de alcançar a menor dose terapêutica eficaz e com menos efeitos colaterais. Atualmente a OMS preconiza que as doses de antimoniais não sejam maiores que 20 mg/kg/dia, não ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos e renais são efeitos colaterais freqüentemente associados ao uso destes fármacos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Ainda que o antimoniato de metilglucamina seja bastante eficaz em regredir rapidamente as manifestações clínicas e hematológicas da doença a crescente incidência de casos de resistência tem sido uma séria preocupação para a sua utilização em áreas endêmicas (SINGH, PANDEY, SUNDAR, 2006). Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento de formas de parasitos resistentes (RATH et al., 2003; SERENO; LEMESRE, 1997).

O aumento da incidência de falha terapêutica nos últimos anos vem se tornando uma grande ameaça, principalmente aos pacientes co-infectados com *Leishmania* e HIV. A principal causa dessa emergência é o mau uso dos fármacos, que leva à seleção de pequenas populações resistentes (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Esse fenômeno de falha

terapêutica é complexo, uma vez que há vários fatores envolvidos: características do hospedeiro, como genética e resposta imunológica; fatores técnicos, como a qualidade do fármaco e a via de administração parenteral; a duração do tratamento; e a biologia do parasito, como uma variabilidade intrínseca em relação à susceptibilidade ao antimônio (GROGL et al., 1989).

Sendo assim, os principais pontos negativos da terapia com antimoniais são os altos índices de desenvolvimento de resistência, os regimes de tratamento com altas doses por longos períodos, administração parenteral, além de elevada toxicidade renal e cardíaca (PLANO et al., 2011).

2.7.2 Anfotericina B

É um antimicrobiano macrolídeo largamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas que pertence ao grupo de fármacos leishmanicidas de segunda linha usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais. Nos Estados Unidos da América a anfotericina B é o único fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento da leishmaniose (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012). O mecanismo de ação, assim como da toxicidade, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito e hospedeiro, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, levando à morte do parasito (COHEN, 1998).

Apesar de sua eficácia a anfotericina B também é tóxica e está associada a efeitos secundários graves. Apesar disso, em áreas em que existem níveis elevados de resistência ao Sb^V , a anfotericina B permanece como fármaco de escolha (LANIADO-LABORIN; VERGAS, 2009). Os efeitos colaterais adversos que ameaçam a vida e dificultam seu uso são a hipocalcemia, nefrotoxicidade e anafilaxia na primeira dose, que não são incomuns. No entanto, alterações em sua formulação, encapsulada em lipossomas, mostraram reduzir a toxicidade, porém o alto custo limita sua utilização (PLANO et al., 2011).

2.7.3 Pentamidina

A pentamidina pertence ao grupo das diaminas aromáticas e sua atividade terapêutica foi descoberta casualmente. Basselin e colaboradores em 1996 descreveram que este fármaco,

utilizado na clínica contra casos de leishmaniose resistente aos antimoniais pentavalentes, apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos (BERMAN, 1997).

Apesar de ser menos tóxica que os antimoniais têm sido observados efeitos adversos significantes após sua administração. (AMATO et al, 2000). Dentre os principais efeitos estão hipoglicemia, hipotensão, mialgias, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade. Outros efeitos colaterais comuns são dor no local da injeção, gosto metálico na boca, dor de cabeça, congestão e dispnéia. Além disso, há relatos de morte repentina e também foram descritos casos de resistência ao tratamento, o que limita seu emprego terapêutico (RATH et al., 2003; BRAY et al., 2003).

O regime terapêutico consiste na administração de uma dose de 4mg/kg/dia deste fármaco, por via intramuscular, três vezes por semana em dias alternados, até que haja a cura do paciente, não excedendo a dose total recomendada de 2g (OURIVES-NEVES et al, 2011).

Embora o mecanismo preciso pelo qual a pentamidina age não esteja claro, tem sido relatado que este fármaco entra em promastigotas através de transportadores de argina ou de poliamina, acumulando-se, principalmente, na mitocôndria, agindo sobre o genoma do parasito, dificultando a replicação e transcrição em nível mitocondrial (MUKHERJEE et al., 2005; PORCHEDDU et al., 2012). Além disso, outra teoria bastante aceita tem proposto que ocorre inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al., 2005). Já o mecanismo de resistência pode estar associado à redução do potencial da membrana mitocondrial e redução do acúmulo do fármaco em terapias prolongadas (MUKHERJEE et al., 2006).

2.7.4 Miltefosina

A miltefosina é um antineoplásico alquilfosfolipídico que se mostrou eficaz contra *Leishmania* spp. *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a grande vantagem do uso desse fármaco é o fato de ser o primeiro e único usado por via oral quer seja para tratar a LV ou LC. A dose de miltefosina atualmente recomendada, como monoterapia, é de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias, embora na prática clínica outras doses sejam administradas. A toxicidade gastrointestinal grave, o aumento significativos nos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, além do seu potencial teratogênico dificultam seriamente a sua utilização generalizada na clínica e em programas nacionais de eliminação (KAPOOR et al., 1999; DORLO, HUITEMA, BEIJNEN, 2012).

Atualmente, a miltefosina tem sido utilizada principalmente no Sul da Ásia em regiões de focos de LV em um programa de estratégia governamental de eliminação realizado pela Índia, Bangladesh e Nepal. Nesses países a recomendação é a monoterapia com miltefosina como tratamento de escolha para o tratamento da LV (SUNDAR, 2008). No entanto, ainda não se sabe se o medicamento será utilizado no leste da África, não só para LV, mas também na co-infecção HIV/LV e LC causada por *L. aethiopica*. De fato, pois atualmente a miltefosina só é recomendada em LC causada por *L. mexicana*, *L. guyanensis* ou *L. panamensis* (WHO, 2010).

O mecanismo de ação da miltefosina não é conhecido com precisão, mas está associado a alterações no metabolismo alquil-lipídico e com a biossíntese de fosfolípidos (LUX et al., 2000). Devido à recente introdução de miltefosina no campo, parasitas clinicamente resistentes ainda não foram relatados. No entanto, a resistência pode ser facilmente induzida *in vitro* e alguns dos mutantes resultantes já foram caracterizados (PEREZ-VICTORIA et al., 2003; SEIFERT et al., 2003).

Como observado, os fármacos utilizados no tratamento atual da leishmaniose apresentam diversos problemas incluindo a alta toxicidade e diversos efeitos colaterais levando os pacientes a abandonarem o tratamento, o que conseqüentemente gera linhagens de *leishmanias* resistentes. Além disso, o alto custo dos compostos torna o tratamento muitas vezes inviável e longe de ser o ideal (YARDLEY et al., 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

2.8 Resistência ao tratamento

Como já citado anteriormente poucas drogas têm surgido nos últimos 50 anos, e a resistência às drogas tem aumentado muito, de modo que a taxa de cura não ultrapassa os 80% dos casos na maioria dos estudos (TUON et al., 2008). As leishmanias, como outros parasitos, são capazes de desenvolver resistência às drogas usadas contra elas, tais mecanismos relacionam-se com a adaptabilidade genética destes organismos (BORST, OUELLETTE, 1995).

Sobre a resistência aos antimonialis, em alguns casos mais graves como observado em Bihar na Índia, cerca de 60% dos parasitos isolados são resistentes a estas substâncias (SUNDAR et al., 2001). Um dos mecanismos de resistência induzida aos antimonialis já

identificados é a amplificação do gene que codifica um transportador do tipo ABC, responsável pela extrusão da droga (HAIMEUR, OUELLETTE, 1998). Este transportador ABC é uma proteína transmembrana, localizada dentro da célula, e está relacionada com as vias endocíticas e exocíticas do parasito. Além da resistência aos antimoniais este mecanismo de defesa também foi desenvolvido durante o tratamento com Pentamidina (COELHO, 2007).

Casos isolados de resistência à anfotericina B não parecem ser um problema, embora as recidivas sejam por vezes encontradas após o tratamento, especialmente em pacientes soropositivos. Um estudo demonstrou que o sucesso do tratamento com anfotericina B depende grandemente do estado imunitário do paciente e indicou que recaídas sucessivas poderiam aumentar o aparecimento de resistência contra a droga (GIORGIO et al., 1999; LACHAUD et al., 2009).

Registros de resistência aos compostos como paromomicina, azóis e bifosfonatos são raros, possivelmente devido a seu uso limitado. Entretanto, sabe-se que a obtenção de cepas resistentes *in vitro* à Miltefosina é bastante fácil (PEREIRA, 2011). Os estudos *in vitro* dos mecanismos de resistência com células de *L. donovani* resistentes a miltefosina revelaram uma correlação entre a resistência e a acumulação reduzida da droga (PEREZ-VICTORIA et al., 2003). Esta acumulação diminuída foi causada por um defeito na translocação para o interior do fármaco, isto é, o movimento a partir do exterior para a região interna da membrana plasmática. Para alguns autores uma sugestão para reduzir a possibilidade de aparecimento de parasitas resistentes, pode ser usar miltefosina em combinação com outros medicamentos (OUELLETTE, DRUMMELSMITH, PAPADOPOULOU, 2004).

2.9 Modelos experimentais utilizados em testes de novos fármacos para leishmaniose

A utilização de modelos experimentais em pesquisas sobre a leishmaniose aponta questões importantes relacionadas à evolução da doença e desenvolvimento da resposta imune de resistência e susceptibilidade. Tais modelos admitem a avaliação de componentes do sistema imune envolvidos na resolução da infecção e permitem obter e ampliar as perspectivas e propor novas estratégias terapêuticas e vacinais (HOMMEL et al., 1995; CARRIÓN et al., 2006).

Diferentes sistemas experimentais para o estudo da leishmaniose foram desenvolvidos, cada um com suas peculiaridades, a fim de caracterizar a resposta imune para espécies de *Leishmania*. Sejam roedores, cachorros ou macacos, nenhum destes reproduz bem a patologia observada na doença humana. Ademais, diversos fatores como o tamanho e natureza do inóculo, a rota de infecção e a linhagem do hospedeiro ou cepa do parasito contribuem com as diferenças entre modelos animais e a infecção natural em humanos. Apesar disso, os modelos animais são ainda a melhor alternativa para se estudar vacinas ou tratamentos para a doença, já que por razões éticas não poderiam ser realizados em humanos (LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Os ensaios *in vitro* constituem uma primeira etapa para avaliação da eficácia de novos compostos que têm atividade direta sobre o parasito. Entretanto, compostos que são eficazes após a metabolização ou aqueles cujas ações são mediadas através de um sistema de defesa do hospedeiro não mostram qualquer atividade nestes ensaios. Portanto, os resultados obtidos *in vitro*, por vezes, não podem ser extrapolados para sistemas *in vivo* (GUPTA, NISHI, 2011).

Apesar disso, estes testes têm muitas vantagens, por exemplo, (I) poucos animais são suficientes para fornecer os parasitas para testar diversos compostos; (II) a quantidade do composto a ser testado é muito mínima; (III) o volume de resultados por triagem é alto e rápido; e (IV) as repostas são consistentes. No entanto, os resultados dos testes de um sistema *in vitro* sempre precisam ser verificados em animais (GUPTA, NISHI, 2011).

Os ensaios *in vitro* com leishmania são realizados com o parasito tanto na sua forma promastigota como amastigota. Segundo Croft os requisitos necessários para a realização destes ensaios são: uma população de células em divisão, medidas reprodutíveis e quantificáveis da atividade da nova substância e do fármaco padrão. Além disso, é interessante utilizar pequenas quantidades do composto, e que a técnica seja de rápida execução e baixo custo (CROFT et al., 1986, 2006).

Com relação à forma parasitária usada nos ensaios *in vitro* a promastigota é a mais popular, pois cresce em meio simples, são fáceis de cultivar e os ensaios utilizados para avaliar a atividade farmacológica de novos compostos são de fácil mensuração e rápida execução, sendo um modelo bastante utilizado para triagem. No entanto, diferenças observadas em sua susceptibilidade a drogas padrão em comparação com as formas amastigotas, e as diferenças bioquímicas que existem entre as duas formas, tornam esse

modelo mais útil apenas para determinar da toxicidade de novas moléculas (CROFT et al., 2006).

Outra razão pela qual o uso de promastigotas não ser muito indicado é o fato das culturas *in vitro* crescerem em temperatura mais baixa (24 °C) que a temperatura *in vivo* (37 °C), o que reduz a ação leishmanicida e dificulta uma boa correlação com os ensaios *in vivo*. Além disso, a cultura de promastigotas representa uma situação artificial, sendo usada em situações em que o custo em relação ao benefício é compensador (GUPTA, NISHI, 2011).

Os modelos *in vitro* que simulam o ambiente da fase amastigota intracelular têm sido descritos como mais confiáveis para avaliação de novos compostos (CROFT, 1986). Nestes são utilizados macrófagos primários, peritoneais murinos ou derivados de sangue humano, ou linhagens de células hospedeiras como macrófagos J774.1 (SEIFERT et al., 2010). Nesses ensaios existe uma estreita correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, já que a forma do parasita a ser testada é a que produz a doença no homem, além disso, essas culturas apresentam uma semi condição *in vivo*. Apesar das vantagens, a técnica é laboriosa e de custo mais elevado (BHATNAGAR et al., 1989).

Já os ensaios *in vivo* permitem avaliar o efeito de novas substâncias em um sistema complexo bem como determinar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos. O modelo murino é o mais utilizado, pois requer um pequeno volume de substância e reproduz bem os resultados utilizando apenas 5 animais por grupo (GUPTA, NISHI, 2011). Outra vantagem do modelo de murino é a simplicidade em manter a criação e reprodução deles (GUÉNET, BONHOMME, 2003).

Camundongos BALB/c são extensivamente utilizados devido à isogenicidade, a susceptibilidade desse camundongo à infecção por diferentes espécies de *Leishmania* causadora de LT, e por ser uma linhagem cuja cura é excepcionalmente difícil (CROFT et al., 2006). Nas últimas décadas, modelos murinos de leishmaniose cutânea têm sido extensivamente utilizados para elucidar os tipos celulares, citocinas, cascatas de transdução de sinal e mecanismos leishmanicidas necessários para o controle dos parasitas, assim como para a resolução clínica da doença, resistência a uma infecção secundária, e desenvolvimento de vacinas (LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Outra vantagem dos ensaios com murinos é a diferença de resposta imune expressa frente à doença por diferentes linhagens de camundongos, o que permite o estudo dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção. Camundongos BALB/c são geneticamente susceptíveis à infecção por *L. major* e desenvolvem diversas lesões associadas à resposta imune específica do tipo Th2. Já a linhagem C57BL/6 é resistente e desenvolve resposta imune do tipo Th1, que leva à cicatrização das feridas espontaneamente (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002).

Para o estudo da LV o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é considerado o melhor modelo experimental, pois este animal é altamente suscetível à infecção, com visceralização, por espécies de *Leishmania* (*L. donovani* e *L. infantum*) e reproduz diversos sinais clínicos típicos de LV durante a infecção experimental. Em contrapartida, camundongos apresentam pouco ou nenhum sinal (MOREIRA, 2012; GARG, DUBE, 2006; NIETO et al., 2011).

Pancitopenia marcada por leucopenia e anemia, caquexia, hipergamaglobulinemia e ausência de resposta de células T específicas para *Leishmania* são aspectos da doença humana que estão presentes na infecção experimental do hamster. De acordo com alguns pesquisadores esta última disfunção tem sido atribuída à incapacidade de células apresentadoras de antígeno em estimular células T específicas como elemento chave na progressão da LV no modelo hamster (BUNN-MORENO et al., 1985; GIFAWESEN et al., 1989; MATHIAS et al., 2001; FRUTH et al., 1993).

Outra causa da evolução da doença neste modelo experimental é a replicação incontrolada de parasitos no fígado, baço e medula óssea, apesar da forte expressão de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e INF- γ) nestes tecidos e a inibição da geração de NO por macrófagos, possivelmente atribuída a expressão de TGF- β e IL-10 (MELBY et al., 2001). Apesar disso, a utilização de hamsters ainda é limitada devido à escassez de reagentes específicos para o estudo da resposta imune, tais como anticorpos, citocinas e marcadores celulares, o que dificulta um estudo mais completo (WILSON et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade leishmanicida de uma série inédita de derivados dialquilfosforilidrazonas

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o potencial citotóxico de compostos sintéticos para a célula hospedeira;
- Realizar o *screening* farmacológico sobre a viabilidade de formas promastigotas (atividade direta sobre o parasito) de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*;
- Avaliar a ação *in vitro* dos derivados sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, quanto à taxa de infecção e à multiplicação dos parasitas intracelulares;
- Investigar os efeitos dos derivados sobre a morfologia de promastigotas de *L. chagasi*;
- Determinar o potencial terapêutico dos derivados mais ativos em modelo *in vivo* de leishmaniose tegumentar e visceral;
- Avaliar a função hepática e renal em animais infectados e tratados com tais derivados;
- Realizar estudos de *docking molecular* para identificar o possível alvo farmacológico dos derivados mais ativos.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Novel dialkylphosphorylhydrazones: Synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action



Carolina Barbosa Brito da Matta ^a, Aline Cavalcanti de Queiroz ^a, Mariana Silva Santos ^a,
Magna Suzana Alexandre-Moreira ^a, Vinicius Tomaz Gonçalves ^{b, c},
Catarina de Nigris Del Cistia ^d, Carlos Mauricio R. Sant'Anna ^b, João Batista N. DaCosta ^{b, *}

^a LaFI – Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

^b Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

^c CEFET/RJ – Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Itaguaí, RJ, Brazil

^d Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Matemática, Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2014

Received in revised form

24 April 2015

Accepted 5 June 2015

Available online 9 June 2015

Keywords:

Dialkylphosphorylhydrazones

Leishmanicidal activity

Glycolytic pathway

Molecular docking

ABSTRACT

As part of a program to develop new drugs for the treatment of neglected diseases, new dialkylphosphorylhydrazones were synthesized and evaluated against the trypanosomatid parasites *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis*. The synthesis of these compounds proved satisfactory with yields ranging from moderate to good. The most active compounds against *L. braziliensis* presented IC₅₀ values in the 10^{−2} μM range, similar to that of the reference drug pentamidine. Two compounds, **4m** and **4n**, showed a significant dose dependent decrease in the infection index of *L. amazonensis* infected macrophages and caused a complete healing of nodules and ulcers when tested *in vivo* against *L. amazonensis*-infected mice, but the control of parasite burden at the inoculation site was statistically significant only in the case of treatment with **4n**. A target fishing (reverse docking) approach using molecular docking with 15 enzymes of *L. braziliensis* indicated that the probable target of the active compounds was hexokinase, the first enzyme of the glycolytic pathway.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of the world's most neglected diseases, with a major impact among the poorest individuals, mainly in developing countries. The number of leishmaniasis cases is increasing worldwide [1,2]. Leishmaniasis transmission is endemic in 98 countries and 3 territories on 5 continents. According to the World Health Organization, 350 million people are considered at risk of contracting this disease, and some 2 million new cases occur each year [1,3]. Each year approximately 58,000 cases of visceral leishmaniasis and 220,000 cutaneous cases are officially reported. However, it is thought that only approximately two-thirds of countries actually report incidence data, with the sparsest data from Africa [3].

One of the main problems in leishmaniasis treatment is the limited number of available drug options, along with the adverse effects they can cause, including death [4]. In addition, there are reports of treatment failures due to increased parasite resistance to the drugs of first choice, the antimonials [5,6]. Second-choice drugs, such as amphotericin B, pentamidine, paromomycin, and more recently, miltefosine, also have toxic effects, and their use requires hospital supervision [4,7]. Therefore, there is an urgent need for the development of safer and more effective drugs against this parasite.

Screening tests implemented with a series of new dialkylphosphorylhydrazones (DAPH) synthesized by our group were indicative of promising activity profiles against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* [8]. New compounds were then synthesized and added to the series. In the present work, we show the synthesis of the entire DAPH series and a detailed evaluation of the compounds' leishmanicidal activity against *L. amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in comparison with known leishmanicidal agents. Although the information available from these *in vivo* tests

* Corresponding author.

E-mail address: dacosta@ufrj.br (J.B.N. DaCosta).

is essential for the identification of new leishmanicidal agents, an understanding of the observed effects is a prerequisite for improving the selectivity and potency of the investigated compounds. In an attempt to identify probable targets for the active compounds prepared in the present work, we also implemented a strategy based on molecular docking of the compounds into a set of candidate target enzymes.

The presence of the $(R'O)_2P(O)NHR$ group in DAPH suggests that these molecules could act as inhibitors of enzymes that have, as substrates, molecules containing the $(R'O)_2P(O)OR$ group. There are a huge number of such enzymes, so the target identification procedure should be based on some criteria to reduce the number of possibilities to be explored. Some parasite enzymes have been shown to be inhibited by phosphorous-containing molecules, such as farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) [9,10] and hexokinase (HK) [11], an enzyme of glycolysis metabolic pathway in which glucose is converted into pyruvate and the free energy released is used to form the high-energy compounds ATP and NADH. In addition to FPPS and the enzymes of the glycolytic pathway, promising targets also include the enzymes of the pentose phosphate pathway (PPP), which serves to convert glucose-6-phosphate to ribose-5-phosphate. The PPP has been proposed to have crucial roles in the protection of trypanosomatids against oxidative stress, as well as in the production of nucleotide precursors [12]. Each of the enzymes of the PPP has been identified and specific activities measured for one of the Leishmania species, *Leishmania Mexicana* [13].

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of the dialkylphosphorylhydrazones

The synthesis of the dialkylphosphites (**1**) and dialkylphosphorylhydrazines (**2**) were performed using the synthetic route previously used by our research group [14–18], according to the synthetic route shown in Scheme 1.

The synthesis of the new DAPH (**4a–o**) occurred through a condensation reaction, catalyzed in an acidic medium, between the respective dialkylphosphorylhydrazines (**2**) and different aldehydes (**3**) at room temperature, as shown in Scheme 2.

The infrared spectra of the DAPH synthesized show the characteristic absorption bands. The main absorption bands correspond to the stretching frequencies of the $P=O$, $P-O-C$ and $C=N$ bonds. In pentavalent phosphorus compounds containing a bond between a phosphorus atom and a nitrogen atom, the stretching frequency range of the $P=O$ bond is generally from 1198 to 1274 cm^{-1} [19], the $P-O-C$ bond absorbs in the 950 – 1018 cm^{-1} range, and the $C=N$ bond has a stretching frequency in the 1580 – 1690 cm^{-1} range [20]. These frequencies were observed for all products, which confirm the expected reactions.

In the 1H -NMR analyses, two characteristic signals confirm that the DAPH were obtained. These signals correspond to the iminic hydrogen $-NHN=CH-Ar$, with a chemical shift (δ) in the range of

7.88 – 8.26 ppm ; and to the phosphoramidic hydrogen, $P(O)NH$, with a chemical shift in the 9.74 – 10.21 ppm range and showing a doublet signal with a coupling constant ranging between 27 and 31 Hz . The literature reports that this coupling occurs between 23 and 53 Hz [21]. Compounds **4i** and **4j** also presented an additional doublet in the region approximately 12.8 ppm , with a coupling constant of approximately 34 Hz , which is characteristic of an intramolecular hydrogen bond.

NOEDIF experiments were used to determine the configuration of the synthesized compounds. The results clearly show, according to 1H -NMR spectroscopy, that all molecules have the *E* configuration, except for compounds **4i** and **4j** which were obtained as a diastereoisomeric mixture with *E/Z* ratio of $80:20$ and $85:15$, respectively.

In the ^{13}C NMR spectrum of DAPH, the signal that characterizes these compounds is related to the iminic carbon, $(-NHN=CH-Ar)$, which has a chemical shift in the 136 – 145 ppm range and is observed as a doublet because it is coupled with the phosphorus atom, with a coupling constant in the 18 – 21 Hz range. The same feature can be observed with the alkoxide groups, $(RCH_2O)_2P(O)-$, where the methylene hydrogens, neighbors to the ester oxygen atoms, have chemical shifts in the range from 3.7 to 4.5 ppm .

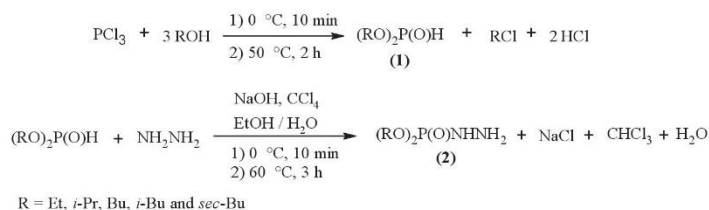
2.2. Biological evaluation

An initial screening was carried out to evaluate and compare the in vitro leishmanicidal profiles of the 18 DAPH and 2 standard drugs, miltefosine and pentamidine, against the promastigote forms of *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. The maximum effects and the IC_{50} values (concentrations causing 50% inhibition of growth of the promastigotes) were used as the parameters for leishmanicidal activity (Table 1).

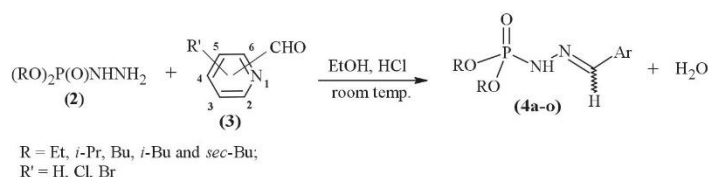
After 48 h of incubation, most of the compounds were significantly active against *L. braziliensis*. Among these, those that showed efficacy greater than 70% were as follows: **4b** (IC_{50} : $5.1 \pm 0.5\text{ }\mu\text{M}$), **4d** (IC_{50} : $0.06 \pm 0.0\text{ }\mu\text{M}$), **4f** (IC_{50} : $5.4 \pm 0.2\text{ }\mu\text{M}$), **4g** (IC_{50} : $0.4 \pm 0.3\text{ }\mu\text{M}$), **4h** (IC_{50} : $40.7 \pm 3.5\text{ }\mu\text{M}$), **4j** (IC_{50} : $0.06 \pm 0.0\text{ }\mu\text{M}$), **4m** (IC_{50} : $3.6 \pm 0.3\text{ }\mu\text{M}$), **4n** (IC_{50} : $5.2 \pm 0.7\text{ }\mu\text{M}$) and **4o** (IC_{50} : $0.03 \pm 0.02\text{ }\mu\text{M}$).

However, not all of these compounds were active against *L. amazonensis* as they were for *L. braziliensis*. The compounds **4b**, **4d**, **4g** and **4h** showed high specificity against the *L. braziliensis* species. The compounds were active against *L. amazonensis* with efficacies greater than 70% were as follows: **4f** (IC_{50} : $53.3 \pm 2.9\text{ }\mu\text{M}$), **4j** (IC_{50} : $6.2 \pm 1.7\text{ }\mu\text{M}$), **4m** (IC_{50} : $26.3 \pm 2.0\text{ }\mu\text{M}$), **4o** (IC_{50} : $26.0 \pm 7.8\text{ }\mu\text{M}$) and **4n** (IC_{50} : $0.001 \pm 0.1\text{ }\mu\text{M}$). Compound **4n** was as effective as miltefosine (IC_{50} : $3.4 \pm 0.4\text{ }\mu\text{M}$) and pentamidine (IC_{50} : $1.8 \pm 1.1\text{ }\mu\text{M}$) and was approximately 2000 times more potent than these standard drugs.

An important criterion in the search for new substances with leishmanicidal activity is that they should not be toxic to mammalian cells, a requirement for further clinical development. Therefore, the cytotoxic potential of these substances on J774



Scheme 1. Synthetic route for dialkylphosphites (**1**) and dialkylphosphorylhydrazines (**2**).



Scheme 2. Synthetic route for DAPH(4a-o).

Table 1
Activity of DAPH against promastigote forms of *L. braziliensis* and *L. amazonensis*.

Substance	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. amazonensis</i>	
	IC ₅₀ (μM)	Efficacy (%)	IC ₅₀ (μM)	Efficacy (%)
Miltefosine	0.7 ± 0.6	84.5 ± 0.3	3.4 ± 0.4	96.3 ± 0.3
Pentamidine	0.06 ± 0.02	95.7 ± 0.5	1.8 ± 1.1	93.8 ± 0.7
4a	>100	NA	>100	NA
4b	5.1 ± 0.5	77.2 ± 4.2	99.3 ± 0.7	45.5 ± 3.2
4c	>100	NA	>100	NA
4d	0.06 ± 0.0	84.2 ± 2.6	>100	NA
4e	>100	NA	>100	NA
4f	5.4 ± 0.2	87.9 ± 1.1	53.3 ± 2.9	85.6 ± 0.5
4g	0.4 ± 0.3	75.9 ± 6.6	>100	NA
4h	40.7 ± 3.5	81.6 ± 0.4	83.3 ± 11.6	52.8 ± 5.6
4i	7.5 ± 0.8	62.1 ± 3.4	>100	NA
4j	0.06 ± 0.0	76.3 ± 8.7	6.2 ± 1.7	69.5 ± 4.2
4k	0.7 ± 0.1	56.3 ± 2.7	>100	NA
4l	>100	NA	98.3 ± 1.2	40.7 ± 6.1
4m	3.6 ± 0.3	92.2 ± 0.4	26.3 ± 2.0	93.8 ± 0.3
4n	5.2 ± 0.7	80.1 ± 2.6	<0.001	95.3 ± 0.4
4o	0.03 ± 0.02	74.1 ± 0.3	26.0 ± 7.8	92.4 ± 0.1

Data are reported as the mean ± standard error of the mean, S.E.M. Differences with an $^{***}p < 0.01$ were considered significant in relation to the 0.1% DMSO group. IC₅₀ is the concentration required to give 50% inhibition; NA: compound is not active.

macrophages (murine cell line) was determined by the colorimetric MTT method, which was originally described by Mossmann [22]. In this assay, all substances, including the reference drugs miltefosine and pentamidine, showed low cytotoxicity against J774 macrophages with LC₅₀ values >100 μM, except for **4o**, which was toxic to approximately 20.5 ± 0.1% of the treated cells. It is important to stress that the reference drug pentamidine was toxic to 28.8 ± 0.1% of the cells at 100 μM.

From these results, some substances have been selected for tests on intracellular amastigotes and *in vivo* model. The selection criteria took into account the potency, the efficacy against both species and the cytotoxicity of each compound. Among the substances tested, only **4f**, **4j**, **4m**, **4o** and **4n** showed activity against both species with efficacies greater than 70%. However, **4m** and **4n** best fulfilled the requirements and, therefore, have been chosen for the subsequent tests.

With respect to activity against intracellular amastigotes 48 h post infection, the results showed that the treatment with **4m** and **4n** resulted in a significant ($p < 0.01$), dose dependent decrease in infection index of *L. amazonensis* infected macrophages with an inhibition of 99.9% and 97.9% (100 μM), respectively (Fig. 1A). Infected cultures were also treated with the highest concentration of DMSO used for substances solubilization (0.01%) and the viability and infection of macrophages were not reduced (data not shown). Miltefosine was also significantly different compared to the control ($p < 0.01$), with an inhibition of 100%.

The average of the number of parasites per macrophage and the percentage of infected macrophages, which influence the calculation of the index of infection, were also analyzed (Fig. 1B). The mean number of intracellular parasites per macrophage decreased

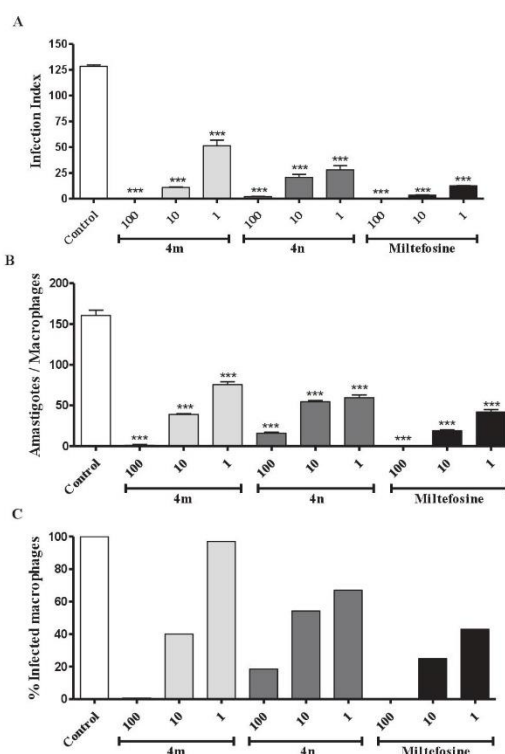


Fig. 1. Activity of **4m**, **4n** and miltefosine against intracellular parasites 48 h post infection. **A:** infection index. **B:** number of parasites per macrophages infected. **C:** percentage of macrophages infected. Data are reported as the mean ± standard error. Differences with an $^{***}p < 0.01$ were considered significant in relation to the control group.

compared to the control after treatment with **4m** and **4n** ($p < 0.01$). The percentage of infected macrophages (Fig. 1C) was also reduced by both substances, with exception of **4m** at 1 μM, which showed no significant difference compared to the control. **4m** and **4n** showed higher percentages of inhibition of infection at 100 μM (99.3 and 82.2%, respectively).

Using an established mouse model of cutaneous leishmaniasis that mimics human leishmaniasis [23], BALB/c mice were infected in the ear dermis with 10⁵ stationary phase *L. amazonensis* promastigotes, and lesion development and parasite burden were quantified. Infected mice were treated orally for 28 consecutive days with **4m** or **4n** or standard drug. The untreated group was used as a control and resulted in an average lesion size of 0.2831 mm (S.E.M = 0.1022). The treated groups had significantly

reduced lesion size in the ear, the averages being 0.0527 mm (S.E.M = 0.03482) and 0.0804 mm (S.E.M = 0.0392) in **4m**- and **4n**-treated groups, respectively. These results were similar to the miltefosine group, with an average lesion size of 0.0231 mm (S.E.M = 0.0021) (Fig. 2).

To investigate if there was a correlation between lesion development and parasite replication, parasite load was estimated at both the inoculation site and the draining lymph nodes. In the ear dermis (Fig. 3A), **4n** treatment controlled parasite burden in a statistically significant manner, corroborating the therapeutic improvement in lesions of the ears. However, **4m** was not able to reduce the parasite load, although it caused a reduction in the ear lesion.

However, **4m** and **4n** did not reduce the parasite burden in the draining lymph node (Fig. 3B). This result indicates that either the dose (30 mg/kg/day) was not sufficient to control the infection systemically or, in addition to leishmanicidal activity, such compounds also have anti-inflammatory activity. Parasite load was reduced at the inoculation site and in the draining lymph nodes after miltefosine treatment.

3. Molecular modeling

3.1. Homology models

Table 2 presents details about models of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* enzymes: PDB code and resolution of the template;

sequence identity; GMQE (Global Model Quality Estimation), which is a quality estimation that is expressed as a number between zero and one, reflecting the expected accuracy of a model built with that alignment and its template [24]; QMEAN4, which is a composite scoring function for the estimation of the global and local model quality, consisting of four structural descriptors [25]; and the quaternary structure information for the models. Ramachandran plots were generated with the Rampage server [26] and are available as [supplementary material](#).

The sequence identities between the models and their templates were above 30%, with the exception of the ENO and PGM enzymes. The Ramachandran plots for ENO and PGM enzyme models presented 4.7% and 5.5% residues in the outlier region, respectively, whereas all of the remaining models have at least 98% of their residues in the favored and/or allowed regions. The resulting models obtained for these two enzymes presented GMQE values lower than 0.5 and very low values of QMEAN4. Attempts to improve the models' quality were unsuccessful, and these enzymes were excluded from the subsequent target fishing procedure. As seen in Table 2, excluding PGM, a monomer resulted from the modeling procedure in five cases. This was not a problem for molecular docking in RPE, TAL, HK, and PGK, because the active site of these enzymes involves residues of a single chain, but this was not the case for RPI. Analysis of the tetrameric co-crystal structure of *Trypanosoma cruzi* RPI and its substrate (PDB code 3K7S) revealed that the active site of RPI shares residues from two adjacent chains.

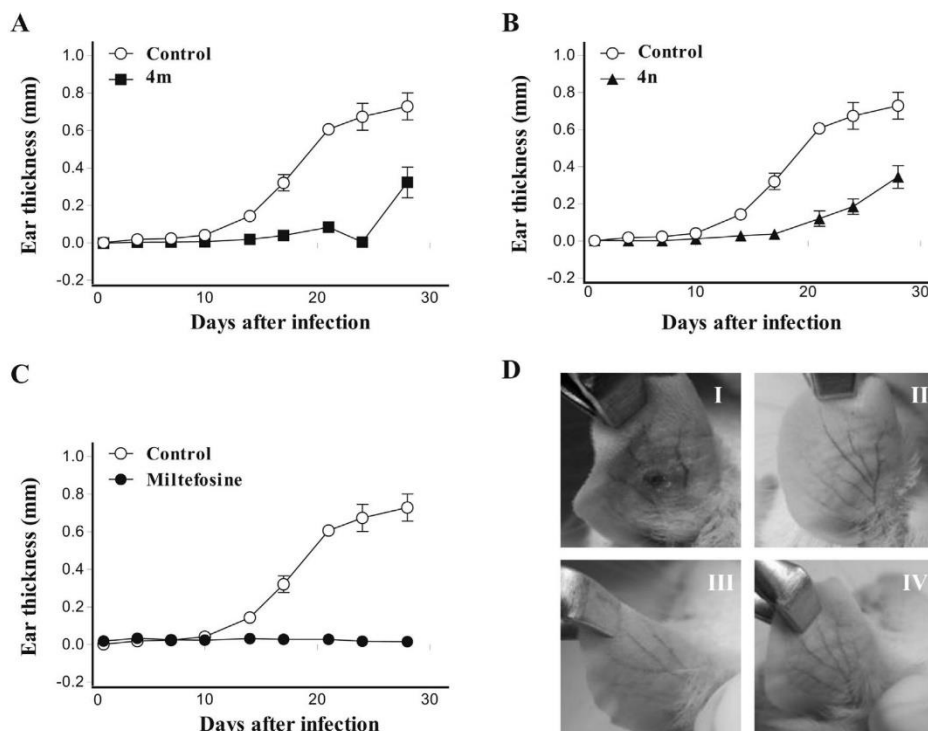


Fig. 2. In vivo leishmanicidal effect of **4m** and **4n** in BALB/c *Leishmania*-infected mice. Mice were infected with 10^5 *L. amazonensis* promastigotes, and the course of lesion development was monitored for 28 days during treatment with **4m** (A), **4n** (B) and miltefosine (C). Lesion size (mm) is expressed as the mean $\pm$ SEM of a representative experiment ($n = 5$ mice in each experimental group) (Unpaired t-test, 5 weeks, *** $p < 0.0001$). (D) Images of lesions after the end of treatment of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. In the vehicle control group (I), the lesions showed an intense swelling and were ulcerated. In groups treated with miltefosine (II), **4m** (III) and **4n** (IV) at doses of 30 mg/kg/day, the pictures reveal a complete healing of the nodules and ulcers.

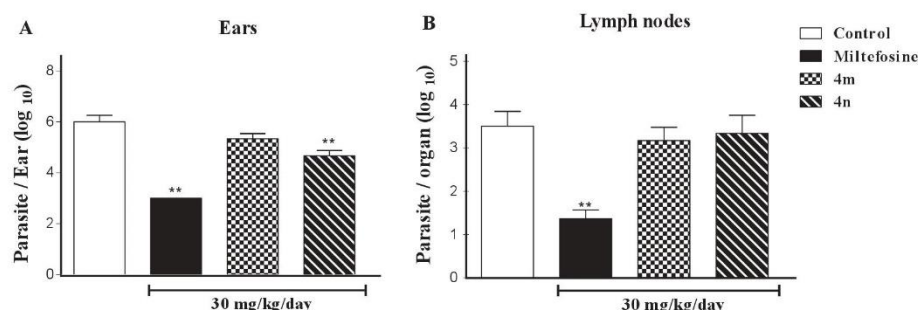


Fig. 3. Parasite load in the ear and draining lymph node were determined at 4 weeks post-infection via a limiting dilution assay. (A) Ear parasite load data (normal distribution following log transformation) represent the mean $\pm$ SEM ($n = 5$) (Dunnett's test, ** $p = 0.05$). (B) Lymph node parasite load data were not normally distributed, even after log transformation, and are expressed as the median $\pm$ SEM ($n = 5$) (Dunnett's test, ** $p = 0.05$).

Table 2
L. braziliensis and *L. amazonensis* enzyme models.

Enzyme model	PDB code of template	Template resolution	Sequence identity	GMQE	QMEAN4	Quaternary structure of model
6PGDH ^a	1pgj(A)	2.82	72.54	0.92	-1.76	dimer
G6PDH ^a	4e9i(A)	2.85	65.89	0.77	-2.20	tetramer
RPI ^a	3k7p(A)	1.40	49.36	0.81	-1.87	monomer
RPE ^a	1h1y(A)	1.87	45.98	0.71	-2.10	monomer
TAL ^a	1f05 (A)	2.45	59.43	0.80	-2.84	monomer
TKT ^a	1r9j(A)	2.22	84.95	0.96	-0.15	dimer
HK ^a	3o4w(A)	1.61	37.59	0.71	-5.50	monomer
PGI ^a	1t10 (A)	2.35	88.81	0.96	-1.22	dimer
PFK ^a	2hig(A)	2.40	70.81	0.81	-1.00	tetramer
FBPA ^a	1epx(A)	1.80	91.87	0.98	-0.28	tetramer
TPP ^a	1amk(A)	1.83	88.84	0.98	-0.29	dimer
GPDH ^a	1i32 (C)	2.60	91.39	0.99	-0.31	tetramer
PGK ^a	16pk (A)	1.60	48.33	0.61	-4.08	monomer
PGM ^a	3f3k(A)	1.75	21.43	0.21	-10.22	monomer
ENO ^a	1iyx(B)	2.80	23.33	0.47	-18.22	dimer
PYK ^a	3pp7(A)	2.35	92.49	0.99	0.81	tetramer
FPPS ^a	3dyh(A)	1.94	62.12	0.81	-2.06	dimer
6PGDH ^b	1pgj(A)	2.82	72.38	0.92	-1.76	dimer
G6PDH ^b	4e9i(A)	2.85	65.16	0.77	-2.77	tetramer

^a *L. braziliensis*.

^b *L. amazonensis*.

To obtain a structure with a complete active site, we constructed a dimer with Swiss PDB-Viewer 4.01 by superposition of the monomeric model of *L. braziliensis* RPI with both chains of its dimeric template 3K7P. This dimeric model of *L. braziliensis* RPI, after energy minimization with GROMOS96 [27], presented a very low RMSD value (0.34 Å) when superimposed on 3K7P and was used for the subsequent docking study.

3.2. Molecular docking

The identification of the biochemical target of a group of compounds with experimentally determined bioactivities is a very difficult task. In fact, the observed *in vivo* effects can involve several biochemical targets simultaneously. Together with virtual screening approaches to identify candidate ligands for a specific target, the availability of a great number of 3D structures of proteins has stimulated the development of theoretical methodologies to search for the targets of bioactive ligands, a process called target fishing or reverse docking [28,29]. The method is particularly useful in cases where purified enzymes are not available in sufficient

amounts to apply experimental procedures, such as in the case of the many parasites associated with neglected diseases. We explored molecular docking methodology as a way to implement small-scale target fishing for the active compounds identified in the bioassays. To improve the chances of identifying the best docking solution for each enzyme, docking runs were performed as duplicates, and the solution with the highest fitness score in each case was selected for further analysis. GOLD fitness scores are dimensionless, but the scale of the score provides a guide as to how good a ligand pose is - the higher the score for a specific function, the better the docking result is likely to be.

The limitations of scoring functions to produce data that correlate with activity data is well known, but docking programs have demonstrated the ability to identify active compounds from a pharmaceutically relevant pool of decoy compounds [30]. Based on the IC₅₀ data (Table 1), it can be concluded that the most active compounds against *L. braziliensis* were **4d**, **4j** and **4o**, all presenting activities in the 10⁻² μM range. Therefore, our analysis was focused on identifying enzymes for which these three compounds presented an improved binding profile in comparison with the remaining molecules, as measured by their docking fitness scores. As seen in Tables 3 and 4, **4d**, **4j** and **4o** were classified as the three best ligands only in the case of the docking procedure with *L. braziliensis* HK as the target. HK was validated as a target for

Table 3
ChemPLP score results from docking into *L. braziliensis* and *L. amazonensis* PPP enzymes.^a

	<i>L. braziliensis</i>							<i>L. amazonensis</i>	
	6PGL	6PGDH	G6PDH	RPE	RPI	TAL	TKT	6PGDH	G6PDH
4a	47.7	45.0	45.2	48.6	43.6	43.6	50.8	45.9	44.3
4b	51.4	55.1	55.8	51.5	54.0	46.7	58.7	53.9	52.1
4c	47.7	46.5	46.0	48.5	45.9	48.1	56.0	47.7	46.3
4d	50.2	53.7	48.3	49.5	50.9	46.3	57.8	53.1	48.7
4e	44.1	44.1	46.2	53.3	45.8	42.0	44.9	45.4	41.5
4f	50.3	54.4	53.8	55.5	55.9	46.6	61.3	56.3	52.6
4g	47.0	48.2	45.0	45.2	45.0	49.3	58.2	50.7	42.6
4h	47.1	55.7	48.3	50.5	54.5	48.3	57.0	61.3	49.4
4i	42.6	46.5	43.8	50.0	41.9	41.4	47.0	46.2	44.1
4j	49.9	55.9	53.7	51.9	52.2	44.5	60.6	55.8	49.1
4k	43.7	46.4	43.2	42.6	42.7	46.4	47.5	46.4	42.2
4l	46.8	54.1	47.8	48.8	50.2	43.4	58.4	54.4	47.2
4m	42.8	50.3	45.0	40.2	48.1	48.5	52.3	53.2	48.2
4n	48.4	51.9	47.3	45.4	50.6	40.0	55.8	54.4	50.2
4o	41.3	47.6	48.5	35.8	43.8	44.1	52.4	51.9	45.2

^a Bold values indicate the three highest score values.

Table 4ChemPLP score results from docking into *L. braziliensis* glycolysis and FPPS enzymes.^a

	HK	PGI	PFK	FBPA	TPI	GPDH	PGK	PYK	FPPS
4a	42.6	43.6	47.4	51.3	51.3	45.8	45.5	48.8	68.4
4b	49.6	53.9	62.6	58.4	58.6	57.2	53.1	57.9	78.8
4c	44.3	45.6	52.8	55.9	50.2	49.2	44.5	50.0	70.0
4d	51.4	51.0	59.8	59.0	57.4	56.7	50.7	56.6	67.9
4e	40.9	45.5	48.6	53.4	51.3	48.2	42.3	47.3	65.5
4f	51.4	56.0	61.3	63.1	60.1	57.3	51.6	56.0	90.6
4g	45.2	45.9	52.3	57.6	53.3	49.9	43.6	48.5	69.7
4h	49.8	50.4	59.7	59.9	57.6	56.3	49.3	54.0	78.7
4i	45.1	43.6	48.4	52.8	53.7	47.2	41.8	49.9	66.5
4j	54.2	52.6	61.7	58.7	60.9	59.7	52.5	53.7	76.3
4k	44.5	40.6	52.9	57.6	56.4	50.6	44.6	49.9	70.6
4l	50.6	47.6	58.6	56.0	53.2	58.8	46.1	53.3	69.5
4m	50.5	49.4	60.6	60.2	56.4	56.3	49.9	49.6	69.7
4n	49.3	51.3	64.3	54.5	62.3	56.0	48.4	53.8	68.2
4o	52.9	43.2	61.7	53.8	62.1	54.8	49.6	53.0	66.6

^a Bold values indicate the three highest score values.

another trypanosomatid, *T. cruzi*, in experiments involving some phosphorus-containing compounds [11,31]. Comparison of *L. braziliensis* (UniProtKB/Swiss-Prot code A4HBM3) and *T. cruzi* (Q4DQ27) HK sequences with the SIM alignment tool [32] revealed

that the overall identity between the two sequences is 65.8% (471 residues), which is suggestive that similar inhibition mechanisms may operate in HK from both species.

In the case of *L. amazonensis*, the inhibition profile was not the same as with *L. braziliensis*, and there is only one compound with activity in the submicromolar range, **4n**. The docking analysis was, in this case, unfortunately limited to a pair of enzymes, and **4n** was not classified by the docking procedure as the best ligand with any of these enzymes. Therefore, it was not possible to identify the probable biochemical target for this *Leishmania* species.

After identification of HK as the most probable target of the bioactive DAPH against *L. braziliensis*, we compared the interaction profiles of the best poses obtained for the most active compounds with the co-crystallized structure of the HK reaction product, glucose-6-phosphate (G6P) (PDB code 1CZA). As an example, Fig. 4A and B presents the superposition of the structure 1CZA with the complex between compound **4d** and *L. braziliensis* HK. It can be observed that compound **4d** can occupy the same site as G6P in HK, but one of its *iso*-butyl groups is inserted into an adjacent binding site, which is occupied by a glucose molecule in the co-crystal structure. It can also be observed that the G6P binding site is smaller and the neck connecting both sites is narrower in the human enzyme (Fig. 1A) than in the *L. braziliensis* enzyme (Fig. 1B).

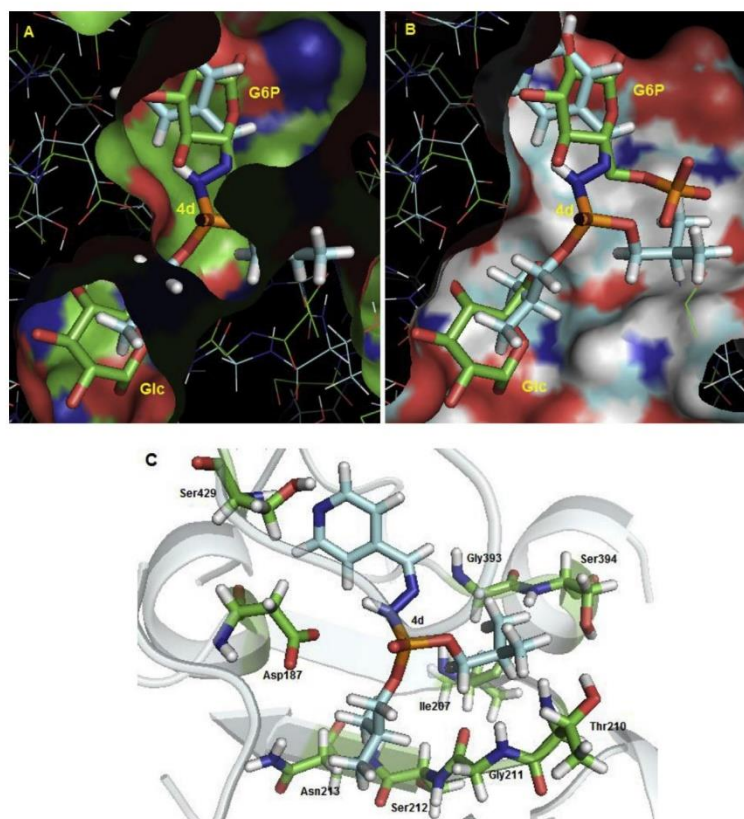


Fig. 4. (A and B) Superposition of the best-ranked pose of DAPH **4d** (carbon atoms in cyan, stick representation) into *L. braziliensis* hexokinase (carbon atoms in cyan) with the co-crystal structure of human hexokinase (carbon atoms in green) containing glucose-6-phosphate (G6P, stick representation) and glucose (Glc, stick representation) (PDB code 1CZA). In A it is shown the molecular surface of human hexokinase and in B the molecular surface of *L. braziliensis* hexokinase. (C) *L. braziliensis* hexokinase residues (carbon atoms in green) interacting with **4d** (carbon atoms in cyan). Color code for the remaining atoms: oxygen, red; nitrogen, blue; hydrogen, white; phosphorus, orange. Figures were generated with PyMOL. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

This observation suggests the **4d** molecule would probably have difficulties to be accommodated in the human HK enzyme, which is indicative of some level of selectivity of **4d** for the parasite enzyme. Fig. 1C presents the *L. braziliensis* HK amino acid residues interacting with **4d**, including residues from G6P and glucose binding sites. Four of these residues have correspondent residues in the human enzyme that are interacting directly with G6P Asp187 (Asp209 in human HK), Thr210 (Thr232), Ser394 (Ser415) and Ser429 (Ser449).

4. Conclusion

The synthesis of new dialkylphosphorylhydrazones proved satisfactory, with yields ranging from moderate to good. An excellent advantage of these compounds is that they have a fairly simple synthesis methodology. The compounds had their in vitro leishmanicidal profile evaluated, and some active compounds could be identified with efficacy greater than 70% against *L. braziliensis* (**4b**, **4d**, **4f**, **4g**, **4h**, **4j**, **4m**, **4n**, and **4o**) and against *L. amazonensis* (**4f**, **4j**, **4m**, **4n**, and **4o**). The compounds with the greatest efficacy against both species, **4m** and **4n**, were tested in vivo against *L. amazonensis*-infected mice. Both of the compounds completely healed the nodules and ulcers, but control of parasite burden at the inoculation site was statistically significant only in the case of **4n** treatment.

Comparing the corresponding IC₅₀ values, the only compounds with IC₅₀ against *L. braziliensis* in the 10^{−2} μM range (the same range for pentamidine activity) were **4d**, **4j**, and **4o**. Compound **4n** was the only one with an IC₅₀ value in the submicromolar range against *L. amazonensis*, which was even lower than that for the reference compounds pentamidine and miltefosine. A target fishing procedure based on docking methodology using 15 different enzymes from *L. braziliensis* and two from *L. amazonensis* was implemented to identify probable biochemical targets for the active compounds. After comparison with the IC₅₀ values, it was concluded that hexokinase is the most probable target in *L. braziliensis*, but it was not possible to identify a target for *L. amazonensis* because of the limited number of candidate enzymes available for this species.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

All solvents used in reactions and purification methods were distilled prior to use and, when necessary, treated and dried according to the usual methods described in the literature [33]. Thin layer chromatography was performed using 0.2 mm-thick, aluminum-backed plates containing Kieselgel 60 F254, and visualized under UV light at 254 nm.

The devices used for the characterization of the compounds were as follows: (a) Perkin–Elmer infrared spectrometer, model 1600 FT. The spectra were obtained using a film on NaCl cells in the case of liquid samples, and KBr pellets in the case of solid samples. The absorptions were measured in reciprocal centimeters (cm^{−1}); (b) gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, Varian Saturn model 2000. The analysis conditions were VF-5ms column (30 × 0.25 × 0.25 mm), oven temperature 150–290 °C/10 °C/min, injector 270 °C, MS trap 220 °C, manifold 60 °C, transfer line 250 °C, EI ionization (70 eV); (c) NMR spectra were performed on a Bruker AC 200 spectrometer (¹H NMR: 200 MHz, ¹³C NMR: 50.3 MHz, ³¹P NMR: 81.0 MHz) and Bruker AVANCE II 400 spectrometer (¹H NMR: 400 MHz, ¹³C NMR: 100.6 MHz, ³¹P NMR: 161.9 MHz). The spectra were obtained using tetramethylsilane (TMS) or the solvent itself as a reference for ¹H and ¹³C spectra. For ³¹P spectra, 85% phosphoric

acid was used as the external reference. In each case, the deuterated solvents are specified, the chemical shifts are measured in ppm and the coupling constants are in Hertz (Hz).

5.2. General procedure

In a 50 mL flask, the dialkylphosphorylhydrazine and the specific aldehyde in a 1:1 M ratio, ethanol, and three drops of 37% hydrochloric acid as the reaction catalyst were added. The reaction mixture was stirred at room temperature (25 °C) for approximately 4 h. At the end of the reaction, sodium bicarbonate (10%) was added to neutralize the reaction mixture. The resulting solution was transferred to a beaker containing 20 mL of cold distilled water in an ice bath. After approximately 20 min, a solid material was observed that was subsequently filtered and dried at room temperature. Compounds that did not precipitate in water were transferred to a separatory funnel with the aid of an appropriate amount of methylene chloride. After separation of the resulting layers, anhydrous magnesium sulfate was added to the organic phase for complete removal of residual water. Filtration was carried out for removal of the drying agent, and the solvent was evaporated under vacuum, after which an oily product was obtained.

6. Characterization of the products

6.1. Phosphorohydrazidic acid, N'-[(1E)-4-pyridinylmethylene]-diethyl ester (**4a**)

Aspect: orange oil. **yield:** 53%. **IR (NaCl):** 3425.7 (st, NH); 3149.6 (st, CH_{aromatic}); 2985.7, 2925.9 and 2821.7 (st_{ass}, CH₃ and CH₂); 1597.0 (st, C=N); 1475.5 (δ_{ass}, CH₂ and CH₃); 1407.9 (δ_{sim}, CH₃); 1240.1 (st P=O); 1163.0 (st, P–N); 1031.8 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.95 [d, (P–N–H), J_{HP} = 29.0 Hz, 1H]; 8.56 [d, (H₂ and H₆), J_{ortho} = 6.27 Hz, 2H]; 7.89 [s, (N=C–H), 1H]; 7.48 [d, (H₃ and H₅), J_{ortho} = 6.27 Hz, 2H]; 4.03 [m, (CH₃CH₂OP), 4H]; 1.23 [t, (CH₃CH₂OP), J_{HH} = 7.41 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 150.13 [s, (C₂ and C₆), 2C]; 141.76 [s, (C₄), 1C]; 141.46 [d, (N=C), J_{CP} = 20.35 Hz, 1C]; 120.23 [s, (C₃ and C₅), 1C]; 62.57 [d, (CH₂OP), J_{CP} = 5.30 Hz, 2C]; 16.06 [d, (CH₃CH₂OP), J_{CP} = 6.26 Hz, 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.33 [dq, (P–N–H), J_{HP} = 29.35 Hz, (CH₂OP), J_{HP} = 7.91 Hz]. **m/z:** 45(8%), 81(61%), 98(100%), 126(87%), 133(3%), 153(22%), 184(3%), 200(2%), 228(1%), 258(3%). HR-MS(ESI) calc. for C₁₀H₁₆N₃O₃P (M)⁺: 257.092928, found: (M + H)⁺: 258.100204, (M + Na)⁺: 280.082149.

6.2. Phosphorohydrazidic acid, N'-[(1E)-4-pyridinylmethylene]-dibutyl ester (**4b**)

Aspect: orange oil. **yield:** 55%. **IR (NaCl):** 3437.0 (st, NH); 3101.4 (st, CH_{aromatic}); 2960.6, 2931.7 and 2879.6 (st_{ass}, CH₃ and CH₂); 1591.2 (st, C=N); 1471.6 (δ_{ass}, CH₂ and CH₃); 1394.4 (δ_{sim}, CH₃); 1240.1 (st P=O); 1110.9 (st P–N); 1029.9 (st P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.96 [d, (P–N–H), J_{HP} = 28.10 Hz, 1H]; 8.57 [d, (H₂ and H₆), J_{ortho} = 6.21 Hz, 2H]; 7.88 [s, (N=C–H), 1H]; 7.48 [d, (H₃ and H₅), J_{ortho} = 6.21 Hz, 2H]; 3.83 [m, (CH₂OP), 4H]; 1.57 [qui, (CH₂CH₂OP), J_{HH} = 6.47 Hz, 4H]; 1.33 [sex, (CH₂(CH₂)₂OP), J_{HH} = 7.02 Hz, 4H]; 0.84 [t, (CH₃(CH₂)₃OP), J_{HH} = 7.55 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 150.13 [s, (C₂ and C₆), 2C]; 141.80 [s, (C₄), 1C]; 141.34 [d, (N=C), J_{CP} = 20.01 Hz, 1C]; 120.18 [s, (C₃ and C₅), 1C]; 66.04 [d, (CH₂OP), J_{CP} = 5.35 Hz, 2C]; 31.74 [d, (CH₂CH₂OP), J_{CP} = 6.57 Hz, 2C]; 18.18 [s, (CH₂CH₂CH₂OP), 2C]; 13.37 [s, (CH₃CH₂CH₂CH₂OP), 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.33 [dq, (P–N–H), J_{HP} = 27.56 Hz, (CH₂OP), J_{HP} = 7.35 Hz]. Coupled. **m/z:** 41(13%), 80(4%), 98(100%), 124(4%), 154(22%), 202(2%), 214(<2%), 258(<2%), 270(<2%), 314(<2%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₄H₂₄N₃O₃P (M)⁺: 313.155528, found: (M + H)⁺: 314.162805, (M + Na)⁺: 336.144749.

6.3. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-4-pyridinylmethylene]-diisopropyl ester (**4c**)

Aspect: orange solid. **MP:** 156–158 °C. **yield:** 52%. **IR (NaCl):** 3431.2 (st, NH); 3116.8 (st, CH_{aromatic}); 2979.9, 2933.6 and 2823.6 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1597.0 (st, C=N); 1481.2 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1386.7 (δ_{sim.}, CH₃); 1236.3 (st, P=O); 1114.8 (st, P–N); 1014.5 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.87 [d, (P–NH), *J*_{HP} = 28.92 Hz, 1H]; 8.57 [d, (H₂ and H₆), *J*_{ortho} = 6.77 Hz, 2H]; 7.88 [s, (N=C–H), 1H]; 7.50 [d, (H₃ and H₅), *J*_{ortho} = 6.77 Hz, 2H]; 4.55 [m, (CHOP), 2H]; 1.27 [d, ((CH₃)₂CHOP), *J*_{HH} = 6.42 Hz, 6H]; 1.22 [d, ((CH₃)₂CHOP), *J*_{HH} = 6.42 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 149.80 [s, (C₂ and C₆), 2C]; 142.25 [s, (C₄), 1C]; 140.83 [d, (N=C), *J*_{CP} = 21.02 Hz, 1C]; 120.20 [s, (C₃ and C₅), 1C]; 71.00 [d, (CHOP), *J*_{CP} = 5.97 Hz, 2C]; 23.56 [d, ((CH₃)₂CHOP), *J*_{CP} = 4.41 Hz, 2C]; 23.36 [d, ((CH₃)₂CHOP), *J*_{CP} = 4.41 Hz, 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** –0.79 [dt, (P–N–H), *J*_{HP} = 29.52 Hz, (CHOP), *J*_{HP} = 7.64 Hz], coupled. ***m/z*:** 43(27%), 81(11%), 98(100%), 120(4%), 140(17%), 184(6%), 200(1%), 228(5%), 242(2%), 286(<2%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₂H₂₀N₃O₃P (M)⁺: 285.124228, found: (M + H)⁺: 286.131504, (M + Na)⁺: 308.113449.

6.4. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-4-pyridinylmethylene]-diisobutyl ester (**4d**)

Aspect: yellow solid. **MP:** 110–112 °C. **yield:** 43%. **IR (NaCl):** 3453.1 (st, NH); 3097.5 (st, CH_{aromatic}); 2956.7, 2925.9 and 2821.7 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1597.0 (st, C=N); 1475.5 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1409.9 (δ_{sim.}, CH₃); 1245.9 (st, P=O); 1105.1 (st, P–N); 1033.8 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.98 [d, (P–N–H), *J*_{HP} = 29.0 Hz, 1H]; 8.57 [d, (H₂ and H₆), *J*_{ortho} = 6.27 Hz, 2H]; 7.88 [s, (N=C–H), 1H]; 7.48 [d, (H₃ and H₅), *J*_{ortho} = 6.27 Hz, 2H]; 3.77 [m, (CH₂OP), 4H]; 1.88 [m, (CHCH₂OP), *J*_{HH} = 6.69 Hz, 2H]; 0.88 [d, ((CH₃)₂CHCH₂OP), *J*_{HH} = 6.97 Hz, 12H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 150.10 [s, (C₂ and C₆), 2C]; 141.84 [s, (C₄), 1C]; 141.31 [d, (N=C), *J*_{CP} = 18.90 Hz, 1C]; 120.16 [s, (C₃ and C₅), 1C]; 72.26 [d, (CH₂OP), *J*_{CP} = 6.28 Hz, 2C]; 28.57 [d, (CHCH₂OP), *J*_{CP} = 6.76 Hz, 2C]; 18.51 [d, ((CH₃)₂CHCH₂OP), *J*_{CP} = 3.97 Hz, 4C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.14 [dq, (P–N–H), *J*_{HP} = 29.0 Hz, (CH₂OP), *J*_{HP} = 8.00 Hz], coupled. ***m/z*:** 57(16%), 92(3%), 98(100%), 138(3%), 154(10%), 202(2%), 214(1%), 242(3%), 314(<1%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₄H₂₄N₃O₃P (M)⁺: 313.155528, found: (M + H)⁺: 314.162805, (M + Na)⁺: 336.144749.

6.5. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-3-pyridinylmethylene]-diethyl ester (**4e**)

Aspect: yellow oil. **yield:** 55%. **IR (NaCl):** 3427.3 (st, NH); 3165.0 (st, CH_{aromatic}); 2985.7 and 2927.8 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1604.7 (st, C=N); 1475.5 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1413.7 (δ_{sim.}, CH₃); 1238.2 (st, P=O); 1163.0 (st, P–N); 1031.8 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.77 [d, (P–N–H), *J*_{HP} = 28.48 Hz, 1H]; 8.69 [d, (H₂), *J*_{HH} = 1.71 Hz, 1H]; 8.52 [dd, (H₆), *J*_{ortho} = 4.83 Hz, *J*_{meta} = 1.71 Hz, 1H]; 7.94 [m, (N=CH and H₄), 2H]; 7.40 [dd, (H₅), *J*_{ortho} = 4.71 Hz and 7.90 Hz, 1H]; 4.04 [m, (CH₂CH₂OP), 4H]; 1.23 [t, (CH₃CH₂OP), *J*_{HH} = 6.90 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 149.82 [s, (C₆), 1C]; 147.77 [s, (C₂), 1C]; 141.01 [d, (N=C), *J*_{CP} = 19.02 Hz, 1C]; 132.65 [s, (C₄), 1C]; 130.53 [s, (C₃), 1C]; 123.89 [s, (C₅), 1C]; 62.45 [d, (CH₂OP), *J*_{CP} = 5.48 Hz, 2C]; 16.03 [d, (CH₃CH₂OP), *J*_{CP} = 5.48 Hz, 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.61 [dq, (P–N–H), *J*_{HP} = 29.89 Hz, (CH₂OP), *J*_{HP} = 7.35 Hz], coupled. ***m/z*:** 51(5%), 65(38%), 92(96%), 120(100%), 133(2%), 155(2%), 184(2%), 200(<1%), 229(<1%), 257 (8%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₀H₁₆N₃O₃P (M)⁺: 257.092928, found: (M + H)⁺: 258.100204, (M + Na)⁺: 280.082149.

6.6. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-3-pyridinylmethylene]-dibutyl ester (**4f**)

Aspect: orange oil. **yield:** 55%. **IR (NaCl):** 3431.2 (st, NH); 3101.4 (st, CH_{aromatic}); 2960.6, 2931.7 and 2873.8 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1600.8 (st, C=N); 1465.8 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1419.5 (δ_{sim.}, CH₃); 1242.1 (st, P=O); 1066.6 (st, P–N); 1029.9 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.77 [d, (P–N–H), *J*_{HP} = 28.02 Hz, 1H]; 8.70 [d, (H₂), *J*_{HH} = 1.70 Hz, 1H]; 8.52 [dd, (H₆), *J*_{ortho} = 4.74 Hz and 1.58 Hz, 1H]; 7.93 [s, (N=CH), 1H]; 7.92 [td (H₄), *J*_{ortho} = 6.45 Hz, *J*_{meta} = 1.94 Hz, 1H]; 7.41 [dd, (H₅), *J*_{ortho} = 4.61 Hz and 7.83 Hz, 1H]; 3.98 [m, (CH₂OP), 4H]; 1.57 [m, (CH₂CH₂OP), 4H]; 1.33 [sex, (CH₂(CH₂)₂OP), *J*_{HH} = 7.39 Hz, 4H]; 0.84 [t, (CH₃(CH₂)₃OP), *J*_{HH} = 7.20 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 149.83 [s, (C₆), 1C]; 147.72 [s, (C₂), 1C]; 140.90 [d, (N=C), *J*_{CP} = 20.84 Hz, 1C]; 132.63 [s, (C₄), 1C]; 130.56 [s, (C₃), 1C]; 123.90 [s, (C₅), 1C]; 65.95 [d, (CH₂OP), *J*_{CP} = 6.64 Hz, 2C]; 31.71 [d, (CH₂CH₂OP), *J*_{CP} = 6.64 Hz, 2C]; 18.20 [s, (CH₂CH₂CH₂OP), 2C]; 13.38 [s, (CH₃CH₂CH₂OP), 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.73 [dq, (P–N–H), *J*_{HP} = 27.47 Hz, (CH₂OP), *J*_{HP} = 7.84 Hz], coupled. ***m/z*:** 41(11%), 80(5%), 98(100%), 124(7%), 154(21%), 184(2%), 214(1%), 258(1%), 270(<1%), 314(1%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₄H₂₄N₃O₃P (M)⁺: 313.155528, found: (M + H)⁺: 314.162805, (M + Na)⁺: 336.144749.

6.7. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-3-pyridinylmethylene]-diisopropyl ester (**4g**)

Aspect: orange oil. **yield:** 55%. **IR (NaCl):** 3431.2 (st, NH); 3099.5 (st, CH_{aromatic}); 2979.9, 2925.9 and 2817.9 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1604.7 (st, C=N); 1475.5 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1380.9 (δ_{sim.}, CH₃); 1245.9 (st, P=O); 1097.4 (st, P–N); 1028.0 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.67 [d, (P–N–H), *J*_{HP} = 28.32 Hz, 1H]; 8.70 [d, (H₂), *J*_{HH} = 1.75 Hz, 1H]; 8.52 [dd, (H₆), *J*_{ortho} = 4.92 Hz and 1.66 Hz, 1H]; 7.94 [m, (N=CH) and (H₄), 2H]; 7.41 [dd, (H₅), *J*_{ortho} = 4.72 Hz and 7.94 Hz, 1H]; 4.54 [m, (CHOP), 2H]; 1.23 [d, (CH₃)₂CHOP, *J*_{HH} = 6.22 Hz, 6H]; 1.19 [d, (CH₃)₂CHOP, *J*_{HH} = 6.22 Hz, 6H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 149.57 [s, (C₆), 1C]; 147.51 [s, (C₂), 1C]; 140.43 [d, (N=C), *J*_{CP} = 19.15 Hz, 1C]; 132.63 [s, (C₄), 1C]; 130.71 [s, (C₃), 1C]; 123.93 [s, (C₅), 1C]; 70.82 [d, (CHOP), *J*_{CP} = 5.32 Hz, 2C]; 23.58 [d, (CH₃)₂CHOP, *J*_{CP} = 4.52 Hz, 2C]; 23.34 [d, (CH₃)₂CHOP, *J*_{CP} = 4.52 Hz, 2C]. **NMR ³¹P (DMSO):** –0.15 [dt, (P–N–H), *J*_{HP} = 27.54 Hz, (CHOP), *J*_{HP} = 7.36 Hz], coupled. ***m/z*:** 43(22%), 81(11%), 98(100%), 120(19%), 140(16%), 184(6%), 200(1%), 228(3%), 242(1%), 285(1%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₂H₂₀N₃O₃P (M)⁺: 285.124228, found: (M + H)⁺: 286.131504, (M + Na)⁺: 308.113449.

6.8. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-3-pyridinylmethylene]-diisobutyl ester (**4h**)

Aspect: white solid. **MP:** 92–94 °C. **yield:** 47%. **IR (NaCl):** 3435.1 (st, NH); 3097.5 (st, CH_{aromatic}); 2956.7, 2927.8 and 2823.6 (st_{ass.}, CH₃ and CH₂); 1606.6 (st, C=N); 1465.8 (δ_{ass.}, CH₂ and CH₃); 1398.3 (δ_{sim.}, CH₃); 1247.9 (st, P=O); 1093.6 (st, P–N); 1031.8 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO):** 9.78 [d, (P–N–H), *J*_{HP} = 28.52 Hz, 1H]; 8.70 [d, (H₂), *J*_{HH} = 1.86 Hz, 1H]; 8.52 [dd, (H₆), *J*_{ortho} = 4.76 Hz and 1.65 Hz, 1H]; 7.93 [s, (N=CH), 1H]; 7.92 [td (H₄), *J*_{ortho} = 7.04 Hz, *J*_{meta} = 1.86 Hz, 1H]; 7.42 [dd, (H₅), *J*_{ortho} = 4.26 Hz and 7.65 Hz, 1H]; 3.77 [m, (CH₂OP), 4H]; 1.88 [m, (CHCH₂OP), *J*_{HH} = 6.50 Hz, 2H]; 0.88 [d, ((CH₃)₂CHCH₂OP), *J*_{HH} = 7.66 Hz, 12H]. **NMR ¹³C (DMSO):** 149.76 [s, (C₆), 1C]; 147.64 [s, (C₂), 1C]; 140.84 [d, (N=C), *J*_{CP} = 19.30 Hz, 1C]; 132.61 [s, (C₄), 1C]; 130.58 [s, (C₃), 1C]; 123.91 [s, (C₅), 1C]; 72.12 [d, (CH₂OP), *J*_{CP} = 6.37 Hz, 2C]; 28.57 [d, (CHCH₂OP), *J*_{CP} = 6.37 Hz, 2C]; 18.53 [d, (CH₃)₂CHCH₂OP, *J*_{CP} = 3.70 Hz, 4C]. **NMR ³¹P (DMSO):** 1.64 [dq, (P–N–H), *J*_{HP} = 30.5 Hz, (CH₂OP), *J*_{HP} = 7.56 Hz], coupled. ***m/z*:** 57(13%), 92(4%), 98(100%), 138(4%),

154(11%), 184(3%), 214(1%), 242(1%), 313(<1%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{14}H_{24}N_3O_3P$ (M)⁺: 313.155528, found: ($M + H$)⁺: 314.162805, ($M + Na$)⁺: 336.144749.

6.9. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E,Z*)-2-pyridinylmethylene]-diethyl ester (**4i**)

Aspect: dark oil. **yield:** 36%. **IR (NaCl):** 3433.1 (st, NH); 3140.0 (st, $CH_{aromatic}$); 2983.7, 2931.7 and 2912.4 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2); 1585.4 (st, $C=N$); 1461.9 (δ_{ass} , CH_2 and CH_3); 1394.4 (δ_{sim} , CH_3); 1240.1 (st, $P=O$); 1164.9 (st, $P-N$); 1028.0 (st, $P-O-C$). **NMR 1H (DMSO):** 9.84 [d, ($P-N-H$), J_{HP} = 27.94 Hz, 1H]; 8.53 [ddd, (H6), J_{ortho} = 4.93 Hz, J_{meta} = 1.82 Hz, J_{para} = 0.64 Hz, 1H]; 7.96 [s, ($N=CH$), 1H]; 7.79 [dt, (H4), J_{ortho} = 7.64 Hz, J_{meta} = 1.96 Hz, 1H]; 7.75 [td, (H3), J_{ortho} = 7.82 Hz, J_{meta} = 1.10 Hz, 1H]; 7.33 [ddd, (H3), J_{ortho} = 7.52 Hz, J_{ortho} = 5.37 Hz, J_{meta} = 1.28 Hz, 1H]; 4.03 [m, (CH_2OP), 4H]; 1.24 [t, (CH_3CH_2OP), J_{HH} = 7.23 Hz, 6H]. **NMR ^{13}C (DMSO):** 153.49 [s, (C2), 1C]; 149.30 [s, (C5), 1C]; 144.60 [d, ($N=C$), J_{CP} = 19.15 Hz, 1C]; 136.74 [s, (C6), 1C]; 123.66 [s, (C4), 1C]; 119.03 [s, (C3), 1C]; 62.56 [d, (CH_2OP), J_{CP} = 5.67 Hz, 2C]; 16.04 [d, (CH_3CH_2OP), J_{CP} = 6.60 Hz, 2C]. **NMR ^{31}P (DMSO):** 1.53 [dq, ($P-N-H$), J_{HP} = 28.25 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 7.70 Hz]; 0.97 [td, ($P-N-H$), J_{HP} = 34.01 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 7.70 Hz]. Coupled; **m/z:** 51(5%), 65(39%), 92(94%), 120(100%), 133(2%), 155(2%), 184(2%), 200(<1%), 229(<1%), 257(7%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{10}H_{16}N_3O_3P$ (M)⁺: 257.092928, found: ($M + H$)⁺: 258.100204, ($M + Na$)⁺: 280.082149.

6.10. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E,Z*)-2-pyridinylmethylene]-dibutyl ester (**4j**)

Aspect: dark oil. **yield:** 45%. **IR (NaCl):** 3429.3 (st, NH); 3136.1 (st, $CH_{aromatic}$); 2960.6 and 2877.7 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2); 1585.4 (st, $C=N$); 1463.9 (δ_{ass} , CH_2 and CH_3); 1386.7 (δ_{sim} , CH_3); 1240.1 (st, $P=O$); 1110.9 (st, $P-N$); 1028.0 (st, $P-O-C$). **NMR 1H (DMSO):** 9.85 [d, ($P-N-H$), J_{HP} = 28.72 Hz, 1H]; 8.53 [ddd, (H6), J_{ortho} = 5.04 Hz, J_{meta} = 1.84 Hz, J_{para} = 0.96 Hz, 1H]; 7.95 [s, ($N=CH$), 1H]; 7.79 [dt, (H4), J_{ortho} = 7.73 Hz, J_{meta} = 1.89 Hz, 1H]; 7.74 [td, (H3), J_{ortho} = 7.87 Hz, J_{meta} = 1.10 Hz, 1H]; 7.34 [ddd, (H5), J_{ortho} = 7.37 Hz, J_{ortho} = 5.28 Hz, J_{meta} = 1.32 Hz, 1H]; 3.98 [m, (CH_2OP), 4H]; 1.57 [m, (CH_2CH_2OP), 4H]; 1.34 [sex, ($CH_2(CH_2)_2OP$), J_{HH} = 7.28 Hz, 4H]; 0.84 [t, ($CH_3(CH_2)_3OP$), J_{HH} = 7.25 Hz, 6H]. **NMR ^{13}C (DMSO):** 153.54 [s, (C2), 1C]; 149.29 [s, (C5), 1C]; 144.49 [d, ($N=C$), J_{CP} = 19.11 Hz, 1C]; 136.68 [s, (C6), 1C]; 123.63 [s, (C4), 1C]; 118.85 [s, (C3), 1C]; 65.98 [d, (CH_2OP), J_{CP} = 5.49 Hz, 2C]; 31.76 [d, (CH_2CH_2OP), J_{CP} = 6.34 Hz, 2C]; 18.19 [s, ($CH_2CH_2CH_2OP$), 2C]; 13.36 [s, ($CH_3CH_2CH_2CH_2OP$), 2C]. **NMR ^{31}P (DMSO):** 1.54 [dq, ($P-N-H$), J_{HP} = 29.41 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 7.66 Hz]; 1.05 [td, ($P-N-H$), J_{HP} = 34.83 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 7.66 Hz]. Coupled. **m/z:** 65(19%), 92(67%), 120(100%), 133(2%), 161(4%), 184(1%), 208(2%), 258(1%), 270(<1%), 313(1%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{14}H_{24}N_3O_3P$ (M)⁺: 313.155528, found: ($M + H$)⁺: 314.162805, ($M + Na$)⁺: 336.144749.

6.11. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-2-pyridinylmethylene]-diisopropyl ester (**4k**)

Aspect: white solid. **MP:** 171–173 °C. **yield:** 54%. **IR (NaCl):** 3427.3 (st, NH); 3136.1 (st, $CH_{aromatic}$); 2981.8, 2943.2 and 2839.1 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2); 1583.5 (st, $C=N$); 1456.2 (δ_{ass} , CH_2 and CH_3); 1382.9 (δ_{sim} , CH_3); 1228.6 (st, $P=O$); 1110.9 (st, $P-N$); 1024.1 (st, $P-O-C$). **NMR 1H (DMSO):** 9.74 [d, ($P-N-H$), J_{HP} = 27.83 Hz, 1H]; 8.53 [ddd, (H6), J_{ortho} = 5.24 Hz, J_{meta} = 1.95 Hz, J_{para} = 0.86 Hz, 1H]; 7.96 [s, ($N=CH$), 1H]; 7.79 [dt, (H4), J_{ortho} = 7.91 Hz, J_{meta} = 1.88 Hz, 1H]; 7.74 [td, (H3), J_{ortho} = 7.65 Hz, J_{meta} = 1.25 Hz, 1H]; 7.32 [ddd, (H5), J_{ortho} = 7.45 Hz, J_{ortho} = 5.43 Hz, J_{meta} = 1.51 Hz, 1H]; 4.55 [m, ($CHOP$), 2H]; 1.34 [d, ($CH_3)_2CHOP$], J_{HH} = 6.35 Hz, 6H];

1.28 [d, ($CH_3)_2CHOP$], J_{HH} = 6.35 Hz, 6H]. **NMR ^{13}C (DMSO):** 153.64 [s, (C2), 1C]; 149.25 [s, (C5), 1C]; 144.12 [d, ($N=C$), J_{CP} = 18.42 Hz, 1C]; 136.71 [s, (C6), 1C]; 123.52 [s, (C4), 1C]; 118.77 [s, (C3), 1C]; 70.90 [d, ($CHOP$), J_{CP} = 5.51 Hz, 2C]; 23.55 [d, ($CH_3)_2CHOP$], J_{CP} = 4.82 Hz, 2C]; 23.34 [d, ($CH_3)_2CHOP$], J_{CP} = 4.82 Hz, 2C]. **NMR ^{31}P (DMSO):** -0.36 [dt, ($P-N-H$), J_{HP} = 27.43 Hz, ($CHOP$), J_{HP} = 7.34 Hz]. Coupled. **m/z:** 43(16%), 65(20%), 92(56%), 120(100%), 147(5%), 184(5%), 201(1%), 228(2%), 243(23%), 285(5%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{12}H_{20}N_3O_3P$ (M)⁺: 285.124228, found: ($M + H$)⁺: 286.131504, ($M + Na$)⁺: 308.113449.

6.12. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-2-pyridinylmethylene]-diisobutyl ester (**4l**)

Aspect: brown solid. **MP:** 90–92 °C. **yield:** 50%. **IR (NaCl):** 3438.9 (st, NH); 3134.2 (st, $CH_{aromatic}$); 2958.7, 2875.7 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2); 1585.4 (st, $C=N$); 1461.9 (δ_{ass} , CH_2 and CH_3); 1371.3 (δ_{sim} , CH_3); 1228.6 (st, $P=O$); 1103.2 (st, $P-N$); 1018.3 (st, $P-O-C$). **NMR 1H (DMSO):** 9.84 [d, ($P-N-H$), J_{HP} = 28.90 Hz, 1H]; 8.52 [ddd, (H6), J_{ortho} = 4.82 Hz, J_{meta} = 1.92 Hz, J_{para} = 0.63 Hz, 1H]; 7.95 [s, ($N=CH$), 1H]; 7.80 [dt, (H4), J_{ortho} = 7.75 Hz, J_{meta} = 1.64 Hz, 1H]; 7.72 [td, (H3), J_{ortho} = 7.90 Hz, J_{meta} = 1.16 Hz, 1H]; 7.32 [ddd, (H5), J_{ortho} = 7.51 Hz, J_{ortho} = 6.11 Hz, J_{meta} = 1.36 Hz, 1H]; 3.78 [m, (CH_2OP), 4H]; 1.88 [n, ($CHCH_2OP$), J_{HH} = 6.61 Hz, 2H]; 0.87 [d, ($CH_3)_2CHCH_2OP$], J_{HH} = 6.98 Hz, 12H]. **NMR ^{13}C (DMSO):** 153.54 [s, (C2), 1C]; 149.28 [s, (C5), 1C]; 144.46 [d, ($N=C$), J_{CP} = 19.80 Hz, 1C]; 136.71 [s, (C6), 1C]; 123.61 [s, (C4), 1C]; 118.76 [s, (C3), 1C]; 72.15 [d, (CH_2OP), J_{CP} = 6.51 Hz, 2C]; 28.51 [d, ($CHCH_2OP$), J_{CP} = 6.25 Hz, 2C]; 18.50 [d, ($CH_3)_2CHCH_2OP$], J_{CP} = 3.50 Hz, 4C]. **NMR ^{31}P (DMSO):** 1.43 [dq, ($P-N-H$), J_{HP} = 30.05 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 7.12 Hz]. Coupled. **m/z:** 65(17%), 92(61%), 120(100%), 123(1%), 161(5%), 202(4%), 214(<1%), 258(4%), 313(2%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{14}H_{24}N_3O_3P$ (M)⁺: 313.155528, found: ($M + H$)⁺: 314.162805, ($M + Na$)⁺: 336.144749.

6.13. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-(5-bromo-3-pyridinyl)methylene]-disecbutyl ester (**4m**)

Aspect: white solid. **MP:** 121–122 °C. **yield:** 62%. **IR (NaCl):** 3440.9 (st, NH); 3101.4 (st, $CH_{aromatic}$); 2972.2, 2931.7 and 2827.5 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2); 1600.8 (st, $C=N$); 1471.6 (δ_{ass} , CH_2 and CH_3); 1242.1 (st, $P=O$); 1095.5 (st, $P-N$); 1018.3 (st, $P-O-C$). **NMR 1H (DMSO):** 9.91 [d, ($P-N-H$), J_{HP} = 28.62 Hz, 1H]; 8.70 [s, (H6), 1H]; 8.64 [s, (H2), 1H]; 8.12 [s, ($N=CH$), 1H]; 7.89 [s, (H4), 1H]; 4.34 [m, ($CHOP$), 2H]; 1.55 [m, (CH_2CHOP), 4H]; 1.27 [d, (CH_3CHOP), J_{HH} = 5.45 Hz, 3H]; 1.21 [d, (CH_3CHOP), J_{HH} = 5.45 Hz, 3H]; 0.88 [t, (CH_3CH_2CHOP), J_{HH} = 7.80 Hz, 3H]; 0.84 [t, (CH_3CH_2CHOP), J_{HH} = 7.80 Hz, 3H]. **NMR ^{13}C (DMSO):** 150.00 [s, (C6), 1C]; 145.90 [s, (C2), 1C]; 138.68 [d, ($N=C$), J_{CP} = 19.85 Hz, 1C]; 134.62 [s, (C4), 1C]; 132.70 [s, (C3), 1C]; 120.48 [s, (C5), 1C]; 75.55 [t, ($CHOP$), J_{CP} = 5.76 Hz, 2C]; 29.84 [d, (CH_2CHOP), J_{CP} = 6.00 Hz, 1C]; 29.68 [d, (CH_2CHOP), J_{CP} = 6.00 Hz, 1C]; 21.10 [d, (CH_3CHOP), J_{CP} = 2.63 Hz, 1C]; 20.82 [d, (CH_3CHOP), J_{CP} = 2.63 Hz, 1C]; 9.32 [d, (CH_3CH_2CHOP), J_{CP} = 6.72 Hz, 2C]. **NMR ^{31}P (DMSO):** -0.30 [dt, ($P-N-H$), J_{HP} = 27.97 Hz, (CH_2OP), J_{HP} = 8.13 Hz]; Coupled. **m/z:** 57(17%), 91(4%), 98(100%), 137(1%), 154(5%), 200(5%), 262(4%), 280(1%), 306(2%), 392(<1%). HR-MS (ESI) calc. for $C_{14}H_{23}BrN_3O_3P$ (M)⁺: 391.066041, found: ($M + H$)⁺: 392.073317, ($M + Na$)⁺: 414.055262.

6.14. Phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-(2-bromo-3-pyridinyl)methylene]-disecbutyl ester (**4n**)

Aspect: yellow oil. **yield:** 64%. **IR (NaCl):** 3435.1 (st, NH); 3134.2 (st, $CH_{aromatic}$); 2974.1, 2937.5 and 2879.6 (δ_{ass} , CH_3 and CH_2);

1577.7 (st, C=N); 1460.0 (δ_{ass} , CH₂ and CH₃); 1392.6 (δ_{sym} , CH₃); 1234.4 (st, P=O); 1105.2 (st, P–N); 1002.9 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO)**: 10.00 [d, (P–N–H), J_{HP} = 29.20 Hz, 1H]; 8.35 [dd, (H₆), J_{m} = 2.12 Hz, J_{o} = 4.87 Hz, 1H]; 8.17 [s, (N=CH), 1H]; 8.06 [dd, (H₄), J_{m} = 1.94 Hz, J_{o} = 7.77 Hz, 1H]; 7.50 [m, (H₅), 1H]; 4.35 [m, (CHOP), 2H]; 1.55 [m, (CH₂CHOP), 2H]; 1.25 [d, (CH₃CHOP), J_{HH} = 6.08 Hz, 3H]; 1.20 [d, (CH₃CHOP), J_{HH} = 6.08 Hz, 3H]; 0.87 [t, (CH₃CH₂CHOP), J_{HH} = 7.44 Hz, 3H]; 0.84 [t, (CH₃CH₂CHOP), J_{HH} = 7.44 Hz, 3H]. **NMR ¹³C (DMSO)**: 150.36 [s, (C₆), 1C]; 141.21 [s, (C₂), 1C]; 140.02 [d, (N=C), J_{CP} = 18.22 Hz, 1C]; 134.53 [s, (C₄), 1C]; 131.10 [s, (C₃), 1C]; 123.96 [s, (C₅), 1C]; 75.66 [m, (CHOP), 2C]; 29.84 [d, (CH₂CHOP), J_{CP} = 4.19 Hz, 1C]; 29.73 [d, (CH₂CHOP), J_{CP} = 4.19 Hz, 1C]; 21.10 [d, (CH₃CHOP), J_{CP} = 3.60 Hz, 1C]; 20.83 [d, (CH₃CHOP), J_{CP} = 3.60 Hz, 1C]; 9.38 [d, (CH₃CH₂CHOP), J_{CP} = 6.47 Hz, 2C]. **NMR ³¹P (DMSO)**: –0.46 [dt, (P–N–H), J_{HP} = 29.45 Hz, (CHOP), J_{HP} = 8.12 Hz]; coupled. **m/z**: 41(28%), 57(20%), 73(10%), 98(100%), 103(6%), 120(7%), 154(4%), 185(5%), (392(<1%)). HR-MS (ESI) calc. for C₁₄H₂₃BrN₃O₃P (M)⁺: 391.066041, found: (M + H)⁺: 392.073317, (M + Na)⁺: 414.055262.

6.15. Phosphorohydrazidic acid, *N*-[(1*E*)-(3,5-dichloro-4-pyridinyl)methylene]-disecbutyl ester (**4o**)

Aspect: yellow oil. **yield**: 64%. **IR (NaCl)**: 3423.5 (st, NH); 3128.4 (st, CH_{aromatic}); 2974.1 and 2929.7 (δ_{ass} , CH₃ and CH₂); 1600.8 (st, C=N); 1465.2 (δ_{ass} , CH₂ and CH₃); 1388.7 (δ_{sym} , CH₃); 1238.2 (st, P=O); 1109.3 (st, P–N); 1004.8 (st, P–O–C). **NMR ¹H (DMSO)**: 10.16 [d, (P–N–H), J_{HP} = 29.74 Hz, 1H]; 8.63 [s, (H₂ and H₆), 2H]; 8.13 [s, (N=CH), 1H]; 4.36 [m, (CHOP), 2H]; 1.56 [m, (CH₂CHOP), 4H]; 1.24 [d, (CH₃CHOP), J_{HH} = 6.07 Hz, 3H]; 1.20 [d, (CH₃CHOP), J_{HH} = 6.07 Hz, 3H]; 0.86 [t, (CH₃CH₂CHOP), J_{HH} = 7.29 Hz, 3H]; 0.83 [t, (CH₃CH₂CHOP), J_{HH} = 7.29 Hz, 3H]. **NMR ¹³C (DMSO)**: 148.87 [s, (C₂ and C₆), 2C]; 137.64 [d, (N=C), J_{CP} = 20.19 Hz, 1C]; 136.80 [s, (C₃ and C₅), 2C]; 130.33 [s, (C₄), 1C]; 76.17 [m, (CHOP), 2C]; 30.30 [d, (CH₂CHOP), J_{CP} = 5.62 Hz, 1C]; 30.14 [d, (CH₂CHOP), J_{CP} = 5.62 Hz, 1C]; 21.41 [d, (CH₃CHOP), J_{CP} = 3.00 Hz, 1C]; 21.30 [d, (CH₃CHOP), J_{CP} = 3.00 Hz, 1C]; 9.70 [s, (CH₃CH₂CHOP), 2C]. **NMR ³¹P (DMSO)**: –1.54 [dt, (P–N–H), J_{HP} = 29.97 Hz, (CHOP), J_{HP} = 8.12 Hz]; Coupled. **m/z**: 57(15%), 98(100%), 124(2%), 154(5%), 252(2%), 296(2%), 326(<1%), 352(<1%), 382(<1%). HR-MS (ESI) calc. for C₁₄H₂₂Cl₂N₃O₃P (M)⁺: 381.077584, found: (M + H)⁺: 382.084860, (M + Na)⁺: 404.066805.

7. Biological evaluation

7.1. Macrophage culture

The J774 cell line-derived murine macrophage cells were provided by the Rio de Janeiro Cell Bank-HUCFF-UFRJ. The cells were grown in DMEM medium containing L-glutamine (2 mM), buffered with HEPES (10 mM), and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and gentamicin (1 mg/L) in a humidified incubator (5% CO₂) at 37 °C. The cells were passaged twice per week.

7.2. Cytotoxicity assay in macrophages

J774 macrophages were seeded (1.5 × 10⁵ cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 µL of medium. The cells were allowed to attach to the bottom of the well for 24 h at 37 °C and then exposed to the different concentrations of compounds (100, 10 and 1 µM) for 48 h. Afterwards, the cells were washed with PBS and 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, the cells were resuspended in 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO), and the

absorbance was measured using an ELISA reader at 540 nm [22]. Each concentration was assayed in triplicate, and the corresponding cell growth controls were used in each measurement. The trials were also performed in duplicate.

7.3. Parasite culture

L. amazonensis [MHOM/BR/87/BA125] and *L. braziliensis* [MHOM/BR/01/BA788] strains were kindly provided by Valéria Borges, PhD (Fundação Oswaldo Cruz – BA/Brazil) and were maintained in vitro as proliferating promastigotes at 26 °C in Schneider's insect medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, gentamycin (1 mg/L), L-glutamine (2 mM) and 2% sterile human urine.

7.4. Leishmanicidal activity

Leishmania parasites were harvested at a late exponential phase of growth, resuspended in fresh medium, counted in a Neubauer's chamber and adjusted to a concentration of 10⁵ parasites/well in the presence of the corresponding concentration of compounds in a 96-microwell plate. They were allowed to proliferate in the presence of the compounds at 26 °C for 48 h for promastigotes. Then, the parasites were counted using an automatic cell counter [34]. All of the assays were performed in triplicate, and the experiments were repeated at least twice. The inhibition caused by each compound was expressed as a percentage relative to the control cells (treated with the vehicle, DMSO). The LD₅₀ and their standard errors were calculated using GraphPad Prism 5.0 software.

7.5. Antiamastigote assay

In vitro model of the amastigotes, inflammatory macrophages were obtained from BALB/c mice previously inoculated by the intraperitoneal route with 3% thyoglycollate medium (Sigma). Briefly, peritoneal macrophages were plated at 4 × 10⁵ cell/well on coverslips (Ø 13 cm) previously arranged in a 24-well plate in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS and allowed to adhere overnight. Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigote using a ratio of 1:10 at 37 °C for 4 h. Non-internalized promastigotes were eliminated, and solutions of tested compounds were added in different concentrations and maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h. Slides were fixed with methanol, stained with Giemsa and intracellular amastigotes were counted (two hundred macrophages were evaluated per assay). The results were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software and expressed as infection index (percentage of infected macrophages multiplied by the average number of amastigotes per macrophage). Miltefosine was used as reference drug.

7.6. In vivo infection in a murine model

Female BALB/c mice, 6–8 weeks old, were obtained from the Federal University of Ribeirão Preto, Brazil. The animals were maintained under a 12-h light/dark cycle in a controlled-temperature room (22 ± 2 °C) with free access to water and pellet food. All of the procedures were performed after the approval of the protocol by the Ethics Committee – UFAL for animal handling (No: 2013.02).

A murine model closely resembling human pathology was previously described [23]. Briefly, the right ear dermis of BALB/c mice was inoculated with stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/87/BA125), with 10⁵ parasites in 10 µL of sterile saline, using a 27.5-gauge needle. After the second week post-infection, a group of mice (n = 5) was treated daily (28 days) with

4m, **4n** or miltefosine (positive control) by oral administration at 30 mg/kg/day, diluted in water for administration. A negative control group was treated orally with water by injection ($n = 5$). Lesion size, which was defined as the difference in thickness (in millimeters) between the infected ear and the non-infected contralateral ear, was monitored twice weekly using a digital caliper.

7.7. Parasite load quantification

Parasite load was determined using a quantitative limiting dilution assay as previously described [35]. Briefly, infected ears and draining lymph nodes were aseptically excised after treatment and homogenized in Schneider medium. The homogenates were serially diluted in Schneider medium with 10% FCS and seeded into 96-well plates.

The data are reported as the average $\pm$ standard error of the mean ($M \pm S.E.M$) after statistical analysis employing one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Differences between means were considered significant when $p < 0.05$ when compared to the control group. Calculations were performed using GraphPad 5.0 software.

7.8. Molecular modeling

According to the reasons presented above, we chose FPPS and the enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways as possible targets in the molecular docking study. Glycolysis is a process catalyzed by ten enzymes: hexokinase (HK), glucose-6-phosphate isomerase (G6PI), phosphofructokinase (PFK), fructose bisphosphate aldolase (FBPA), triose phosphate isomerase (TPI), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), phosphoglycerate kinase (PGK), phosphoglycerate mutase (PGM), enolase (ENO) and pyruvate kinase (PYK). The PPP is subdivided into two branches – the oxidative branch, comprising the enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconolactonase (6PGL) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH); and the non-oxidative branch, comprising the enzymes ribose-5-phosphate isomerase (RPI), ribulose-5-phosphate 4-epimerase (RPE), transaldolase (TAL) and transketolase (TKT).

In this group of enzymes, there is only one with an available crystallographic structure for one of the *Leishmania* species evaluated in the experimental section, namely, *L. braziliensis* 6PGL, which is deposited in the RCSB Protein Data Bank (PDB code 3CH7) with a resolution of 2.29 Å. For this structure, incomplete side chains were corrected using Swiss PDBViewer v. 4.1 [36], and water molecules were removed before the docking procedure. For the remaining *L. braziliensis* enzymes, sequences available in the UniProtKB/Swiss-Prot protein sequence database were used for construction of homology models using the automated mode of the Swiss-Model protein structure homology-modeling server [37]: A4HCH8 for FPPS, A4HBM3 for HK, A4H6W2 for PGI, A4HHQ0 for PFK, A4HNY6 for FBPA, E9AIG9 for TPI, A4HIN0 for GPDH, A4HIS6 for PGK, A4HLS3 for PGM, A4HL13 for ENO, A4HM36 for PYK, B0FGJ4 for 6PGDH, A7UFH5 for G6PDH, A4HGQ2 for RPI, A4HLL7 for RPE, A4HJ8 for TAL, and A4HDR8 for TKT. Unfortunately, there is a paucity of available crystallographic and sequence information for *L. amazonensis* enzymes, and it was only possible to find sequence data for two enzymes: Q8I911 for G6PDH, and B0FZP5 for 6PGDH, for which we constructed homology models according to the same procedure used for the *L. braziliensis* enzymes.

All of the ligand structures were constructed and energy-minimized with the PM3 method [38] available in the Spartan'14 software (Wavefunction, Inc.). The molecular docking study was carried out with GOLD 5.2 (CCDC Software Ltd.). Among the four different scoring functions available in the program, ASP [39],

ChemScore [40,41], GoldScore [42], and ChemPLP [43], the latter is claimed to be generally more effective than the other scoring functions for both pose prediction and virtual screening. ChemPLP is the default scoring function for GOLD 5.2 and was employed by us for the docking procedure.

Hydrogen atoms were added to protein structures based on ionization and tautomeric states defined by the program. Serine, threonine and tyrosine hydroxyl groups and lysine amino groups were free to rotate during the docking procedure to allow the best orientation of hydrogen bonds involving these groups. The number of genetic operations (crossover, migration, mutation) for each run was set to 100,000 during the searching procedure. The radius of the binding sites for the enzymes was set to 10 Å around atoms selected after superposition with available, related, ligand-containing crystallographic structures.

Acknowledgments

The authors would like to thank CNPq, FAPERJ, INCT-INOVAR, and CAPES for fellowship and financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.014>.

References

- [1] WHO. Control of the Leishmaniasis, 2010. World Health Organization Technical Report Series. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [2] L.H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H.A. Kim, J.L. Siqueira-Neto, Visceral Leishmaniasis Treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol.* 2 (2012) 11–19.
- [3] J. Alvar, I.D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. Den Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS ONE* 7 (2012) e35671.
- [4] L.F. Oliveira, A.O. Schubach, M.M. Martins, S.L. Passos, R.V. Oliveira, M.C. Marzochi, C.A. Andrade, Systematic review of the adverse effects of cutaneous Leishmaniasis treatment in the new world, *Acta Trop.* 118 (2011) 87–96.
- [5] F. Faraut-Gambarelli, R. Piarroux, M. Deniau, B. Giusiano, P. Marty, G. Michel, B. Faugère, H. Dumon, *In vitro* and *in vivo* resistance of Leishmania infantum to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral Leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 827–830.
- [6] D.A. Goyeneche-Patino, L. Valderrama, J. Walker, N.G. Saravia, Antimony resistance and Trypanothione in experimentally selected and clinical strains of leishmania panamensis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 4503–4506.
- [7] H.C. Maltezou, Visceral Leishmaniasis: advances in treatment, *Recent Pat. Anti Infect Drug Discov.* 3 (2008) 192–198.
- [8] A.J.M. Nogueira, M.E.F. Lima, J.B.N. DaCosta, E.S.S. Alves, D.O. Anjos, M.A. Vannier-Santos, A.L. Rangel, Síntese, caracterização e estudo da atividade inibitória de novas dialquilfosforil-amilidrazonas Sobre o crescimento de Tripanossomatídeos, *Quím. Nova* 34 (2011) 1365–1369.
- [9] A. Montalvetti, B.N. Bailey, M.B. Martin, G.W. Severin, E. Oldfield, R. Docampo, Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl pyrophosphate synthase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33930–33937.
- [10] V. Yardley, A.A. Khan, M.B. Martin, T.R. Slifer, F.G. Araujo, S.N.J. Moreno, R. Docampo, S.L. Croft, E. Oldfield, *In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 929–931.
- [11] M.P. Hudock, C.E. Sanz-Rodríguez, Y. Song, J.M. Chan, Y. Zhang, S. Odeh, T. Kosztowski, A. Leon-Rossell, J.L. Concepción, V. Yardley, S.L. Croft, J.A. Urbina, E. Oldfield, Inhibition of *Trypanosoma cruzi* hexokinase by bisphosphonates, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 215–223.
- [12] M.P. Barrett, The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa, *Parasitol. Today* 13 (1997) 11–16.
- [13] D.A. Mauger, J.J. Cazzulo, R.J. Burchmore, M.P. Barrett, P.O. Ogbunode, Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasit.* 130 (2003) 117–125.
- [14] W.O. Lin, M.C. Souza, J.B.N. DaCosta, Química de organofosforados. X: Síntese de N-dialquilfosforil-guanidinas, ureias e tioureias, *Quím. Nova* 18 (1995) 431–434.
- [15] J.M. Rodrigues, J.B.N. DaCosta, Synthesis and characterization of new symmetrical bisphosphonates, *Phosphorus Sulfur* 177 (2002) 137–149.

- [16] V.M.R. Dos Santos, J.B.N. DaCosta, C.M.R. Sant'anna, M.C.C. Oliveira, Synthesis, characterization, molecular modeling and biological activity against artemia salina of new symmetrical bisphosphoramidates, *Phosphorus Sulfur* 179 (2004) 173–184.
- [17] V.M.R. Dos Santos, C.M.R. Sant'anna, G.E.M. Borja, A. Chaaban, W.S. Cortes, J.B.N. DaCosta, New bisphosphorothioates and bisphosphoramidates: synthesis, molecular modeling and determination of insecticide and toxicological profile, *Bioorg. Chem.* 35 (2007) 68–81.
- [18] J.M. Rodrigues, C.M.R. Sant'anna, V.M. Rumjanek, J.B.N. DaCosta, Diastereoselective synthesis of new dialkylphosphorylhydrazones, *Phosphorus Sulfur* 185 (2010) 1–17.
- [19] L.C. Thomas, Interpretation of the Infrared Spectra of Organophosphorus Compounds, Heyden & Son, Ltd., London, 1974.
- [20] E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon, Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos, Madrid, Alhambra, 1980.
- [21] L.C. Thomas, The Identification of Functional Groups in Organophosphorus Compounds, first ed., Academic Press Inc. Ltd., London, 1974.
- [22] T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [23] J.C.M. Pereira, V. Caregaro, D.L. Costa, J. Santana Da Silva, F.Q. Cunha, D.W. Franco, Antileishmanial activity of ruthenium(II) tetraammine nitrosyl complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4180–4187.
- [24] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T.G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) W252–W258.
- [25] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, *Bioinformatics* 27 (2011) 343–350.
- [26] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, de P.I.W. Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation, *Proteins: Structure, Funct. Genet.* 50 (2002) 437–450.
- [27] W.F. Van Gunsteren, S.R. Billeter, A.A. Eising, P.H. Hünenberger, P. Krüger, A.E. Mark, W.R.P. Scott, I.G. Tironi, Biomolecular Simulation: the GROMOS96 Manual and User Guide, Vdf Hochschulverlag AG an der ETH, Zürich, Switzerland, 1996.
- [28] D. Rognan, Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling, *Mol. Inf.* 29 (2010) 176–187.
- [29] J.L. Jenkins, A. Bender, J.W. Davies, In Silico target fishing: predicting biological targets from chemical structure, *Drug Discov. Today Technol.* 3 (2006) 413–421.
- [30] G.L. Warren, C.W. Andrews, A.M. Capelli, B. Clarke, J. Lalonde, M.H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S.F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I.D. Wall, J.M. Woolven, C.E. Peishoff, M.S. Head, A critical assessment of docking programs and scoring functions, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5912–5931.
- [31] C.E. Sanz-Rodríguez, J.L. Concepción, S. Pekerar, E. Oldfield, J. Urbina, Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. Kinetic and metabolic studies, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12377–12387.
- [32] X. Huang, W.A. Miller, Time-efficient, linear-space local similarity algorithm, *Adv. Appl. Math.* 12 (1991) 337–357.
- [33] A.I. Vogel, Análise Orgânica Qualitativa, Ao Livro Técnico S.A., RJ, 1981.
- [34] J.L. Ávila, A. Ávila, M.A. Polegre, V.E. Márquez, Specific inhibitory effect of 3-deazaneplanocin A against several *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* strains, *J. Trop. Med. Hyg.* 57 (1997) 407–412.
- [35] R.G. Titus, M. Marchand, T. Boon, J.A. Louis, A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice, *Parasite Immunol.* 7 (1985) 545–555.
- [36] N.E. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [37] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [38] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods I, *Method. J. Comput. Chem.* 10 (1989) 209–220.
- [39] W.T. Mooij, M.L. Verdonk, General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions, *Proteins* 61 (2005) 272–287.
- [40] M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 11 (1997) 425–445.
- [41] M.D. Eldridge, C.A. Baxter, C.W. Murray, D.E. Clark, D.R. Westhead, Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity, *Proteins* 33 (1998) 367–382.
- [42] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 727–748.
- [43] O. Korb, T. Stützel, T.E. Exner, empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS, *J. Inf. Model* 49 (2009) 84–96.

5 ARTIGO II DERIVADO DA TESE

(Em processo de submissão)

Efficacy of dialkylphosphorylhydrazones against *Leishmania chagasi* in vitro and in vivo

Carolina Barbosa Brito da Matta^a, Vinícius Tomaz Gonçalves^b, Morgana Vital de Araújo^a, Aline Cavalcanti de Queiroz^a, Rafael José Ribeiro Padilha^c, Luiz Carlos Alves^d, Fábio André Brayner dos Santos^d, Lucas Tricarico Barcellos^e, Carlos Mauricio R. Sant'Anna^e, João Batista Neves da Costa^e and Magna Suzana Alexandre Moreira^{a*}

^aLaboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil, ^bFederal Centre for Technology Education Celso Suckow da Fonseca (CEFET/RJ), Itaguaí, RJ, Brazil, ^cLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) and Research Center Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, ^eRural Federal University of Rio de Janeiro, Chemistry Department, Seropédica, RJ, Brazil.

* Address correspondence to Magna Suzana Alexandre-Moreira, suzana.magna@gmail.com

INTRODUCTION

Protozoan parasites from *Leishmania* genus causes the complex disease called leishmaniasis, an of neglected tropical disease in terms of drug discovery and development. This disease affects more than 12 million people worldwide and are endemic in 88 countries. It is found on every continent except Australia and Antarctica (Desjeux, 2004; CDC, 2015). This protozoa parasite is transmitted by the bite of infected female *Phlebotomine* sandflies as a flagellated promastigote, which is phagocytized by host cells, such as macrophages and dendritic cells. After that, promastigote forms differentiate into the non-flagellated amastigote, which replicates intracellularly until bursting the host cell (WHO, 2015; Tripathi et al., 2007).

There are three main forms of leishmaniasis: cutaneous, visceral and mucocutaneous. The most aggressive form of the disease is the visceral (VL), which affects the vital organs of the host and if left untreated often results in death. Bone marrow, liver, and spleen are the organs commonly affected during VL. Factors determining the kind of clinical manifestation, such as hepatosplenomegaly, depend upon the infecting species and host factors, such as general health, genetic and immune constitution (WHO, 2015; Tripathi et al., 2007). According to World Health Organization over 90% of VL cases occur in Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan and Sudan. In non-endemic areas of the world up to 70% of cases of VL in adults are related to co-infection by the human immunodeficiency virus (HIV) (WHO, 2015).

Leishmaniasis cases are increasing worldwide being a serious public health problem that requires global control strategies. Besides, the chemotherapy of this disease is done with drugs used since the beginning of last century. However, it has severe side effects, present resistance issues and requires medical supervision and prolonged therapy (Griensven et al.,

2010; GOYENECHEPATINO et al., 2008). Actually, improvements have been achieved by combination therapy, leading reducing the time and cost of treatment. Nonetheless, the development of new compounds against these diseases is still necessary and extremely important (Frézard et al., 2009; Freitas-Junior et al., 2012).

In the present study, the efficacy of two dialkylphosphorylhydrazones, previously synthesized by our group and identified as active against *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-(5-bromo-3-pyridinyl) (4m) and phosphorohydrazidic acid, *N'*-[(1*E*)-(2-bromo-3-pyridinyl)methylene]-diisobutyl ester (4n) (DA MATTA et al., 2015), was evaluated against *L. chagasi*, species that causes VL.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the peritoneal macrophages and cell culture

Experiments were performed using Balb/C mice 6–8 weeks old, weighing 20–25 g. Animals were maintained in accordance with the International Commission on Ethics for handling animal (ZIMMERMAN, 1983) and approved by the ethical committee (003570-2011-63) for animal handling of Federal University of Alagoas, Brazil. To obtain macrophages, thioglycolate (TG)-elicited macrophages were harvested 3 days after ip injection of 1 mL TG medium. Balb/C mice were killed by cervical dislocation and macrophages were isolated by peritoneal lavage after washing with ice cold phosphate buffer saline (PBS). Cells were maintained on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 mM), non-essential amino acids (0.1 mM) and gentamicin (50 µg/mL) for 24 h at 37°C with 5% CO₂ (DAVIES; GORDON, 2004).

Cytotoxicity assay on macrophages

Murine peritoneal macrophages were seeded (2×10^5 cells/well) in 96-well flat bottom microplates with 100 μ L of medium. The cells were allowed to attach to the bottom of the dish for 24 h at 37 °C and non-adherent cells were removed by vigorously washing three times with PBS. Then, were exposed to the different concentrations of compounds (100, 10 and 1 μ M) for 48 h, three wells were left dead cells (lysed by 1% Triton X-100) and incubated with only the medium. After, the cells were washed with PBS and incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 100 μ L/well for 1 h in the dark at 37 °C. MTT solution was removed, then cells were resuspended in 100 μ L of dimethylsulphoxide (DMSO) and the absorbance measured in an ELISA reader at 540 nm (MOSSMANN, 1983). Each concentration was assayed in triplicate and corresponding cell growth controls were used in each measurement. The trials were also performed in duplicate.

Parasite culture

Leishmania (L.) chagasi promastigotes (strain MCAN/BR/89/BA262, kindly provided by Valéria Borges, FIOCRUZ/BA, Brazil) were maintained by successive passage in golden hamsters. Isolates parasites were cultured at 26°C for 5 days to reach stationary phase in Schneider's insect medium supplemented with 10% FBS, gentamycin (1 mg/L), L-glutamine (2 mM) and 2% sterile male human urine. Cultures were maintained in a B.O.D. incubator at 26 ° C.

Leishmanicidal Activity

Leishmania parasites were harvested at a late exponential phase of growth, resuspended in fresh medium, counted in Neubauer's chamber and adjusted to a concentration of 10^5 parasites/well in the presence of the corresponding concentration of compounds in a 96-microwell plate. Promastigotes forms were kept in contact with the compounds for 48 h

for promastigotes. Then, they were counted by using an automatic cell counter (ÁVILA et al., 1997). All assays were performed in triplicate and the experiments were repeated twice at least. The inhibition caused by each compound was expressed as percentage, relative to the control cells (treated with the vehicle, DMSO). LD₅₀ and its standard error were calculated using GraphPad Prism 5.0 software.

Activity against intracellular amastigotes from *L. (L.) chagasi* was determined in infected peritoneal macrophages. The cells were seeded into 24-well plates containing glass cover slips at a density of 4×10^5 cells/well and were incubated for 24 h prior to infection. *L. chagasi* promastigotes were added to the macrophages at a ratio of 10:1 (promastigotes:macrophages). The plates were further incubated overnight prior to drug addition. Non-internalized parasites were removed by washing once with PBS and the cells were then incubated with the test substances for 72 h at 37°C in 5% CO₂. At the end of the assay, the cells were fixed in methanol, stained with May Grunwald-Giemsa stain and observed under a light microscope to determine the number of intracellular parasites. The number of amastigotes was determined in 100 macrophages from the drug-treated and control wells. The number of counted amastigotes in the untreated cultures was considered to be 100% to calculate the percentage of parasites suppressed in the drug-treated cultures (Borborema et al. 2011). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated using a sigmoid dose-response model that was generated with GraphPad Prism 5.0 using the mean of two experiments performed in duplicate.

Ultrastructural alterations - scanning electron microscopy (SEM)

After treatment with the 100 µM (24 h) of 4m and 4n, promastigotes were washed in PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 °C, placed on a specimen support with a poly-L-lysine-coated coverslip

and washed in cacodylate buffer and post-fixed in with 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer. The cells were dehydrated in an increasing ethanol gradient, critical- point dried in CO₂, adhered to scanning electron microscopy stubs and then coated with a 20-nm thick gold layer in a sputtering device Q150T (Quorum Technologies). The parasites were examined using a scanning electron microscope, model EVO LS 15 (Zeiss), operating at 10 kV.

Animals and infection

In this study, 25 male Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), 6- to 8-wk-old, weighing 88–145 g were obtained from Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in Institute of Biological and Health Sciences (Federal University of Alagoas, Brazil) facilities. The animals were hosted in cages under controlled light, temperature, and humidity conditions with free access to water and pelletized food. The ethics Committee of the Federal University of Alagoas approved the protocols employed.

Four groups of five animals each were infected with 10⁷ stationary phase promastigotes forms of *L. (L.) chagasi* in PBS, per animal, inserted into the peritoneal cavity. Inoculum was derived from low passage cultures initiated with cryostored parasites. Every day, the animals were examined for clinical signs of the disease. Clinical symptoms of the disease were weight loss, decreased activity and scaling on the extremities.

One group (control group) received only water, whereas the other three groups were treated intraperitoneally with 100 µmol/kg of Glucantime[®], **4m** and **4n**, respectively, on 60 days postinfection. The healthy group was composed of uninfected and untreated animals. Animals were sacrificed at day 15 posttreatment.

Estimation of parasite burden

The animals were euthanized (by overdose anesthesia) at day 75 postinfection. The liver and spleen from each animal were removed and weighed, and afterwards, samples of each were homogenized in cold PBS solution using a stainless steel tissue grinder.

The suspensions obtained were centrifuged at 3,500 rpm for 10 min at 4°C. Thereafter, the supernatants were discarded and the pellets resuspended in Schneider's medium supplemented with 10% FBS, gentamycin (1 mg/L), L-glutamine (2 mM) and 2% sterile male human urine. Two hundred microliters of suspension was transferred to each of 96 microtiter wells containing Schneider's medium supplemented with antibiotics.

Parasite burdens were estimated by a limiting dilution assay according to the methods of Hill *et al.*, 1983 and Titus *et al.*, 1985. The results were expressed as log₁₀ values of the numbers of parasites per gram of tissue.

Data were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. and significant differences between the treated and control groups were evaluated using ANOVA and Dunnett *post-hoc* tests.

Biochemical parameters

To spectrophotometric evaluation of the biochemical parameters, the standard diagnostic kits Labtest[®] were used. The assays were performed according to the protocol provided in the kit. The blood samples were obtained by centrifugation (1500 rpm x 10 min) of whole blood without anticoagulant and frozen. The following biochemical parameters were analyzed: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and creatinine.

Molecular Modeling

Previous theoretical results from our group using the reverse docking procedure with 15 enzymes of *L. braziliensis* indicated the first enzyme of the glycolytic pathway, hexokinase (HK), as the most probable target of the active compounds (DA MATTA *et al.*, 2015). As was the case for *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, there is no crystallographic structures available for *L. chagasi*'s HK, so it was necessary first to develop 3D models for the enzyme. According to studies of the genome of Leishmania species and the comparison of the clinical manifestations of the disease in New and Old Worlds, some authors suggest that *L. chagasi* corresponds to *L. infantum*, a species previously identified as the cause of VL in the Old World and that may have been exported to the New World during the Portuguese and Spanish colonization period [MAURICIO *et al.*, 1999; MAURICIO *et al.*, 2000]. Another possibility is to treat each one as subspecies, being suggested for the New World subspecies the *L. infantum chagasi* denomination [SHAW, 2002; LIMA *et al.*, 2012].

Based on these proposals, we selected the protein sequence attributed to *L. infantum* HK, obtained from UniProtKB/Swiss-Prot with the code A4HZB1 (PEACOCK *et al.*, 2007), as the target for a 3D model development. Three homology models, which we defined as *L. infantum chagasi* HK (LicHK), were prepared for this target with the automated mode of the Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>), based on three different crystallographic structures as templates, available in the Protein Data Bank: chain A of 1HKC, chain A of 1QHA, and chain B of 1QHA. All templates were obtained as co-crystals with substrate molecules, so the conformations of the resulting models are expected to contain cavities adequate for the docking procedure.

Ligand structures were constructed and energy-minimized with the PM6 method [STEWART, 2007] available in Spartan'14 software (Wavefunction, Inc.). The molecular docking study was carried out with GOLD 5.2 (CCDC Software Ltd.) with the ChemPLP

scoring function [KORB *et al.*, 2009], which was previously used by us to identify the most probable target for *L. braziliensis* species and which is the default scoring function for GOLD 5.2. The binding site was defined as the site that corresponds to the one that contains the glucose-6-phosphate molecule in 1QHA. The number of genetic operations (crossover, migration, mutation) in the searching procedure was set to 100,000 in each docking run. The ensemble docking approach was employed to take advantage during the docking procedure of the different model conformations obtained with the three templates. One additional advantage of ensemble docking is that it very significantly reduces the risk of inadvertently choosing an unsuitable protein model.

RESULTS

Inhibition of *in vitro* growth of *Leishmania* by dialkylphosphorylhydrazones and mammalian cytotoxicity

The activity of dialkylphosphorylhydrazones was tested initially against promastigotes of *L. chagasi* incubated in Schneider's medium supplemented. Sensitivity was uniform for all treatments, with IC₅₀ values ranging from 19.0 to 44.2 µM. Maximal effect was observed after 48 h incubation and inhibition reached about 93% for 4m, 96% for Miltefosine and 75% for 4n (Table 1). Cytotoxicity against the host cells was determined using cultures of mouse peritoneal macrophages *in vitro* treated with the compounds for 48 h. The CC₅₀ was calculated and results were > 100 µM. Drug activity was also tested *in vitro* against *L. chagasi* amastigotes obtained from mice infected macrophages allowing the determination of an IC₅₀ of 47.8 ± 3.7 and 51.4 ± 2.2 µM for 4m and 4n, respectively.

4m and 4n induces morphological alterations of promastigotes

SEM was employed to assess morphological alterations induced by 4m and 4n in leishmania promastigotes. Control cells analyses revealed healthy promastigotes with the typical elongated shape, stable cell surface and long flagellum [Fig. 1(a-b)]. Cells treated with 4m exhibited different degrees of morphological alterations. Most of promastigotes presented a thin and tapered appearance, flagellum duplication, membrane folds, multi-septated or twisted body cell and atypical cell division. Also, we observed projections of the plasma membrane [Fig. 1(c-d)]. When promastigotes were exposed to 4n it revealed shrinkage and overall rounding up with significant loss in body length and shortening of flagella compared to untreated cells [Fig. 1(e-f)].

***In vivo* antileishmanial activity of 4m and 4n**

Since VL therapy should be effective and achieve systematically infected organs without causing significant toxicity, the ability of 4m and 4n to alter the parasite burden in established leishmaniasis *in vivo* was evaluated. Syrian golden hamsters were infected intraperitoneally with stationary phase *L. chagasi* promastigotes to establish systemic infections. The disease course in golden hamsters results in asymptomatic infection that closely parallels the subclinical form of the human disease. In experimental VL normally the parasite burden is measured to evaluate the effectiveness of treatment. After 2 weeks of the treatment, the animals were sacrificed and splenic parasite burden was measured.

A hepatosplenomegaly was observed upon organ dissection as expected. The treatment with 4m and 4n caused no significant increase in the weight of these organs. Although the Glucantime drug increased the weight of both organs significantly [Fig. 2]. Hamsters treated with either 4m or 4n had significantly fewer parasites in the spleen compared to control hamsters (treated with water) [Fig. 3]. A reduction of 61.1% and 71.3% in the parasite load splenic was observed after 4m and 4n treatment, respectively. These

results demonstrate that both 4m and 4n can lead to a significant reduction of parasite load in an *in vivo* model of visceral disease. It was not possible to evaluate the hepatic parasite load in this experiment.

Biochemical parameters of evaluation: renal and hepatic function

Biochemical assessment consisted of the following analyzes: liver function test, including the dosage of the enzymes alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) and kidney function from the urea and creatinine levels.

According to Figure 4 there was no significant increase in AST and ALT serum levels in infected hamsters after the 4n or 4m treatment in relation to healthy group. However, were observed a significant increase in AST values in Glucantime group compared to healthy hamsters [Fig 4A]. Moreover, the ALT serum levels increased significantly in the control group compared to healthy group, indicating liver damage caused by the disease, but the treated groups had this values significantly decreased compared to untreated group [Fig. 4B].

Regarding the assessment of renal function there was no significant changes in the levels of urea and creatinine in the control group compared to healthy group. Moreover, none of the treated groups significantly altered creatinine levels [Fig. 5A] and 4m or 4n treatment did not modify urea levels, but these values significantly were increased with Glucantime [Fig. 5B]. This means that the disease did not alter the renal function significantly and there was none or little renal toxicity from 4m or 4n treatment during the analysis period.

Molecular Modeling

Details of the resulting LicHK homology models are presented on Table 2.

Table 2 *L.infantum chagasi* hexokinase models

Model	Template (Chain)	Resolution (Å)	Sequence similarity	Coverage	GMQE*	Residues in allowed regions (%)
1	1HKC (A)	2.80	0.37	0.92	0.70	98.2
2	1QHA (B)	2.25	0.37	0.92	0.71	98.2
3	1QHA (A)	2.25	0.37	0.92	0.69	95.1

*GMQE (Global Model Quality Estimation) is a quality estimation which combines properties from the target-template alignment. The resulting GMQE score is expressed as a number between zero and one, reflecting the expected accuracy of a model built with that alignment and template. Higher numbers indicate higher reliability.

The data presented in Table 2 show that there was a good coverage between models and templates and the sequence identity between models and the three templates was above the lower limit for production of acceptable models. The resulting models have satisfactory GMQE values, and more than 95% of the models' residues are in the allowed regions of the Ramachandran's plot.

These data are indicative of the good quality of all three homology models and they were used for the ensemble docking study with compounds **4m** and **4n**. The docking procedure was implemented with both compounds and also with glucose-6-phosphate (G6P), the co-crystallized ligand observed into the binding site of one of the corresponding X-ray structures (1QHA). Figure 6 show a comparison of the complexes between LicHK and G6P, **4m** and **4n**.

Figure 6

It can be observed that, despite the difference in molecular size, all three compounds could be accommodated into the same binding site. The natural ligand made hydrogen bonds with four amino acid residues: Asp90, Thr94, Arg97 and Thr237. In the best pose obtained for compound **4m**, it was able to interact by hydrogen bonds with two of these residues, Arg97 and Thr237, and with another residue, Asn95. Compound **4n** interacted by means of hydrogen

bonds with Thr94, Arg97 and Thr237. As expected from the greater number of hydrogen bonds with the protein, G6P has a higher docking score (62.9) than compounds **4m** (51.1) and **4n** (53.0). The docking score of each pose is calculated as the negative of the sum of a series of energy terms involved in the protein-ligand interaction process, so that the more positive the score, the better is the interaction. However, the results show that, although not as effective as the natural ligand, both dialkylphosphorylhydrazones were able to interact favorably with the LicHK binding site. The N atom of the pyridinyl ring present in compounds **4m** and **4n** interacts by means of hydrogen bonds with Thr237, a result that indicates the importance of this group for the inhibition profile.

DISCUSSION

Recently, promising oral leishmanicidal activity of **4m** and **4n** compounds in cutaneous leishmaniasis model was reported (Matta et al., 2015). In this work we evaluated the *in vitro* and *in vivo* activity, as well as the ultrastructural effect of these substances against *L. chagasi*.

The dialkylphosphorylhydrazones (compounds **4m** and **4n**) presented in this work have shown leishmanicidal activity against *L. chagasi* promastigotes and intracellular amastigotes. In promastigote studies, these compounds were as active as the standard drug miltefosine and demonstrated no cytotoxicity to macrophage cells at concentrations tested.

However, leishmanicidal activity against promastigotes does not guarantee activity against intracellular amastigotes, the clinically relevant form of *Leishmania* species. Then, we performed intracellular amastigote studies in which we have found that compounds **4m** and **4n** were more active against amastigote forms than miltefosine.

Given that **4m** and **4n** treatments induced loss of parasite viability, the effects of these compounds on the ultrastructure of **4m** and **4n**-treated parasites were evaluated using electron

microscopy. This method may indicate the nature of the cell death and some authors indicate how unique technique to identify the type of cell death (Rodrigues; Souza, 2008; Galluzzi et al., 2007). As expected the control cells were with characteristic appearance. Promastigotes treated with 4m showed changes in the shape of the parasites, the presence of multiple flagellae, aberrant shapes and multi-septation.

These morphological alterations were described elsewhere in trypanosomatids treated with other drugs such as taxol, ansamitocin P3, piperine and trifluralin and may be caused by the interference in the process of cell division, probably due truncated or slowed cytokinesis [Havens et al., 2000; Freire-de-Lima et al., 2008; Dantas et al., 2003; Adade, Souto-Padrón, 2010; Vannier; Castro, 2009]. To reinforce this finding, many cells were seen apparently doubling by an atypical cell division, since the division process initiated at the posterior instead of the normal anterior position [Duran et al., 2008; Souto-Padrón, 2010].

The changes caused by 4n such as cell body shrinkage suggest induced apoptosis death. During the early process of apoptosis cell shrinkage is visible. The cells appear as a round or oval mass, smaller in size and cytoplasm is dense (Elmore, 2014). These features are alterations frequently detected in apoptotic cells of multicellular organisms (Jimenez-Ruiz et al., 2010). Our SEM observation revealed multi-septation, shortening of the cell body and flagellum, this features are typical of apoptosis. Similar observations have also been reported in promastigotes upon treatment with *Cymbopogon citratus* oil, geldanamycin, clerodane diterpene K-09 and cyclosporine A [Wiesgigl, Clos, 2001; Oliveira et al., 2009; Yau et al., 2010; Kathuria et al., 2014].

Considering the *in vitro* results, the compounds 4m and 4n were also used to evaluate the *in vivo* leishmanicidal activity in a visceral leishmaniasis model. Animal models are expected to mimic as closely as possible the features of human disease. Between several animals tried, Syrian golden hamsters are the commonest and currently used animal models

for initial screening of drug against VL (BORBOREMA et al., 2011, GARG; DUBE, 2006). Despite this, the wide use of hamsters is still limited due to lack of available reagents such as antibodies to cell markers and cytokines (GUPTA; NISHI, 2011).

In vivo experiments demonstrated significant therapeutic efficacy of both 4m and 4n in Leishmaniasis, caused by *L. chagasi*. Experimental VL is characterized by the development of an organ-specific immune response, spleen and liver are the main target organs affected (ROUSSEAU et al., 2001). In the evaluation of organs weight it was seen that the Glucantime caused significant increase in both liver and spleen. Studies show that pathological changes such as hepatosplenomegaly are associated with the persistence of the parasite in the spleen and liver leading to a defect in the granulomas formation (Kaye et al., 2004). As there was no significant increase in the weight of these organs after 4m and 4n treatment, it can suggest that these compounds have reduced the effects caused by infection with *L. chagasi*.

The parasite load in spleen showed a significant reduction in the groups treated with Glucantime and 4m and 4n compounds, when compared to control group. The spleen is a very parasitized lymphoid organ, representing a site of interaction between the parasite and response of the host immune system. This organ plays a central role in VL, because it is an initial site for the generation of specific immune response against the parasite cell-mediated and can also become a place of persistence of the parasite presenting numerous immunopathological changes. Thus, substances that cause significant reduction in parasitic load in the spleen should control the disease. These results coupled with the reduction in weight of liver and spleen suggest that these compounds exhibit *in vivo* anti-leishmanial activity, corroborating the tests previously performed orally against cutaneous leishmaniasis (Matta et al., 2015).

Changes in the concentration of enzymes serum aminotransferases (ALT and AST) are considered important indicators of injury in liver cells. The dosage of ALT and AST

concentration allow determining the presence of alterations in the hepatocytes permeability. The concentrations of these transaminases in the serum are normally low. However, if the liver is damaged, such as during VL, the liver cell (hepatocyte) membrane becomes more permeable and some enzymes leak out into the bloodstream, increasing its levels (Kaneko et al., 1997).

In this study there was an increase in the levels of these transaminases after treatment with Glucantime. Additionally, there was a significant increase of AST. It is known that 80% of this enzyme are present in liver mitochondria and in severe injuries no predominant release of this transaminase. Thus, the results indicate liver damage after treatment with the standard drug.

The compounds 4m and 4n did not increase serum levels of AST and ALT compared to untreated group. Although few studies have sought to evaluate changes in the levels of AST and ALT in the hamster model for VL, several authors have reported increases in serum levels of these enzymes in the human VL (Queiroz et al., 2004; Oliveira et al., 2010). Thus, it is suggested that both 4m and 4n reduced the liver damage caused by the disease

Biochemical parameters related to the assessment of renal function are primarily the urea and creatinine serum dosages. The biochemical analyses of the present study revealed renal injury following treatment with Glucantime, since there was an increase in urea levels. The groups treated with 4m and 4n did not increase these values, indicating that treatment with these dialkylphosphorylhydrazones not cause kidney injury.

The definition of the molecular target of an *in vivo* active compound is not an easy task, but it is known that phosphorous-containing anti-parasitic compounds are able to inhibit some parasites' enzymes, such as farnesyl diphosphate synthase [MONTALVETTI *et al.*, 2001; YARDLEY *et al.*, 2002], and HK [HUDOCK *et al.*, 2006]. Our previous reverse docking results were suggestive that the active dialkylphosphorylhydrazones could act as *L.*

braziliensis HK inhibitors (Da Matta et al., 2015). HK is the rate-limiting enzyme in glycolysis and controls cell survival by promoting metabolism and/or inhibiting apoptosis. Interestingly, it was shown that the anti-tumor agent lonidamine interferes with cellular energy production by inhibiting mitochondrial HK, leading to apoptosis (Paggi et al., 1988; Constantini et al., 2000). Chambers et al. showed that lonidamine is also toxic to cultured bloodstream form and procyclic form of *Trypanosoma brucei*, a trypanosomatid as *L. chagasi*, and that it is also able to inhibit *T. brucei* HK (Chambers et al., 2008).

The docking results presented here show that both dialkylphosphorylhydrazones were able to interact favorably with G6P binding site in LicHK models. The electron microscopy results presented here showed morphological alterations caused by the active compounds that are consistent with apoptosis of *L. chagasi* cells, which reinforces the proposal of HK as at least one of the major biochemical targets of dialkylphosphorylhydrazones in Leishmania.

Given these results, it was demonstrated that substances tested here have leishmanicidal activity against *L. chagasi* in Golden hamsters model. These results are in agreement with previously found ones (Da Matta et al., 2015). Furthermore, there is probably no significant renal and hepatic toxicity after treatment with these substances in the dose and time used.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Adade CM, Souto-Padrón T. 2010. “Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. *Open Parasitol J* 4:178–187.

Bogitsh BJ, Middleton OL, Ribeiro-Rodrigues R. 1999. Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res 85: 475-80.

Capriles PVSZ, Baptistaa LPR, Guedes, IA, Guimarães ACR, Custódia FL, Alves-Ferreira M, Dardenne LE. 2015. Structural modeling and docking studies of ribose 5-phosphate isomerase from *Leishmania major* and *Homo sapiens*: A comparative analysis for Leishmaniasis treatment. J Mol Graph Model 55:134–147.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Parasites – Leishmaniasis. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> (accessed 09.07.15).

Chambers JW, Fowler ML, Morris, MT, Morris JC. 2008. The anti-trypanosomal agent lonidamine inhibits *Trypanosoma brucei* hexokinase 1. Mol. Biochem. Parasitology 158: 202–207.

Costantin P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. 2000. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. J Nat Cancer Inst 92:1042–53.

Da Matta CB, de Queiroz AC, Santos MS, Alexandre-Moreira MS, Gonçalves VT, Del Cistia CN, Sant'Anna, CMR, DaCosta JB. 2015. Novel dialkylphosphorylhydrazones: Synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action. Eur J Med Chem 101:1-12.

Dantas AP, Barbosa HS, De Castro SL. 2003. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent Taxol against *Trypanosoma cruzi*. J Submicrosc Cythol Pathol 35:287-94.

Desjeux P. 2004. “Leishmaniasis: current situation and new perspectives,” Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27:305–318.

Duran G, Duran N, Culha G, Ozcan B, Oztas H, Ozer B. 2008. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on Leishmania tropica: a preliminary study. Parasitol Res 102:1217–25.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516.

Frédéric Frézard, Cynthia Demicheli, Raul R. Ribeiro. 2009. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. Molecules 14:2317-2336.

Freire-de-Lima L, Ribeiro TS, Rocha GM. 2008. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. Parasitol Res; 102: 1059-67.

Freitas-Junior, LH Chatelain HA, Kim E, Siqueira-Neto JL. 2012. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2:11–19.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14:1237-1243.

Goyeneche-Patino DAL, Valderrama, J. Walker, N G. Saravia. 2008. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother* 52:4503-4506.

Griensven, J.M. Balasegaram F, Meheus J, Alvar LL, Combination therapy for visceral Leishmaniasis, *Lancet Infect Dis* 10:184:194.

Havens CG, Bryant N, Asher L. 2000. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 110:223-36.

Hudock M P, Sanz-Rodríguez CE, Song Y, Chan JM, Zhang, Y, Odeh S, Kosztowski, T, Leon-Rossell, A, Concepción, JL., Yardley, V, Croft, S. L, Urbina JA, Oldfield E. 2006. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* hexokinase by bisphosphonates. *J Med Chem* 49:215-23.

Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Luder CG, Fasel N, Hurd H. 2010. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 3:104.

Kaneko J J, Harvey JW. 1997. Clinical Biochemistry of domestic animals. *Academic Press Inc, San Diego.* 932.

Korb O, Stützle, T, Exner, T E 2009. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* 49:84-96.

Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz P V S, Pontes, NN, Barbosa J DA, Martins DR, Weirather JL, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SMB. 2012. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*, *Am. J. Trop. Med. Hyg* 86: 99–107.

Manoj Kathuria, Arindam Bhattacharjee, Koneni V Sashidhara, Suriya Pratap Singh, Kalyan Mitra. 2014. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by 2 orally active clerodane diterpene. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(10):5916-28.

Mauricio IL, Howard MK., Stothard, JR, Miles MA. 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 119: 237–246.

Mauricio IL; Stothard, JR, Miles, M. A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188–189.

Montalvetti A, Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R. 2001. Bisphosphonates are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *J Biol Chem*, 276, 33930–33937.

Ogungbe IV, Setzer WN. 2013. In-silico *Leishmania* Target Selectivity of Antiparasitic Terpenoids. *Molecules*, 18:7761-7847.

Oliveira JM, Fernandes NA. 2010. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. *Rev Soc Bras Med Tropical*, v.43, p.188-193.

Oliveira VC, Moura DM, Lopes JA, De Andrade PP, Da Silva NH, Figueiredo RC. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. Parasitol Res 104:1053–9.

Paggi MG, Fanciulli M, Perrotti, N. 1988. The role of mitochondrial hexokinase in neoplastic phenotype and its sensitivity to lonidamine. Acad Sci, 551:358-60.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters, N, Adlem, E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Berriman M. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet. 39: 839-847

Queiroz MJ, Alves JG. 2004. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. J Pediatr 80:141-6.

Rodrigues JC, de Souza W. 2008. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. Curr. Pharm. Des. 14: 925-38.

Rousseau D, Demartino, S. 2001. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-

Shaw JJ. 2002. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In J. Farrell, World Class Parasites: Leishmania, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, p. 11-31

Stewart JJP. 2007. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. J. Mol. Model 13:1173-213.
transcripts and lack of protection against challenge. Eur Cytokine Netw, 12:340-7.

Tripathi P, Singh V, Naik S. 2007. Immune response to Leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol Med Microbiol. 51:229–242.

Vannier-Santos MA, De Castro SL. 2009. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. Curr Drug Targets 10: 246–260.

WHO, 2007. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection.

Wiesgigl M, Clos J. 2001. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. Mol Biol Cell 12:3307-16.

World Health Organization (WHO): Leishmaniasis. Available from:
<http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (accessed 09.07.15).

Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SNJ, Docampo R, Croft SL, Oldfield E. 2002. *In Vivo* Activities of Farnesyl Pyrophosphate Synthase Inhibitors

against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 46:929-931.

Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn JA. 2003. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 873–85.

Yau WL, Blisnick T, Taly JF, Helmer-Citterich M, Schiene-Fischer C, Leclercq O, Li J, Schmidt-Arras D, Morales MA, Notredame C, Romo D, Bastin P, Späth GF. 2010. Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 4: e729.

TABLES

Table 1. Leishmanicidal effect of Miltefosine, 4m and 4n against promastigotes of *L. chagasi*.

Substance	IC _{50%} (μM)	Maximum effect (%)
Miltefosine	19.4 ± 0.2	96.3 ± 0.5
4m	24.8 ± 1.3	93.0 ± 0.1
4n	36.6 ± 0.9	75.0 ± 1.1

Data are reported as mean ± standard error of the mean, S.E.M. Differences with a $p < 0.01$ were considered significant in relation to DMSO 0.1% group.

IC₅₀: concentration required to give 50% inhibition.

Table 2. Leishmanicidal effect of Miltefosine, 4m and 4n against amastigotes of *L. chagasi*.

Substance	IC _{50%} (μM)	Maximum effect (%)
Miltefosine	59.8 ± 3.2	66.2 ± 2.5
4m	47.8 ± 3.7	73.8 ± 1.6
4n	51.4 ± 2.2	84.3 ± 2.8

Data are reported as mean ± standard error of the mean, S.E.M. Differences with a $p < 0.01$ were considered significant in relation to DMSO 0.1% group.

IC₅₀: concentration required to give 50% inhibition.

FIGURES AND LEGENDS

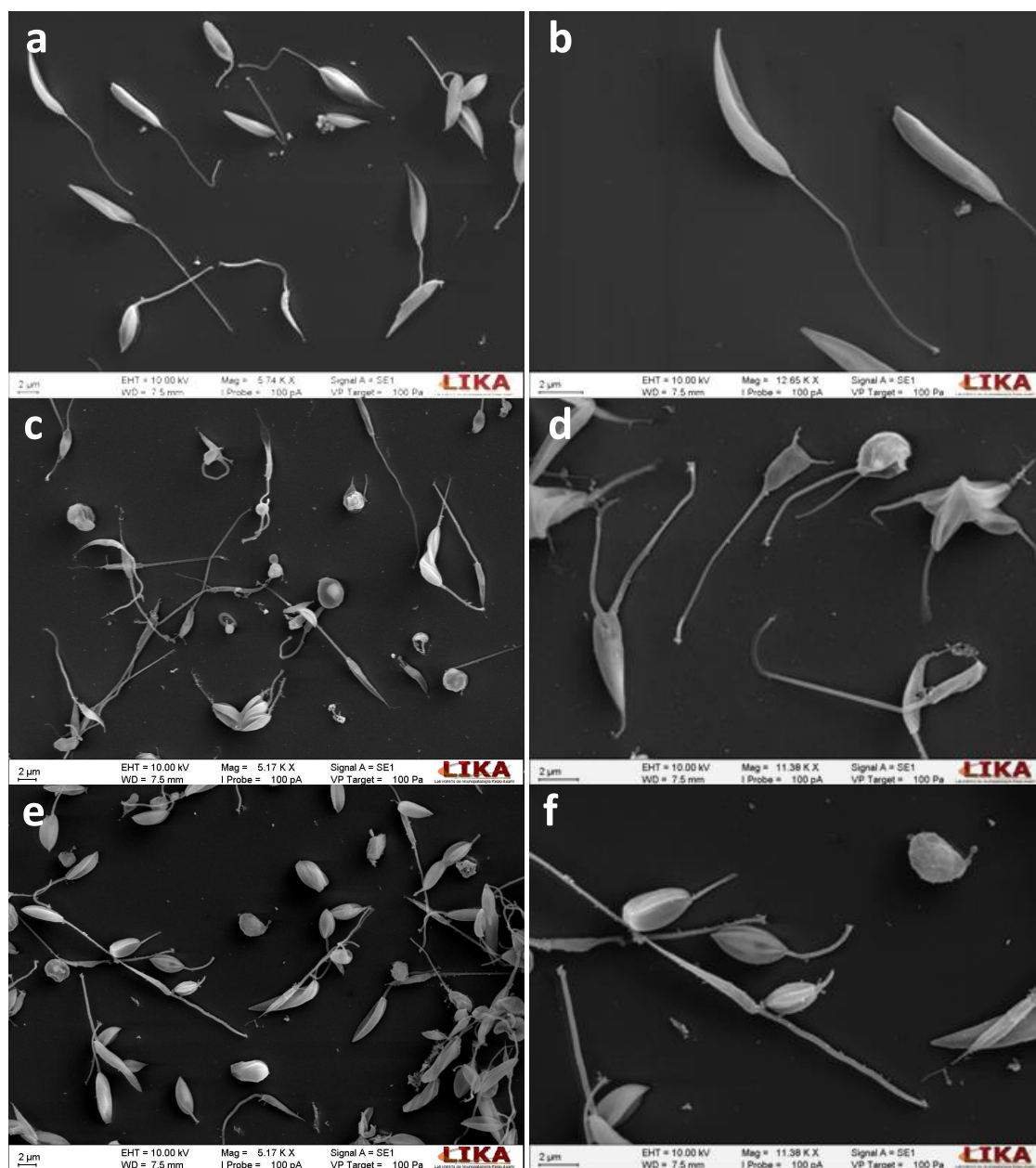


Figure 1: Scanning electron micrographs of *L. chagasi* promastigotes showing altered morphology after exposed to 4m (B) and 4n (C) compounds (100 μ M, 24 hours) compared to control (A). Bars=2 μ m; magnifications=5.000x.

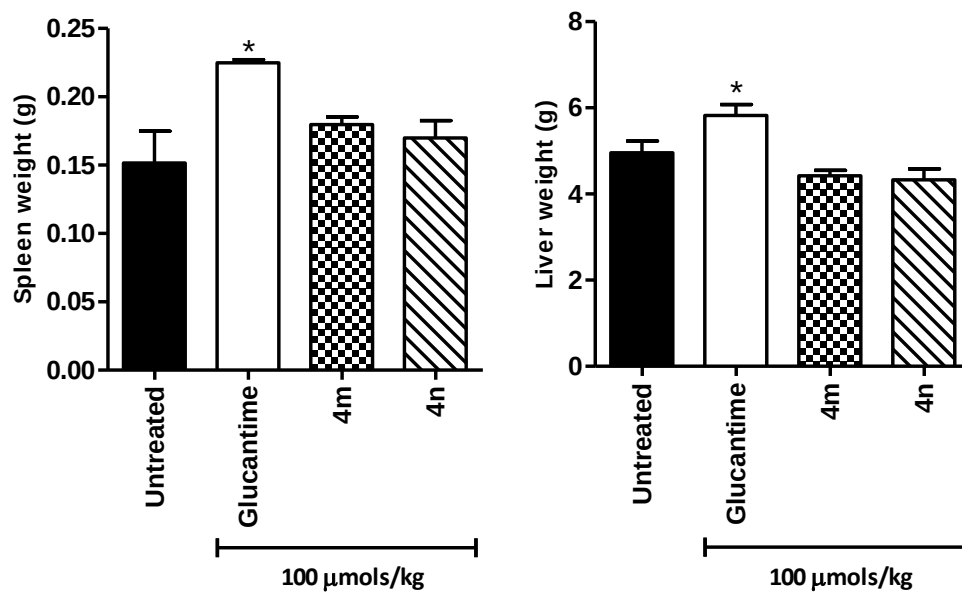


Figure 2. Effect of Glucantime, 4m and 4n on the growth of spleen and liver from golden hamsters infected with *L. chagasi*. Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean, S.E.M Differences with a $*p < 0.05$ were considered significant in relation to untreated group according to the one-way analysis of variance, followed by a Dunnet's post hoc test.

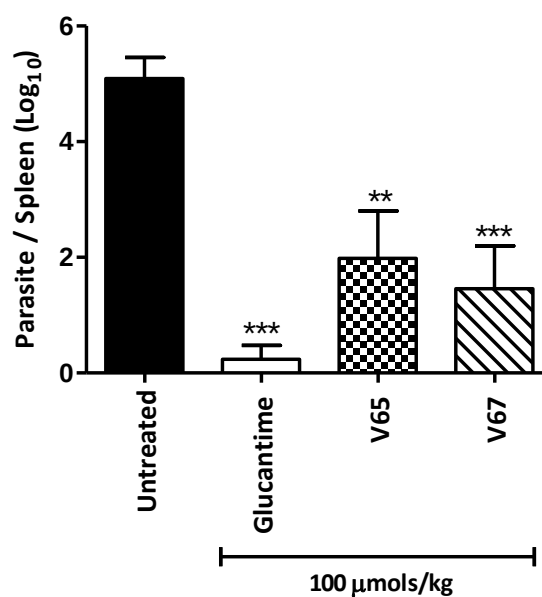


Figure 3. *In vivo* leishmanicidal effect of 4m and 4n (100 μ mol/kg/day) in golden hamsters infected with *L. chagasi*. Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean, S.E.M. Differences with a $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ were considered significant in relation to untreated group according to the one-way analysis of variance, followed by a Dunnet's post hoc test.

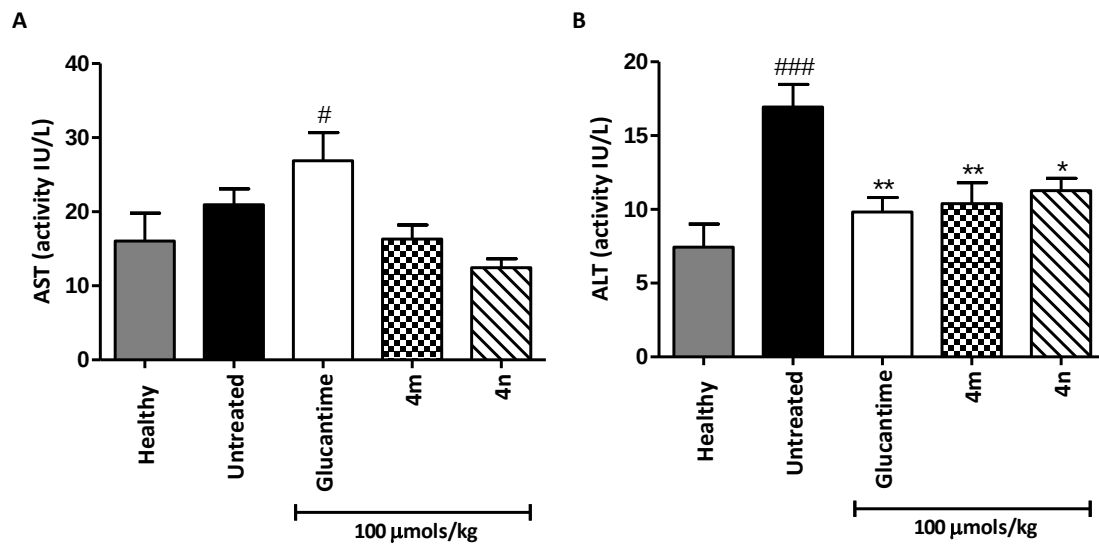


Figure 4. Effect of Glucantime, 4m and 4n on the AST (A) and ALT (B) transaminase activities in the serum of Golden Syrian hamsters infected with *L. chagasi*. Data represent mean $\pm$ standard error of mean (S.E.M.). Differences with a $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ were considered significant in relation to untreated group and $^{\#}p < 0.05$ and $^{##}p < 0.01$ versus the healthy group according to the one-way analysis of variance, followed by a Dunnet's post hoc test.

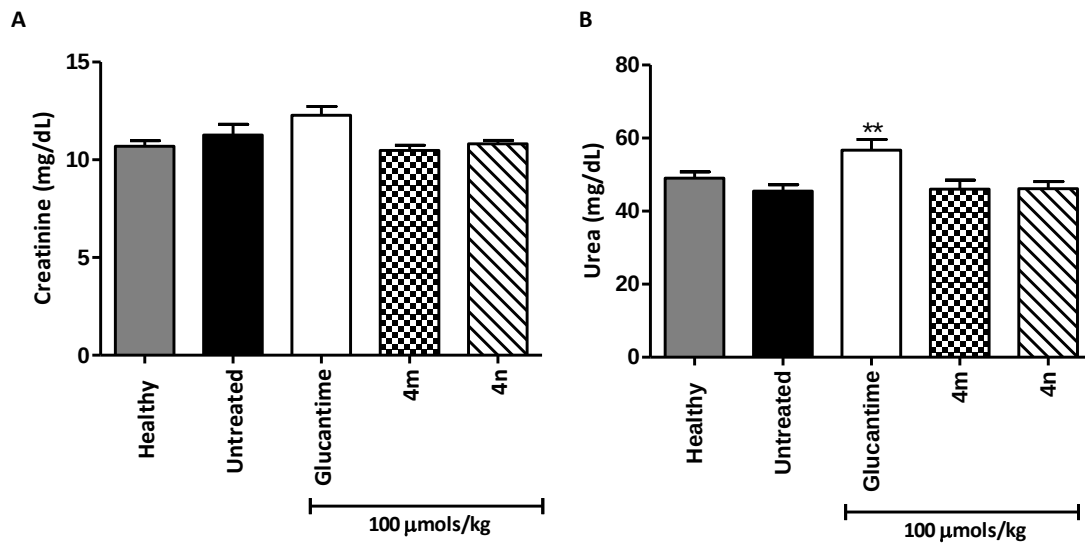
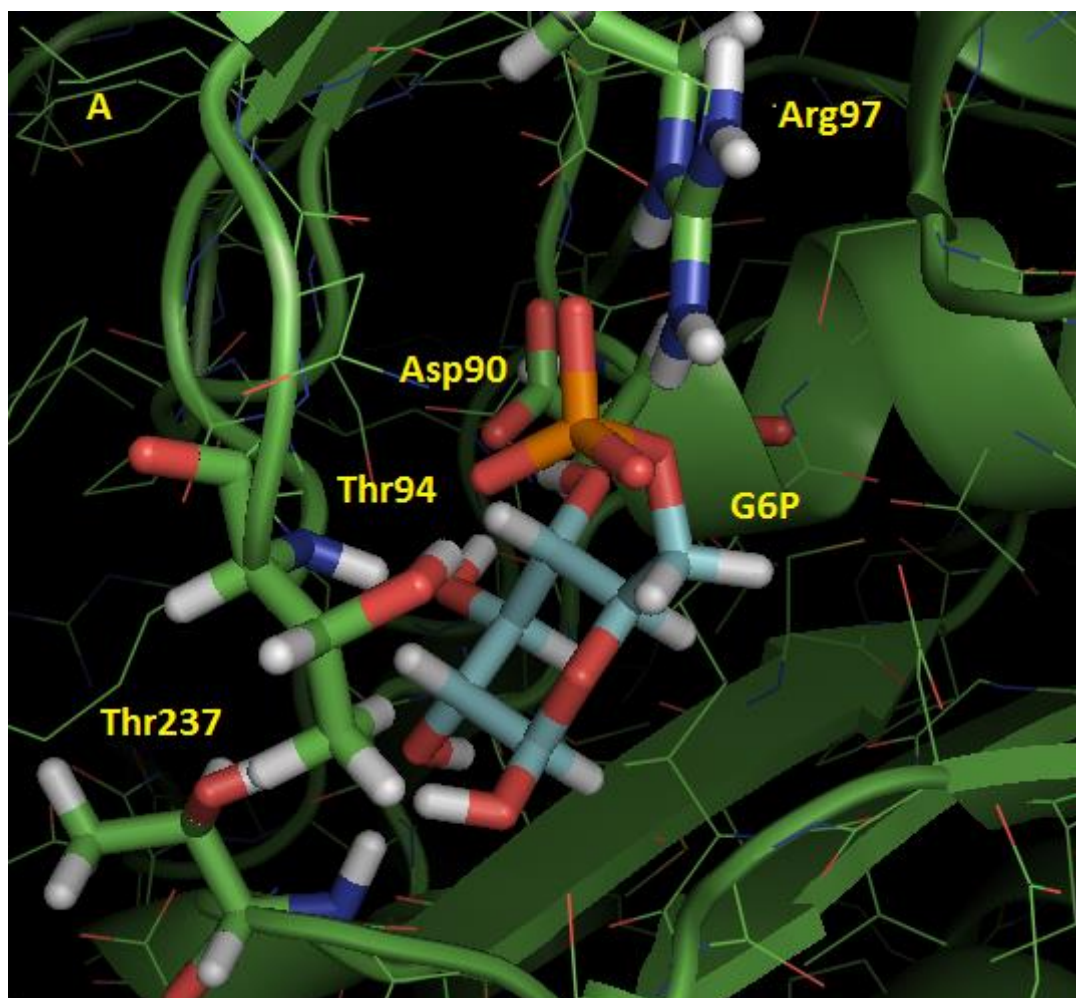
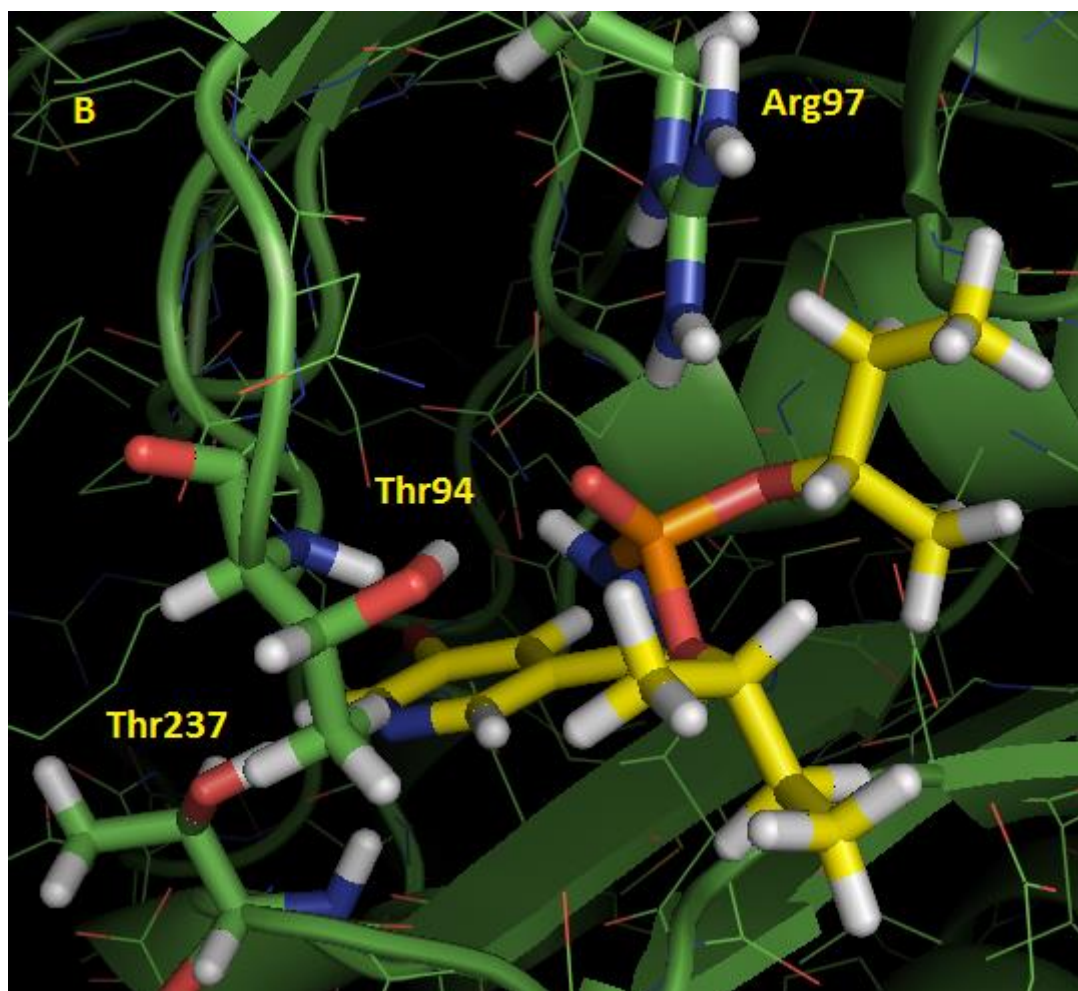


Figure 5. Effect of Glucantime, 4m and 4n on the levels of serum creatinine (A) and urea (B) in golden hamsters infected with *L. chagasi*. Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean, S.E.M. Differences with $**p < 0.01$ were considered significant in relation to untreated group according to the one-way analysis of variance, followed by a Dunnet's post hoc test.





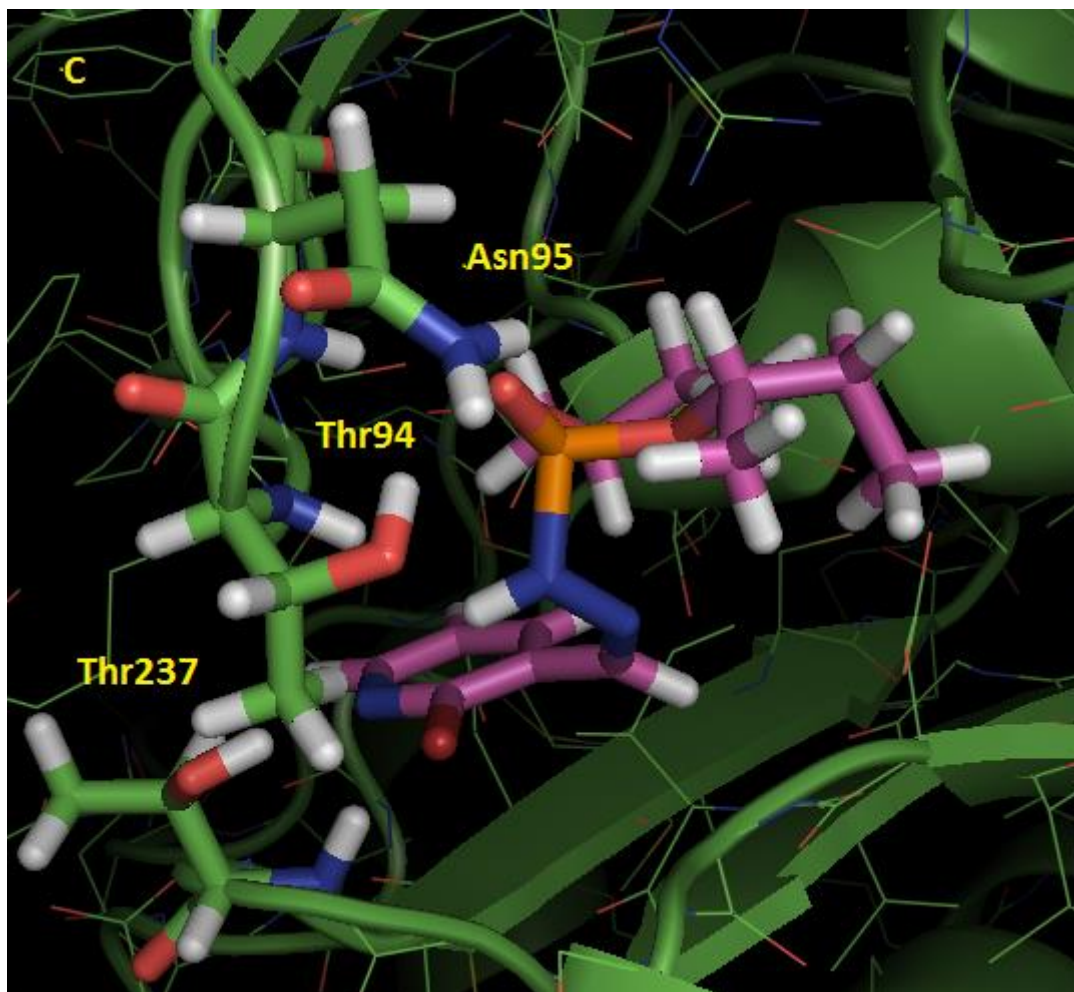


Figure 6. Best ranked poses of ligands in LicHK. (A) G6P (carbon atoms in cyan); (B) **4m** (carbon atoms in yellow); (C) **4n** (carbon atoms in purple). Color code for the remaining atoms is: carbon (protein), green; hydrogen, white; oxygen, red; nitrogen, blue; phosphorous, orange, bromine, brown. Protein amino acid residues with hydrogen bonds with the ligands and the ligands are presented in capped stick mode. Figure generated with PyMOL.

6 DISCUSSÃO

Uma série com 18 novos derivados dialquilfosforilidrazonas (4a – 4o; Quadro 1) foram planejados e sintetizados para serem testados quanto a atividade farmacológica contra espécies de *Leishmania*. Tais substâncias foram desenvolvidas racionalmente com base na estrutura química dos fármacos Miltefosina e Nifurtimox, que são sabidamente ativos, respectivamente, contra leishmania e tripanossomatídeos. Dessa forma, os grupos funcionais fosfato (PO_4^{3-}) e hidrazona ($\text{R}_2\text{C}=\text{NNR}_2$) foram mantidos na estrutura de todos os derivados sintetizados com a proposta de potencializar tal efeito farmacológico.

Inicialmente foi realizada uma triagem *in vitro* para avaliar o efeito leishmanicida dessas moléculas contra a forma promastigota de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A partir daí, foram utilizados os parâmetros farmacológicos de potência e eficácia, valores de E_{max} e CI_{50} , respectivamente, para mensurar tal efeito. A pentamidina e a miltefosina foram utilizados como fármacos-padrão. Observou-se que com exceção dos compostos 4a, 4c e 4e, todos os demais apresentaram atividade leishmanicida após 48h de tratamento. No entanto, alguns compostos apresentaram seletividade para uma das espécies estudadas, como os derivados 4d, 4g, 4i e 4k que foram seletivos para *L. braziliensis*, enquanto o derivado 4l foi seletivo para a espécie *L. amazonensis* (Tabela 1 – Artigo 1; Quadro 1).

A atividade leishmanicida de hidrazonas foi também descrita por Visbal e colaboradores (2008), quando demonstraram que derivados esteróis hidrazonas associados à platina apresentam efeito anti-leishmania contra promastigotas de *L. mexicana*. Além disso, Silva (2013) observou atividade *in vitro* de compostos sintéticos derivados da estrutura das Ftalil-Hidrazona-Tiazóis contra promastigotas de *L. amazonensis*. Com base nisso, o conjunto dos resultados encontrados no presente trabalho reforçam a ideia de que o núcleo hidrazona é um grupo farmacofórico que deve ser considerado no desenvolvimento de protótipos de fármacos com atividade leishmanicida.

A análise da atividade dos compostos diante das trocas dos grupamentos em suas estruturas indica que a introdução do substituinte etila não favorece a atividade leishmanicida dos derivados dialquilfosforilidrazonas, uma vez que os compostos 4a e 4e não foram ativos contra ambas as espécies testadas. Além disso, outro derivado etil-substituído, o 4i, apresentou efeito razoável apenas para *L. braziliensis*, com E_{max} em torno de 60%, reforçando que este grupamento não confere a atividade desejada. Já os derivados 4b, 4j e 4f, que são

butil-substituídos, apresentaram uma alta eficácia farmacológica contra ambas as espécies de *Leishmania*, o que pode estar relacionado a maior lipofilicidade desses derivados em relação àqueles etil-substituídos.

Outra diferença na estrutura química dessas moléculas que também parece influenciar na atividade leishmanicida é a posição do nitrogênio no anel piridínico. Analisando os resultados apresentados no quadro 1 observa-se que os compostos 4f, 4g e 4h, que possuem o nitrogênio na posição meta desse anel, apresentaram atividade leishmanicida superior aos seus análogos 4b, 4c e 4d, os quais apresentam o átomo na posição para. Já os compostos 4j, 4k e 4l, possuem nitrogênio na posição orto do anel piridínico e foram menos potentes que seus análogos 4f, 4g e 4h.

Adicionalmente, os derivados halogenados, 4m, 4n e 4o, apresentaram um efeito leishmanicida potente e eficaz contra a espécie *L. amazonensis*, sendo o derivado 4n duas mil vezes mais potente que os fármacos padrões, pentamidina e miltefosina. Sabe-se que a incorporação de átomos halogênicos (e.x.: Br e Cl) resulta em aumento da hidrofobicidade e, por conseguinte, favorece a penetração em camadas lipídicas (THOMAS, 2007). Portanto, presume-se que essa característica possa favorecer a passagem dessas moléculas pela membrana celular da leishmania causando alterações que levem à morte do parasito.

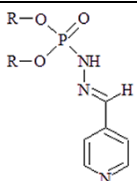
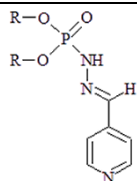
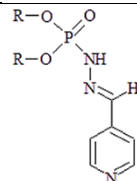
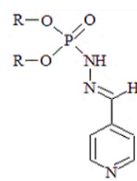
Devido a esta particularidade alguns compostos lipossolúveis com atividade antiparasitária podem também apresentar efeitos adversos devido à penetração e consequente toxicidade às células do hospedeiro. Sabe-se que o arsenal terapêutico utilizado na atualidade contra a leishmaniose caracteriza-se por apresentar vários efeitos adversos relacionados à toxicidade celular em mamíferos (VAN GRIENSVEN, 2010). Portanto, é importante que o estudo farmacológico de novas substâncias leishmanicidas seja acompanhado de ensaios de toxicidade.

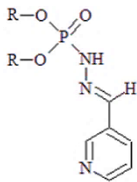
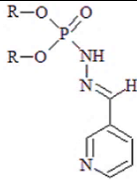
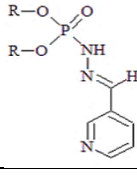
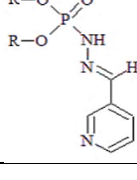
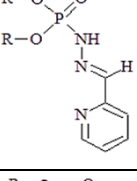
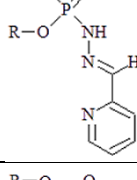
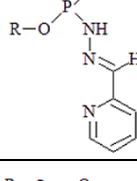
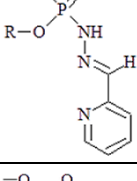
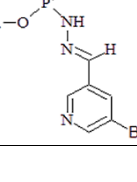
Para tanto, foi utilizado neste trabalho o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para avaliar a citotoxicidade dessas substâncias em macrófagos da linhagem J774, que é uma linhagem de células derivadas de mamíferos. Nesse ensaio, as enzimas mitocondriais de células viáveis convertem por redução enzimática o MTT em cristais de formazan, que possui coloração arroxeada. Uma vez incorporado pelas células viáveis, a forma estrutural em anel do componente tetrazólio do MTT é quebrada pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, gerando cristais insolúveis de formazan na cor roxa.

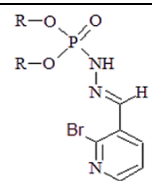
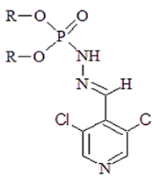
Assim, o aumento ou diminuição no número de células viáveis pode ser detectado pelos níveis intracelulares destes cristais e mensurado pelo leitor de ELISA. Portanto, esse método é utilizado para avaliar viabilidade celular via determinação da atividade mitocondrial, a qual é afetada durante a necrose e apoptose da célula. (MOSMANN, 1983).

Partindo deste princípio, nenhum dos derivados dialquilfosforilidrazonas testados apresentou citotoxicidade contra macrófagos J774, com exceção apenas do 4o que se mostrou tóxico para cerca de 20 % das células. Comparativamente, a pentamidina foi citotóxica em torno de 30 %, mostrando uma vantagem dessas dialquilfosforilidrazonas em reação a este fármaco padrão (Artigo 1). Corroborando com estes dados, Nogueira e colaboradores (2011) demonstraram que derivados dialquilfosforilidrazonas também não apresentam efeito citotóxico quando testados em linfócitos de camundongos, isso pressupõe certa segurança no uso desses derivados em modelos experimentais celulares.

Tabela 1. Estruturas dos derivados dialquilfosforilidrazona e valores de CI_{50} e E_{max} contra promastigotas de das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Derivados Dialquilfosforilidrazonas		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. amazonensis</i>	
		CI_{50} (μM)	E_{max} (%)	CI_{50} (μM)	E_{max} (%)
4a R = etil		> 100	NA	> 100	NA
4b R = n-butil		$5,1 \pm 0,5$	$77,2 \pm 4,2$	$99,3 \pm 0,7$	$45,5 \pm 3,2$
4c R = isopropil		> 100	NA	> 100	NA
4d R = isobutil		$0,06 \pm 0,0$	$84,2 \pm 2,6$	> 100	NA

4e R = etil		> 100	NA	> 100	NA
4f R = butil		$5,4 \pm 0,2$	$87,9 \pm 1,1$	$53,3 \pm 2,9$	$85,6 \pm 0,5$
4g R = isopropil		$0,4 \pm 0,3$	$75,9 \pm 6,6$	> 100	NA
4h R = isobutil		$40,7 \pm 3,5$	$81,6 \pm 0,4$	$83,3 \pm 11,6$	$52,8 \pm 5,6$
4i R = etil		$7,5 \pm 0,8$	$62,1 \pm 3,4$	> 100	NA
4j R = n-butil		$0,06 \pm 0,0$	$76,3 \pm 8,7$	$6,2 \pm 1,7$	$69,5 \pm 4,2$
4k R = isopropil		$0,7 \pm 0,1$	$56,3 \pm 2,7$	> 100	NA
4l R = isobutil		> 100	NA	$98,3 \pm 1,2$	$40,7 \pm 6,1$
4m R = secbutil		$3,6 \pm 0,3$	$92,2 \pm 0,4$	$26,3 \pm 2,0$	$93,8 \pm 0,3$

4n R = secbutil		$5,2 \pm 0,7$	$80,1 \pm 2,6$	$0,001 \pm 0,1$	$95,3 \pm 0,4$
4o R = secbutil		$0,03 \pm 0,02$	$74,1 \pm 0,3$	$26,0 \pm 7,8$	$92,4 \pm 0,1$

N.A.: Não ativo.

Baseado nos dados de citotoxicidade e nos parâmetros de eficácia e potência farmacológica, os derivados 4m e 4n foram selecionados para dar continuidade aos estudos com as formas intracelulares amastigotas e testes *in vivo*, por serem ensaios mais dispendiosos.

Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, a forma promastigota é fagocitada por células como macrófagos e células dendríticas. Uma vez dentro da célula, há uma evolução para a forma amastigota, que é aflagelada. Após replicação intracelular, a célula hospedeira pode se romper e liberar essas formas amastigotas, que, por sua vez, poderão infectar outros fagócitos (KAYE, SCOTT, 2011). Assim, é fundamental que substâncias com atividade leishmanicida atuem também impedindo esse processo de re-infecção celular. Por isso, avaliou-se o efeito dos derivados 4m e 4n sobre as formas amastigotas o número de parasitos por macrófagos infectados, a porcentagem de células infectadas e o índice de infecção (porcentagem de macrófagos infectados *versus* a média de amastigotas por macrófago) foram mensurados. Com base nos resultados, observou-se que ambos os derivados foram ativos contra as formas amastigotas, já que reduziram os parâmetros investigados de maneira semelhante ao fármaco padrão Miltefosina (Artigo 1 – Figura 1).

Uma vez que os derivados 4m e 4n apresentaram efeito leishmanicida *in vitro* contra ambas as formas de *L. amazonensis*, que é uma espécie mais resistente em relação a *L. brasiliensis*, deu-se continuidade aos estudos utilizando o modelo de leishmaniose cutânea induzido por *L. amazonensis* para avaliar o efeito *in vivo* destes derivados. Nesse modelo, foram inoculadas promastigotas de *L. amazonensis* na orelha de camundongos BALB/C e foram avaliados o desenvolvimento da lesão e a carga parasitária.

Comumente as lesões causadas por LC se tornam evidentes a partir de 2 semanas após a infecção e são caracterizadas por infiltrados de macrófagos infectados, linfócitos T e B (SOONG, HENARD, MELBY, 2012). No caso dos camundongos BALB/C, que são animais isogênicos, comumente se formam lesões severas sem, no entanto, o aparecimento da imunidade a reinfecção (SILVEIRA, LAYSON, CORBET, 2005). Essas características se devem em parte ao desenvolvimento de uma resposta imunológica polarizada para o perfil de células Th2, ou seja, um perfil característico de susceptibilidade à infecção por leishmania (OLIVEIRA et al., 2004; ALEXANDER, BRYSON, 2005).

Como observado na Figura 2 (Artigo 1), o tratamento com os derivados 4m e 4n reduziu o diâmetro e aparentemente curou as lesões induzidas por *L. amazonensis*. No entanto, apenas o derivado 4n reduziu a carga parasitária na orelha dos camundongos. Esse efeito, porém, não foi acompanhado por uma redução sistêmica na carga parasitária, identificada pela presença dos parasitos nos linfonodos drenantes. Isto significa que apesar da atividade leishmanicida *in vitro* desses derivados, a dose testada no modelo animal não foi suficiente para controlar a carga parasitária sistêmica.

O mecanismo de lesão tecidual e a manutenção da infecção por leishmania envolvem, além da polarização para o perfil de células Th2, um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 e citocinas do perfil Th17, como IL-17 e IL-21, que em conjunto contribuem para o dano tecidual (SOONG, HENARD, MELBY, 2012). Assim, a redução da lesão cutânea causada pelos derivados 4m e 4n pode estar relacionada a um possível efeito anti-inflamatório, uma vez que está descrito na literatura este efeito em compostos contendo o grupo hidrazona (KAJAL et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

Dentre as três formas de leishmaniose existentes a visceral é considerada a forma mais grave por acometer, principalmente, órgãos como fígado, baço e medula óssea (MATLASHEWSKI et al., 2011). Por se tratar de uma doença potencialmente fatal, com tratamento limitado e sem disponibilidade de vacinas (FREITAS-JUNIOR et al., 2012), é importante estudar novas substâncias que também atuem nessa forma de leishmaniose, que por conseguinte é mais difícil de ser tratada. Nesse sentido, resolveu-se investigar se os derivados 4m e 4n seriam eficazes no modelo experimental de leishmaniose visceral em hamsters induzida pela administração intraperitoneal de *L. chagasi*.

Inicialmente, verificou-se que essas moléculas também possuíam atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. chagasi*. Como observado no Artigo 2, ambos os derivados foram ativos contra as formas promastigota (Tabela 1) e amastigota (Tabela 2) de *L. chagasi*. Esses dados corroboram com os previamente descritos (Artigo 1), que também mostraram o efeito leishmanicida dos derivados 4m e 4n contra outras espécies de leishmania. Vale ressaltar, que os demais derivados testados não foram ativos contra esta espécie (dados não mostrados).

Para melhor analisar o efeito direto dos derivados 4m e 4n sobre as formas promastigota de *L. chagasi*, foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura 24 h após o tratamento com essas substâncias. Através desse método é possível indicar o tipo de morte celular induzida pelos compostos em estudo (RODRIGUES, SOUZA, 2008; GALLUZZI et al, 2007). Após análise observou-se que as promastigotas tratadas com o derivado 4m apresentaram alterações morfológicas, com presença de múltiplos flagelos e multi-septações (Artigo 2 – Figura 1). Essas alterações são características da interferência no processo de divisão celular, possivelmente no processo de citocinese. Esse tipo de alteração em tripanomastídeos já foi descrita para diferentes compostos que alteram o processo de divisão celular (HAVENS et al, 2000; FREIRE-DE-LIMA et al, 2008; DANTAS, BARBOSA, DE CASTRO, 2003; ADADE, SOUTO-PADRÓN, 2010; VANNIER, CASTRO, 2009).

Enquanto o derivado 4m parece causar alterações no processo de divisão celular, as alterações causadas pelo derivado 4n indicam um processo de apoptose, visto que as células apresentaram redução do tamanho, que caracteriza a fase inicial da morte celular por apoptose. Além disso, observou-se redução dos flagelos e formas multi-septadas (Artigo 2 – Figura 1).

Visto que os derivados 4m e 4n também foram ativos contra *L. chagasi*, uma das principais espécies causadora da leishmaniose visceral (CRESCENTE et al., 2009), deu-se continuidade ao estudo utilizando o modelo de leishmaniose visceral em hamsters (*Mesocricetus auratus*), já que este é considerado o melhor modelo experimental para o estudo da leishmaniose visceral, por reproduzir características clínico-patológicas da doença em humanos (LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Durante a progressão da leishmaniose visceral em hamsters, desenvolve-se uma resposta Th1 com produção de citocinas como TNF e IFN- γ (MELBY et al., 2001). Apesar de

estas moléculas induzirem a atividade efetora dos macrófagos, estes são ineficientes em controlar a infecção. Isso ocorre devido a uma inibição da produção de NO, uma das principais moléculas endógenas que controlam a infecção por *Leishmania*. Esse fenômeno pode estar relacionado com uma redução da atividade dos macrófagos por citocinas reguladoras como IL-10 ou pela polarização de macrófagos M2 (ESPITIA et al., 2014; LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; MELBY et al., 2011). No entanto, ainda são grandes as limitações deste modelo animal em estudos imunopatológicos, devido à escassez de reagentes, como anticorpos e citocinas, específicos para essa espécie.

Nesse ensaio *in vivo*, o tratamento com os derivados 4m e 4n foi eficaz em controlar a infecção em hamsters por *L. chagasi* (Artigo 2 – Figura 3). Ao avaliar a carga parasitária no baço, observou-se que ambos os derivados reduziram este parâmetro, assim como o fármaco padrão glucantime, quando comparado ao grupo controle não tratado. O baço é um dos principais órgãos acometidos durante a leishmaniose visceral e representa um sítio importante de interação entre o parasito e as células do sistema imune do hospedeiro. Durante a fase aguda da infecção por *Leishmania* (14-21 dias), a arquitetura do baço é mantida e uma resposta de células T e B pode ser detectada rapidamente. No entanto, essa resposta imune não é capaz de controlar a infecção e uma resposta crônica se desenvolve. Ao longo dessa fase, desenvolve-se uma esplenomegalia severa associada a alterações do microambiente linfoide (STANLEY, ENGWERDA, 2007).

Na avaliação do peso do baço e do fígado, principais órgãos afetados durante a leishmaniose visceral, não houve diferença entre os grupos tratados com os derivados 4m e 4n e o grupo controle não tratado (Artigo 2 – Figura 2). Ainda que não tenha ocorrido uma redução no peso desse órgão, pode-se inferir que o tratamento com ambos os derivados conteve a infecção por *L. chagasi*, uma vez que houve redução da carga parasitária no baço. Os dados aqui encontrados corroboram com o efeito anti-leishmania do tratamento oral dos derivados dialquilfosforilidrazonas no tratamento da leishmaniose cutânea (Artigo 1).

Por outro lado, o tratamento com o fármaco padrão glucantime aumentou o peso do fígado e baço quando comparado aos animais não tratados (Artigo 2 – Figura 2). Esse dado corrobora os dados da literatura que mostram que apesar do glucantime aumentar o peso desses órgãos viscerais (POURRAJAB, FOROUZANNIA, TABATABAEE, 2012), ele

consegue reduzir a sua carga parasitária, embora possa estar causando lesão tecidual concomitante (TEMPONE et al., 2010).

Para avaliar se o tratamento com os derivados 4m e 4n estaria causando lesão hepática, avaliou-se os níveis das enzimas (alanina transaminase) ALT e aspartato transaminase (AST) no soro desses animais após o tratamento. A concentração sérica dessas transaminases normalmente é baixa em indivíduos/animais saudáveis. No entanto, se ocorre alguma dano hepático, como induzido durante a leishmaniose visceral, a membrana plasmática dos hepatócitos se torna mais permeável e algumas destas enzimas são liberadas na circulação, provocando o aumento de seus níveis séricos (KANEKO et al., 1997).

Poucos estudos avaliam os níveis de AST e ALT no modelo de leishmaniose visceral em hamsters. No entanto, alguns autores demonstraram que há um aumento dos níveis séricos dessas enzimas na leishmaniose visceral em humanos (QUEIROZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010). No modelo experimental em hamsters utilizado, houve um aumento sérico de ALT e o tratamento com os derivados 4m e 4n reduziu os níveis dessa enzima, semelhante ao fármaco padrão glucantime (Artigo 2 – Figura 4).

Por outro lado, a transaminase AST não aumentou de forma significativa nos animais infectados e não tratados quando comparados aos animais saudáveis. Além disso, o tratamento com os derivados dialquilfosforilidrazonas não alterou os níveis de AST quando comparado ao grupo saudável (Artigo 2 – Figura 4). Em conjunto, esses dados indicam que os derivados em estudo não causam danos hepáticos e, possivelmente, através do seu efeito leishmanicida produz um efeito hepatoprotetor, uma vez que esses reduziram significativamente os níveis de ALT.

Ainda com relação ao ensaio *in vivo*, os níveis de AST estavam elevados nos animais tratados com Glucantime (Artigo 2 – Figura 4). Essa transaminase está presente, predominantemente, nas mitocôndrias hepáticas e é liberada quando ocorre lesões severas no fígado. Esse dado pode estar relacionado ao efeito do glucantime sobre o peso do fígado, no qual o fármaco padrão induziu um aumento significativo no peso deste órgão, o que pode indicar dano hepático nos animais tratados com este fármaco.

Um dos principais efeitos colaterais relacionados ao tratamento da leishmaniose visceral é a nefrotoxicidade (VAN GRIENSVEN et al., 2010), sabendo disso, foi avaliado se

o tratamento com os derivados dialquilfosforilhidrazonas estaria causando esse tipo de toxicidade. Parâmetros bioquímicos da função renal, como ureia e creatina sérica, compreendem dois indicadores fundamentais no estudo de nefrotoxicidade. No nosso modelo experimental, não houve diferença entre os níveis desses parâmetros bioquímicos entre o grupo saudável e o grupo infectado e não tratado. No entanto, o tratamento com glucantime promoveu um aumento dos níveis de ureia, indicando uma possível nefrotoxicidade. Enquanto o tratamento com 4m e 4n não promoveu o aumento de ureia e creatinina, sugerindo que esses derivados não induzem lesão renal (Artigo 2 – Figura 5).

A análise dos resultados descritos neste trabalho mostra que os derivados 4m e 4n possuem atividade farmacológica contra diferentes espécies de *Leishmania* e tais achados levam ao questionamento sobre a identificação do alvo molecular. Nesse sentido, estudos de *docking* molecular são excelentes ferramentas teóricas que direcionam a identificação do alvo molecular de uma substância ativa farmacologicamente.

No Artigo 1 o estudo de docking sugeriu que as dialquilfosforilhidrazonas estariam atuando na inibição da hexoquinase (HK), uma enzima mitocondrial que age na regulação do metabolismo da glicose, especificamente na fosforilação da glicose, formando glicose-6-fosfato (G6P) e limita a taxa de sobrevivência celular por promover ou inibir a apoptose. Tal hipótese foi reforçada na construção do segundo Artigo, quando se observou que tanto 4m como 4n interagem por ligações de hidrogênio com o sítio de ligação da G6P. Os resultados de microscopia electrónica aqui apresentados mostraram alterações morfológicas em *L. chagasi*, causadas pelos compostos 4m e 4n, que são características de morte por apoptose, o que reforça a proposta de que a HK é, pelo menos, um dos principais alvos bioquímicos das dialquilfosforilhidrazonas em *Leishmania*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação da atividade leishmanicida dos derivados dialquilfosforilidrazonas resultou nos seguintes achados:

- Os compostos 4b, 4d, 4f, 4g, 4h, 4j, 4m, 4n, e 4o possuem atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. brasiliensis*, enquanto 4f, 4j, 4m, 4n, e 4o foram ativos contra *L. amazonensis* com eficácia superior a 70%;

- Dentre os compostos testados, 4m e 4n apresentaram maior eficácia *in vitro* contra *L. brasiliensis*, *L. amazonenses* e *L. chagasi*;

- Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. chagasi*, causadas por 4m e 4n, foram identificadas por MEV;

- 4m e 4n foram ativos no modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea em camundongos Balb/C, bem como no modelo de leishmaniose visceral em Hamsters Golden;

- Os compostos mais ativos nas três espécies, 4m e 4n, não apresentaram toxicidade renal ou hepática nos ensaios realizados.

- A HK parece ser um alvo farmacológico das dialquilfosforilidrazonas em *Leishmania*.

Em conjunto, os dados obtidos nesse trabalho mostram que os derivados dialquilfosforilidrazonas 4m e 4n apresentam efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* em modelos de leishmaniose cutânea e visceral, sem, no entanto, causar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, indicando que tais compostos podem ser tratados como protótipos de fármacos leishmanicidas.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. Development of vaccines against human parasitic diseases: tools, current status and perspectives. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 9, p. 301-310, 2000.
- ABRAMSON, M. A. et al. Comparison of new and old-world leishmanins in an endemic region of Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1292-1297, 1995.
- ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. **Open Parasitol J.**, v. 4, p. 178-187, 2010.
- ALBUQUERQUE, L.C.P. et al. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p. 38-46, 2014.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett.**, v. 15, p. 17-23, 2005.
- ALMEIDA, I. A. Z. C. et al. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo, 2001-2011. **Bol. Epidemiol. Paul.**, v. 8, p. 16-23, 2011.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, e35671, 2012.
- ARIAS, J. R. et al. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v. 2, p. 145-146, 1996.
- ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 279-286, 1981.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p. 1269-1281, 2000.

AVILA-PIRES, F. D. Ecologia das Zoonoses. In: COURA, J. R. (Ed.) **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 5, p. 53-63.

BAILY, G.G.; NANDY, A. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. **J. Infect.**, v. 29, p. 241-247, 1994.

BALANCO, J. M., et al. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, p. 103-113, 1998.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 328-337, 2004.

BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 79, p. 215-218, 1994.

BHATNAGAR, S. et al. Exploration of antileishmanial activity in heterocycles results of their in vivo & in vitro bioevaluations. **Indian. J. Med. Res.**, v. 89, p. 439-444, 1989.

BOMFIM, G. et al. A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p.188-194, 1996.

BORASHI, C.C.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clin. Vet.**, v. 71, p. 44-48, 2007.

BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.49, p. 427-460, 1995.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 445-449, 1994.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2000.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 291-296, 2003.

BUNN-MORENO, M. M.; MADEIRA, E. D. et al. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clin. Exp. Immunol.**, v.59, p. 427-34, 1985.

CÁCERES-DITTMAR, G. et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 91, p. 500-505, 1993.

CAMPOS JR, D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. **J. Pediatr.**, v. 71, p. 261-265, 1995.

CARRIÓN, J.; NIETO, A. et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunol.**, v. 28, p.173-183, 2006.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 873-82, 2007.

CHAVES, L. F. et al. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. **Trends in Parasitol.**, v. 23, p. 311-316, 2007.

COELHO, A.C. **Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania* spp.** 2007. Tese (Doutorado em Ciências) -- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CRESCENTE, J. A. et al. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, p. 1250–1256, 2009.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S., FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L. *In vitro* screens in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis and trypanosomiasis. **Parasitol. Today.**, v. 2, p. 64-69, 1986.

DA-CRUZ, A. M. et al. T-cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 251-256, 2002.

DA-CRUZ, A.M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: COURA. J.R. (Ed.) **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 697-712.

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent Taxol against *Trypanosoma cruzi*. **J. Submicrosc. Cythol. Pathol.**, v. 35, p. 287-94, 2003.

DANTAS-TORRES, F. et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Rev. Clín. Vet.**, São Paulo, v. 11, p. 32-40, 2006.

DE CAMPOS, S. N. et al. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 137, p. 149-54, 2010.

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 692–693, 2004b.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Chemotherapy of chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quim. Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DYE, C.; WILLIAMSON, B. G. Malnutrition, age and risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revised. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 254, p. 33-39, 1993.

ESPITIA, C. M. et al. Transcriptional profiling of the spleen in progressive visceral leishmaniasis reveals mixed expression of type 1 and type 2 cytokine-responsive genes. **BMC Immunol.**, v. 15, p. 1-14, 2014.

FORATTINI, O. P., **Entomologia Médica**, 4. ed., São Paulo: Edgard Blücher. p. 11, 1973.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitol Res.**, v. 102, p. 1059-67, 2008.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.**, v. 28, p. 11-19, 2012.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N. et al. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. **J. Immunol.**, v. 150, p.1857-1864, 1993.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, 5. ed., 16p., 2002.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1237-1243, 2007.

GAMA, M. E. A. et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. **Cad. de Saúde Pública**, v. 14, p. 381-390, 1998.

GANTT, K.R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of leishmanial chagasi. **J. Immunol.**, v. 167, p. 893-901, 2001.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p.439-454, 2006.

GIFAWESEN, C.; FARRELL, J. P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3091-3096, 1989.

GILL, L. H. S. et al. Recent observations on the sandfly (Díptera: Psychodidae) fauna of the sate of Rondônia, Western Amazônica, Brazil: the importance of *Psychodopygus davis* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 751-75, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUÉNET JL, BONHOMME F. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. **Trends Genet.**, v. 19, p. 24-31, 2003.

GUPTA, NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian. J. Med. Res.**, v. 133, p. 27-39, 2011.

HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1689-1694, 1998.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 229-243, 2001.

HAVENS, C. G. et al. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 110, p. 223-36, 2000.

HAYDON D. T. et al. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 1468-1473, 2002.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, p. 363-370, 2000.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOMEDES, N. **The Disability-Adjusted Life Year (DALY) definition, measurement and potential use.** Human Capital Development and Operations Policy. Working Papers. European Bioethics Conference. "Institut Borja de Bioetica". Sant Cugat del Valles, Spain. Oct. 1995.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L. et al. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.89, p.55-73, 1995.

KAJAL, A. et al. Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agents. **Int. J. Med. Chem.**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

KANEKO, J. J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press Inc: San Diego, p.932, 1997.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 11, p. 604-15, 2011.

KUMAR, N. et al. Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of chalconyl-incorporated hydrazone derivatives of mefenamic acid. **Med. Chem. Res.**, v. 24, p. 2580-2590, 2015.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press Inc, 1987. p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Eds.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. London: Arnold/New York: Oxford University Press; 1998. p. 241-66

LEIBY, D. A. et al. Leishmaniasis. In: KIERSZENBAUM, F. (Ed.). **Parasitic Infection and Immune System**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 87-118.

LEWIS, D. J.; WARD. Transmission and vectors. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press Inc, 1987, p. 235-262.

LIMA, C. H.; TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5442-5445, 1996.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 56, p. 1-11, 2014.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTASKI, W. A. Outros protozoários que habitam o sangue e os tecidos. In: **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 115-176.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escornel, 1911). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil (As leishmanioses tegumentares). **J. Basic Microbiol.**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. DE A.; SCHUBACH, A. DE O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar Americana. In: CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. (Ed.). **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

MATHIAS, R.; COSTA F. A. et al. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p. 539-543, 2001.

MATLASHEWSKI, G. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 322-325, 2011.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, v. 201, p.206-224, 2004.

MELBY, P. C. et al. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J. Immunol.**, v. 166, p. 1912-1920, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília, 1º Ed, 2014.

MITTRA, B. et al. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. **J. Exp. Med.**, v. 210, p. 401-416, 2013.

MOREIRA, N. D. **História natural da leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de *Leishmania infantum* com perfis distintos de virulência e patogenicidade.** 2012. Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, *Tese de Doutorado*, p.30, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v, 145, p. 1-10, 2005.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Rev. Percorso**, v. 6, p. 147- 168, 2014.

NIETO, A., G.; DOMINGUEZ-BERNAL. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet. Res.**, v. 42, p. 39, 2011.

NOGUEIRA, A. J. M. et al. Síntese, caracterização e estudo da atividade inibitória de novas dialquilfosforilarilidrazonas sobre o crescimento de tripanossomatídeos. **Quim. Nova**, v. 34, p. 1365-1369, 2011.

OLIVEIRA, C. I. et al. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discov. Today Dis. Models**, v. 1, p. 81-86, 2004.

OLIVEIRA, J. M. et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43, p.188-193, 2010.

OURIVES-NEVES, L. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, p. 1092-101, 2011.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 1-13, 1996.

PEREIRA, I. O; SACRAMENTO, L. V. S.; MARQUES, M. J. Leishmanioses: “estado da arte”. **RUVRD**, v. 9, p. 220-238, 2011.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 593-595, 2009.

POURRAJAB, F.; FOROUZANNIA, S. K.; TABATABAEE, S. A. Novel immunomodulatory function of 1,3,4-thiadiazole derivatives with leishmanicidal activity. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 1968-78, 2012.

PORCHEDDU, A.; GIACOMELLI, G.; DE-LUCA, L. New pentamidine analogues in medicinal chemistry. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, 5819-5836, 2012.

QUEIROZ, M. J. et al. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 80, p. 141-6, 2004.

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

REMME, J. H. F. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 421-426, 2002.

REY, L. C. et al. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 81, p. 73-78, 2005.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: leishmaniasis. **BMJ**, v. 321, p. 801-804, 2000.

ROCHA, L. S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 104, p. 461-466, 2010.

RODRIGUES, J. C., DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, p. 925-938, 2008.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. **Brit. Med. J.**, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SAVIOLI, L., DAUMERIE, D., CROMPTON, D. W. T. Leishmaniasis. In: SAVIOLI, L.; DAUMERIE, D.; CROMPTON, D. W. T. (Ed.) Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization. p. 91-96, 2010.

SEIFERT, K.; ESCOBAR, P.; CROFT, S. L. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 508-511, 2010.

SHAW, J. J. et al. Transmissão de colaboradores agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Eds.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 337-351.

SHUKLA, A.K. et al. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, p. 2208-2218, 2010.

SILVA, M. V. Leishmanioses. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 5, p. 13-17, 2003.

SILVEIRA, F. T. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 18-22, 1991.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 525-34, 2005.

SOARES, P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 75, 301-330, 2003.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin. Immunopathol.** v. 34, p. 735-751, 2012.

SOUSA-GOMES, M. L. et al. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiol. Serv. Saude**, v. 20, p. 519-526, 2011.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 138-47, 2007.

SUNDAR, D. et al. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 193-196, 2001.

TEMPONE, A. G. et al. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 36, p. 159-63, 2010.

THOMAS, G. **Medicinal chemistry: an introduction**. 2nd ed. London: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 280-284, 2007.

VAN-GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, v. 10, p. 184-94, 2010.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v. 26, p. 309-322, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Curr. Drug Targets**, v. 10, p. 246-260, 2009.

VISBAL, G. et al. Synthesis and characterization of platinum–sterol hydrazine complexes with biological activity against *Leishmania (L.) mexicana*. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 547-554, 2008.

WALTON, B.C. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in biology and medicine**, 1987. p.637-664.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun*,

WILLIAMS, E. J. *Leishmania* and *Trypanosoma*. In: GISLLEPIE, S. H.; HAWKEY, P. M. **Medical parasitology a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 151-176.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.**, v. 38, p. 147-160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. 1999. Disponível em: . Acesso em: 12 fev. 2004.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitol.**, v. 18, p. 272-278, 2002.

Anexo: Aprovação do Comitê de Ética da UFAL



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 01/2015

TÍTULO: Avaliação de protótipos de fármacos leishmanicidas.

RESPONSÁVEL: Magna Suzana Alexandre Moreira

OBJETIVO: Este projeto visa à obtenção de protótipos que representem uma nova estratégia terapêutica contra doenças negligenciadas com características multifatoriais, com comprometimento imune e/ou infeccioso.

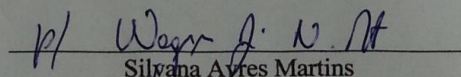
SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 22.06.2015 a 22.06.2016

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo	Swiss	140

Maceió, 16 de junho de 2015.


Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858

Anexo B: Aprovação do Comitê de Ética da UFAL



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 56/2014

TÍTULO: Desenvolvimento de protótipos de fármacos leishmanicidas a partir de produtos naturais, derivados semi-sintéticos e/ou sintéticos

RESPONSÁVEL: Magna Suzana Alexandre Moreira

OBJETIVO: Visa à obtenção de protótipos que representem uma nova estratégia terapêutica contra doenças negligenciadas com características multifatoriais, com comprometimento imune e/ou infeccioso.

JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):

A pesquisa proposta é de relevada importância científica apresentando justificativas plausíveis para a utilização de animais. O projeto ressubmetido atendeu a todas as solicitações do parecer consubstanciado.

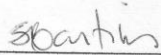
SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 15-03-2015 a 30-05-2015

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Hamster	Syrian Golden	72

Maceió, 12 de fevereiro de 2015.


Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858