



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS**

Maceió-AL

2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS

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

Profa. Orientadora: Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Profa. Coorientadora: Dra. Lidia Moreira Lima

Maceió-AL

2015

Catálogo na fonte
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

Q3e Queiroz, Aline Cavalcanti de.
Estudos in vitro e in vivo da atividade leishmanicida de novos derivados sintéticos / Aline Cavalcanti de Queiroz. – 2015.
320 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Coorientadora: Lídia Moreira Lima.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2015

Bibliografia: f. 277-309.
Anexos: f. 310-320.

1. Doenças negligenciadas. 2. Leishmaniose. 3. Cisteína protease .
4. Semicarbazona. 5. Hidrazida-N-acilidrazona. 6. Peptídeo mimético.
7. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDU: 542:616.993.161

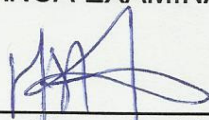
ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

Estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade leishmanicida de novos derivados sintéticos

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: 26/02/2015.

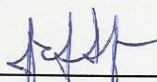
BANCA EXAMINADORA



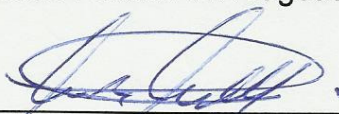
Prof^a. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientadora/Presidente)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



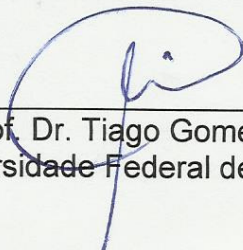
Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro,
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



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



Prof. Dr. Mário Roberto Meneghetti
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



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

À minha querida mãe, Cilene, e às minhas irmãs, Lívia e Elane, pela ajuda e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado para finalizar este trabalho;

À minha orientadora, Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, que ao longo deste período de convivência, demonstrou o valor da orientação segura e firme não somente pela sua alta competência profissional, mas pela generosidade, compreensão e disponibilidade com que me acolheu;

À minha coorientadora, Profa. Dra. Lídia Moreira Lima, e à doutoranda Marina Amaral Alves, por disponibilizarem os compostos para serem testados e por todo empenho destinado a este trabalho;

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Melissa Fontes Landell, Dr. Tiago Gomes de Andrade, Dr. João Xavier de Araújo Júnior; bem como aos membros da minha banca de defesa, Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro, Dr. João Xavier de Araújo Júnior, Dr. Tiago Gomes de Andrade e Dr. Mário Roberto Meneghetti, pela valorosa contribuição ao meu trabalho;

À minha mãe, Cilene, por todo sacrifício que fez para que eu tivesse a oportunidade de estudar, pelo apoio e confiança;

Às minhas irmãs, Lívia e Elane, que sempre me apoiaram de forma a conseguir tempo e disposição para desenvolver esse trabalho;

Aos meus familiares, ao meu cunhado Lucas Pitta e a minha grande amiga Francisca, por terem sempre me auxiliado durante esses quatro anos, apresentando um papel importantíssimo para conclusão desse trabalho;

A todos os membros e ex-membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pelo acolhimento, em especial: Thays de

Lima Matos Freire Dias, Mariana da Silva Santos, Anderson Brandão Leite, Éverton Tenório de Souza, Carolina Barbosa Brito da Matta, Gabriela Muniz de Albuquerque Melo, Amanda Evenlyn da Silva, Yolanda Karla Cupertino da Silva e Morgana Vital de Araújo;

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, por todo apoio dado durante o meu doutoramento;

A todos os meus queridos amigos, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, em especial: Thays, Mariana, Anderson, Morgana, Amanda, Anne Mércia, Rayssa Juliana, Eduardo Jorge, Deysiane, Walleska, Gabriela, Ana Soraya, Everton e Adriano;

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

A todos os colegas de minha turma de doutorado, pela união, companheirismo, desafios e alegrias compartilhadas;

Aos coordenadores do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)-UFPE, Prof. Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos, pelo auxílio na execução da Microscopia Eletrônica de Varredura;

A todos os membros do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR), em especial, ao Prof Dr Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Prof Dr Fernando de Queiroz Cunha, por todo apoio, empenho e confiança depositados para execução desse trabalho;

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva e Prof^a Dr^a Vanessa Carregaro, por todos os ensinamentos científicos obtidos no Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP;

A Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz por ceder a cepa de *Leishmania major*;

A Profª Drª 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;

Aos meus amigos Djalma de Souza Lima Júnior e Manuela Sales Lima Nascimento, que foram essenciais para conclusão do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorada ofertada a minha pessoa;

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;

A todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

“Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo”.

(Galileu Galilei)

RESUMO

O arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento das infecções por *Leishmania* spp. é limitada e de elevada toxicidade. Portanto, novos tratamentos, eficazes e menos tóxicos para leishmaniose ainda são necessários. Neste trabalho, duas séries de derivados contendo as subunidades semicarbazona ou hidrazida-*N*-acilhidrazona foram desenhados e sintetizados como inibidores de proteases. A partir destas séries, os derivados LASSBio 1483, LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 se destacaram, mostrando atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Assim, esses derivados apresentaram atividade leishmanicida potente contra amastigotas de *L. major* (CI₅₀ de 1,5 µM para LASSBio 1483, 8,5 µM para LASSBio 1705 e 15,9 µM para LASSBio 1707), *L. amazonensis* (CI₅₀ de 3,5 µM para LASSBio 1483 e 84,0 µM para LASSBio 1736), *L. braziliensis* (CI₅₀ de 31,7 µM para LASSBio 1483, 8,0 µM para LASSBio 1705 e 5,3 µM para LASSBio 1736) e *L. chagasi* (CI₅₀ de 53,3 µM para LASSBio 1707 e 57,6 µM para LASSBio 1736). Além disso, a atividade leishmanicida dos derivados LASSBio 1483, LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 foi mediada via indução de apoptose como evidenciado pela externalização de fosfolipídeos de membrana, despolarização da membrana mitocondrial e ativação de caspases. Os efeitos morfológicos ultra-estruturais de LASSBio 1483 e LASSBio 1736 em promastigotas de *L. chagasi* também foram verificados. O tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* com os derivados LASSBio 1483 (efeito de 30,5% e 33,3% na orelha infectada, por v.o. e i.p., respectivamente), LASSBio 1705 (efeito de 58,1% na orelha infectada e de 61,1% no linfonodo, i.p.), LASSBio 1707 (efeito de 56,5% no linfonodo, i.p.) e LASSBio 1736 (efeito de 38,8% na orelha infectada, i.p.) ou o tratamento de hamsters infectados por *L. chagasi* com LASSBio 1707 (efeito de 53,6%, i.p.) e LASSBio 1736 (efeito de 46,0%, i.p.), na dose de 30 µmols/kg/dia, levaram a uma redução significativa da carga parasitária quando comparados aos controles que receberam PBS. O tratamento com estes derivados não resultaram em toxicidade hepática ou renal nestes modelos animais de leishmaniose. Estes dados fazem de LASSBio-1483, LASSBio-1705, LASSBio-1707 e LASSBio-1736 novos candidatos a protótipos a fármacos contra leishmaniose cutânea e visceral.

Palavras-Chave: Doenças Negligenciadas. Leishmaniose. Cisteína Protease. Semicarbazona. Hidrazida-*N*-Acilhidrazona. Peptídeo Mimético.

ABSTRACT

The arsenal of drugs available for treating Leishmania infections is limited and presents high toxicity. Therefore, new, effective, and less toxic leishmaniasis treatments are still needed. In this work, two series of derivatives, containing a semicarbazone or hydrazide-*N*-acylhydrazone scaffolds was designed and synthesized as protease inhibitors. From these series, derivatives LASSBio 1483, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 highlighted, showing *in vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities. Thus, these derivatives presented a potent leishmanicidal activity against amastigotes of *L. major* (IC₅₀ of 1.5 μM to LASSBio 1483, 8.5 μM to LASSBio 1705 and 1.9 μM to LASSBio 1707), *L. amazonensis* (IC₅₀ of 3.5 μM to LASSBio 1483 and 84.0 μM to LASSBio 1736), *L. braziliensis* (IC₅₀ of 31.7 μM to LASSBio 1483, 8.0 μM to LASSBio 1705 and 5.3 μM to LASSBio 1736) and *L. chagasi* (IC₅₀ of 53.3 μM to LASSBio 1707 and 57.6 μM to LASSBio 1736). Also, the leishmanicidal activity of derivatives LASSBio-1483, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 were mediated via induction of apoptosis as evidenced by externalization of phospholipids, depolarization of mitochondrial membrane and elevation of activation of caspases. The ultrastructural morphological effects against the parasite of LASSBio 1483 and LASSBio 1736 against *L. chagasi* promastigotes were also verified. The treatment of *L. amazonensis*-infected BALB/c mice with derivatives LASSBio 1483 (effect of 30.5% and 33.3% in infected ear, by p.o and i.p., respectively), LASSBio 1705 (effect of 58.5% in infected ear and 61.1% in lymph node, i.p.), LASSBio 1707 (effect of 56.5% in lymph node, i.p.) and LASSBio 1736 (effect of 53.6% in infected ear, i.p.) or the treatment of *L. chagasi*-infected hamsters with LASSBio 1707 (effect of 53.6, i.p.) and LASSBio 1736 (effect of 46.0%, i.p.) led to a significant reduction of parasite burden when compared to controls that received PBS. The treatment with these derivatives did not result in hepatic or renal toxicity in these animals models of leishmaniasis. These data make LASSBio 1483, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 new lead-candidates against cutaneous and visceral leishmaniasis.

Key-Words: Neglected Diseases. Leishmaniasis. Cysteine Protease. Semicarbazone. Hydrazide-*N*-Acylhydrazone. Peptide Mimetic.

PREÂMBULO

Esta tese está dividida em revisão bibliográfica e artigos originados da tese. A revisão bibliográfica realizada na presente tese será convertida em um livro didático; o artigo 1 derivado da tese corresponde ao artigo submetido ao periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*; os demais artigos derivados da tese correspondem aos artigos a serem submetidos subsequentemente. Nesses artigos, apresenta-se apenas os dados farmacológicos relativos à avaliação da atividade leishmanicida dos derivados, tendo sido escritos e revisados pela Ms. Aline Cavalcanti de Queiroz e pela Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira. Desta forma, o artigo 1 originado da tese é referente ao manuscrito “Design, synthesis and *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities of novel semicarbazone derivatives”, que foi submetido à revista “*European Journal of Medicinal Chemistry*”, visando à avaliação leishmanicida de derivados semicarbazônicos contra *Leishmania major* 5-ASKH (efetuada no Laboratório de Farmacologia e Imunidade, sob orientação da Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira), bem como sobre os dados de planejamento, síntese dos derivados (realizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – LASSBio/UFRJ) e determinação da atividade tripanomicida (realizada na Universidad de La Republica – UDELAR/Uruguai). O artigo 2 originado da tese corresponde ao artigo “Novel Semicarbazone Derivatives As Promising Therapeutic Alternative in Leishmaniasis”, o qual pretende-se submeter à revista “*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*”. Este artigo mostra os resultados farmacológicos obtidos na avaliação da atividade leishmanicida de derivados semicarbazônicos contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi*. O artigo 3 originado da tese corresponde ao artigo “*In vitro/in vivo* antileishmanial effects of novel hydrazide-*N*-acyhydrazone derivatives”, o qual pretende-se submeter à revista “*Journal of Medicinal Chemistry*”. Este artigo mostra apenas os resultados farmacológicos obtidos na avaliação da atividade leishmanicida de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos contra *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Os dados químicos referentes aos derivados ainda serão acrescentados. O artigo 4 originado da tese corresponde ao artigo “Leishmanicidal and apoptotic activity of a novel synthetic hydrazide-*N*-acyhydrazone derivatives in *Leishmania amazonensis*”, o qual pretende-se submeter à revista “*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*”. Este artigo decorre sobre o estudo do efeito de três hidrazida-*N*-acilidrazonas, LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736, sobre o tipo de morte celular

que estavam induzindo em promastigotas de *L. amazonensis*, bem como o efeito desses derivados sobre o ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis*. O artigo 5 originado da tese corresponde ao artigo “*In vitro* and *in vivo* activity of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives on *Leishmania chagasi*”, o qual pretende-se submeter à revista “Antimicrobial Agents and Chemotherapy”. Este artigo demonstra os resultados relativos ao efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos contra *L. chagasi*, o agente etiológico da leishmaniose visceral no continente americano. Por fim, o artigo 6 originado da tese refere-se ao artigo “*In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against *Leishmania major* LV39”, no qual avaliou-se a atividade leishmanicida de LASBio 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 e LASSBio 1492 contra a cepa de *L. major* LV39, uma cepa mais virulenta e com menor susceptibilidade ao óxido nítrico que a cepa de referência da OMS utilizada nos estudos anteriores. Pretende-se submeter este artigo ao periódico “Journal of Antibiotics”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Importância de cisteína proteases lisossomais para <i>Leishmania</i> spp.	23
Figura 2. Exemplos de derivados contendo grupo amida-mimético capazes de inibir proteases de protozoários	26
Figura 3. Equilíbrio tautomérico de LASSBio 1022 com o intermediário <i>o</i>-quinonametídeo	27
Figura 4. Gênese das séries I e II a partir da aplicação da estratégia de aza-homologação sobre o protótipo LASSBio-1064	28
Figura 5. Estrutura química dos derivados semicarbazônicos das séries I e II	29
Figura 6. Gênese das séries III e IV a partir da aplicação da estratégia de hibridação molecular entre os protótipos LASSBio-1111 e LASSBio-1064	31
Figura 7. Estrutura química dos intermediários sintéticos e dos derivados hidrazida-<i>N</i>-acilidrazônicos das séries III e IV	32
Figura 8. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	35
Figura 9. Formas clínicas da leishmaniose tegumentar	40
Figura 10. Paciente com leishmaniose visceral	44
Figura 11. O ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	50
Figura 12. Imunopatogênese da leishmaniose	64
Figura 13. Distribuição geográfica das leishmanioses em 2012	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura química dos derivados semicarbazônicos com maior citotoxicidade contra macrófagos da linhagem J774.A1, promastigotas de <i>L. major</i> e amastigotas de <i>L. major</i>, <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	242
Quadro 2. Estrutura química dos derivados hidrazida-<i>N</i>-acilidrazônicos e intermediários sintéticos com maior citotoxicidade <i>in vitro</i> contra macrófagos da linhagem J774.A1, promastigotas de <i>L. major</i> e amastigotas de <i>L. major</i>, <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	259

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora-1
Células NK	Células natural killers
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de IL-1
IFN-γ	Interferon-gama
i.p.	Via intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
IgER	Receptor de Imunoglobulina E
JAK2	Janus quinase 2
JAK/STAT	Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós- calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LR	Leishmaniose recidivante

LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitrógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	Molécula de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NLR	Receptores do tipo Nod
NO	Óxido nítrico
NOS2	Sintase de óxido nítrico 2
nTregs	Células T reguladoras naturais
O₂⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGC-1	Co-ativador 1 de PPAR-γ
PKC	Proteína quinase C
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PPG	Proteofosfoglicanos

PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PS	Fosfatidilserina
PSG	Gel secretado por promastigota
SHP-1	Tirosina fosfatase contendo o domínio SH2 do tipo 1
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TGF-β	Fator transformante do crescimento beta
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
Tr1	Células T reguladoras do tipo 1
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
3.1	Leishmaniose tegumentar	37
3.2	Leishmaniose visceral	42
3.3	O ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	47
3.4	A invasão das células hospedeiras pela <i>Leishmania</i> e a resposta imune de mamíferos	50
3.5	Epidemiologia e diagnóstico das leishmanioses	65
3.6	Tratamento das leishmanioses	68
4	ARTIGO I DERIVADO DA TESE	75
5	ARTIGO II DERIVADO DA TESE	109
6	ARTIGO III DERIVADO DA TESE	149
7	ARTIGO IV DERIVADO DA TESE	187
8	ARTIGO V DERIVADO DA TESE	205
9	ARTIGO VI DERIVADO DA TESE	222
10	DISCUSSÃO	242
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	276
	REFERÊNCIAS	278
	ANEXOS	310

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença endêmica em 98 países, apresentando cerca de prevalência de 12 milhões de casos e incidência anual de 2 milhões de novos casos. Além disso, cerca de 310 milhões de pessoas vivem em áreas de alto risco de infecção da doença, sendo classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma das cinco maiores doenças parasitárias do mundo (OMS, 2015).

A leishmaniose é caracterizada por ser um conjunto de antroponoses com uma variedade de manifestações clínicas pela infecção com parasitos do gênero *Leishmania*, sendo classificada em duas formas clínicas principais: a forma tegumentar, que é caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele e mucoso, sendo causadas por espécies dermatóricas de *Leishmania*; e a forma visceral, que apresenta como agentes etiológicos, principalmente, as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi*, as quais geram uma infecção sistêmica caracterizada por febre, anemia, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, podendo ser fatal em paciente não tratados adequadamente (CHAPPUIS et al., 2007; GOTO e LINDOSO, 2012;).

O agente etiológico da doença apresenta um ciclo biológico complexo, envolvendo duas formas evolutivas (promastigotas e amastigotas) e dois tipos de hospedeiros (invertebrado e vertebrado). De forma sucinta, o ciclo biológico do parasito se inicia com a picada do vetor (fêmeas de dípteros do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*) no hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos), inoculando formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro mamífero (KAYE e SCOTT, 2011). Após a infecção, os parasitos são internalizados por células do sistema mononuclear fagocitário (em especial, macrófagos), se diferenciam em amastigotas, as quais se multiplicam e sobrevivem no fagolisossomo através de uma complexa interação entre parasito-hospedeiro (LODGE et al., 2006). Caso haja condições apropriadas para sobrevivência das amastigotas, esses parasitos irão se proliferar até ocasionarem subsequente lise da célula hospedeira. Uma vez liberadas no meio extracelular, as formas amastigotas podem infectar novos macrófagos ou um novo vetor, quando esse exerce seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado (PETER e SACKS, 2006). No trato gastrointestinal do vetor, as formas amastigotas (aflageladas) se diferenciam em formas flageladas replicativas denominadas promastigotas

procíclicas. Essas promastigotas sofrem posterior processo de metaciclologênese, se diferenciando em promastigotas metacíclicas que são a forma infectante do parasito para o hospedeiro mamífero, reiniciando o ciclo (PETERS e SACKS, 2006; SECUNDINO et al., 2005).

Desta forma, *Leishmania* spp. é um patógeno que invade silenciosamente o sistema imune do hospedeiro mamífero (KAYE e SCOTT, 2011). Além de se dividem dentro do ambiente hostil existente no vacúolo parasitóforo, as amastigotas interferem nas funções normais efetoras do macrófago infectado, como geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas pró-inflamatórias. (OLIVER et al., 2005).

Como parasitos de *Leishmania* spp. residem na forma de amastigotas no interior das células de macrófagos de mamífero, as respostas imunes inatas e adaptativas são responsáveis por controlar a infecção (MOUGNEAU et al., 2011). Um fator leishmanicida potente formado por macrófagos é o NO produzido pela enzima sintase do NO 2 (NOS2). No entanto, amastigotas intracelulares são conhecidas pela sua capacidade de diminuir a produção de NO em macrófagos infectados (WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010). É debatido se amastigotas inibem ativamente a produção de NO ou se é uma consequência da redução da atividade basal do macrófago induzida por IFN- γ (SEIFERT et al., 2007).

Na verdade, os macrófagos podem ser polarizados pelo microambiente para assim apresentar funções específicas, formando um grupo de células heterogêneo. Desta forma, quando estimulado por INF- γ , os macrófagos se diferenciam no fenótipo denominado classicamente ativado ou M1, com expressão de NOS2, que produz NO a partir da arginina. Parasitos intracelulares de *Leishmania* spp. são normalmente eliminados por esta subpopulação (GALLARDO-SOLER et al., 2008). Ao contrário, a estimulação com IL-4 faz com que o macrófago se diferencie no fenótipo alternativamente ativado, conhecido como M2, que promove a imunidade humoral e reparação tecidual. Esta subpopulação produz IL-10 e expressa arginase (RIOS et al., 2008). A arginase catalisa a conversão enzimática de L-arginase em uréia e L-ornitina. Este último é usado por *Leishmania* spp. para gerar poliaminas essenciais para a proliferação das amastigotas (KROPF et al., 2005).

Apesar de sua importância epidemiológica, o arsenal terapêutico existente para o tratamento da leishmaniose é limitado e de elevada toxicidade, sendo considerada uma doença extremamente negligenciada pela indústria farmacêutica. Os fármacos de primeira escolha

para o tratamento da doença são os antimoniais pentavalentes desde a década de 50. A segunda linha de tratamento é constituída por anfotericina B (convencional ou lipossomal), pentamidina e miltefosina, sendo este último o único fármaco existente no mercado que pode ser administrado por via oral (ALVAR et al., 2006; AMEEN, 2010; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Portanto, há a necessidade premente de buscar novas opções terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, assim como a necessidade urgente de desenvolver novos protótipos candidatos a fármacos leishmanicidas de fácil administração (preferencialmente ativos por via oral), seletivos e de elevado índice terapêutico, sendo ainda capazes de ativar adequadamente o sistema imune do hospedeiro infectado (OLIVEIRA et al., 2011; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

Sabe-se que o primeiro e mais importante passo do processo de descoberta de fármacos é a pesquisa e seleção do alvo terapêutico (DAS et al., 2013). Assim, uma estratégia racional para busca de novas moléculas leishmanicidas é a exploração das diferenças metabólicas e bioquímicas entre parasito e a célula do mamífero hospedeiro que podem ser exploradas como alvo terapêutico, já que pesquisas filogenéticas indicam que os tripanossomatídeos, apesar de eucariotos, apresentam diferenças consideráveis no que diz respeito à organização celular quando comparados a células de mamíferos (BARRET et al., 1999; SHUKLA et al., 2010). Nesse contexto, o conhecimento do genoma de *Leishmania* é uma importante ferramenta na identificação dos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra a leishmaniose (DAS et al., 2013).

Embora a pesquisa sobre os protozoários do gênero *Leishmania* tenha progredido significativamente durante as duas últimas décadas, a identificação de alvos de medicamentos adequados ou desenvolvimento de medicamentos eficazes para combater a doença está longe de ser satisfatória. Enfim, são alvos potenciais da ação de fármacos leishmanicidas, os sistemas de transporte para glicose, purinas e outras biomoléculas essenciais, bem como diversos sistemas enzimáticos importantes e específicos do parasito (DAS et al., 2013; SINGH et al., 2014).

Sistemas enzimáticos de *Leishmania* de vias metabólicas e bioquímicas são essenciais para a sua sobrevivência e na infecção do hospedeiro, assim como as enzimas do sistema antioxidante tripanotona/tripanotona redutase, enzimas do glicossoma, bem como aquelas envolvidas na via das poliaminas e na biossíntese de ergosterol e estigmasterol

(SINGH et al., 2012). Entre os vários sistemas enzimáticos, as proteases apresentam um elevado potencial como alvo terapêutico no desenvolvimento de novos fármacos. Terapeuticamente, os inibidores de proteases têm sido introduzidos com sucesso no tratamento da infecção pelo HIV, bem como de doenças como hipertensão, pancreatite e mieloma múltiplo (CARMODY et al., 2005; SINGH et al., 2014). Há um total de 154 proteases no genoma *Leishmania* spp., havendo um especial interesse no desenvolvimento de inibidores de proteases da família das metaloproteases, bem como das serina proteases, aspartato proteases e cisteína proteases, uma vez que essas enzimas têm sido amplamente estudadas e considerados indispensáveis para a sobrevivência dos parasitos e agravo da doença (MATLASHEWSKI, 2001; DAS et al., 2013).

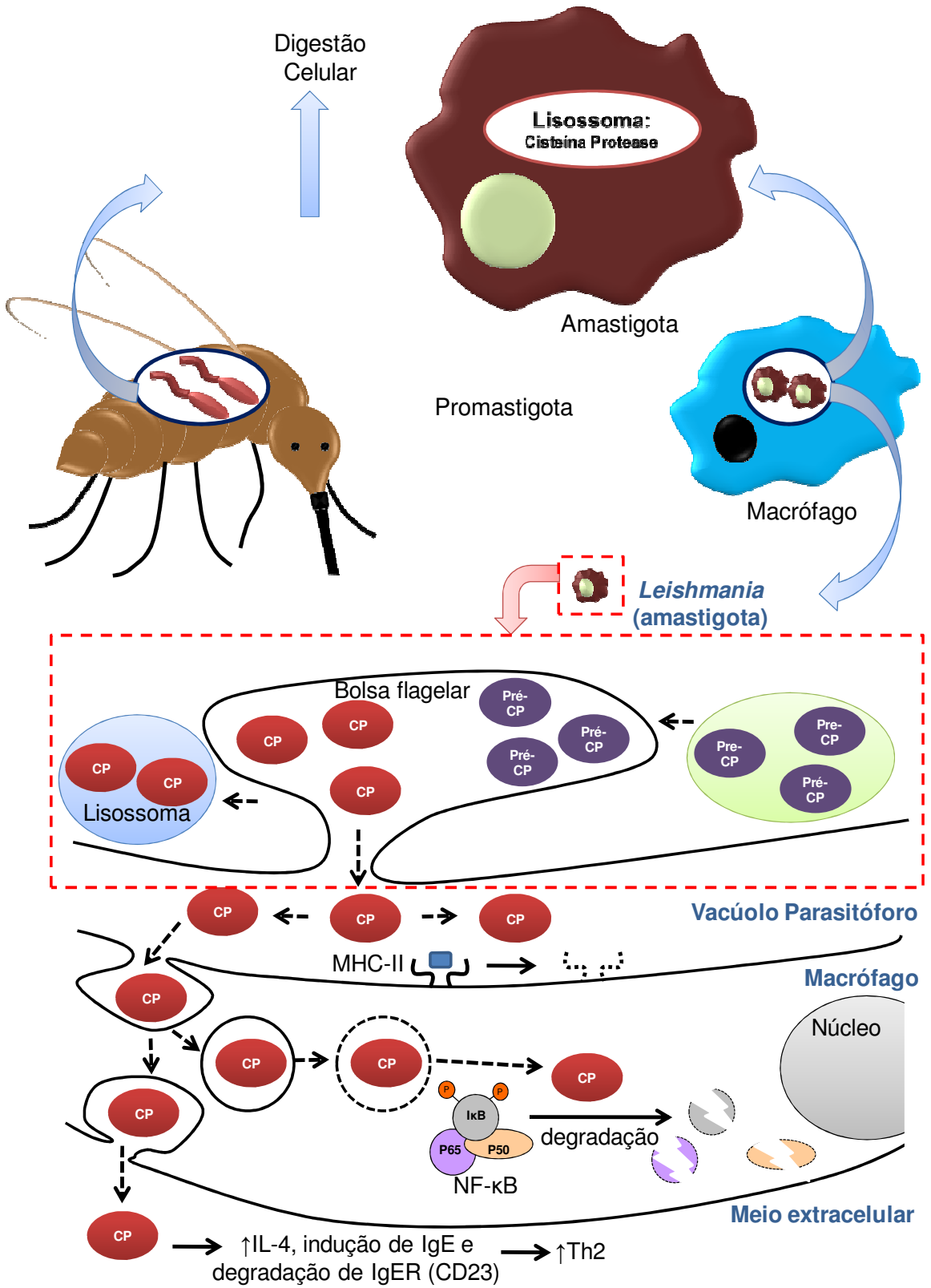
Cisteína proteases são enzimas vitais no ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*. Dentre outras funções, essas enzimas participam na nutrição, infecção da célula hospedeira e evasão da resposta imune do hospedeiro (BARRETT et al., 1999; MOTTRAM et al., 2004). Assim, a importância de cisteína protease como fatores de virulência e seu potencial como alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de vacinas foram investigados extensivamente (NÄGLER et al., 1999).

As cisteína proteases de *Leishmania* spp. distribuem-se ainda em entre a família C1 (semelhantes à papaína) e subfamílias das catepsinas L e B, e também na família C2 (semelhantes às calpaínas). No caso do gênero *Leishmania*, as proteases mais estudadas são três isoformas de cisteína proteases lisossomais: CPA e CPB, que são enzimas do tipo catepsina L; e CPC, que é uma enzima do tipo catepsina B. Essas três enzimas são do tipo papaína e pertencem ao mesmo grupo de cisteína proteases (Clã CA e Família C1) (COSTA, 2006). Estas enzimas lisossomais desempenham importantes funções na *Leishmania* spp. como fatores de virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, modulação de sua resposta imune e parecem possuir um papel vital na sobrevivência do parasita nos macrófagos, constituindo assim atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses (MOTTRAM et al., 2004; SILVA-LÓPEZ, 2010).

Com relação à modulação da resposta imunitária, essas proteases apresentam a capacidade de degradar moléculas de MHC de classe II no vacúolo parasitóforo, além de NF- κ B e I κ B no citoplasma de macrófagos e assim modular os sinais de transdução e transcrição de IL-12 (importante para geração de resposta Th1, que favorece a imunidade mediada por

célula) e NOS2 (enzima responsável pela produção de NO, que leva a destruição do parasito), além de induzir resposta Th2 via degradação do receptor de Imunoglobulina E (IgER) de baixa afinidade e aumento da produção de IL-4 e Imunoglobulina E (IgE) (GRISCAVAGE *et al.*, 1996; HSIEH *et al.*, 1993; MOTTRAM *et al.*, 2004; ROGERS *et al.*, 2002). Logo, a inibição de cisteína protease interfere com a penetração do parasito na célula hospedeira, interfere na nutrição da *Leishmania*, além de inibir um dos mecanismos de escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro, visto que há indução de resposta do tipo Th1 e um desvio para maior expressão de IL-12 e NOS2 (e conseqüentemente menor expressão de arginase, que participa da via das poliaminas que propiciam maior crescimento das formas amastigotas na célula hospedeira, via NF- κ B de macrófagos). Portanto, é bastante relatado na literatura que cisteína proteases também representam um potencial alvo quimioterapêutico contra infecções por *Leishmania* spp.(COHEN *et al.*, 2002). A **Figura 1** mostra a importância de cisteína proteases lisossomais para a nutrição e evasão da evasão da resposta imune do parasito.

Figura 1. Importância de cisteína proteases lisossomais para *Leishmania* spp.



Fonte: MOTRAM et al., 2004; SELZER et al., 1999.

Em um esforço para descobrir novos inibidores da cisteína proteases, a cisteína protease de *L. mexicana* CPB2.8, que mostra diferenças significativas com catepsina B bovina, foi selecionada como alvo para triagem de uma biblioteca de compostos contra esta enzima e a catepsina B bovina, identificando-se novas classes de inibidores classificados em três grupos: triazinas contendo grupamento nitrila, tiosemicarbonas e semicarbonas (SCHRÖDER et al., 2013). Esses inibidores de cisteína proteases, normalmente, matam os parasitos em concentrações que não afetam as células hospedeiras (SELZER et al., 1999). Por esta razão, as cisteína proteases podem ser utilizadas como alvo terapêutico no desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas (MUNDODI et al., 2005). Além disso, o uso de um inibidor específico para cisteína pretease do tipo L, K11777, mostrou que essas proteases são necessárias para o crescimento do parasito, indicando o potencial dessas enzimas como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos úteis para o tratamento da leishmaniose (MAHMOUDZADEH-NIKNAM e MCKERROW, 2004).

É bem relatado na literatura que semicarbonas apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal. De modo geral, pode-se dizer que tiossemicarbonas apresentam elevando potencial antiparasitário, agindo como inibidores de enzimas chaves, a exemplo de cisteína proteases e tripanotiona redutase (BERALDO, 2004). Semelhantemente, as semicarbonas, biosósteros clássicos de tiossemicarbonas, são compostos com características estruturais interessantes para atividade antiprotozoária, principalmente, através da inibição de cisteíno protease e tripanotiona redutase (CARDOSO, 2008).

Desta forma, grande atenção tem sido despertada para a síntese fácil e eficiente de semicarbonas, uma vez que essas substâncias têm ocupado uma posição importante na química medicinal, destacando-se como estrutura privilegiada para identificação de derivados com propriedades antimicrobiana, pesticida, herbicida, hipnótico, anticonvulsivo, anti-leucêmico, anti-hipertensivo. Ademais, complexos metálicos obtidos a partir de semicarbonas, a exemplo daqueles oriundos de coordenação com cobre (II), são capazes de mimetizar a ação da superóxido-dismutase (BERALDO e GAMBINO, 2004). Por outro lado, semicarbonas são uma classe de compostos com interesse terapêutico, devido à sua capacidade em inibir o crescimento de vários agentes patogênicos. Estes compostos

apresentam uma vasta gama de efeitos biológicos, incluindo a atividade antiprotozoária (GREENBAUM et al., 2004), anti-tumoral (CHOREV e GOODMAN, 1993), antibacteriana (DOBEK, 1980) e antiviral (LAM et al., 1994), as quais são extensivamente estudadas.

Com relação à sua ação como antiparasitário, geralmente, os mecanismos de ação das semicarbazonas envolvem a inibição de enzimas (como cisteína protease), formação de complexos com metais endógenos, reação redox, interrupção na síntese de DNA ou a interação com o DNA (BERALDO e GAMBINO, 2004). Estudos anteriores sobre semicarbazonas e tiosemicarbazonas propuseram que essas classes químicas representam uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra leishmaniose, tripanossomíase e malária, por seu elevado potencial em inibir as cisteína proteases dos parasitos *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. e *Plasmodium* spp. (COHEN et al., 2002).

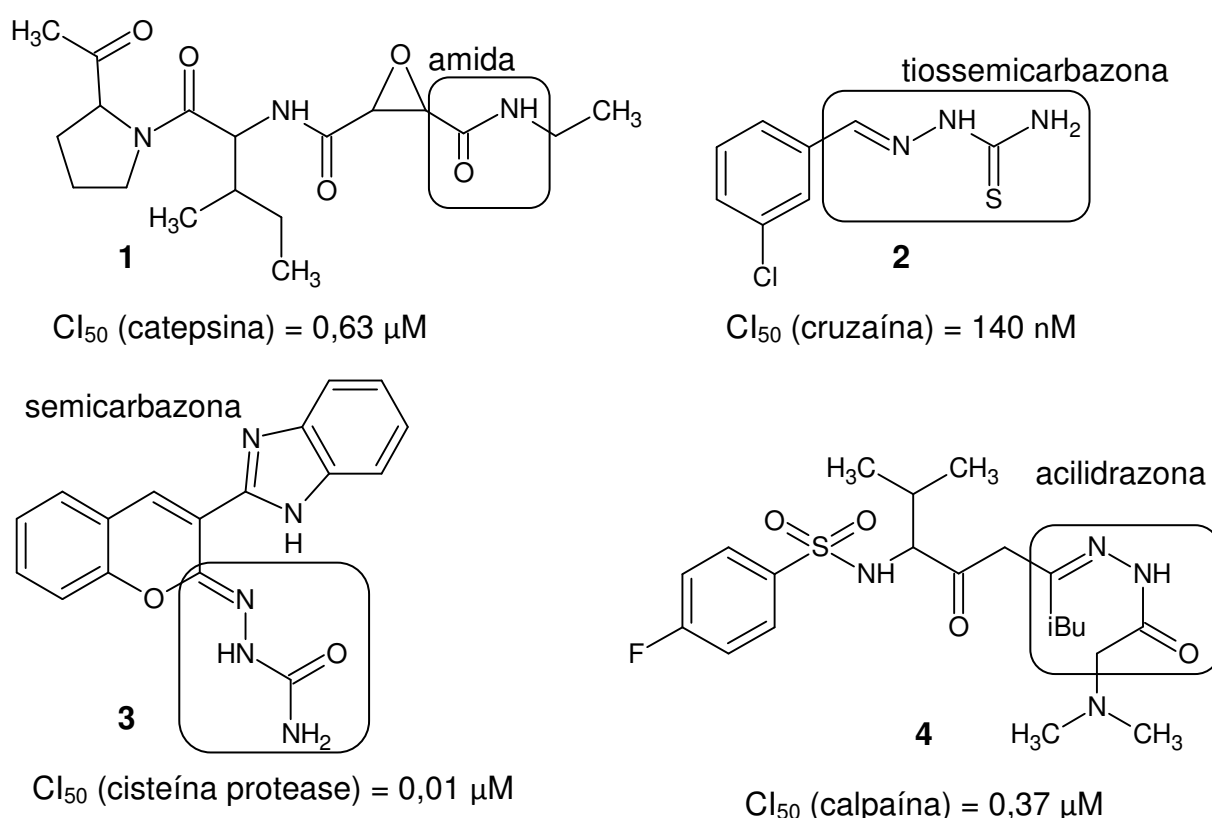
Além das semicarbazonas, também tem sido reportado na literatura que a subunidade *N*-acilidrazona, amplamente descrita como estrutura privilegiada para o desenvolvimento de novos compostos com efeitos farmacológicos diversos (DUARTE et al., 2007), vem sendo explorada no desenho de derivados com ação antiparasitária e antimicrobiana (HERNÁNDEZ et al., 2013). Por exemplo, Al-Kahraman e colaboradores (2012) reportaram a atividade leishmanicida, antibacteriana e antifúngica de alguns derivados hidrazoda-*N*-diarilacilidrazônicos de benzofenonas, destacando-se a elevada atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. major* destes compostos. Já Hernández e colaboradores (2013) também relataram a síntese e avaliação biológica de novas *N*-acilidrazonas furoxânicas como agentes antimicrobianos e antiparasitários para tratar as doenças negligenciadas, apresentando excelente atividade contra *M. tuberculosis*, *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Além disso, vários estudos têm demonstrado que a subunidade *N*-acilidrazona é o grupo farmacofórico para inibição de cisteína proteases (LI et al., 1996; IFA et al., 2000; ROMEIRO et al., 2009). Como discutido anteriormente, cisteína proteases são enzimas essenciais em muitas vias bioquímicas parasitárias e, portanto, constituem potenciais alvos na busca de novos fármacos contra várias doenças infecciosas tropicais (MCKERROW et al., 1999; MCKERROW, 1999).

Portanto, a partir do ponto de vista da química medicinal, *N*-acilidrazonas são dotadas com a interessante capacidade de interagir com diversos bioreceptores, visto que podem estabelecer ligações de hidrogênio, bem como a possibilidade de adotar uma orientação conformacional única (FRAGA e BARREIRO, 2006). Estudos comparativos do

efeito inibidor de *N*-acilidrazonas e chalconas em cisteínas proteases parasitárias conhecidas, tais como cruzaína, falcipaína, e tripanopáina, têm sido realizados. (TROEBERG et al., 2000), sendo reconhecida a importância da insaturação imínica de acilidrazona como sítio ativo para inibição enzimática nesses protozoários. Nesse cenário, *N*-acilidrazonas forneceram uma estratégia sólida para o desenvolvimento de inibidores de cisteína protease de parasitos, incluindo a enzima CPB de *Leishmania* spp. (IFA et al., 2000).

Considerando a habilidade destas enzimas para catalisarem a hidrólise de peptídeos (7-9), derivados contendo a subunidade amida ou um grupo amida-mimético podem ser desenhados como inibidores proteolíticos de cisteína proteases de protozoários (DU et al., 2002; RAGHAV et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2013; STEVERDIN et al., 2012), como os derivados exemplificados na **Figura 2**.

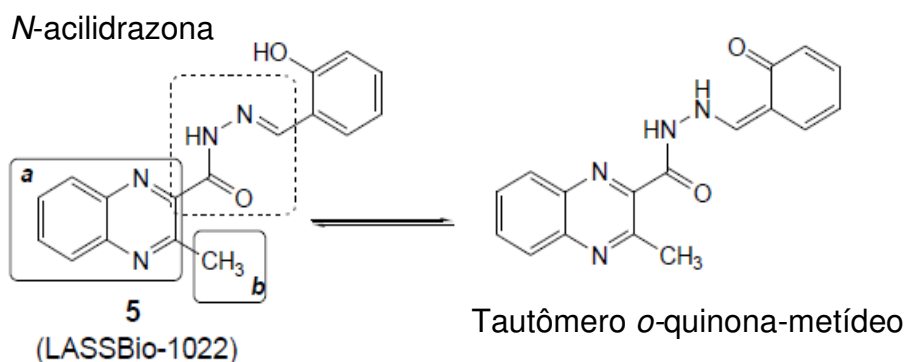
Figura 2. Exemplos de derivados contendo grupo amida-mimético capazes de inibir proteases de protozoários.



Fonte: DU et al., 2002; RAGHAV et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2013; STEVERDIN et al., 2012.

De maneira similar, o grupo *o*-hidroxifenila ligado à subunidade imina do grupo da função *N*-acilidrazona do derivado LASSBio 1022 (5) é um interessante arcabouço estrutural para inibição de cisteína proteases. Esta afirmação se baseia no mecanismo teórico proposto, o qual envolve o ataque nucleofílico do grupo sulfidril de cisteína proteases ao carbono eletrofílico presente no intermediário reativo *o*-quinona-metídeo, gerado mediante equilíbrio tautomérico da função 2-hidroxibenzilideno (IFA et al., 2000; ROMEIRO et al., 2009), como mostra a **Figura 3**.

Figura 3. Equilíbrio tautomérico de LASSBio 1022 com o intermediário *o*-quinona-metídeo.

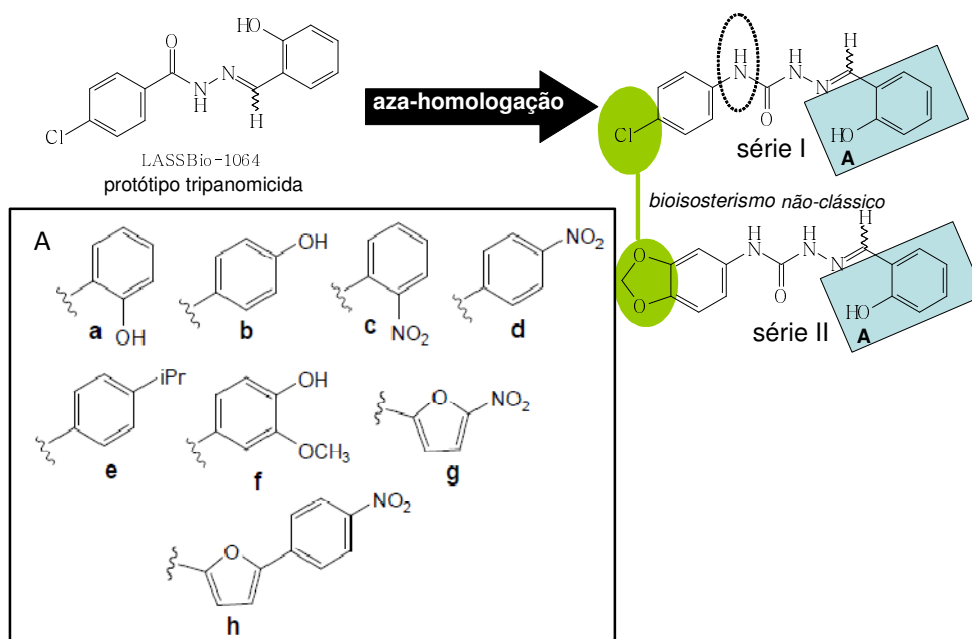


Desta forma, em continuidade aos esforços de pesquisa que o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI-UFAL) vem desenvolvendo na busca por novos protótipos imunomoduladores e antiparasitários úteis ao tratamento de doenças negligenciadas, bem como devido ao elevado potencial terapêutico de semicarbazonas e *N*-acilidrazonas como inibidores de cisteína protease de protozoários, realizou-se no presente trabalho a avaliação farmacológica de séries de derivados semicarbazônicos e de hidrazida-*N*-acilidrazônicos, planejados e sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ), visando à descoberta de novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose.

O planejamento da série de derivados semicarbazônicos foi realizado aplicando-se a estratégia de aza-homologação sobre a estrutura do protótipo tripanomicida LASSBio-1064, representada pela inserção do grupo NH como espaçador entre as subunidades aromática e

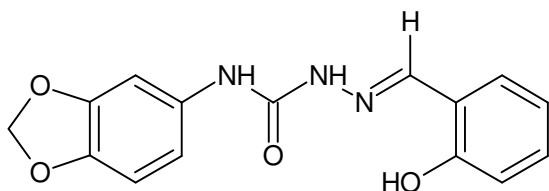
acilidrazona de LASSBio-1064 (**Figura 4**). Posteriormente, foi proposta a troca bioisostérica do átomo de cloro, presente nos derivados da subsérie Ia-I (derivados 7a-h), pela unidade metilenodioxila, permitindo o desenho dos derivados semicarbazônicos da subsérie IIa-I (derivados 6a-h) (**Figura 4**). Ressalta-se que este tipo de bioisosterismo não-clássico foi previamente identificado em nosso laboratório quando da descoberta do saftolobano a partir do daltrobano (LIMA, 1997). Além disso, as modificações estruturais nos anéis ligados à carbonila do tipo amida (CONH) e ao grupo imina (N = CH) nesses derivados semicarbazônicos também foram avaliadas, visando estabelecer sua contribuição para a atividade leishmanicida.

Figura 4. Gênese das séries I e II a partir da aplicação da estratégia de aza-homologação sobre o protótipo LASSBio-1064.

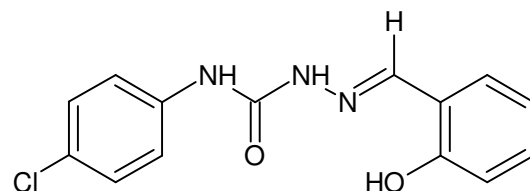


Assim, as estruturas químicas dos derivados semicarbazônicos estão representadas na **Figura 5**.

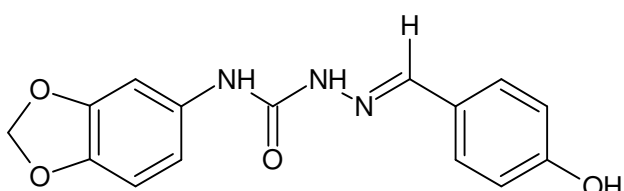
Figura 5. Estrutura química dos derivados semicarbazônicos das séries I e II.



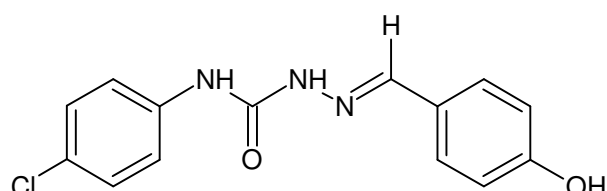
LASSBio 1200 (6a)



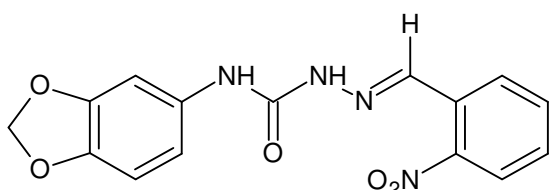
LASSBio 1487 (7a)



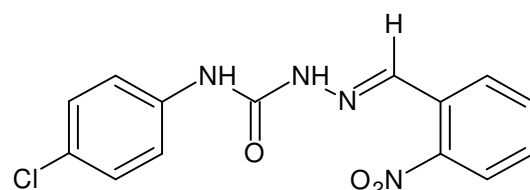
LASSBio 1205 (6b)



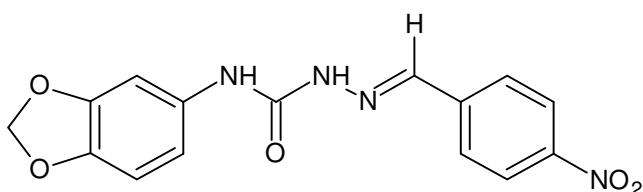
LASSBio 1701 (7b)



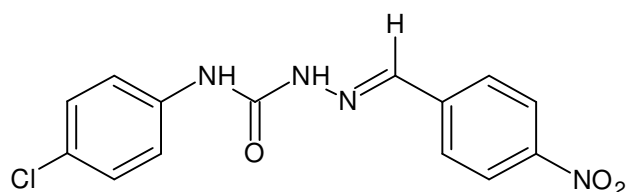
LASSBio 1201 (6c)



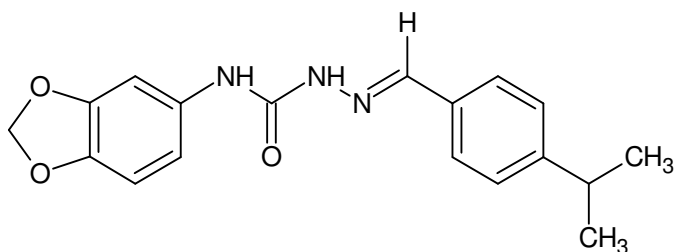
LASSBio 1490 (7c)



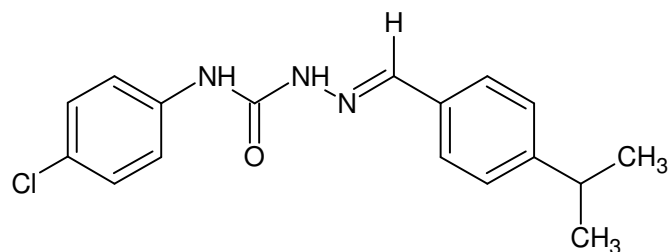
LASSBio 1203 (6d)



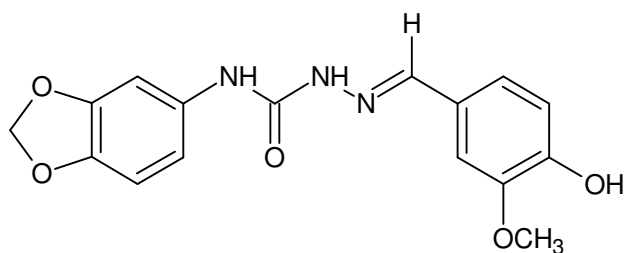
LASSBio 1489 (7d)



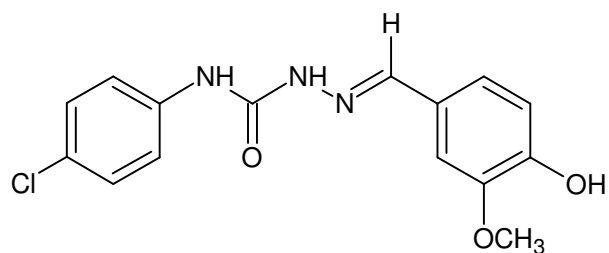
LASSBio 1206 (6e)



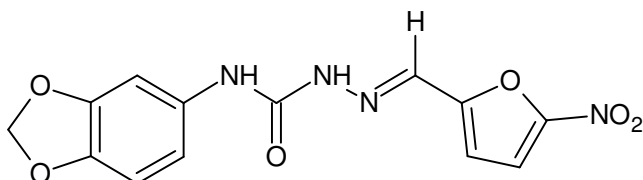
LASSBio 1486 (7e)



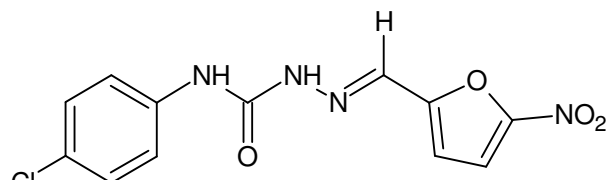
LASSBio 1210 (6f)



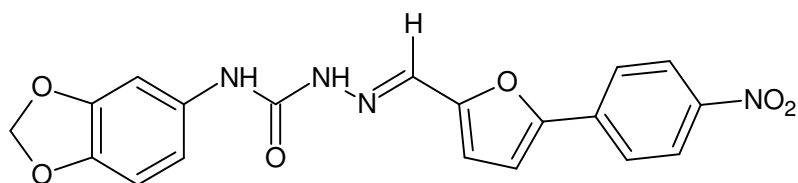
LASSBio 1488 (7f)



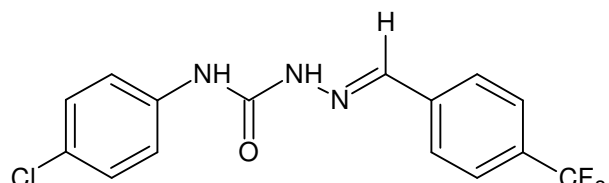
LASSBio 1302 (6g)



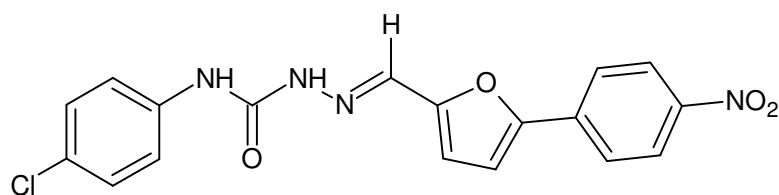
LASSBio 1483 (7g)



LASSBio 1303 (6h)



LASSBio 1485

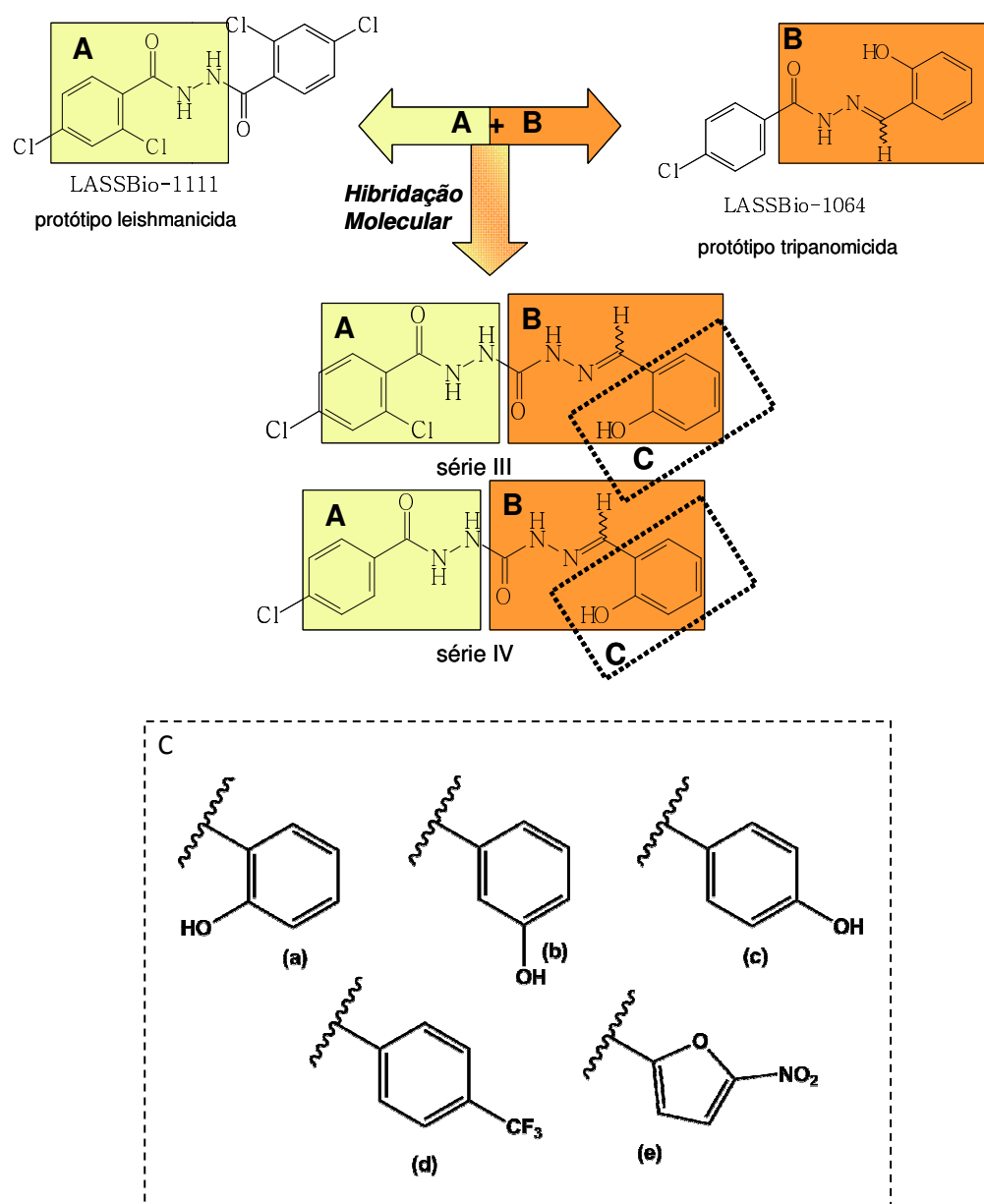


LASSBio 1699 (7h)

Já o planejamento da série de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos funcionalizados (IIIa-e e IVa-e) foi realizado aplicando-se a estratégia de hibridação molecular entre os protótipos leishmanicida LASSBio-1111 e o protótipo tripanomicida LASSBio-1064. Neste processo foi proposta a hibridação da subunidade arilidrazina de LASSBio-1111 (**Figura 6A**) com a acilidrazona funcionalizada de LASSBio-1064 (**Figura 6B**), com objetivo de obter uma nova e original série que conjugue as atividades leishmanicida e tripanomicida. Subsequentemente, a fim de construir uma série congênere, realizou-se a substituição

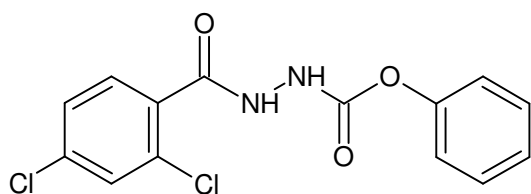
regioisomérica da subunidade 2-hidroxi-benzilideno pelos substituintes 3-hidroxi-benzilideno, 4-hidroxi-benzilideno, 4-trifluorometilbenzilideno e pelo sistema 5-nitrofurano.

Figura 6. Gênese das séries III e IV a partir da aplicação da estratégia de hibridação molecular entre os protótipos LASSBio-1111 e LASSBio-1064.

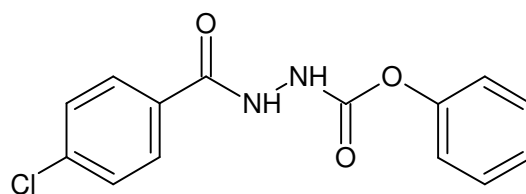


As estruturas químicas dos derivados hidrazida-*N*- acilidrazônicos estão representadas na Figura 7.

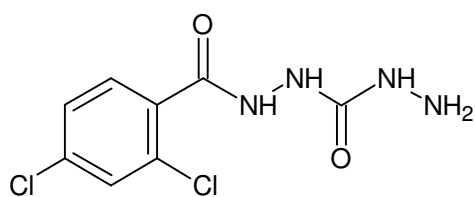
Figura 7. Estrutura química dos intermediários sintéticos e dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos das séries III e IV.



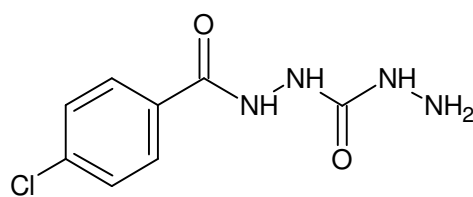
LASSBio 1492 (9)



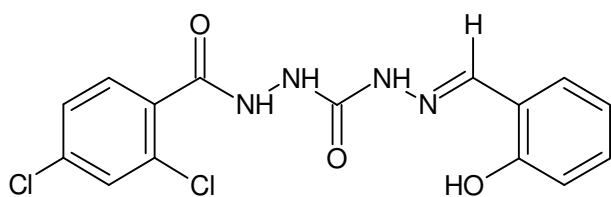
LASSBio 1702 (10)



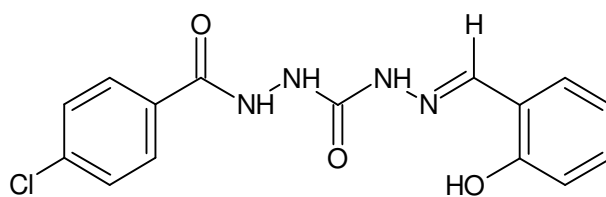
LASSBio 1493 (11)



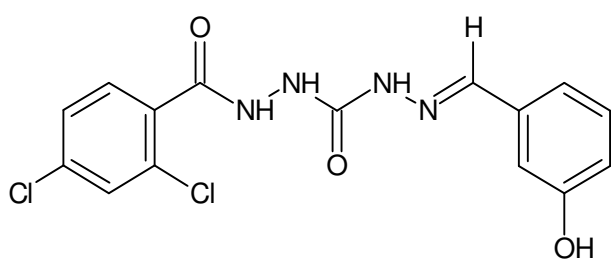
LASSBio 1710 (12)



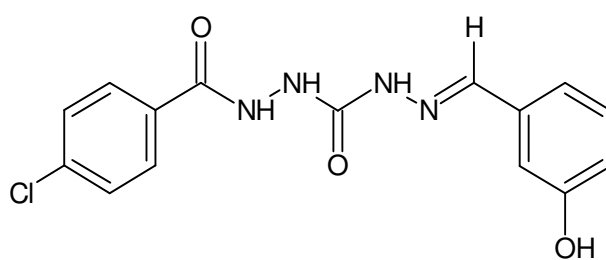
LASSBio 1705 (3a)



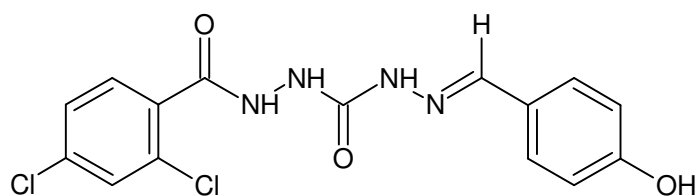
LASSBio 1704 (4a)



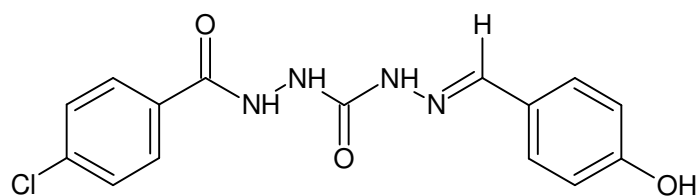
LASSBio 1708 (3b)



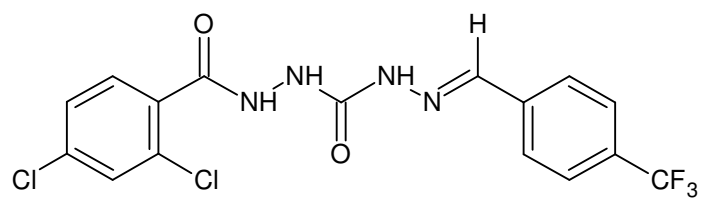
LASSBio 1709 (4b)



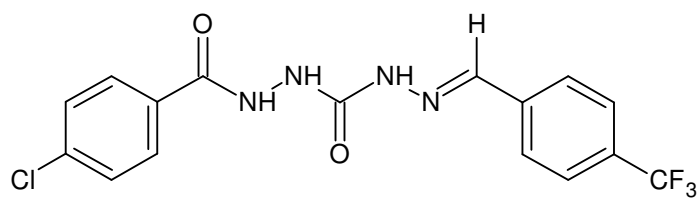
LASSBio 1707 (3c)



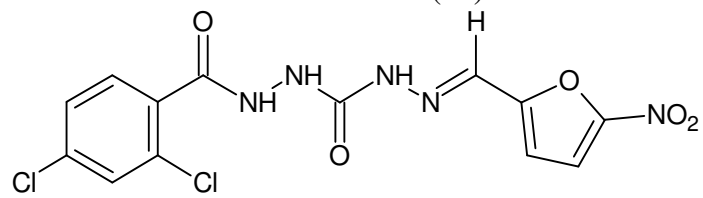
LASSBio 1706 (4c)



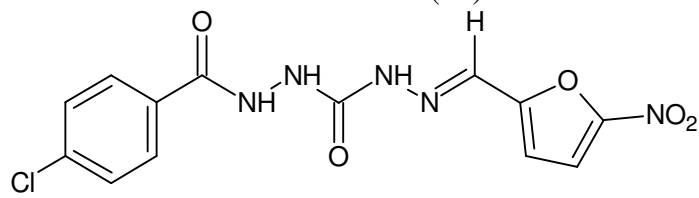
LASSBio 1736 (3d)



LASSBio 1737 (4d)



LASSBio 1703 (3e)



LASSBio 1491 (4e)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade leishmanicida de novas séries de derivados semicarbazônicos e de hidrazida-*N*-acilidrazônicos.

2.2 Objetivos Específicos

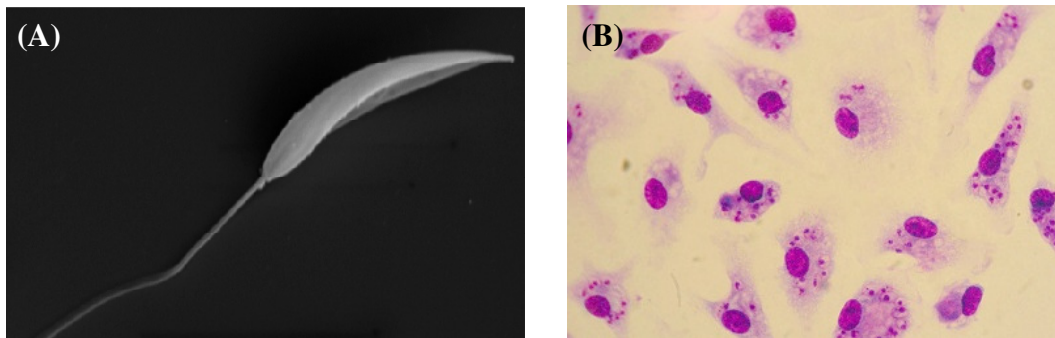
- Determinar o potencial citotóxico de produtos sintéticos para a célula hospedeira;
- Realizar o “screening” farmacológico das séries de derivados semicarbazônicos e de hidrazida-*N*-acilidrazônicos sobre a viabilidade de formas promastigotas (atividade direta dos derivados sobre o parasito) de *L. major*;
- Avaliar a ação dos derivados sobre macrófagos infectados *in vitro* com *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, quanto a taxa de infecção e a multiplicação dos parasitas intracelulares;
- Determinar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados e cultivados com os derivados;
- Avaliar o perfil de morte celular de promastigotas de *L. amazonensis* desencadeada pelo tratamento *in vitro* com os derivados mais ativos;
- 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 toxicidade hepática e renal em animais infectados e tratados com os derivados mais ativos.
- Determinar a influência dos derivados sobre a morte celular e ciclo celular do parasito;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As infecções parasitárias mais negligenciadas dos seres humanos, incluindo malária, doença do sono, doença de Chagas, leishmaniose, filariose e esquistossomose, têm um impacto devastador sobre a saúde global e no desenvolvimento econômico. Apesar de sua diversidade filogenética, esses protozoários e helmintos compartilham uma característica biológica importante: produzem infecções crônicas para maximizar as suas oportunidades de transmissão para seus vetores artrópodes. Seu sucesso como parasitos depende da grande diversidade de mecanismos de adaptação e estratégias de evasão da resposta imunológica do hospedeiro mamífero. Desta forma, os parasitos do gênero *Leishmania* spp, que são protozoários que desenvolveram mecanismos de resistência, os quais permitem sua sobrevivência privilegiada a longo prazo dentro de fagocitos especializados, principalmente, macrófagos (PETERS e SACKS, 2006).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos de uma variedade de antropozoonoses conhecidas coletivamente como leishmanioses. Estes parasitos pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* ou *Viannia*. *Leishmania* spp. apresenta um ciclo de vida digenético, alternado entre formas promastigotas e amastigotas. As promastigotas são encontradas no vetor flebotomíneo e transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada deste inseto. Após a infecção do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas se transformam em formas amastigotas dentro das células hospedeiras (GOTO e LINDOSO, 2012; KAYE e SCOTT, 2011). A **Figura 8** mostra as duas formas evolutivas de *Leishmania* spp.

Figura 8. Formas evolutivas de *Leishmania* spp. (A) Promastigotas. (B) Amastigotas.



Fonte: Autora, 2015.

Nos últimos anos, houve também grande avanço no entendimento da biologia do parasito: os genomas de grande parte das espécies de *Leishmania* spp. foram sequenciados (PEACOCK, 2007); análise pós-genômica da resposta imune desencadeada por estes parasitos e de fatores de virulência dos mesmos estão em rápido progresso (KAYE e BLACKWELL, 2008); diferenças sobre a imunorregulação descobertas a partir de estudos com várias espécies de *Leishmania* spp. em modelos animais e em humanos; a ocorrência de recombinação sexual entre parasitos foi demonstrada (AKOPYANTS et al., 2009); e os detalhes da vida dentro do vetor (DOBSON et al., 2010; SADLOVA et al., 2010).

Além disso, existem mais de 20 espécies de *Leishmania* que são conhecidas por infectar seres humanos (PETERS e SACKS, 2006). Algumas espécies causam doenças crônicas de cura lenta denominadas de leishmanioses tegumentares (LTs), com sintomas que permanecem localizados na superfície cutânea e/ou mucosa, podendo ser classificadas, principalmente, como cutâneas, mucocutâneas e cutâneas difusas, a depender do aspecto e localização das lesões. Outras espécies se disseminam por órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea, causando a leishmaniose visceral (LV), responsável pela grande maioria das mortes associadas à doença (CHAN et al., 2012; KAYE e SCOTT, 2011).

Os genomas de espécies de *Leishmania* também têm sido elucidados. Inicialmente, o genoma de duas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, *L. major* e *L. infantum* JPCM5, e de uma espécie do Novo Mundo, *L. braziliensis* M2904, foram sequenciados (IVENS et al., 2005; PEACOCK et al., 2007). Recentemente, os genomas de *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. tarentolae* e *L. amazonensis* foram sequenciados (DOWNING et al., 2011; 24, RAYMOND et al., 2012; REAL et al., 2013; ROGERS et al., 2011). Além disso, o número de cromossomos também tem sido estabelecido para muitas espécies de *Leishmania* (ROVAI et al., 1992; WINCKER et al., 1996). De forma geral, a análise comparativa dos três primeiro sequenciados de *Leishmania* revelou um alto grau de conservação gênica com sintenia quase completa. Em contraste com as grandes diferenças fenotípicas de cada espécie, menos de 50 genes foram diferencialmente distribuídos, indicando que podem existir alguns genes específicos para cada espécie (DUJARDIN, 2009; LEPROHON et al., 2009). O cariótipo molecular das espécies *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major* compreende 36 cromossomos, enquanto que as espécies *L. braziliensis* e *L. mexicana* tem 35 e 34 cromossomos, respectivamente (BRITTO et al., 1998; PEACOCK et al., 2007). A sintomopatologia clínica da doença é dependente tanto da espécie do parasito responsável pela infecção, como da

resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* causam lesões tegumentares, enquanto que *L.donovani* e *L.chagasi* são responsáveis pela leishmaniose visceral. De forma semelhante a outros patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, o mesmo microrganismo pode causar uma variedade de doenças dependendo da resposta imune do hospedeiro, incluindo infecções subclínicas, doença crônica disseminada ou autocura (GOTO e LINDOSO, 2012; KAYE e SCOTT, 2011; PETERS e SACKS, 2006).

A leishmaniose também tem sido tradicionalmente dividida em duas categorias referentes a região geográfica na qual a infecção foi adquirida: a leishmaniose do Velho Mundo, que é causada por espécies de *Leishmania* spp. encontradas na Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e África; já a leishmaniose do Novo Mundo apresenta como agente etiológico espécies encontradas na América Latina. Apesar da virulência, patogenicidade e as manifestações clínicas serem dependentes do tipo de espécie, compreender a distribuição geográfica de *Leishmania* spp. pode, muitas vezes, diminuir a possibilidade de infecção a um número reduzido de espécies de *Leishmania*, além de predefinir os regimes de tratamento, possível prognóstico clínico e progressão da doença (MURRAY et al., 2005).

3.1 Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é frequentemente definida como um grupo de doenças associadas a uma multiplicidade de manifestações clínicas, que variam de pequenos nódulos cutâneos a destruição do tecido na mucosa. Apesar da sua elevada incidência, por não ser fatal, a leishmaniose cutânea é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, com pouco interesse de organizações financiadoras para fomentar atividades de pesquisa, prevenção e controle da doença (GOTO e LINDOSO, 2012; REITHINGER et al., 2007).

Aproximadamente 15 diferentes espécies são conhecidas por serem os agentes etiológicos da LT em humanos: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, e algumas cepas de *L. chagasi* na Ásia, África e Europa; *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *L. peruviana*, *L. shawi* e *L. lainsoni* no Novo Mundo, principalmente na América Latina, contendo a maior diversidade de parasitos na região amazônica; e a espécie viscerotrópica *L. donovani*, que também pode causar a

leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (AKILOV et al., 2007; OMS, 2010; WEIGLE e SARAVIA, 1996; ZIJLSTRA et al., 2003). As principais espécies responsáveis pela forma tegumentar da leishmaniose são *L. mexicana*, *L. braziliensis* ou *L. panamensis* na América Latina; e *L. major* ou *L. tropica* no Velho Mundo (MURRAY et al., 2005). *L. braziliensis* é a principal espécie que causa a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, seguida de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (BANULS et al, 2007; GOTO e LINDOSO, 2012; OMS, 2010).

Em humanos, a infecção pode ser subclínica ou pode apresentar manifestações que vão desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, bem como a lesões mucocutâneas agressivas e mutilantes (SOUZA et al., 2012). As características clínicas da doença dependem de fatores inerentes ao parasito, ao vetor e ao hospedeiro (BASANO e CAMARGO, 2004). Por exemplo, existem relatos na literatura de que a doença provocada por *L. braziliensis* é diferente da gerada por outras espécies, principalmente, devido ao menor número e maior diâmetro das lesões, bem como pela frequente associação com adenomegalia, ao contrário das características da LTA geralmente ocasionada por *L. guyanensis*, que faz com que haja um quadro clínico caracterizado por lesões menores e mais numerosas. Além disso, tem sido relatado no Brasil que a subpopulação de *L. braziliensis* encontrada no Ceará é mais patogênica do que a encontrada na Bahia, visto que a infecção causa lesões maiores, com alto envolvimento ganglionar e maior persistência do parasito (FIGUEIREDO-SOUZA et al., 2012; TEXEIRA, 2005).

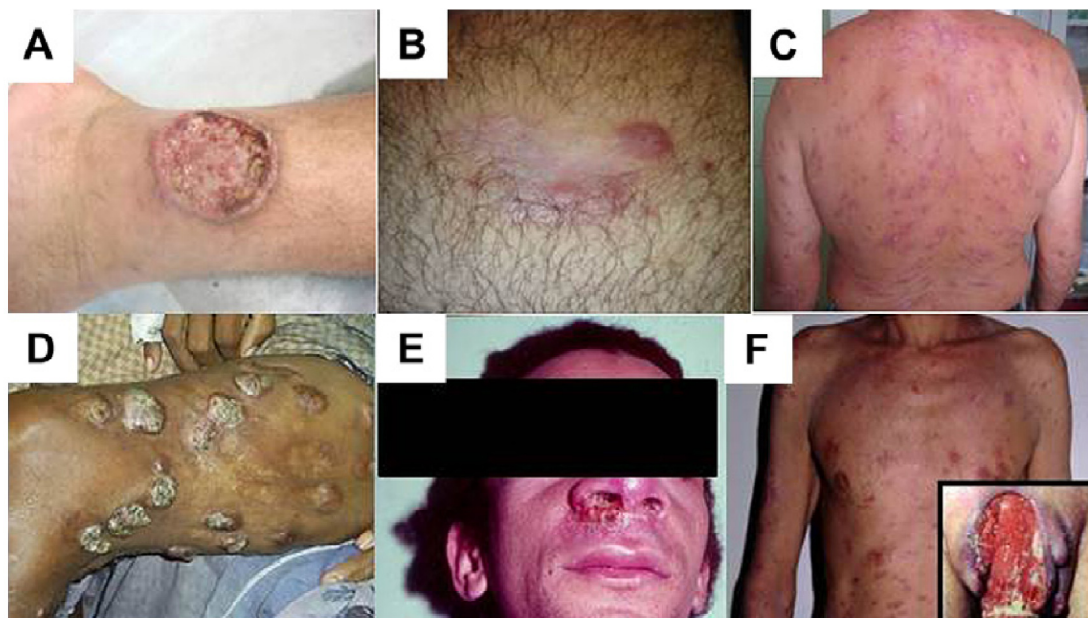
Em geral, as espécies dermatrópicas do Velho Mundo causam menos manifestações clínicas do que as responsáveis pela LTA (GOTO e LINDOSO, 2010; OMS, 2010). *L. major* e *L. tropica* causam lesões menos severas, de aparecimento rápido e que possuem curso relativamente benigno. Ao contrário das outras espécies, dificilmente as lesões causadas por *L. major* e *L. tropica* precisam de tratamento, já que normalmente a lesão evolui para autocura. No entanto, como as lesões podem levar à significativa estigma social e disfiguração, é preferível a realização do tratamento. É importante mencionar que o tratamento inadequado das lesões primárias, em uma pequena parcela de pacientes infectados com uma dessas duas espécies de *Leishmania*, pode aumentar o risco de desenvolvimento de leishmaniose mucocutânea (DAVID e CRAFT, 2009).

O período de incubação da doença pode ser de algumas semanas a meses após a picada do vetor infectado. As lesões são geralmente encontradas em partes expostas do corpo

como o rosto, braços e pernas (MAURER et al., 2009). De forma geral, a lesão inicial está no local da picada do vetor na forma de uma mácula, que a partir de 2 semanas a 3 meses em diante pode se apresentar como uma pruriginosa lesão papular de tamanho inicial de 5-10 mm. Dependendo da espécie de *Leishmania*, essa pápula pode permanecer durante 1-3 meses, podendo progredir para nódulo eritematoso (AMEEN, 2010; MAGILL, 2005). A lesão pode evoluir para um granuloma com um aumento progressivo do nódulo que pode se desenvolver para uma placa eritematosa, endurecida e escamosa. Essa lesão pode espontaneamente desaparecer ou pode evoluir para uma úlcera crônica (GOTO e LINDOSO, 2012). As lesões podem ser secas com crosta ou acompanhadas de exsudato. Lesões satélites e linfadenopatia local também podem estar presentes. As lesões podem deixar cicatrizes despigmentada retraídas (SINHA et al., 2005). As lesões de leishmaniose cutânea, muitas vezes, podem ser confundidas com furúnculos e infecções de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (DAVID e CRAFT, 2009).

Os pacientes podem ter uma ou mais lesões. Cada lesão pode representar uma mordida independente de flebotomíneo ou haver propagação de lesões satélites, porém, em casos raros, a leishmaniose pode se manifestar como uma doença disseminada. Outra variante da leishmaniose cutânea encontra-se nas florestas tropicais da América Central, sendo conhecida como "úlceras chiclero", a qual caracteristicamente afeta apenas o pavilhão auricular. Já a leishmaniose mucocutânea pode envolver as mucosas nasais e bucais, causando inflamação considerável com riscos de necrose e destruição da cartilagem. As lesões são muitas vezes crônicas e não respondem às tentativas de uso de antibióticos ou esteroides. As lesões são geralmente pruriginosas e não são tão dolorosas como possam parecer. Na maioria dos casos, os sintomas sistêmicos estão ausentes. No entanto, alguns sintomas sistêmicos como linfadenopatia, febre e hepatomegalia foram relatados, principalmente, em paciente com lesões ulcerativas causadas por *L. braziliensis* (DAVID e CRAFT, 2009; OMS, 2015). Com base nas suas diferentes apresentações clínicas, a LT pode ser classificada como a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada, leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose recidivante (LR), leishmaniose mucocutânea (LMC) e LDPC (GOTO e LINDOSO, 2012). A **Figura 9** exemplifica a maioria das formas clínicas da LT.

Figura 9. Formas clínicas da leishmaniose tegumentar. (A) LCL. (B) LR. (C) Leishmaniose disseminada. (D) LCD. (E) LMC. (F) Leishmaniose atípica em paciente HIV positivo.



Fonte: GOTO e LINDOSO, 2012

A LCL é a forma mais prevalente e é causada por todas as espécies de *Leishmania* dermatrópicas. O tipo de lesão mais comum é caracterizado por uma úlcera, que pode variar de 1 a 10 lesões localizadas numa área exposta do corpo. Geralmente, a úlcera é indolor, redonda, com bordas bem delimitada de base endurecida, apresentando uma crosta central que, às vezes, pode sangrar. A resolução espontânea pode ocorrer, deixando uma lisa e fina cicatriz hipopigmentada. No entanto, em alguns casos, evolui para outras formas da doença (GOTO e LINDOSO, 2012).

A LR é mais prevalente no Velho Mundo, estando associada à infecção com *L. tropica*, porém há diversos relatos no Novo Mundo. A lesão é caracterizada por uma lesão ativa na área próxima a borda da lesão curada que se desenvolve com ou sem tratamento após um período de tempo variável. No Novo Mundo, LR está associada a infecção com *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Brasil e *L. panamensis* no Equador (BITTENCOURT et al., 1993; CALVOPINA et al., 2006).

A leishmaniose disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleomórficas (10-300) em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, que são provavelmente causadas por disseminação linfática ou hematogênica da *Leishmania*. As lesões são acneiforme, ulceradas e papulares. A mucosa é afetado em cerca de 29% dos casos. No Brasil, esta apresentação é atribuída a *L. braziliensis*, embora outras espécies também possam ser agente etiológico destas forma de LT (TURETZ et al., 2002).

A LCD evolui progressivamente da LCL, apresentando lesões repletas de parasitos. A doença é caracterizada pela presença de múltiplos nódulos, pápulas ou tubérculos, com infiltração cutânea difusa e sem ulceração, que estão localizados principalmente em áreas expostas do corpo, com características semelhantes à hanseníase virchowiana (AMEEN, 2010; GOTO e LINDOSO, 2012). LCD é uma condição rara relatada na América do Sul, América Central, na Etiópia e Quênia. Os principais agentes etiológicos são *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo e *L. aethiopica* no Velho Mundo (OMS, 2010; REITHINGER et al., 2007).

A LMC pode ocorrer simultaneamente com a LCL, no entanto, geralmente, as lesões mucosas aparecem meses ou anos após a LCL. *L. braziliensis* é a espécie primária que está envolvida no Novo Mundo com esta forma de LTA, apesar de *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* também poderem ser agentes etiológicos (GOTO e LINDOSO, 2010). No Velho Mundo, *L. major* e algumas cepas de *L. infantum chagasi* também podem causar a doença. LMC danifica principalmente a mucosa nasal, mas a mucosa oral também pode ser afetada. Os sintomas iniciais são inespecíficos, tornando o diagnóstico difícil. Os sintomas podem incluir comichão no nariz ou na mucosa oral, que evolui para formação de crostas e sangramento. Inicialmente, inflamação nasal ou oral, bem como congestão nasal são observados, no entanto, a ulceração e perfuração do septo nasal pode acontecer lentamente. Partes do rosto, palato mole, faringe e laringe podem ser comprometidos (GOTO e LINDOSO, 2012). Linfadenopatia pode estar presente e é um achado comum em LMC associada à *L. braziliensis*. Linfadenopatia tipicamente precede a ulceração da lesão e pode ser acompanhada de sintomas sistêmicos como febre e hepatomegalia (DAVID e CRAFT, 2009). Finalmente, há uma destruição progressiva da mucosa oronasofaríngeas e das estruturas das vias aéreas superiores cartilaginosas e faciais, resultando na deformação e obstrução das vias aéreas (MURRAY et al., 2005; SINHA et al., 2005). Além disso, infecções bacterianas secundárias são comuns e potencialmente fatais (REITHINGER et al., 2007).

LDPC é uma manifestação dérmica da leishmaniose visceral, sendo freqüentemente causada pela espécie *L. donovani*. As lesões de LDPC podem estar em qualquer lugar do corpo e a remissão da infecção pode ocorrer de semanas a anos após o desaparecimento dos sintomas da leishmaniose visceral (SALOTRA e SINGH, 2006; ZIJLSTRA e EL-HASSAN, 2001). O espectro da apresentação dérmica da LDPC varia de máculas hipocrômicas a pápulas ou nódulos infiltrativos. Erupções podem ou não serem ulceradas, dependendo da cepa de *L. donovani* e região geográfica onde a infecção é adquirida (SALOTRA e SINGH, 2006). Lesões de LDPC pode atuar como um reservatório de parasitos. O diagnóstico é baseado nos padrões epidemiológicos e clínicos, porém a cultura de tecidos e o esfregaço das lesões são os padrões-ouro para o diagnóstico. No entanto, os testes sorológicos e detecção do DNA do parasito no tecido também são utilizados para confirmação do mesmo, já que o diagnóstico pode ser difícil devido à baixa carga parasitária no interior das lesões (DAVID e CRAFT, 2009).

A LT também é uma doença oportunista emergente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em casos de coinfeção entre HIV e *Leishmania*, as manifestações clínicas da leishmaniose pode se apresentar com diferentes características. No Velho Mundo, LDPC é relatada em pacientes infectados simultaneamente com HIV. No Novo Mundo, as manifestações podem variar de sintomas semelhantes aos encontrados em pacientes HIV-negativos a manifestações incomuns. Uma grande variedade de lesões, como pápulas, nódulos, placas e ulcerações, podem ocorrer, e algumas lesões também podem afetar os órgãos genitais (AMEEN, 2010; LINDOSO et al., 2009).

3.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença sistêmica, sendo a forma mais grave dentre todas as infecções de *Leishmania* spp., podendo ser fatal, se não tratada (SINGH et al., 2012). É causada pelo complexo *L. donovani* no leste da África e no subcontinente indiano, bem como e por *L. chagasi* na Europa, Norte da África e América Latina. Excepcionalmente, tem sido observado visceralização por espécies tipicamente associadas à LT. Mais comumente, esse achado tem sido relatado em infecções com *L. tropica* no Oriente Médio e *L. amazonensis* na América do Sul. Além disso, existem mais de 10 espécies de flebotomíneos que desempenham o papel na transmissão da LV, com pelo menos uma espécie

envolvida por região geográfica. Nas Américas, *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie vetora no Novo Mundo, mas a transmissão também pode ocorrer através da picada de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* (ALVAR et al., 2008; BELO et al., 2013; CHAPPUIS et al., 2007; MURRAY et al., 2005;).

Dependendo das características de transmissão, existem dois tipos de LV: a que é transmitida do animal para o vetor e depois para o homem, conhecida como antroponozoonótica; e a antroponótica, que é transmitida de humano para vetor e deste para outro hospedeiro humano. No primeiro caso, os seres humanos são hospedeiros ocasionais e os animais são os reservatórios da doença (ALVAR et al., 2004). O ciclo antroponozoonótico de LV é encontrada em áreas de transmissão *L. infantum chagasi*, apresentando os cães (*Canis familiaris*) como os principais reservatórios no ambiente urbano, ocorrendo na bacia do Mediterrâneo, China, Oriente Médio e América do Sul. Outras formas de transmissão já foram registrados, tais como congênita, por uso de drogas injetáveis e transfusão de sangue. Reservatórios potenciais da doenças silvestres são a raposa (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e o gambá (*Didelphis albiventris*). No entanto, em nível global, a forma antroponótica é claramente mais comum. Esta forma é causada por *L. donovani* e é prevalente no leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal (BELO et al., 2013; CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Após a infecção, os parasitos são internalizados pelas células dendríticas e macrófagos na derme, se transformam em amastigotas, as quais se multiplicam e sobrevivem no fagolisossomo através de uma complexa interação entre parasito-hospedeiro. Posteriormente, os parasitos difundem através dos sistemas linfático e vasculares para infectar outros monócitos e macrófagos no sistema retículo-endotelial, o que resulta em infiltração na medula óssea, aumento dos gânglios linfáticos e, por vezes, hepatoesplenomegalia (linfadenopatia). É importante ressaltar que a infecção nem sempre condiz com a doença clínica (CHAPPUIS et al., 2007). A **Figura 10** mostra um paciente sudanês com LV.

Figura 10. Paciente com leishmaniose visceral.



Fonte: OMS, 2015

Embora os determinantes para a progressão da doença após a infecção primária sejam apenas parcialmente entendidos, sabe-se que a virulência parasitária, estado nutricional, idade e fatores genéticos podem contribuir. Em alguns pacientes, os parasitos viáveis persistem após a infecção primária, levando à reativação da doença em caso de supressão do sistema imune, como a imunossupressão adquirida durante a infecção pelo HIV e malnutrição (ALVAR et al., 2008). Além disso, após a recuperação da LV, alguns pacientes (50% no Sudão e 1-3 % na Índia) desenvolvem LDPC, caso o esquema terapêutico usado não seja efetivo para eliminar o parasito (SINGH et al., 2012).

Os indivíduos infectados podem apresentar desde a forma assintomática, até uma doença de evolução fatal. O período de incubação dura cerca de dois a seis meses, mas pode variar de semanas a vários anos. Os pacientes de LV apresentam sintomas e sinais de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso) e de invasão parasitária do sistema sanguíneo e retículo-endotelial (tais como aumento dos gânglios linfáticos, baço e fígado). A febre está geralmente associada com rigor e calafrios, podendo ser intermitente. Fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, que é causada pelo persistente estado inflamatório, hiperesplenismo (devido à destruição periférica dos eritrócitos no baço) e às vezes por sangramento. O desfecho fatal da doença ocorre, predominantemente, por coinfeção ou complicações hemorrágica. Estudos realizados no Brasil mostram uma variação nas taxas de mortalidade entre 4,2 % e 10,2% em pacientes tratados (BELO et al., 2013; CHAPPUIS et al., 2007).

A apresentação clínica da LV é semelhante nas várias áreas endêmicas, mas existem algumas diferenças. Por exemplo, aumento dos gânglios linfáticos são raramente encontrados em pacientes indianos, mas são freqüentes em pacientes sudaneses. Hiperpigmentação, o que provavelmente deu origem ao nome calazar (febre negra em hindu), apenas tinha sido descrita em pacientes com LV do subcontinente indiano, mas hoje este sintoma é incomum e, provavelmente, era uma característica da doença prolongada na época em que o tratamento eficaz não estava disponível. Conforme a doença avança, a esplenomegalia pode aumentar, causando distensão abdominal e dor, que às vezes é agravada devido à hepatomegalia concomitante (CHAPPUIS et al., 2007). As seguintes características são consideradas como marcadores de mau prognóstico: febre com duração de mais de 60 dias, infecção bacteriana, icterícia, dispnéia, hemorragia, anemia grave, neutropenia grave e trombocitopenia (BRASIL, 2011; COSTA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2010;). No entanto, a infecção pode não progredir para forma sintomática, sendo encontrada uma proporção de até 30% dos habitantes com infecção assintomática em algumas áreas altamente endêmicas (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

A ocorrência de morte por LV está associada a vários fatores, incluindo idade e presença de comorbidades, tais como infecções, desnutrição e Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) (GAMA et al., 2013). Sintomas e sinais de coinfeções bacterianas, como a pneumonia, a diarreia ou a tuberculose pode apresentar quadro clínico distinto e confundir o diagnóstico. Os sintomas de LV frequentemente persistem por várias semanas ou meses antes que os pacientes procurarem assistência médica ou morram de coinfeções bacterianas, sangramento maciço ou anemia grave. Além disso, dificuldades no diagnóstico precoce e tratamento adequado em muitas áreas endêmicas são outros fatores determinantes da letalidade (BRASIL, 2006; CHAPPUIS et al., 2007).

LV emergiu como uma importante infecção oportunista em áreas endêmicas na era do HIV. HIV contribuiu para o ressurgimento de LV na Europa na década de 1990, apresentando 50% a 60% de todos os casos de LV coinfectados com HIV. A epidemia de HIV tem influenciado significativamente a epidemiologia, as manifestações clínicas e curso da LV. Posteriormente, os casos de coinfeção entre HIV e de LV foram relatados em 35 países em todo o mundo. A maior prevalência de HIV entre os pacientes com LV é relatada no noroeste da Etiópia, que varia de 20% a 30%. Ambas as respostas imunes humoral e celular à *Leishmania* são diminuídas nesses pacientes coinfectados, conduzindo a um risco maior de

desenvolvimento da LV após infecção por *Leishmania*, ao aumento da carga parasitária no sangue e medula óssea, à menor sensibilidade dos testes sorológicos e uma maior taxa de falha no tratamento (CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012). Desta forma, na presença de coinfeção com HIV, LV tende a ser mais grave e manifestar de forma atípica, principalmente com o avanço da doença. Os pacientes tendem a ter menos organomegalias, enquanto órgãos não reticulo-endotelial são comumente envolvidos, como esôfago, estômago, intestino, pulmão, rins, cérebro e glândulas adrenais (RAMOS et al., 1994; RUSSO et al., 2003). A doença pode se apresentar concomitante com lesões cutâneas, bem como os pacientes podem ainda não apresentar febre. A semelhança de características clínicas de LV com várias outras condições oportunistas associadas ao HIV gera dificuldades no diagnóstico adicionais. Por outro lado, LV também acelera a progressão da imunossupressão gerada por HIV, já que aumenta a replicação viral e causa pancitopenia (ALVAR et al., 2008; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

O diagnóstico precoce e o tratamento preciso são os principais componentes de controle da LV (CHAPPUIS et al., 2007). Apesar de avanços significativos feitos na compreensão de diferentes aspectos da LV, o controle eficaz da doença ainda não foi alcançado devido à sua complexidade clínica e epidemiológica. Na verdade, a letalidade aumentou em várias regiões do Brasil (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006). Em 2011, quando confrontados com a grave situação de aumento da letalidade por LV no Brasil, o Ministério da Saúde iniciou um protocolo clínico-terapêutico para identificar e acompanhar os pacientes que estavam em maior risco de progressão para LV grave ou que já mostraram sinais de gravidade. O protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde visava divulgar, entre os profissionais da saúde, as características clínicas típicas de um paciente suspeito de LV, diagnosticar a doença através de exame parasitológico (em aspirado de medula óssea) e sorológico (reação de imunofluorescência indireta ou ensaio imunoenzimático), identificar a co-infecção com HIV, bem como determinava o tratamento específico com antimoniato de meglumina (Glucantime®) ou anfotericina B convencional ou lipossomal. Este protocolo, sem dúvida, facilitou o acompanhamento adequado dos casos, bem como gerou uma redução gradual da letalidade (BRASIL, 2011).

3.3 O ciclo de vida da *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida complexo, que envolve tanto os hospedeiros vertebrados e invertebrados, como duas formas evolutivas do parasito. De forma sucinta, a forma flagelada extracelular do parasito são chamada de promastigotas. Elas são encontradas no díptero vetor, que são flebotomíneos do sexo feminino. No vetor, as promastigotas sofrem vários e distintos estágios morfológicos de diferenciação até finalmente se transformar na forma infectante metacíclica (KAYE e SCOTT, 2011). As promastigotas metacíclicas são transmitida durante o repasto sanguíneo do vetor aos hospedeiros vertebrados, que incluem os seres humanos e animais domésticos como cães e gatos, além de animais selvagens tais como roedores. Apenas duas espécies de *Leishmania*, *L. donovani* e *L. tropica* são capazes de manter ciclo humano-humano (SINGH et al., 2012). As amastigotas não apresentam flagelo exteriorizado e vivem como parasitas intracelulares em uma variedade de células de mamíferos. Nesses animais, as principais células hospedeiras são aquelas com notável função fagocitária, assim como macrófagos (KAYE e SCOTT, 2011).

A infecção começa quando o inseto vetor infectado com promastigotas metacíclicas pica humanos e outros mamíferos para se alimentarem de sangue. O vetor pertence a ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (BERMAN, 2005; SHARMA e SINGH, 2008). Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo fêmea injeta saliva que impede o processo de coagulação (RIBEIRO et al., 1986). Após a ingestão de sangue, promastigotas metacíclicas são então liberadas e são inoculadas na pele via regurgitação (TURCO e DESCOTEAUX, 1992). Inicialmente, os parasitos invadem células dendríticas dérmicas e macrófagos residentes, os quais juntamente com a ação de inúmeras substâncias liberadas durante a picada, induzem o rápido recrutamento de neutrófilos, macrófagos e monócitos para o sítio de infecção. No entanto, outras células, como células de Langerhans e fibroblastos, também podem ser infectadas (PETERS et al., 2008). Esta primeira etapa de interação entre parasito e célula hospedeira envolve o reconhecimento das mesmas pelo parasito, a adesão na membrana plasmática das células hospedeiras, seguida por sinalização e invasão (HANDMAN e BULLEN, 2002).

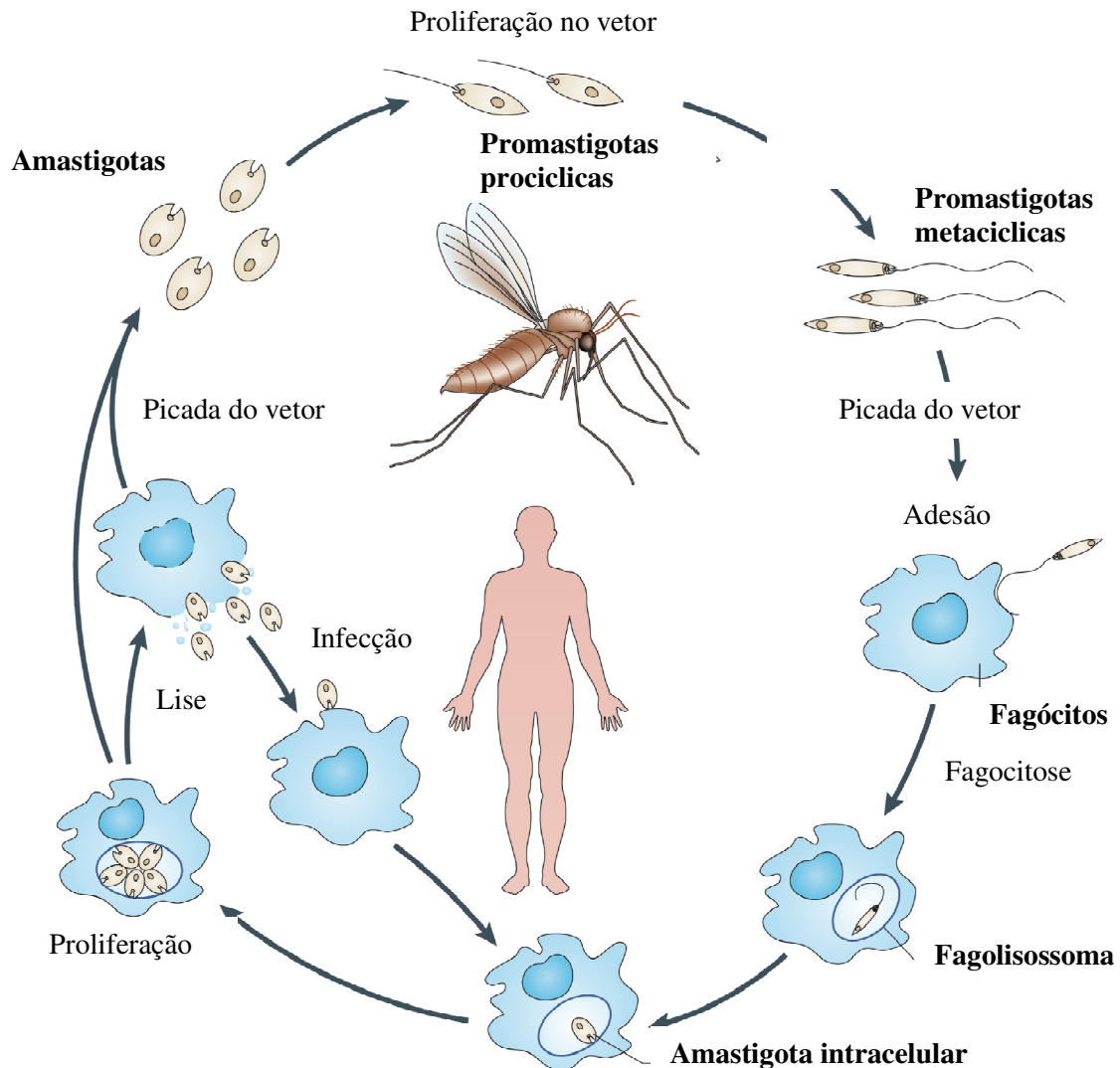
O parasito adere à superfície da célula hospedeira pelo flagelo ou pelo corpo celular, através do reconhecimento por parte da célula hospedeira de moléculas expostas na superfície da *Leishmania*, tais como lipofosfoglicano (LPG) ((TURCO e DESCOTEAUX, 1992) e glicoproteína gp63 (RUSSELL e WILHELM, 1986). Essas moléculas se ligam a diferentes receptores presentes na superfícies de macrófagos, incluindo receptores de complemento (CR1 e CR3), receptores de manose e receptores de fibronectina (SINGH et al., 2012; UENO e WILSON, 2012).

O processo de internalização através da fagocitose se inicia com a formação de pseudópodes e, posteriormente, o parasito é fagocitado e internalizado em um vacúolo parasitóforo. No vacúolo parasitóforo do macrófago, as promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas. Este processo de diferenciação é seguido pela fusão entre o vacúolo parasitóforo e o lisossoma, quando o vacúolo parasitóforo pode ser também denominado de fagolisossomo (PETERS e SACKS, 2006; STUART et al., 2008). Algumas amastigotas se ligam à membrana do vacúolo, enquanto outras permanecem livres no vacúolo e começam a se proliferar. Além disso, no caso da LV, subsequentemente, os parasitos podem se disseminar e infectar células do sistema retículo-endotelial em vários tecidos, predominantemente, infiltram-se no baço, medula óssea, fígado, e linfonodos (VANGRIENSVEN e DIRO, 2012).

Na sequência de uma multiplicação intensa das amastigotas, há a ruptura da membrana plasmática do macrófago infectado, liberando assim as formas amastigotas no tecido. Estas amastigotas podem então invadir outros macrófagos ou serem ingeridas por um novo flebotomíneo fêmea durante o repasto sanguíneo, começando desta forma a infecção do hospedeiro invertebrado. Além das amastigotas, o vetor também pode se infectar através da ingestão de macrófagos infectados (RIBEIRO, 1995). O sangue é digerido no intestino médio do inseto vetor. Neste novo ambiente, as amastigotas são agrupadas em ninhos envolvidos pela matriz peritrófica, cuja função é proteger os aglomerados de *Leishmania* de enzimas digestivas presentes no ambiente intestinal. As amastigotas se transformam em formas replicativas e flageladas denominadas de promastigotas procíclicas. Durante a diferenciação, as formas intermediárias entre amastigotas e promastigotas são as mais susceptíveis à morte por enzimas digestivas. Posteriormente, a porção anterior da matriz peritrófica se rompe, havendo a liberação de parasitos no epitélio do intestino médio do vetor (PIMENTA et al., 1997; SECUNDINO et al., 2005).

As promastigotas procíclicas se dividem, principalmente, por fissão binária. Em sequência, os parasitos aderem à microvilosidades do epitélio do intestino médio, predominantemente, através de LPG presente na região do flagelo (PIMENTA et al., 1992). Quando os parasitos se soltam do epitélio, as promastigotas migram para a válvula estomodeal, localizada no intestino médio anterior, local em que iniciam nova divisão celular (GOSSAGE et al., 2003). As promastigotas também produzem e secretam um gel denominado gel secretado por promastigota (PSG), que atua como tampão de obstrução do intestino médio e faringe (ROGERS et al., 2002; ROGERS, 2012). Durante a produção do PSG, os parasitos iniciam a transformação à promastigotas metacíclicas infectantes. Esse processo de diferenciação é chamado de metaciclogênese. Ocorre então a ruptura da válvula estomodeal, facilitando o refluxo dos parasitos para fagínges do vetor (SCHLEIN et al., 1992). Conseqüentemente, durante as picadas posteriores deste vetor, um baixo número (100-1000) de promastigotas metacíclicas infectantes serão depositadas na pele, infectarão um novo hospedeiro mamífero e iniciarão novamente o ciclo do parasito (PETERS e SACKS, 2006). A **Figura 11** exemplifica o ciclo de vida da *Leishmania*.

Figura 11. O ciclo de vida de *Leishmania*.



Fonte: KAYE e SCOTT, 2011.

3.4 A invasão das células hospedeiras pela *Leishmania* e a resposta imune de mamíferos

As doenças infecciosas podem ser causadas por agentes patogênicos extracelulares ou intracelulares. Como o próprio nome faz menção, os patógenos extracelulares típicos (por exemplo, cepas patogênicas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Pneumococcus* spp.) são capazes de se replicarem do lado de fora das células do hospedeiro. Eles são em grande parte controlados por fagocitose dependente ou não de opsonização (KADIOGLU e ANDREW, 2004), ou seja, por granulócitos neutrófilos e outros fagócitos que, especialmente

na presença de anticorpos ou componentes do sistema complemento, fagocitam e matam o patógeno de forma eficiente através do aumento da expressão e da síntese de moléculas constitutivamente efetoras, tais como peptídeos antimicrobianos, proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOGDAN, 2004). Os linfócitos T auxiliares dão suporte a função de neutrófilos e macrófagos por estimulação de células B, as quais são responsáveis pela produção de anticorpos contra determinados antígenos (WANG et al. , 2006) .

Patógenos intracelulares, em contraste, geralmente vivem e se replicam dentro de compartimentos endossomais ou no citosol de células hospedeiras diferentes, tais como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos ou células epiteliais. Exemplos desses tipos de agentes patogênicos incluem não só os vírus, mas muitas bactérias (por exemplo, *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.), bem como certos protozoários (por exemplo, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*) e fungos (como *Histoplasma capsulatum*). O controle intracelular de protozoários geralmente requer ativação dos macrófagos dependente da produção de Interferon-gama (IFN- γ) por células T CD4⁺ e/ou fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Isto leva a um aumento pós-transcricional da expressão de moléculas efetoras antimicrobianas, gerando a acidificação dos fagolisossomos e a expressão da sintase de óxido nítrico 2 (NOS2) (BOGDAN, 2004; FANG, 2004), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) (MORRISON, 2003), e de GTPases induzidas por interferon (MARTENS e HOWARD , 2006).

Com relação às infecções causadas por *Leishmania* spp., vários determinantes de virulência do parasito foram identificados experimentalmente, os quais podem ajudar o mesmo a evadir o sistema imune do hospedeiro. Estes podem ser classificados em duas categorias principais: determinantes invasivos ou evasivos (por exemplo, LPG, leishmanolisina, ou cisteíno proteases, que são cruciais para a infecção, mas incapaz de produzir patologia no hospedeiro); e determinantes patogênicos (por exemplo, as histonas ou chaperonas), que medeiam a imunopatologia e são as principais causas dos sintomas clínicos (REITHINGER et al., 2007).

Embora estes parasitos possam ser encontrados em neutrófilos, são nas células do sistema mononuclear fagocitário que esses tripanossomatídeos encontram um ambiente mais propício a replicação e sobrevivência a longo prazo, sendo este protozoário amplamente considerado com um fastidioso parasito intracelular obrigatório de macrófagos. Porém,

estudos recentes confirmaram que estes parasitos apresentam um grau maior de abrangência em relação ao tipo de célula hospedeira do que anteriormente se acreditava. A infecção de múltiplos tipos celulares, tanto *in vivo* como *in vitro*, já foram reportadas, incluindo células hematopoiéticas que surgem a partir de um precursor mieloide comum, como células dendríticas, além de célula não hematopoiética assim como fibroblastos (BEATTIE et al., 2010; DE-TREZ et al., 2009).

Os eventos iniciais na interação entre parasito e hospedeiro mamífero irão influenciar o futuro curso da doença. As células T reguladoras naturais (nTregs) Foxp3⁺/CD25^{high} já estão presentes na pele antes da infecção a fim de evitar a geração de resposta imune desnecessária a antígenos infecciosos e não infecciosos, os quais a pele é regularmente exposta, fazendo da pele um local imunológico privilegiado para o estabelecimento do parasito. Os potenciais alvos de regulação por parte das nTregs são os macrófagos, as células dendríticas, as células natural killers (NK) e as células T CD4⁺CD25⁻. As células nTregs apesar de não serem hospedeira para *Leishmania*, são essenciais para manutenção de um estado de fraca resposta pró-inflamatória, a qual pode persistir por algumas semanas, permitindo que o número de parasitos se expanda na ausência de alterações histopatológicas evidentes no sítio de infecção (PETERS e SACKS, 2006; TEIXEIRA et al., 2006).

A composição das populações de células recrutadas na fase inicial da infecção parece ser essencial para definir a progressão da doença. A resposta imune é iniciada no local de entrada do patógeno pelas células sentinela, incluindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos T $\gamma\delta$ (TEIXEIRA et al., 2006). As células dendríticas dérmicas fagocitam estes parasitas, nas primeiras horas de infecção, de forma altamente dinâmica, em um processo que envolve a formação de pseudópodes. Tem sido sugerido que as células dendríticas agem como as principais células apresentadoras de antígenos na leishmaniose (NG et al., 2008; NYLÉN e GAUTAM, 2010). Além delas, macrófagos residentes da derme também são rapidamente infectados no começo da infecção, tornando-se a população celular infectada dominante após 24 horas do início da infecção (PETERS et al., 2008). Essas células apresentam receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores fagocíticos, permitindo a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), absorção de patógenos de partículas opsonizadas. Células sentinelas também expressam vários receptores para citocinas e, em conjunto com células teciduais, produzem numerosas quimiocinas que iniciam uma cascata de respostas imune inatas. Durante este processo, membros da família de quimiocinas têm um papel fundamental

em atrair e estimular subconjuntos específicos de leucócitos para o sítio de infecção (TEIXEIRA et al., 2006). Por exemplo, os fagócitos mononucleares infectados com *Leishmania* no sítio da infecção produzem várias quimiocinas conhecidas por atrair neutrófilos (OGHUMU et al., 2010).

Além de quimiocinas, citocinas liberadas também exercem controle sobre o recrutamento de neutrófilos. Por exemplo, IL-17 pode promover a migração e interferons do tipo I podem inibir o recrutamento dos neutrófilos, mas suas contribuições precisas para a resposta imune imediata ainda não está clara (LOPEZ-KOSTKA et al., 2009; XIN et al., 2010). O próprio parasito também produz uma proteína quimioatraente para neutrófilos, denominada fator quimiotático de *Leishmania* spp. (TEIXEIRA et al., 2006). Além disso, o inseto vetor pode transmitir vírus e bactérias, que também podem modular a resposta inflamatória. Por sua vez, como o número de macrófagos e células dendríticas dérmicas na pele é muito limitado para sustentar a multiplicação do parasito, a progressão da infecção requer o recrutamento de monócitos, sendo este processo ativamente modulado por neutrófilos (CHARMOY et al., 2010; DEPAQUIT et al., 2010; HILLESLAND et al., 2008;).

Juntamente com fagócitos, células *natural killer* (NK) representam a primeira linha de defesa contra patógenos através de dois mecanismos principais: destruição citolítica de células infectadas e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α). Essas células são importantes para controlar a carga parasitária durante as primeiras fases da infecção através de sua habilidade em produzir rapidamente IFN- γ quando entram em contato com promastigotas e LPG, um glicoconjugado de alta expressão na superfície celular de promastigotas de *leishmania*. Além disso, células NK ativadas também promovem a maturação de células dendríticas infectadas com o parasito (NYLÉN e GAUTAM, 2010).

Por outro lado, os monócitos apresentam um papel crítico nas infecções de *Leishmania* spp., visto que se diferenciam em macrófagos, principal célula hospedeira para replicação do parasito. Além disso, os monócitos também podem se diferenciar em células dendríticas, que são cruciais para o condicionamento de uma resposta imune protetora (MOSSER e EDWARDS, 2008).

De forma geral, apesar da notável diversidade de espécies de parasitos, o estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro mamífero, em cada caso, envolve o parasitismo de macrófagos, bem como a persistência e replicação de amastigotas no fagolisossomo dessas células hospedeiras. No caso da LT, *Leishmania* spp. parasita fagócitos

da pele e glândulas linfáticas, já na LV, o parasito tem como alvo células do sistema retículo-endotelial, com infiltração do baço, fígado, glândulas linfáticas e medula óssea causando organomegalias e pancitopenia (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012). Para tanto, um grau considerável de adaptação do parasito ocorreu para permitir que estes protozoários se estabelecessem em células que desempenham um importante papel na resposta imune antimicrobiana celular (PETERS e SACKS, 2006).

Um dos principais desafios que as promastigotas metacíclicas se deparam quando entram no hospedeiro mamífero é justamente estabelecer parasitismo intracelular de longa duração em macrófagos sem ativar as defesas antimicrobianas inatas desta célula de defesa. Em 2003, Laskay e colaboradores sugeriram que os neutrófilos poderiam ser essenciais para que promastigotas pudessem atingir esse objetivo ao observar *in vitro* que neutrófilos contendo promastigotas fagocitadas de *L. major*, tornavam-se apoptóticos e, por sua vez, eram fagocitados por macrófago juntamente com as leishmanias sobreviventes no fagossomo do neutrófilo. Como neutrófilos apoptóticos são fagocitados por via mediadas por receptores que não conseguem desencadear resposta de defesa em macrófagos (RAVICHANDRAN e LORENZ, 2007), as promastigotas via neutrófilos apoptóticos conseguem chegar no fagossoma do macrófago de forma eficiente e segura (LASKAY et al., 2003).

No entanto, outro estudo, utilizando imagem *in situ*, observou que os neutrófilos mais infectados, que fagocitam rapidamente promastigotas no sítio de infecção, são de curta duração e liberam os parasitos antes de serem ativamente fagocitados por macrófagos (PETERS et al., 2008). Na verdade, o mesmo estudo mostrou que o número de parasito em macrófagos e células dendríticas de camundongos permanecia inalterado após a depleção dos neutrófilos, o que sugere que os neutrófilos podem apenas fagocitar os parasitos, que são de outro modo ignorados. Apesar de neutrófilos participarem claramente na resposta inicial à infecção, o seu papel como um carreador de promastigotas para dentro de células fagocíticas mononucleares ainda deve ser confirmado diretamente *in vivo* (KAYE e SCOTT, 2011).

Leishmania spp. é um patógeno que invade silenciosamente o sistema imune do hospedeiro mamífero. Como parasitos do gênero *Leishmania* habitam um nicho intracelular, não é surpreendente o fato deles terem desenvolvido vários mecanismos para atenuar e subverter os sinais da infecção que a célula hospedeira lança para o meio externo (KAYE e SCOTT, 2011; SINGH et al., 2012). Além disso, os antígenos de *Leishmania* spp. modulam várias vias de transdução de sinais como a sinalização da proteína quinase C (PKC) e da

proteína quinase ativada por mitrógenos (MAPK), além de interferirem na geração de EROs, expressão de molécula de histocompatibilidade (MHC) de classe II e produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (OLIVER et al., 2005; KAYE e SCOTT, 2011).

Os macrófagos possuem mecanismos de defesa preliminares, incluindo ativação de metabolismo oxidativo e síntese e liberação metabólitos do ácido araquidônico. A principal fonte de EROs em macrófagos é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que é um enzima multimérica com duas subunidades ligada à membrana do fagolisossomo (gp91phox e p22phox) e pelo menos quatro proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox, rac1/rac2). Os últimos são translocados para a membrana do fagolisossomo quando há estímulos específicos para ativação da NADPH oxidase. Uma vez ativada, esta oxidase transfere um electron a partir de NADPH para oxigênio molecular, produzindo ânio superóxido (O_2^-) dentro do fagolisossomo. O ânion superóxido por si possui notória atividade antimicrobiana atuando via estresse oxidativo, além de ter a capacidade de formar outros EROs (PETERS e SACKS, 2006).

Assim, um dos mecanismos de evasão da *Leishmania* spp. à resposta antimicrobiana desencadeada por macrófagos é a inibição de vias de sinalização que ativam NADPH oxidase, facilitando, desta forma, o estabelecimento da infecção. Relatos na literatura sugerem que esses parasitos inibem a ativação de macrófagos pela PKC. A PKC media um grande número de funções associadas à ativação de macrófagos, incluindo a fosforilação de vários sítios da p47phox. A inibição da fosforilação de proteínas mediada por PKC, com consequente supressão da produção de EROs é ocasionada pelo LPG. Durante a fagocitose de promastigotas, LPG é transferido do parasito para porção interna da membrana do vacúolo parasitóforo, podendo desta forma agir como um inibidor competitivo do diacilglicerol, um ativador natural de PKC, além de alterar as propriedades físicas da bicamada da membrana fagossomal, impedindo desta forma a translocação de PKC na membrana. Além disto, a inserção de LPG na membrana fagossomal pode inibir, similarmente, a translocação dos componentes citosólicos de NADPH oxidase (PETERS e SACKS, 2006; VAN-ASSCHE et al., 2011).

LPG presente na superfície celular de promastigotas possui a capacidade de inibir a maturação normal do fagossoma, um efeito que pode ser crítico para estabilizar um ambiente imune privilegiado dentro do macrófago (LODGE e DESCONTEAUX, 2005). Ao contrário de outros patógenos intracelulares, como *T. gondii*, que inibe a acidificação do vacúolo

parasitóforo; ou do *T. cruzi* que escapa do vacúolo para o citosol, as amastigotas de *Leishmania* spp. não inibem por completo a maturação do vacúolo parasitóforo, já que se replicam em um compartimento acidificado, repleto de enzimas líticas e que expressa marcadores de endossomo tardio, como por exemplo o receptor de manose-6-fosfato, a glicoproteína de membrana lisossomal 1 e Rab 7 (PETERS e SACKS, 2006).

No entanto, unidades repetidas de LPG inibem de forma transiente a maturação do fagossomo e este atraso pode ser necessário para que haja tempo suficiente para a diferenciação de promastigotas metacíclicas a amastigotas, que são mais resistentes a hidrolases. Vários mecanismos foram propostos para explicar como LPG exerce esse efeito na biogênese do fagolisossomo. Unidades repetidas de LPG aumentam o acúmulo perifagossomal de actina F e, por conseqüência, diminui o recrutamento de PKC ativada para o fagossomo. O aumento do volume normal de actina F pode resultar numa barreira física, que impede a interação normal entre o endossomo e o lisossomo. O LPG também altera diretamente a formação de microdomínios lipídicos do fagossomo e/ou desorganiza essas estruturas após a fagocitose de promastigotas. Como várias proteínas envolvidas na fusão das membranas de endossomo e lisossomo, bem como NADPH oxidase e várias isoenzimas de PKC estão presentes na bicamada lipídica do vacúolo parasitóforo e, portanto, a alteração nos microdomínios lipídicos do fagossomo pode explicar múltiplos efeitos que o parasito tem sobre a função normal de macrófagos (PETERS e SACKS, 2006; VILHARDT e VAN-DEURS, 2004).

É importante mencionar que promastigotas do complexo *L. mexicana* e de *L. amazonensis* não afetam a biogênese do fagossomo em macrófago infectados, porém seu mecanismo de resistência consiste em formar enormes vacúolos parasitóforos que abrigam muitas amastigotas, quando comparado ao fagossomo estreito de macrófagos infectados com espécies como *L. major* e *L. donovani*. O aumento do tamanho do vacúolo dilui a concentração de hidrolases luminiais. Tem sido sugerido que promastigotas de *L. mexicana* ocasionam a superexpressão de Rab5, uma guanosina trifosfatase capaz de restringir a fusão completa entre endossomo e lisossomo, gerando assim o aumento de tamanho do fagossomo e a redução da atividade leishmanicida de hidrolases dos macrófagos (COURRET et al., 2002; PETERS e SACKS, 2006).

Amastigotas estabelecem resistência às condições hostis encontradas dentro de um compartimento endocítico tardio e assim são bem adaptadas a resistirem ao pH baixo e

presença de hidrolases ácidas. Amastigotas são organismos acidófilos e expressam em sua membrana plasmática bombas de próton envolvidas com a captura de metabólitos, bem como transportadores de metabólitos estágio específico com atividade otimizada em pH ótimo ácido. O LPG está ausente ou é pouco expresso em amastigotas, portanto, sua resistência a proteases endocíticas é devido, ao menos em parte, a síntese de uma classe de moléculas de fosfoglicanos secretados, incluído os proteofosfoglicanos (PPG) e as fosfatases ácidas. Uma grande quantidade destes fosfoglicanos secretados, em virtude da sua carga negativa, podem proteger as amastigotas por formarem uma barreira transiente contra hidrolases ácidas, agindo de forma análoga a capacidade da mucina, que apresenta similaridade estrutural a PPG, em proteger células epiteliais intestinais (PETERS e SACKS, 2006).

Uma vez estabelecida a replicação de amastigotas dentro do fagolisossomo, o parasito continua a manipular as funções dos macrófagos associadas com apresentação de antígenos e o desenvolvimento de resposta do tipo Th1. A redução da apresentação de antígenos, independente de serem do parasito, por macrófagos infectados com leishmania tem sido um achado comum (PETERS e SACKS, 2006). Um intrigante mecanismo para explicar a possibilidade da limitação no número de MHC de classe II na superfície de células infectadas foi proposto por Antoine e colaboradores (1991) ao observarem que moléculas de MHC de classe II estavam preferencialmente localizadas na membrana do vacúolo parasitóforo, em especial, nos locais de fixação das amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Além disso, estes parasito também apresentavam a capacidade de internalizar e degradar as moléculas de MHC de classe II (PETERS e SACKS, 2006). Já Chakraborty e colaboradores (2005) também confirmaram a redução de complexos de MCH e antígeno na superfície de macrófagos infectados com *L. donovani*, possivelmente devido ao aumento da fluidez da membrana da célula hospedeira.

Portanto, na fase inicial da infecção, a capacidade das espécies de *Leishmania* para invadir e sobreviver dentro de macrófagos do hospedeiro depende da interação entre células hospedeira e parasito. Neste sentido, sabe-se que receptores de reconhecimento padrão (PRRs) desempenham um papel importante no reconhecimento de componentes microbianos e/ou relacionados a danos celulares, os quais desencadeiam a indução de uma resposta imune inata eficaz através do reconhecimento destes sinais. Esta família de receptores inclui vários membros, entre eles os TLRs. Os TLRs são componentes da imunidade inata, que possuem como ligantes moléculas com PAMPs. Esses padrões patogênicos específicos são

extremamente conservados e estão presentes em antígenos de microrganismos potencialmente patogênicos (JANSSENS e BEYAERT, 2003).

Os TLRs são reguladores essenciais da resposta imune inata a vários patógenos, estando envolvidos em uma variedade de fenômenos que incluem fagocitose, maturação e atividade microbicida de fagossoma através da indução da expressão de NOS2 e produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, contribuindo tanto para resposta celular como para humoral. Desta forma, a sinalização TLR ativa funções efetoras de macrófagos que podem resultar em resposta Th1 ou Th2, dependendo da natureza das moléculas patogênicas a ser identificada. A via de sinalização de TLR ocorre por meio de vias dependentes e independentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), que podem induzir ativação de MAPK, tanto a MAPK-p38, como da quinase relacionada a sinalização extracelular (ERK) e, subsequentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (SINGH et al., 2012).

Embora a sinalização de TLR dependentes de MyD88 tenha sido referida como sendo importante para reconhecimento do parasito, as espécies de *Leishmania* são conhecidas por induzirem mecanismos de silenciamento imunológico em macrófagos quando reconhecidas por esse tipo de receptores durante a infecção (DEBUS et al., 2003; XIN et al., 2008; SHIO et al., 2012). Tem sido proposto que vários antígenos de *Leishmania* spp., como os de superfície, produtos excretados ou secretados, DNA e RNA, são capazes de alterar a via de sinalização de TLRs (BIRNBAUM e CRAFT, 2011). *Leishmania* spp. seletivamente regulam a sinalização das MAPKs: induzem o aumento da expressão da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1/2, resultando na supressão de NOS2 através da produção de interleucina (IL)-10; e geram a diminuição da expressão de MAPK-p38 e, conseqüentemente, há a supressão da produção de IFN- γ e sequencialmente de NOS2 (MATHUR et al., 2004). No entanto, os mecanismos dessa regulação via interação entre TLRs e antígenos de *Leishmania* spp. são ainda desconhecidos (SRIVASTAVA et al., 2012).

Além de TLRs, outros PRRs, como por exemplo os receptores do tipo Nod (NLR), também desempenham um importante papel na resposta imune inata como sensores de patógenos e dano celular (CHEN et al., 2009). Todos os membros TLRs e os membros NOD1 e NOD2 dos receptores do tipo NOD (NLR) são conhecidamente capazes de ativar o fator de transcrição NF-kB, induzindo a ativação de diversos genes inflamatórios (HAYDEN et al., 2006).

Alguns membros dos NLRs (como NLRPs, NAIP, NLRC4) regulam a formação de inflamassoma, um complexo multimérico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) (MARTINON et al., 2009). Desta forma, os inflamassomas exercem sua atividade inflamatória especialmente a partir da ativação da protease caspase-1 (que processa e ativa IL-1 β e IL-18 imaturas) e indução da morte celular inflamatória denominada piroptose (FINK e COOKSON, 2005; MARIATHASAN et al., 2004; MARTINON et al., 2002). No caso da leishmaniose, foi descrito recentemente que a formação do inflamassoma é regulado pela ativação de NLRP3, que gera a ativação de macrófagos, culminando na restrição da replicação intracelular das amastigotas. Esse tipo de inflamassoma forma uma plataforma molecular contendo a proteína adaptadora ASC, que por sua vez está envolvida em processos de regulação da ação de IFN- γ e ativação de caspase-1 (com conseqüente secreção de IL-1 β e IL-18), o que facilita a expressão de NOS2 e conseqüente diminuição da replicação de amastigota em macrófagos mediada por NO (LIMA-JÚNIOR et al., 2013; MUKBEL et al., 2007).

Na leishmaniose, o resultado da infecção depende basicamente do equilíbrio entre as respostas imunes Th1/Th2. Geralmente, a patogênese da doença é caracterizada por um misto entre Th1/Th2, porém o equilíbrio é desviado para a resposta Th2. A resistência à infecção está associada com a expansão de um subconjunto de células T CD4⁺ que expressam um fenótipo de tipo Th1 e produzem IL-2 e IFN- γ (PETERS e SACKS, 2006). A resposta Th1 gera a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-12) por macrófagos. A indução de IL-12 por células apresentadoras de antígenos e de IFN- γ por célula T tem sido considerada essencial para controlar o progresso da doença (SINGH et al., 2012). Outras células também produzem citocinas pró-inflamatórias durante a infecção, tais como células dendríticas, que produzem IL-12, e NK produtoras de IFN- γ (TEIXEIRA et al., 2006). IFN- γ ativa macrófagos a produzirem NO (CHAN et al., 2012). O TNF- α e a IL-1 β , produzidos por neutrófilos e macrófagos ativados, estão relacionados com a indução da síntese de quimiocina em vários tipos de células, incluindo polimorfonucleares, fibroblastos e células endoteliais e epiteliais. Há relatos que TNF- α e IL-1 β , conjuntamente com a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1A (também conhecida como CCL3), regulam o transporte de *Leishmania* spp. mediado por células de Langerhans, do local do sítio de infecção na pele até os nódulos linfáticos regionais em modelo murino de leishmaniose cutânea. IL-12 também é necessária para indução de quimiocinas relacionadas com a resposta Th1 tais como CXCL1, CXCL10 e

proteína quimiotática de monócitos 1 (também conhecido como CCL2 ou MCP-1) em linfonodos de camundongos resistentes à infecção com *L. major* (TEIXEIRA et al., 2006).

Em contraste, a susceptibilidade à infecção progressiva está associada com a expansão de um subconjunto de células T CD4⁺ que expressam um fenótipo Th2, caracterizada por produzirem de forma precoce e sustentada a IL-4 (PETERS e SACKS, 2006). Essa resposta conduz a produção de IL-10 por macrófagos. Essas citocinas são as grandes responsáveis por uma maior severidade no quadro clínico da doença (SINGH et al., 2012). No entanto, até o momento, a razão pela qual essas citocinas promovem a patogênese da infecção por *Leishmania* spp. ainda está parcialmente compreendida (GUIMARÃES et al., 2006; ALEXANDER e MCFARLANE, 2008). Sabe-se que o desvio em favor a resposta Th2 por parte do parasito irá ocorrer em detrimento do desenvolvimento da resposta Th1. Além disso, as citocinas Th2 irão efetivamente promover o crescimento intracelular do parasito (PETERS e SACKS, 2006).

Os macrófagos podem ser polarizados pelo microambiente para assim apresentar funções específicas, formando um grupo de células heterogêneas. Os macrófagos são células do sistema imunitário inato, que desempenham um imprescindível papel na resposta primária a agentes patogênicos, mas também tem um papel importante na resolução da inflamação e homeostase do tecido (STEMPIN et al., 2010). Desta forma, quando estimulado por IFN- γ , os macrófagos se diferenciam no fenótipo denominado classicamente ativado ou M1, com expressão de NOS2, que produz NO a partir da arginina. Sabe-se que NOS2 é necessário para o controle de *L. major* em macrófagos ativados por citocinas durante a fase aguda da infecção e na ausência de NOS2 há um aumento significativo da carga parasitária em células estimulada por citocinas Th1 (BLOS et al., 2003). Desta forma, parasitos intracelulares de *Leishmania* spp. são normalmente eliminados por esta subpopulação de macrófagos.

Ao contrário, a estimulação com IL-4 faz com que o macrófago se diferencie no fenótipo alternativamente ativado, também conhecido como M2, que promove a imunidade humoral e reparação tecidual. Esta subpopulação produz IL-10, fator transformante do crescimento beta (TGF- β) (KEDZIERSKI et al., 2009).

Em termos de sinalização, a IL-4 induz a expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) e co-ativador 1 de PPAR- γ (PGC-1), através da proteína β de STAT-6 (CHAWLA, 2010). Este regulador nuclear polariza monócitos a macrófagos M2 com propriedades anti-inflamatórias, que expressam arginase (GALLARDO-SOLER et al.,

2008; RIOS et al., 2008). A arginase catalisa a hidrólise de L-arginase, convertendo este aminoácido à uréia e L-ornitina. Este último é usado por *Leishmania* spp. para gerar poliaminas, que são essenciais para sua proliferação (KROPF et al., 2005). Além da arginase, macrófagos do tipo M2 também expressam CD36, um receptor que medeia a fagocitose e facilita a remoção de células apoptóticas, bem como, bloqueia a expressão de mediadores pró-inflamatórios como NOS2 e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (CHAN et al., 2012).

Além disso, *Leishmania* spp. apresentam em sua superfície fosfatidilserina, uma das principais moléculas de superfície expressa quando a célula do hospedeiro mamífero está em apoptose. A exposição de fosfatidilserina (PS) é fundamental para fagocitose não-inflamatória de células apoptóticas e o reconhecimento deste fosfolípido por macrófagos induz a expressão de receptores ativados por PPAR (EL-KEBIR e FILEP, 2010; NYLÉN e GAUTAM, 2010; WANDERLEY et al., 2006) e, conseqüentemente, os macrófagos parasitados seriam mais susceptíveis a expressar um fenótipo M2. Por sua vez, PPAR aumenta a expressão de CD36, facilitando ainda mais a infecção de macrófago de tipo M2 com neutrófilos apoptóticos infectados com *Leishmania* spp. (VAN-ZANDBERGEN et al., 2006; PETERS et al., 2008). Além disto, as funções do fagócitos também são suprimidas de maneira dependente de TGF-β, IL-10 e pela inibição da produção de NO após o reconhecimento de PS na superfície de *Leishmania* spp. ou de neutrófilos apoptóticos infectados com o parasito (NYLÉN e GAUTAM, 2010; PETERS e SACKS, 2006).

A IL-10 é uma citocina intimamente ligada à progressão da leishmaniose murina e humana. Alguns estudos clínicos e experimentais indicam que o desenvolvimento da doença não está relacionado de forma tão singela como se pensava anteriormente com a polarização Th2 ou simplesmente com um defeito na resposta Th1 em si, mas com a expressão concomitante de IL-10 durante a resposta Th1, que torna os macrófagos pouco responsivos aos sinais de ativação. A principal função da IL-10 é limitar a magnitude de uma resposta imune através da regulação negativa da função de células apresentadoras de antígenos, bloqueio da secreção de citocina e quimiocina e inibição da indução de atividade iniciada por outras citocinas para ativação de macrófagos, notmalmente, IFN-γ (NYLÉN e GAUTAM, 2010; PETERS e SACKS, 2006).

No sítio de infecção da LT, quando altos níveis de IFN-γ e outras citocinas inflamatórias, tais como TNF-α, são liberadas, o dano tecidual ameaça para a manutenção da

barreira da pele. Desta forma, células T reguladoras do tipo 1 (Tr1) CD25⁺Foxp3⁻ produtora de IL-10 são geradas durante o curso normal desta resposta Th1 para regular a função de macrófagos e células dendríticas, evitando assim a imunopatologia severa da doença. Para algumas cepas de *Leishmania* spp., as células Tr1 produtoras de IL-10 evitam a eliminação eficaz do parasito, de tal forma que uma alta carga parasitária e um forte estímulo inflamatório são mantidos simultaneamente e as lesões não se resolvem. À medida que a carga parasitária e de antígeno é reduzida, há também uma diminuição gradual da geração de ambos IL-10 e IFN- γ . As células Tr1 continuam a desempenhar seu papel na regulação da resposta imune exacerbada na pele, porém, como estão enriquecidas com antígeno de *Leishmania* spp., são capazes de regular de forma mais eficiente a resposta efetora específica contra o parasito. Estas células funcionam em equilíbrio dinâmico com as células efetoras para manter a persistência a longo prazo de um baixo número de parasitos na pele (PETERS e SACKS, 2006). A imunidade de longa duração contra a reinfecção é mantida, quando ocorre a eliminação completa de parasitos e antígenos, porém enquanto houver a persistência de *Leishmania*, há um risco substancial de reativação da doença em hospedeiros imunocomprometidos (SCOTT et al., 2004).

Muito conhecimento foi adquirido sobre a imunopatogênese da LV. Como os parasitos multiplicam-se no interior do baço, fígado e macrófagos da medula óssea, os agentes patogênicos induzem forte ativação do sistema fagocitário mononuclear do paciente. Altos níveis de IFN- γ e TNF- α são também detectados e estas citocinas podem controlar a proliferação do parasita durante as fases iniciais. Tem sido sugerido que os principais fatores de risco para óbito em LV estão relacionadas ao fato de que a alta produção sistêmica de tais citocinas pró-inflamatórias compromete muitos os órgãos. No entanto, apesar do sistema imune estar altamente ativado, os pacientes exibem imunossupressão de anticorpos para antígenos específicos *Leishmania* spp. (GOTO e PRIANTI, 2009). Além disso, a ação de IL-10 e TGF- β em macrófagos do baço e do fígado induz a proliferação de parasitos e, portanto, estas citocinas podem ser caracterizadas como provenientes de uma resposta imune regulatória (GAMA et al., 2004; SILVAEIRA et al., 2010a; SILVEIRA et al., 2010b).

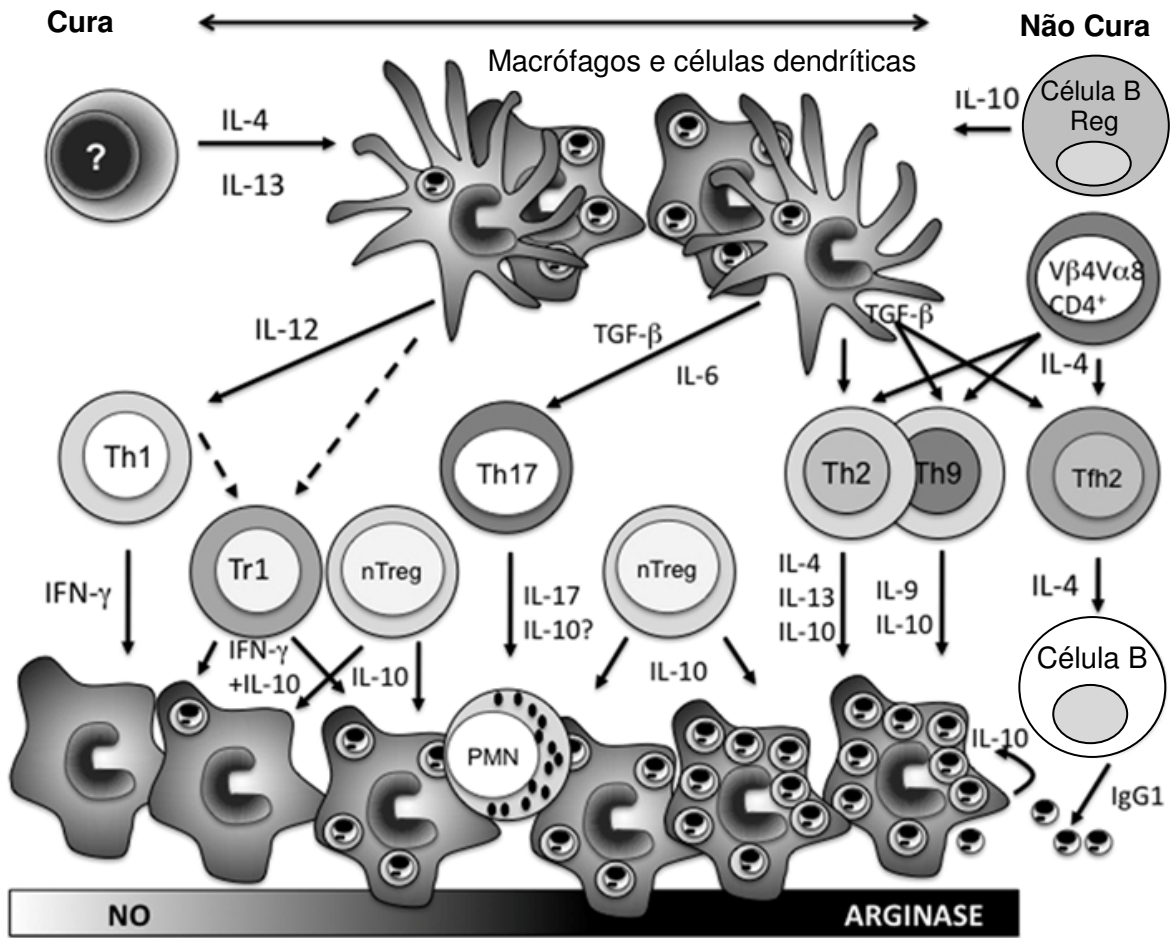
Na LV, o controle de infecção também depende que macrófagos sejam ativados por uma resposta do tipo Th1. Na verdade, quando há o desenvolvimento da doença, é observado um misto de resposta Th1/Th2. Níveis elevados de células T reguladoras contribuem para a imunossupressão pronunciada durante VL. Após um tratamento bem sucedido, o aumento da

produção de citocinas Th1 e a diminuição de a IL -10 são detectados. Posteriormente, após a cura de LV, a aparente imunidade é reestabelecida (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Além do paradoxo Th1/Th2, na leishmaniose experimental, células Th17 (células pró-inflamatórias T auxiliares caracterizada por a sua capacidade de secretar IL-17) têm sido associadas com a destruição de tecidos. Camundongos BALB/c deficientes para IL-17 desenvolvem lesões menores devido ao menor acúmulo de CXCL2 e de neutrófilos nas lesões em comparação com o tipo selvagem, enquanto que níveis elevados de IL - 17 não confere nenhuma redução na carga de parasitária (LOPEZ-KOSTKA et al., 2009). Curiosamente, um estudo recente associou a produção de IL-17 e IL-22 (uma citocina pró-inflamatória, produzido por células Th17 e NK) com a proteção contra leishmaniose visceral humana causada por *L. donovani*. Além disso, foi mostrado que *L. donovani* estimula a produção de células produtoras de IL-17 e IL-22 , bem como de IFN- γ por células T humanas (PITTA et al., 2009).

A cronicidade das infecções de *Leishmania* spp. indica que a indução da imunidade adaptativa é evitada, retardada ou suprimida. Não está claro ainda se células dendrítica ou macrófagos são capazes de transportar parasitos do local inicial da infecção para os linfonodos drenates, local em que a resposta imune adquirida é iniciada. Porém, com a expansão do número de amastigotas, sua fagocitose por células dendríticas se torna também mais freqüentes. As células dendríticas adquirem uma quantidade crescente de antígenos e sinalizam através de seus TLRs para ativarem células CD8⁺ e CD4⁺ em linfonodos drenantes. No entanto, apesar da migração destas células, o processamento de antígenos e a produção de citocinas podem estar ainda prejudicados. (PETERS e SACKS, 2006; KAYE e SCOTT, 2011). A **Figura 12** demonstra os principais eventos imunológicos envolvidos na imunopatogênese da leishmaniose.

Figura 12. Imunopatogênese da leishmaniose.



Fonte: ALEXANDER e BROMBACHER, 2012.

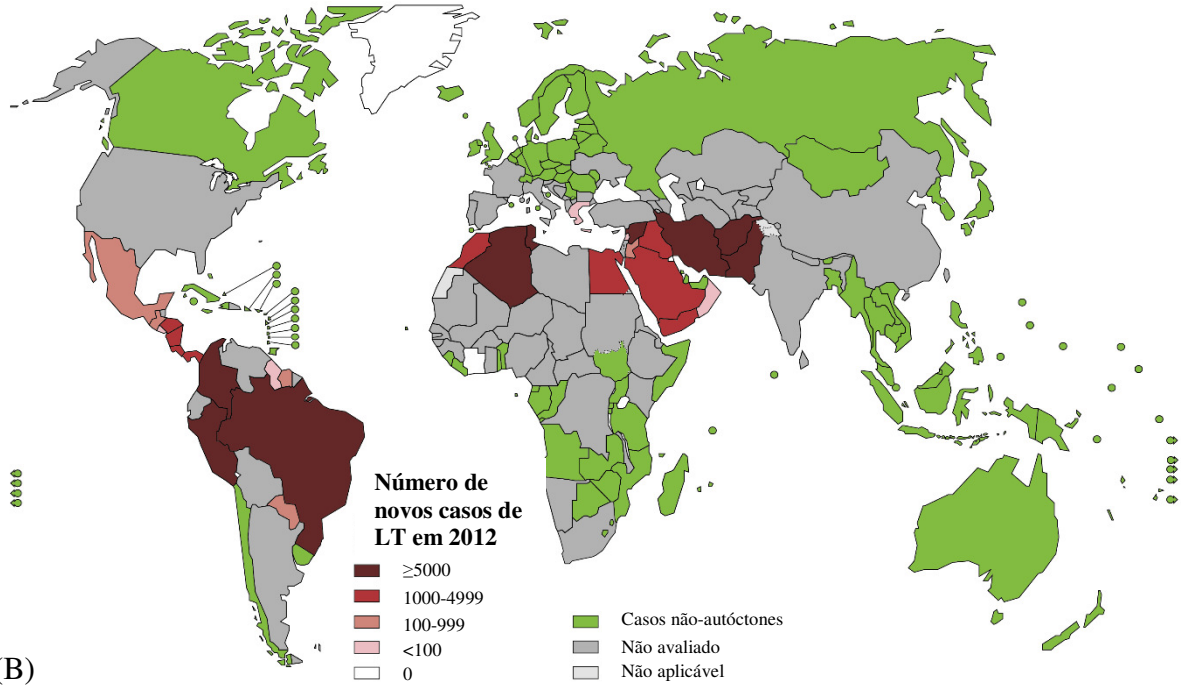
Há de fato uma grande complexidade na resposta do hospedeiro a esses patógeno. Porém, é importante destacar os perigos potenciais que estão associados com o desenvolvimento de apenas um modelo experimental simples para a leishmaniose. Ainda permanece parcialmente desconhecido até que ponto essa complexidade da resposta imune do hospedeiro para estes protozoários deriva de aspectos intrínsecos dos parasitos em si, de diferenças da resposta celular do hospedeiro humano versus murino ou de sutilezas no desenho experimental. No entanto, a compreensão da diversidade existente nas interações parasito-hospedeiro em modelos experimentais em animais e, finalmente, em humanos, deve ajudar a determinar se novas ferramentas de controle da leishmaniose e se elas devem ser verdadeiramente de amplo espectro ou se vão exigir adaptações específicas para cada forma da doença (KAYE e SCOTT, 2011).

3.5 Epidemiologia e diagnóstico das leishmanioses

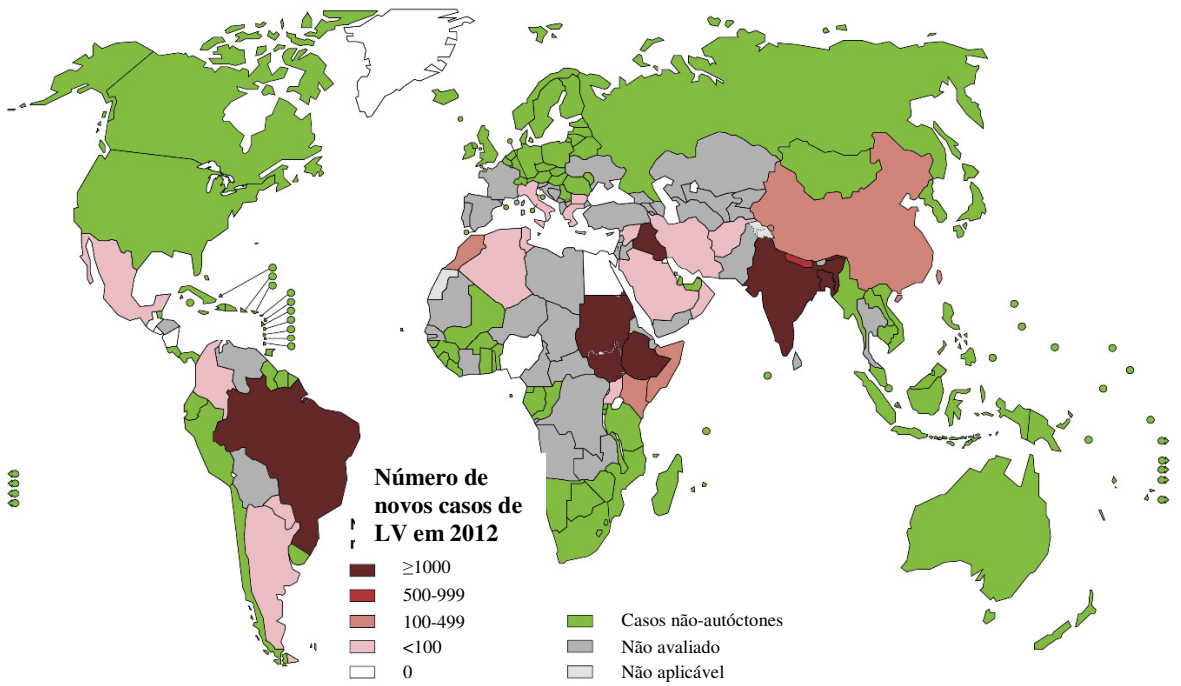
As leishmanioses estão entre as mais significantes doenças tropicais negligenciadas e tem sido considerada como grave problema de saúde pública classificada na categoria I (sem controle) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BOELAERT et al., 2004). As infecções de *Leishmania* spp. são endêmicas em 98 países de regiões temperadas e tropicais com 310 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco para o desenvolvimento de uma das muitas formas da doença. A estimativa de prevalência anual global de todas as formas de leishmaniose é de quase 12 milhões, apresentando mais de 20mil mortes anuais (OMS, 2015). Cerca de 58 mil casos de leishmaniose visceral e 220 mil casos cutâneos são relatados oficialmente a cada ano. No entanto acredita-se que apenas cerca de dois terços dos países realmente reportem dados de incidência, sendo a notificação da doença mais escassa na África. Com base em avaliações de sub-notificação, a incidência global anual estimada para a forma visceral da doença é de cerca de 200mil-400mil novos casos e para LT é de aproximadamente 0,71 -1,2 milhões (ALVAR et al., 2012; CROFT et al., 2006). A **Figura 13** mostra a distribuição geográfica da LT e LV, segundo dados da OMS.

Figura 13. Distribuição geográfica das leishmanioses em 2012. (A) LT. (B) LV.

(A)



(B)



Fonte: OMS, 2015.

No período de 2009-2013, foram registrados no Brasil 115.164 casos de LT e 18.560 de LV. O maior número de casos está concentrado na região Norte (39,7% dos casos registrados no país) e Nordeste (34,9% dos casos registrados no país) para LTA, apresentando 39,7% e 34,9% dos casos registrados no país durante este mesmo período, respectivamente. Já com relação à LV, a região Nordeste é a que apresenta maior percentual de casos notificados no Brasil (50,8%) (DATASUS, 2015). O país é responsável por 90 % dos casos notificados nas Américas e é o terceiro maior foco de LV global. No Brasil, a LV é uma doença que exige a notificação compulsória, cujos medicamentos para o tratamento são fornecidos exclusivamente pelo governo e são liberados somente depois do relato do caso para o Sistema Brasileiro de Informações Reportável de Doenças (ARAÚJO et al., 2013; BELO et al., 2013).

Como pacientes com leishmaniose não tratados são reservatório dos parasitos e, portanto, contribuem para a transmissão da doença, o diagnóstico precoce e tratamento são considerados um componente essencial no controle da doença (CHAPPUIS et al., 2007). O diagnóstico parasitológico, utilizando como amostras a biopsia da lesão tegumentar ou o aspirado de medula óssea, constitui o padrão-ouro para o diagnóstico da LT e LV, respectivamente (GOTO e LINDOSO, 2012; SRIVASTAVA et al., 2011). Para o diagnóstico etiológico, as alternativas incluem abordagens moleculares para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. através de métodos baseados no PCR, que pode detectar o gênero *Leishmania* para confirmar a leishmaniose (como acontece com outros métodos parasitológicos) ou identificar as espécies de *Leishmania* (GOTO e LINDOSO, 2012). Embora tenha havido aumento substancial na aplicação de diagnóstico molecular no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*, sua utilização generalizada ainda é dificultado pela exigência de infra-estrutura laboratorial substancial e domínio de conhecimentos técnicos, estando limitado a laboratórios de referência bem estabelecidos (REITHINGER et al., 2007).

Até o momento também não há vacinas disponíveis ou fármacos profiláticos para doença em humanos. Além disso, a ausência de uma candidata à vacina humana como profilática promissora, juntamente com a escassez de estudos de vacinas humanas, indica que uma vacina humana eficaz e rentável seja improvável em um futuro próximo (GOTO e LINDOSO, 2012; STOCKDALE e NEWTON, 2013).

As outras medidas de controle e prevenção da doença consistem em evitar o contato entre homem e o inseto vetor (MAGILL, 2005; SHARMA e SINGH, 2008), além da

eliminação dos reservatórios.

Os cães são o principal reservatório de *L. infantum chagasi* em LV antroponótica. Apesar das evidências obtidas em estudos experimentais mostrarem diminuição da incidência da LV em cães e crianças após triagem sorológica de cães e sacrifício de animais soropositivos, a eficiência e aceitabilidade desta estratégia de controle é cada vez mais debatida (ALVAR et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007).

Tratar cães infectados não é uma estratégia de controle eficaz, visto que os animais apresentam recaídas frequentes e as leishmanias podem recuperar a infectividade semanas após o tratamento, apesar do animal ser considerado clinicamente curado. Além disso, a utilização generalizada de medicamentos veterinários em LV canina pode conduzir à resistência dos parasitos. A vacinação de cães seria, no entanto, a estratégia mais eficaz. Existiam no mercado duas vacinas anti-*Leishmania* destinadas à vacinação canina, a Leishmune e Leish-Tec, ambas desenvolvidas em centros de pesquisa brasileiros (CHAPPUIS et al., 2007; LAINSON e RANGEL, 2005). No entanto, a Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada no dia 11 de novembro de 2014, proibiu a fabricação da vacina Leishmune. De acordo com o Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários, a suspensão da licença de fabricação da vacina é decorrente do não cumprimento do regulamento técnico para pesquisa e desenvolvimento de produtos conforme regulamenta a normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº31/2007, visto que a vacina não atendeu os requisitos de avaliação de eficácia vacinal feitas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014). Desta forma, apenas a vacina Leish-Tec está disponível para profilaxia contra LV em cães.

3.6 Tratamento das leishmanioses

O objetivo do tratamento consiste em acelerar a cura, reduzir o risco de formação de cicatrizes na LT e prevenir a progressão das leishmanioses (AMEEN, 2010). A terapia medicamentosa para leishmaniose tegumentar não mudou significativamente desde o início do século XX, quando começou. No entanto, o conhecimento sobre a diferença na atividade de fármacos frente a diferentes espécies de *Leishmania* spp. e sua manifestação clínica está aumentando lentamente (GOTO e LINDOSO, 2012).

Tradicionalmente, o tratamento da LV tem contado com o uso de antimônio pentavalente (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzido na década 40 (ALVAR et al., 2006; MURRAY et al., 2005). Os antimoniais pentavalente podem ser administrados por via intravenosa ou intramuscular e são a primeira linha de tratamento da leishmaniose ao longo dos últimos 74 anos, fato que está se modificando lentamente, devido à disponibilidade de opções de tratamento alternativo e surgimento de resistência na Índia ao longo dos últimos 24 anos, com falha do tratamento em até 60% dos casos em certas áreas da Índia, como no Estado de Bihar (ALVAR et al., 2006; CHAPPUIS et al., 2007).

O mecanismo de ação dos antimoniais contra a leishmaniose envolve tanto fatores do hospedeiro como fatores do parasito. Sabe-se que os antimônios trivalentes inibem diretamente a tripanotona reductase do parasito, mas muitos dos detalhes mecanicistas dos antimoniais permanecem obscuros (ASHUTOSH et al., 2007; BAIOTTO et al., 2009). Uma das principais preocupações é a toxicidade acumulativa, particularmente, o desencadeamento de efeitos adversos como arritmia cardíaca e pancreatite aguda. A elevação das enzimas pancreáticas decorrente do tratamento é visto com frequência, mas pancreatite clínica é incomum. Além disso, considerando eletrocardiograma (ECG), leve mudanças (achatamento da onda T ou inversão) são vistas em cerca de 50% dos pacientes. A cardiotoxicidade severa também é incomum, mas potencialmente fatal, ocorrendo em menos de 9% dos casos. A monitorização do ECG deve ser garantida durante o tratamento e atenção especial deve ser dada para aqueles paciente com condições cardíacas pré-existentes. Os efeitos cardíacos são geralmente reversíveis dentro de dias a semanas após a descontinuação do tratamento (VANGRIENSVEN e DIRO, 2012). Pacientes com idade inferior a 2 anos ou superior a 45, com sinais de LV avançada e/ou desnutrição severa, apresentam maior risco de morte durante a terapia antimonial, devido à toxicidade do fármaco, lentidão de ação deste medicamento, bem como às complicações de LV ou uma combinação de todos esses fatores (CHAPPUIS et al., 2007).

A pentamidina é um substituto eficaz para os antimoniais pentavalente e é frequentemente usada com segunda escolha de tratamento após falha do tratamento antimonial. A pentamidina apresenta a mesma eficácia que o tratamento antimonial contra a LV causada por *L. panamensis* ou *L. guyanensis* no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Suriname, mas é menos eficaz para *L. braziliensis* (SEIFERT, 2011; TUON et al., 2008).

Embora o mecanismo preciso de ação ainda não esteja totalmente elucidado, tem sido reportado que este fármaco entra em promastigotas através de transportadores de argina ou de poliamina, acumulando-se, principalmente, na mitocôndria (MUKHERJEE et al., 2005; PORCHEDDU et al., 2012). A pentamidina age sobre o genoma do parasito, dificultando a replicação e transcrição em nível mitocondrial. Estudos biofísicos e de cristalografia demonstram que grupos amidas carregados na pentamidina formam ligações de hidrogênio com O₂ da timina ou com N₃ da adenina, formando complexos na região do sulco menor do DNA. Modificação da morfologia do cinetoplasto e fragmentação de mitocôndrias do parasito também são ocasionadas por este fármaco (MISHRA et al., 2007; SEIFERT, 2011; TUON et al., 2008).

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). Hipoglicemia e hiperglicemia são seus principais efeitos adversos. Outros efeitos colaterais comuns são dor no local da injeção, gosto metálico na boca, dor de cabeça, congestão e dispnéia. Efeitos secundários pouco frequentes incluem febre, parestesias faciais, ardência nos olhos, suor, tontura e fadiga. Os pacientes devem ser monitorados por causa da hipotensão e hipoglicemia (DAVID e CRAFT, 2009).

A anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos que apresenta alta afinidade para o ergosterol, o principal esteroide da membrana celular das *Leishmania* spp., formando canais iônicos não-aquosos (cátion seletivos) e aquosos, o que culmina no aumento da permeabilidade da membrana plasmática e morte do parasito (COHEN, 2010; LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009).

Comercialmente, a anfotericina B é encontrada em quatro formulações diferentes: desoxicolato de anfotericina B (anfotericina B convencional, Fungizon®); anfotericina B lipossomal (Ambisome®); dispersão de colesterol e anfotericina B (Amphocil®); e formulação lipídica de anfotericina B (Abelcet®). Todas elas apresentam uma eficácia semelhante, mas diferem em efeitos colaterais. As formulações comumente utilizadas para o tratamento das leishmanioses são: desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (SEIFERT, 2011). Além disso, a anfotericina B é o único fármaco aprovado pelo os Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América para o tratamento da leishmaniose (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

A partir da década de 80, a anfotericina B convencional foi sendo cada vez mais utilizada em países de alta renda per capita para o tratamento da LV. Atualmente, a anfotericina B convencional substituiu antimoniais pentavalentes como o tratamento de primeira escolha para LV em algumas áreas do Estado de Bihar da Índia, onde a falha terapêutica é alta com o uso de antimoniais pentavalentes. A anfotericina B convencional é uma opção de tratamento eficaz, porém como apresenta elevada toxicidade, há necessidade de hospitalização prolongada. Febre, calafrios e rigor relacionada com a perfusão do medicamento são efeitos colaterais quase universais após o tratamento com anfotericina B convencional. Os efeitos colaterais adversos que ameaçam a vida, como a hipocalemia (baixos níveis de potássio no sangue), nefrotoxicidade e anafilaxia na primeira dose não são incomuns. Além disso, este fármaco é caro e requer um regime complexo (15 infusões lentas em dias alternados) (CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Anfotericina B lipossomal, miltefosina e paromomicina estão gradualmente substituindo antimoniais pentavalentes e anfotericina B convencional como os tratamentos preferenciais em algumas regiões, mas em outras áreas esses fármacos ainda estão sendo avaliados na monoterapia e em combinações terapêuticas (CHAPPUIS et al., 2007).

Diferentes formulações lipídicas de anfotericina B, principalmente anfotericina B lipossomal, foram desenvolvida, combinando alta eficácia desse antifúngico com baixa toxicidade da preparação lipossomal. A anfotericina B lipossomal tem melhor distribuição e maior meia-vida nos tecidos, resultando em menor toxicidade e menos esquemas terapêuticos menos exigente. Esse fármaco é considerado por muitos especialistas como a melhor opção terapêutica existente contra LV, sendo usado como tratamento de primeira escolha na Europa e nos Estados Unidos, e apresenta uso cada vez maior em países de baixa renda per capita. Regimes de tratamento recomendados variam entre as regiões geográficas e a programação de tratamento ideal ainda não foi determinada. Normalmente, uma dose total de 18 a 21 mg/kg de anfotericina B lipossomal tem sido recomendada, com diferentes esquemas terapêuticos sendo usados (BERN et al., 2006; CHAPPUIS et al., 2007).

Em 2007, a anfotericina B lipossomal foi recomendada como primeira linha de tratamento em pacientes com coinfeção entre HIV e *Leishmania* spp., durante uma Reunião Consultiva Informal da OMS. No entanto, nestes pacientes, o risco de falha do tratamento é alto, independente do fármaco usado. Sabe-se atualmente que antimoniais pentavalentes devem ser evitados, uma vez que eles tem sido associados com elevados taxas de

mortalidades destes pacientes. Além disso, a terapia antirretroviral altamente ativa deve ser iniciada para tentar restaurar parcialmente a função imunológica do paciente, mas a sua eficácia em prevenir recaídas é baixa (CHAPPUIS et al., 2007).

Miltefosina, uma hexadecilfosfocolina que foi inicialmente desenvolvida como um fármaco anticâncer, é o primeiro medicamento oral eficaz para LV, fato que constituiu um grande avanço no tratamento da doença. Esse fármaco é o pilar do plano de eliminação da LV recentemente lançado no subcontinente indiano (DAVID e CRAFT, 2009). A maioria dos dados sobre miltefosina são de áreas com LV antroponótica, ou seja, causada pela infecção com *L. donovani*. Em um estudo clínico recente de Fase IV, a taxa de cura final foi de 82% quando se avaliou a intenção de tratamento e de 95% ao realizar a análise de protocolo, com apenas três mortes em 1132 pacientes. Neste estudo, os critérios de toxicidade de eventos adversos comuns de grau 3 foram encontrados em 3% dos pacientes, incluindo a toxicidade gastrointestinal grave e aumento significativos nos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina. Os dados sobre o uso miltefosina no leste da África estão restritos a um estudo que foi realizado no norte da Etiópia, que demonstrou que é tão segura e eficaz quanto estibogluconato de sódio em pacientes HIV-negativos e mais seguro, porém menos eficaz, em pacientes coinfectados com HIV. Além disso, a miltefosina é potencialmente teratogênica e seu uso é, portanto, estritamente proibido em mulheres grávidas ou em mulheres que possam engravidar dentro de dois meses de tratamento, exigindo uma contracepção eficaz até vários meses após o seu uso (CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Miltefosina é licenciada em um número limitado de países, incluindo a Alemanha, Colômbia e Índia. Nesses países, a terapia com este fármaco tem sido cada vez mais explorada, principalmente em regiões de alta endemicidade, com o objetivo de identificar um regime terapêutico curto barato, bem tolerado, com a grande vantagem de pode ser administrada preferencialmente de forma ambulatorial, com exigência de monitorização clínica mínima. O longo tempo de meia-vida (150 horas), o fato da resistência do parasito ser facilmente induzida *in vitro*, combinados com uso irracional da miltefosina observado durante a auto-administração por pacientes, aumentaram a preocupação com o rápido surgimento de resistência ao medicamento em regiões endêmica para doença (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012). A crescente utilização de miltefosina para tratamento da leishmaniose canina na Europa também pode aumentar o desenvolvimento de resistência em *L. infantum chagasi*. Na

Bolívia, miltefosina também pode ser usada para tratar LMC causada por *L. braziliensis* (CHAPPUIS et al., 2007; OMS, 2010).

Paromomicina (anteriormente conhecida como aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo, com boa atividade anti-*Leishmania* e está disponível em formulações parenterais e tópicas (DAVID e CRAFT, 2009). Vários estudos foram realizados em países de baixa e média renda per capita com paromomicina, um fármaco parenteral barato e eficaz, com uma toxicidade aceitável. Esse fármaco pode ser facilmente administrados por injeção intramuscular. Outras vantagens da paromomicina inclui o fato de ser ativa contra uma grande variedade de agentes patogênicos, incluindo bactérias (CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Os resultados de estudos iniciais na Índia e na África foram promissores, mas o fabricante original abandonou a produção do fármaco. Os resultados dos ensaios de Fase III realizados recentemente na Índia mostraram excelente eficácia e segurança. Não foi observada nefrotoxicidade, porém ototoxicidade reversível (lesões no interior ouvido) foi observada em 2% dos pacientes. Além disso, 1,8% dos pacientes apresentaram um aumento significativo (> cinco vezes) de transaminases hepáticas. Dor causada pela injeção leve foi relatado por mais de 50% dos pacientes. É importante mencionar que até o momento não há ensaios clínicos realizados em pacientes infectados com *L. chagasi* (CHAPPUIS et al., 2007; VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

Sitamaquina é uma 8-aminoquinolina cuja eficácia por via oral contra LV foi relatada há mais de 20 anos. Estudos de Fase II foram realizados no Brasil, Quênia e Índia e apresentou taxas de cura que variaram de 27% a 87%, mas também houve vários casos de eventos adversos renais graves. Estudos clínicos de Fase II estão em andamento e os de Fase 3 sendo planejadas na Índia (CHAPPUIS et al., 2007).

A terapia combinada é o caminho sugerido para aumentar a eficácia do tratamento, prevenir o desenvolvimento de resistência a fármacos, reduzir a duração do tratamento e, talvez, diminuir o custo do tratamento, como tem sido verificado no tratamento de doenças como a malária, tuberculose e HIV (VAN-GRIENSVEN et al., 2010). A associação de estibogluconato de sódio e paromomicina foi considerada segura e eficaz em testes preliminares realizados na Índia e na África Oriental, e tem sido usado com sucesso em mais de 4 mil pacientes sudaneses pela Organização Não-Governamental Médicos Sem Fronteiras (CHAPPUIS et al., 2007). A politerapia através da combinação entre anfotericina B

lipossomal (5 mg/kg de dose única), paromomicina e /ou miltefosina também foi altamente eficaz (98% -99%), segura e agora foi incluída nas recomendações da OMS para o tratamento da doença no subcontinente indiano (VAN-GRIENSVEN e DIRO, 2012).

4 ARTIGO I DERIVADO DA TESE

Design, synthesis and *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities of novel semicarbazone derivatives

Marina A. Alves^{1,2}, Aline C. de Queiroz^{1,3}, Magna Suzana Alexandre-Moreira^{1,3}, Javier Varela⁴, Hugo Cerecetto⁴, Mercedes González⁴, Antonio C. Doriguetto^{1,5}, Iara M. Landre^{1,5}, Eliezer J. Barreiro^{1,2}, Lídia M. Lima^{1,2*}.

¹ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCTINOFAR; <http://www.inct-inofar.ccs.ufrj.br/>). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®, <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>), CCS, Cidade Universitária, P.O. Box 68024, ZIP: 21941-971, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ LaFI—Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

⁴ Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, 11400, Uruguay

⁵ Laboratório de Cristalografia, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil.

Abstract:

Trypanosomatids are protozoan parasites that cause various diseases in human, such as leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. The highly syntenic genomes of the trypanosomatid species lead the assumption that they can encode similar proteins, indicating the possibility to design new antitrypanosomatid drugs with dual trypanosomicidal and leishmanicidal activities. In this work a series of compounds (**6a-h** and **7a-h**), containing a semicarbazone scaffold as a peptide mimetic framework, was designed and synthesized. From this series compound **7g** (LASSBio-1483) highlighted, showing dual *in vitro* trypanosomicidal and leishmanicidal activities, with potency similar to the standard drugs nifurtimox and pentamidine. This data, taken together with its good *in silico* druglikeness profile and its great chemical and plasma stability, make LASSBio-1483 (**7g**) a new antitrypanosomatid lead-candidate.

Key-Words: neglected diseases, trypanosomiasis, leishmaniasis, protease, semicarbazone, peptide mimetic

*Address for correspondence: Dr. Lídia Moreira Lima, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco B, sala 14, PO Box 68024, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, ZIP Code: 21941-971 PH/FAX 55-21-39386503. Email: lidia@lassbio.icb.ufrj.br or lmlima23@gmail.com

Introduction:

Neglected diseases (DN) represent a set of parasitic illnesses that primarily affect poor people in developing countries. Those caused by Trypanosomatidae protozoans include Chagas disease and sleeping sickness, produced by *Trypanosoma* species, and leishmaniasis, caused by different species belonging to the genus *Leishmania* [1]. According to World Health Organization (WHO), trypanosomiasis and leishmaniasis are the most challenging among the neglected tropical diseases [2]. A comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa revealed a conserved core proteome of about 6200 genes among *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei* [3]. The highly syntenic genomes of the trypanosomatid species lead to the assumption that they can encode similar proteins and drugs designed against conserved core processes should have the advantage of being potentially useful against all three protozoa. Among the possible drug targets in trypanosomatids, the peptidases or proteases have concerned attention due to their many roles in highly specific functions to the parasites' life cycles [4-6]. Considering the ability of these enzymes to catalyze the hydrolysis of peptide bonds [7-9] compounds containing amide or amide-mimetic frameworks can be designed as proteolytic inhibitors with antitrypanosomatid activity, as exemplified by compounds **1-4** (Chart 1) [9-12]. In similar manner, the *ortho*-hydroxyphenyl group linked to the imine subunit of a hydrazine functional group is believed to be an interesting scaffold for cysteine protease inhibition. This statement is based on a theoretical proposed mechanism involving the nucleophilic attack of a sulfhydryl group of a cysteine-protease on a reactive *ortho*-quinonemethide intermediate, generated from the tautomeric equilibrium of *ortho*-hydroxyarylaldehydehydrazonemoiety (e.g. compound **5**, Chart 2) [13-14].

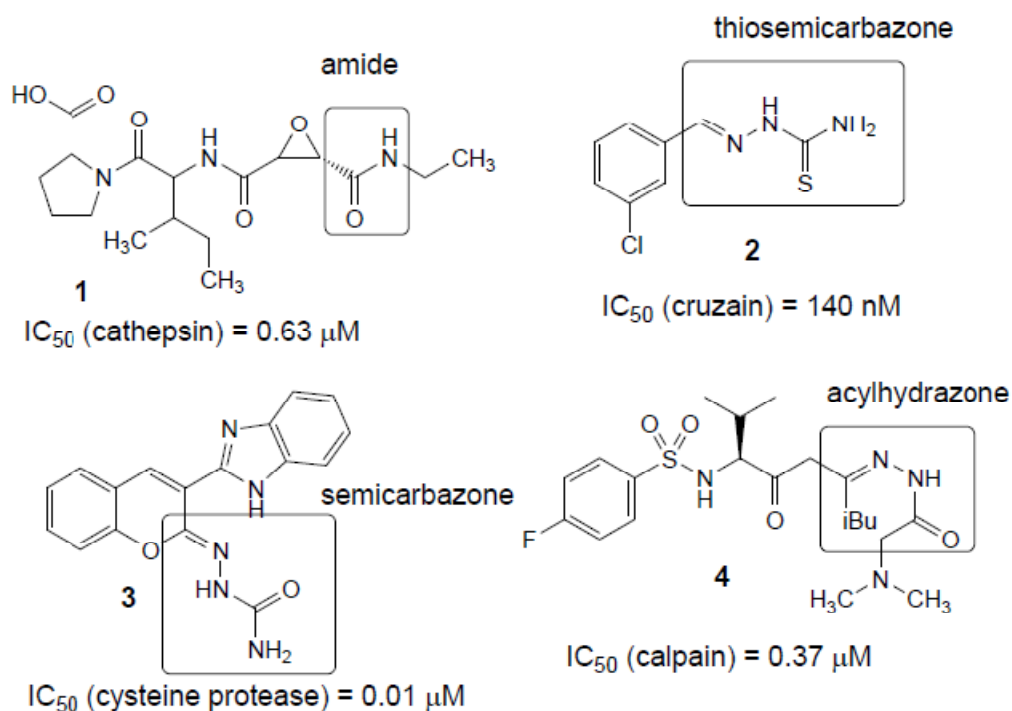


Chart 1: Examples of compound containing amide mimetic framework able to inhibit proteases of parasites

In order to design new peptide mimetic derivatives enclosing frameworks able to be recognized by trypanosomatids proteases, a series of semicarbazone derivatives (**6a-h** and **7a-h**) were planned by molecular modification on prototype **5** (LASSBio-1022) [14]. These modification were based on ring replacement between quinoxaline nucleus and 1,3-benzodioxole system (**a**, Chart 2); molecular simplification represented by elimination of methyl group (**b**, Chart 2); followed by aza-homologation strategy (**c**, Chart 2), converting the *N*-acylhydrazone subunit in a semicarbazone framework. The congeners series was further designed by classical isosterism replacement on 2-hydroxyphenyl subunit, varying the electronic nature of the monovalent group (**a-f**) and by isosteric ring replacement of phenyl group by a substituted furan system (**g**) and its phenylogous analogue (**h**) (Chart 2) [15]. In this paper we described the synthesis of the designed compounds **6a-h** and **7a-h** and their trypanosomicidal and leishmanicidal activities.

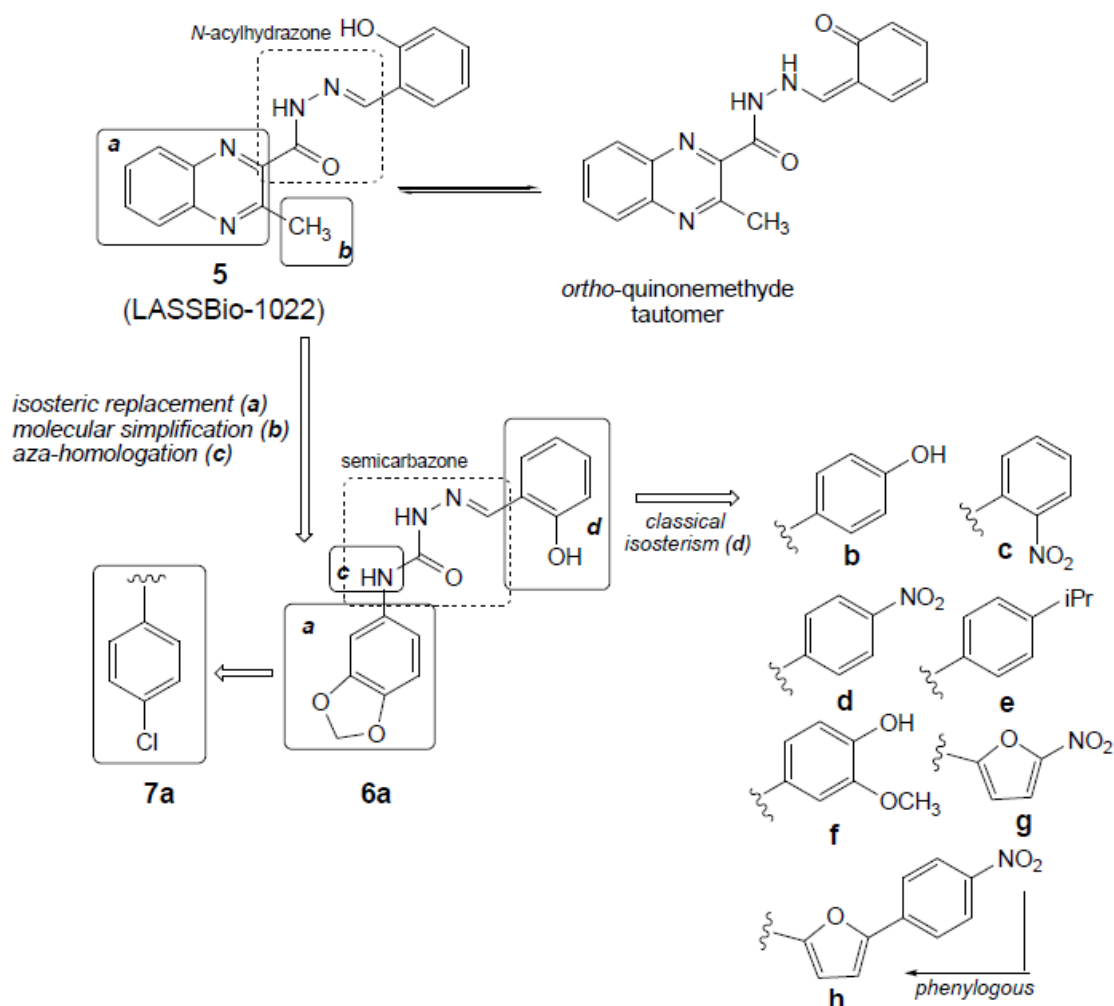


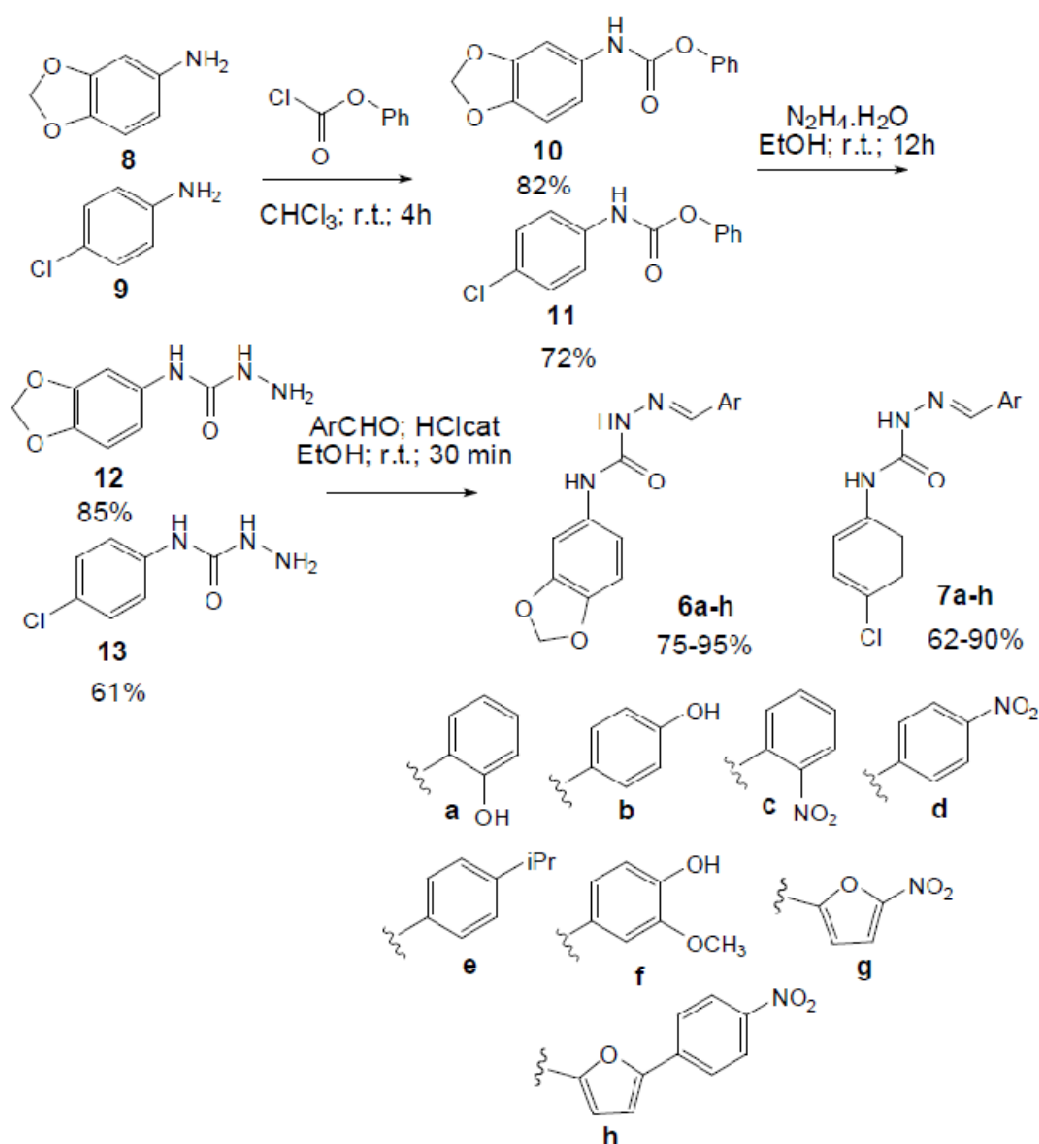
Chart 2: Design concept of semicarbazone derivatives (**6a-h** and **7a-h**) from molecular modifications on prototype **5**

Results and Discussion

Chemistry

Compounds **6a-h** and **7a-h** were synthesized in three linear steps from the amines **8** and **9**, obtained commercially (Scheme 1). In the first step the amines were condensed with phenyl chloroformate in chloroform at room temperature in order to furnish the carbamates **10** and **11** [16-17]. These compounds were treated with

hydrazine monohydrate in ethanol to provide the semicarbazide derivatives **12** and **13** [18]. These key-intermediates were finally condensed with appropriated aldehydes, selected based on the design concept depicted in Chart 2, to obtain the semicarbazones **6a-h** and **7a-h** in good overall yields (Scheme 1) [19]. The chemical structure of the compounds **6a-h** and **7a-h** was elucidated by ^1H and ^{13}C NMR, IR and mass spectrometry. The analysis of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of these compounds revealed the presence of only one signal relative to the hydrogen and carbon of iminedouble bond (N=CH), suggesting that all compounds were synthesized as a single diastereoisomer. The unequivocal characterization of the relative configuration of iminedouble bond (*E* or *Z*) was performed using X-ray diffraction study. However, considering the difficulty of getting compounds **6a-h** and **7a-h** in crystalline form, only derivative **7g** (LASSBio-1483), obtained as crystal solid, was used in X-ray experiment. As shown in Figure 1, this experiment revealed that compound **7g** was obtained as diastereoisomer *E*. Based on these data and considering the similarity in chemical shifts of imine hydrogen in ^1H NMR spectra of compounds **6a-h** and **7a-h**, is reason able to propose that all semicarbazone derivatives (**6a-h** and **7a-h**) were obtained with the same stereochemistry (N=CH; configuration *E*).



Scheme 1: Synthesis of semicarbazone derivatives **6a-h** and **7a-h** from the amines **8** and **9**

X-Ray diffraction analyses

Figure 1 is a structure representation of **7g** crystallized in the $P2_1/c$ space group. Table 1 present its main crystallographic data. The geometric features were studied with the software MOGUL [20] and this analysis showed that all bond lengths and angles were in agreement with the expected statistical values when compared with similar fragments of structures deposited in Cambridge Structural Database

(CSD) [21]. The least-square plane through the non-hydrogen atoms of the 5-nitro-2-furaldehydesemicarbazone moiety shows a high planarity (r.m.s = 0.0358). This molecular moiety forms an angle of $10.78(6)^\circ$ with that one through the benzoic ring (r.m.s = 0.0281). Information about intermolecular geometry of **7g** and the details of all hydrogen bond contacts involved in its networks can be found in the supplementary material (Figure 1S and Table 1S)

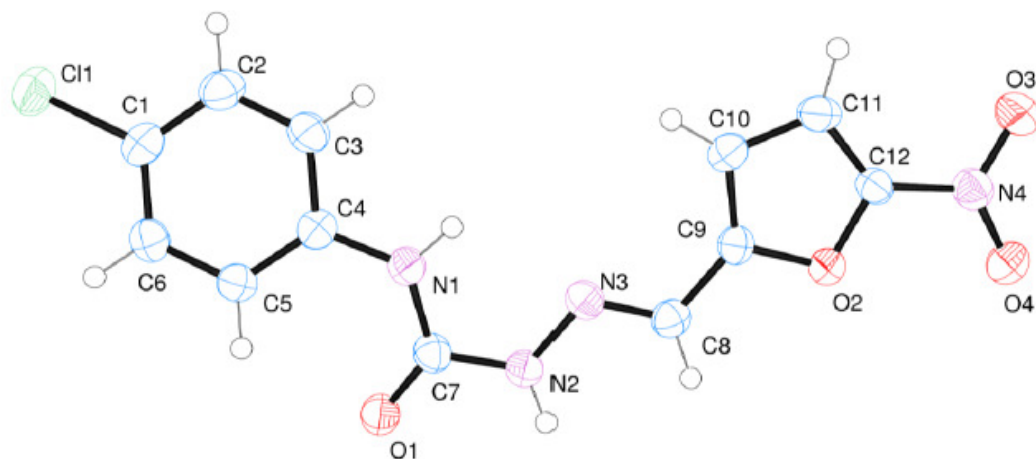


Figure 1: View of representative semicarbazone derivative **7g** with ellipsoids represent 50%-probability level. H atoms are shown as small spheres of arbitrary radii.

Table 1. Crystal data and the structures refinement for **7g** (LASSBio-1483).

Parameters	7g (LASSBio-1483)
Empirical formula	C ₁₂ H ₉ ClN ₄ O ₄
Formula weight	308.68
Wavelength, Å	1.5418
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
Cell Parameters, Å and °	a = 8.8854(2), b = 13.8588(3), c = 13.5620(3) β = 129.229(2)
V, Å ³	1293.65(6)
Z	4
μ, mm ⁻¹	2.855
ρ calc., Mg m ⁻³	1.585
θ-range for data collection	5.283 to 62.270°
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 9, -14 ≤ k ≤ 15, -15 ≤ l ≤ 15
Refl. Collected / Unique	3977 / 2005 [R(int) = 0.0198]
Completeness to theta = 67.680°	85.6 %
Data / restraints / parameters	2005 / 0 / 190
R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0349, wR2 = 0.0886
R indices (all data)	R1 = 0.0479, wR2 = 0.0964
Goof on F ²	1.042
Residual density, eÅ ⁻³	0.200 and -0.253

Cytotoxic studies

Before starting the evaluation of the trypanosomicidal and leishmanicidal activities of semicarbazones **6a-h** and **7a-h**, the eventual cytotoxic profile of these compounds against mammalian cells was investigated by MTT assay [22]. In this study murine macrophages cell line J774.A1 was treated with compounds **6a-h** and **7a-h** at serial concentrations (0.1–100 μM) and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as illustrated in Table 2. Only compounds **7b** and **7e** showed cytotoxic activity to mammalian cell with IC₅₀ = 71.2 and 35.7 μM, respectively (Table 2).

Trypanosomicidal Activity

Semicarbazone derivatives **6a-h** and **7a-h** were evaluated *in vitro* against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, Tulahuen 2 strain, discrete typing unit,

DTU,Tc VI [23] in a screening concentration of 100 μM . Compounds which presented an inhibition superior than 50% at 100 μM were selected to determine their IC_{50} values, and their ability to inhibit the parasite growth was tested in comparison to the standard drug nifurtimox [24]. As shown in Table 2, compounds **7a** ($\text{IC}_{50} = 21 \mu\text{M}$), **7g** ($\text{IC}_{50} = 11.9 \mu\text{M}$), **6d** ($\text{IC}_{50} = 8.5 \mu\text{M}$) and **6g** ($\text{IC}_{50} = 11.5 \mu\text{M}$) presented the better trypanosomicidal profile being equipotent to the standard drug nifurtimox ($\text{IC}_{50} = 7.7\mu\text{M}$).

Leishmanicidal Activity

The ability of compounds **6a-h** and **7a-h** to inhibit the growth of promastigotes forms of *L. major* were investigated, using pentamidine as standard [25]. Compounds with IC_{50} values $< 100 \mu\text{M}$ were selected to study their cytotoxic activity against amastigotes forms of *L. major*. As exemplified in Table 2, all compounds containing the 1,3-benzodioxole system (**6a-h**) were inactive as leishmanicide. In contrast, compounds **7c**, **7d**, **7f**, **7g** and **7h** showed cytotoxic activity against promastigotes of *L. major*, although with potency inferior than pentamidine. Among these compounds only the semicarbazones **7d** ($\text{IC}_{50} = 74.0 \mu\text{M}$), **7g** ($\text{IC}_{50} = 1.5 \mu\text{M}$) and **7h** ($\text{IC}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$) were active against amastigote forms of *L. major*, being compounds **7g** and **7h** more potent than pentamidine ($\text{IC}_{50} = 17.1\mu\text{M}$).

Table 2. Determination of the cytotoxicity of semicarbazone derivatives against macrophages (J774.A1), epimastigotes of *T. cruzi* and promastigote and amastigote forms of *L. major*.

Compounds	J774.A1 cell line	Epimastigote	Promastigote	Amastigote
	IC ₅₀ (μM) ^a	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μM) ^b	<i>L. major</i> IC ₅₀ (μM) ^c	<i>L. major</i> IC ₅₀ (μM) ^c
Nifurtimox	> 100	7.7	0.9	44.1
Pentamidine	> 100	N.D.	0.8	17.1
6a (LASSBio-1200)	> 100	> 100	> 100	N.D.
6b (LASSBio-1205)	> 100	> 100	> 100	N.D.
6c (LASSBio-1201)	> 100	> 100	> 100	N.D.
6d (LASSBio-1203)	> 100	8.5	> 100	N.D.
6e (LASSBio-1206)	> 100	> 100	> 100	N.D.
6f (LASSBio-1210)	> 100	> 100	> 100	N.D.
6g (LASSBio-1302)	> 100	11.5	> 100	N.D.
6h (LASSBio-1303)	> 100	50.0	> 100	N.D.
7a (LASSBio-1487)	> 100	21.0	> 100	N.D.
7b (LASSBio-1701)	71.2	89.1	> 100	N.D.
7c (LASSBio-1490)	> 100	> 100	6.9	> 100
7d (LASSBio-1489)	> 100	> 100	9.4	74.0
7e (LASSBio-1486)	35.7	29.0	> 100	N.D.
7f (LASSBio-1488)	> 100	86.7	12.6	> 100
7g (LASSBio-1483)	> 100	11.9	18.5	1.5
7h (LASSBio-1699)	> 100	> 100	9.7	0.6

N.D. = not determined. ^aIC₅₀ is the concentration required to give 50% death of cells, calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations (100, 10, 1 and 10⁻¹ μM). ^bIC₅₀ is the concentration required to give 50% death of *T. cruzi* epimastigotes, calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations (100, 50, 25, 10, 5, 1 μM); ^cIC₅₀ is the concentration required to give 50% death of *L. major* parasites, calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations (100, 10, 1, 10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³ μM).

Considering the aim of identify a new antitrypanosomatid, the analysis of the results depicted in Table 2, allowed the selection of compound **7g** (LASSBio-1483)

as adual trypanosomicidal and leishmanicidal agent. Therefore, the *in silico* prediction of physicochemical, ADME and toxicity properties of LASSBio-1483 (**7g**) were calculated using the ACD/Labs Percepta Platform (License# 56950) and the results were compared to those obtained for nifurtimox and pentamidine.

As demonstrated in Table 3, the drug-likeness of compound **7g** was very similar to nifurtimox and different from pentamidine, with no violations of Lipinsky's rule of 5 [26]. Regardless of the poor solubility (predicted in buffer at pH of 6.5), compound **7g** (LASSBio-1483) was showed to be highly permeable based on predicted permeability across Caco-2 monolayers (P_e) and human intestinal absorption (HIA) test. These results were similar to nifurtimox and opposite to pentamidine, that was demonstrated to be a poorly permeable drug ($P_e \leq 1 \cdot 10^{-6}$ cm/s and HIA < 30%) with zero oral bioavailability (F = 0 %, Table 3). LASSBio-1483 (**7g**) was expected to have an oral bioavailability (F) of 39% (Table 3). The drug safety profile of these compounds was also projected using

Program ACD/Percepta 14.0.0, based on probabilistic predictors. The metabolic stability in human liver microsomes (HLM), the inhibition of hERG (the human *Ether-à-go-go-Related Gene*) and the mutagenic profile (*i.e.* probability of positive Ames test) were calculated and the results converted in the so called classification scores (Table 4). As depicted in Table 3 compound **7g** (LASSBio-1483) was predicted as stable in HLM (≤ 0.33) and its ability to inhibit hERG was undefined (score > 0.33 and ≤ 0.67). However, similar to nifurtimox, LASSBio-1483 (**7g**) was predictable to be mutagenic (score > 0.67), which is in agreement with the presence of the toxicophoric 5-nitrofuranyl subunit.

Table 3: Physico-chemistry properties and ADMET profile of compounds **7g** (LASSBio-1483), nifurtimox and pentamidine calculated using the Program ACD/Percepta 14.0.0

Predicted Properties	Compounds		
	7g (LASSBio-1483)	Nifurtimox	Pentamidine
MW (g/mol)	308.68	287.25	340.42
H-Donors	2	0	6
H-Acceptors	8	8	6
Rotatable Bonds	4	3	10
LogP	3.03	0.04	2.09
Solubility	0.004 mg/ml	2.39 mg/mL	0.61 mg/mL
Caco-2	$P_e = 204 \times 10^{-6}$ cm/s	$P_e = 88 \times 10^{-6}$ cm/s	$P_e = 0.6 \times 10^{-6}$ cm/s
HIA	100%	100%	16%
% F (oral)	39%	99%	0%
HLM	0.33	0.39	0.33
hERG	0.40	0.42	0.34
AMES	0.74	0.86	0.16

Table 4: The meaning of classification score range values for ADMET properties using Program ACD/Percepta 14.0.0

Classification Scores	Predicted ADMET Properties		
	HLM	hERG	AMES
≤ 0.33	Stable	Non-inhibitor	Non-mutagenic
> 0.33 and ≤ 0.67	Undefined	Undefined	Undefined
> 0.67	Unstable	Inhibitor	Mutagenic

Bearing in mind the possibility of the chemical instability of the imine function, present in the semicarbazone framework, the stability profile of compound **7g**

(LASSBio-1483) was investigated in buffer solution in pH = 2.0 and 7.4 (Figure 3). Moreover, in view of the peptide mimetic profile of semicarbazone scaffold, the plasma stability of LASSBio-1483 was also studied (Figure 2B).

As demonstrated in Figure 2A, compound **7g** (LASSBio-1463) presented high stability in buffer solution, either in pH value that simulate gastric juice (pH = 2) or either in pH value that mimic serum content (pH 7.4). The aqueous solubility of LASSBio-1483 (**7g**) was determined using UV-spectroscopic method [27]. Compound **7g** presented low aqueous solubility, with experimental value (0.0028 mg/mL) similar to that predicted by Program ACD/Percepta 14.0.0 (0.004 mg/mL; Table 3).

The plasma stability of compound **7g** (LASSBio-1483) was determined following the methodology adapted from Konsoula and Jung (2008) [28]. The rat plasma sample was validated using methyl biphenyl-4-carboxylate as standard. As indicated in Figure 2B, this standard was completely metabolized by plasma enzymes at time of 240 minutes, resulting in the formation of the biphenyl-4-carboxylic acid (data not shown). In contrast, LASSBio-1483 (**7g**) was not metabolized during all the analysis time (0, 30, 60, 120, 180, 240 min). The data revealed the great plasma stability of LASSBio-1483 (Figure 2B).

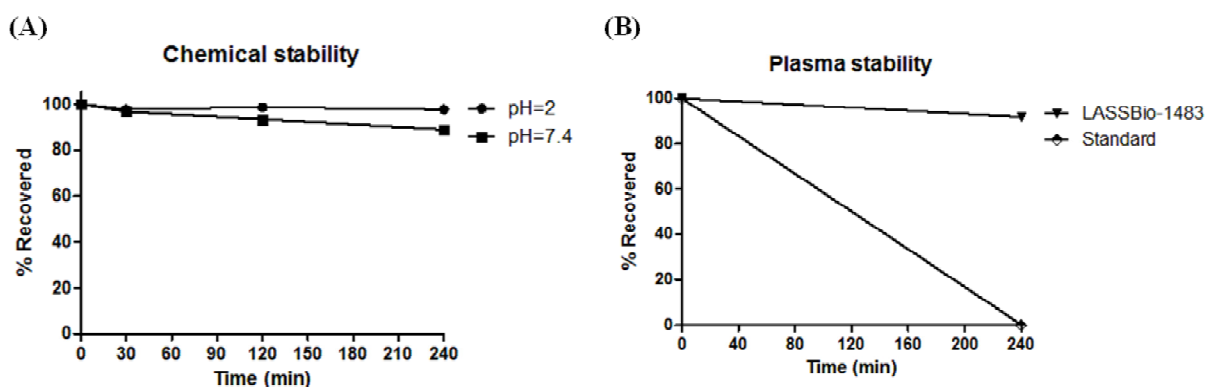


Figure 2: A) Chemical stability of the compound LASSBio-1483 (**7g**) at pH 2 and 7.4; B) Plasma stability of compounds LASSBio-1483 (**7g**) and standard methyl biphenyl-4-carboxylate.

In summary a series of semicarbazone derivatives (**6a-h** and **7a-h**), containing structural modifications on the rings linked to the amine (NH) and imine (N=CH)

groups, were designed and synthesized. From this series compound **7g** (LASSBio-1483) highlighted, showing dual *in vitro* trypanosomicidal and leishmanicidal activities with potency similar to the standard drugs nifurtimox and pentamidine. This data, taken together with its good *in silico* druglikeness profile and its great chemical and plasma stabilities, make LASSBio-1483 (**7g**) a new antitrypanosomatid lead-candidate. The *in vivo* trypanosomicidal and leishmanicidal activities of **7g** will be studied in our labs.

Acknowledgment: The authors would like to thank Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute for having provided *L. major* IOC/L0581 (MHOM/SU/1973/5-ASKH). The authors would like to thank CNPq (BR), FAPERJ (BR), FAPEAL (BR) and INCT-INOVAR (BR, 573.564/2008-6 and E-26/170.020/2008), PEDECIBA, CSIC-UdelaR (UR, 661) for fellowship and financial support. This work was done under the auspices of the Collaborative Network RIDIMEDCHAG-CYTED.

Experimental Section:

Chemistry

Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers. The reactions were monitored by thin layer chromatography, which was performed on aluminum sheets precoated with silica gel 60 (HF-254, Merck) to a thickness of 0.25 mm. The chromatograms were viewed under ultraviolet light (254–265 nm). ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were determined in deuterated dimethyl sulfoxide using a Bruker DPX-200 at 200 MHz, Varian Mercury-300 (300 MHz), Varian MR-400 (400 MHz). Signal multiplicities are represented by: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) and br (broad signal). Infrared (IR) spectra were obtained with a FTIR 2000–100 spectrophotometer using potassium bromide plates. Melting points of final products were determined with a Quimis 340 apparatus and are uncorrected. The purity of compounds was determined by HPLC (>95%) using the Shimadzu-LC20AD apparatus, a Kromasil 100-5C18 (4.6 mm X 250 mm) column and the SPD-M20A detector (Diode Array) at 254 nm for quantification of analyte in a 1 mL/min

constant flux. The injector was programmed to inject a volume of 20 μ L. The mobile phases used were: CH₃CN:H₂O 1:1; 6:4 and 7:3. The results of elemental analysis were obtained FlashEA 1112 Series instrument (Thermo Scientific) from samples previously dried under vacuum. Ultraviolet spectroscopy was performed using Femto spectrophotometer. The wavelength used in solubility assay was determined by the λ_{max} characteristic of each compound. Spectra were analyzed in FemtoScan software. Mass spectrometry was obtained by positive and negative ionization at Esquire 6000-ESI Ion Trap MS_n System Bruker Daltonics and data analyzed in Compass 1.3.SR2 software.

1. Procedure for the preparation of intermediate carbamates 10 and 11(adapted from references 16 and 17)

In 30 mL of chloroform was added 7.1 mL (56 mmol) of phenyl chloroformate and allowed to stir. Then it was added slowly with a pipette, a solution of 6g of the functionalized aniline **8** or **9** (47 mmol) in 50 mL of chloroform. The end of the reaction was monitored by TLC after 4 hours of reaction, with total consumption of the starting material (eluent: dichloromethane / methanol 5%). 2/3 of the solvent volume was reduced in vacuum being subsequently added 50 mL of hexane and left under stirring for 10 minutes. The mixture was vacuum filtered, and washed with hexane.

1.1. Phenyl benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylcarbamate (10; LASSBio-1213)

Yield: 82%, black solid, m.p. >250 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3390 (ν NH), 1717 (ν CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 5.97 (s, 2H, H2), 6.87 (s, 1H, H4), 6.83-7.44 (m, 7H, H7,H6, H2',H3',H4',H5',H6'), 10.00 (s, 1H, Ar-NH); 99% purity in HPLC (R.T.=7.3 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: m/z = 258.1 [M + H]⁺.

1.2. Phenyl 4-chlorophenylcarbamate (11; LASSBio-1481)

Yield: 72%, white solid, m.p. 190-192 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3311 (νNH). 1716 (νC=O); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10.38 (s, 1H, Ar-NH), 7.54 (d, 2H, H2 & H6), 7.47-7.36 (m, 5H, H2', H3', H4', H5' & H6'), 7.28 (d, 2H, H3 & H5); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 152.2 (C=O), 150.9 (C1'), 138.1 (C4), 129.9 (C2 & C6), 129.3 (C3 & C5), 127.2 (C1), 126.0 (C3' & C5'), 122.4 (C2' & C6'), 120.5 (C4'); purity calculated by elemental analysis: analysis calculated (C 63.04%, H 4.07%, N 5.66%), experimental analysis (C 62.99%, H 4.04%, N 5.50%); MS: *m/z* = 246.0 [M - H].

2. Procedure for the preparation of semicarbazides 12 and 13 (adapted from reference 18)

In a solution containing 1g (4 mmol) of carbamate derivative (10 or 11) and 40 mL of ethanol was added 2.3 mL (15 eq) of hydrazine hydrate 80%. After 12 hours at room temperature, it was checked the end of the reaction by TLC (dichloromethane / 5% methanol), and the solvent volume was reduced and added ice checking the precipitation of product that was vacuum filtered.

2.1. *N*-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)hydrazinecarboxamide (12; LASSBio-1212)

Yield: 85%, beige solid, m.p. 215-217 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3356 (νNH₂), 3102-3216 (νNH), 1634 (νCO), 1634 (νC=N); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 3.33 (s, 2H, H2), 4.29 (s, 1H, CONH), 5.90 (s, 2H, NH₂), 6.78 (d, 1H, H7), 6.84 (d, 1H, H6), 7.23 (s, 1H, H4), 8.50 (s, 1H, ArNH); 98% purity in HPLC (R.T.= 2.9 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: *m/z* = 196.1 [M + H]⁺.

2.2. *N*-(4-chlorophenyl)hydrazinecarboxamide (13; LASSBio-1482)

Yield: 61%, white solid, m.p. >250 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3337 (νNH), 1668 (νC=O), 1011 (νC-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 8.76 (s, 1H, Ar-NH), 7.58 (d, 2H, H2 & H6), 7.46 (s, 1H, CONH), 7.25 (d, 2H, H3 & H5), 4.35 (s, 2H, NH₂); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 157.2 (CO), 138.9 (C4), 128.2 (C2 & C6),

124.8 (C1), 119.6 (C3 & C5); purity calculated by elemental analysis: calculated (C 45.30%, H 4.34%, N 22.64%), experimental (C 45.36%, H 4.37%, N 22.70%); MS: $m/z = 184,0 [M - H]^-$.

3. Procedure for the preparation of semicarbazones **6a-h** and **7a-h** (adapted from reference 19)

Semicarbazide **12** or **13** (0.25 g, 1.35 mmol) was added in 10 mL ethanol and 1.35 mmol of aldehyde, at room temperature, followed by addition of 1 drop of concentrated HCl. The solution remained under stirring for 30-240 minutes until TLC (dichloromethane / methanol 5 to 10%) indicated completion of reaction. The volume of ethanol was reduced, and after addition of ice, was observed precipitation of the product that was filtered dried under vacuum. Yields and characterization pattern are described below.

3.1. (*E*)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(2-hydroxybenzylidene)hydrazinecarboxamide (**6a**; LASSBio-1200)

Yield: 95%, brown solid, m.p. 215-217 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3334-2779 (νOH), 3190-3042 (νNH), 1651 (νCO), 1576 (νC=N); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.97 (s, 2H, H₂), 6.84-7.29 (m, 6H, H₄, H₆, H₇, H_{3'}, H_{4'} & H_{5'}), 7.87 (d, 1H, H_{6'}), 8.25 (s, 1H, CONH), 8.72 (s, 1H, N=CH), 10.02 (s, 1H, Ar-NH), 10.48 (s, 1H, Ar-OH); 99% purity in HPLC (R.T.=4.8 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: $m/z = 300,1 [M + H]^+$.

3.2. (*E*)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-hydroxybenzylidene)hydrazinecarboxamide (**6b**; LASSBio-1205)

Yield: 84% , beige solid, m.p. 202-204 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3389-2894 (νOH), 3200-3088 (νNH), 1659 (νCO), 1523 (νC=N); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.95 (s, 2H, H₂), 6.77 (d, 2H, H_{3'} & H_{5'}), 6.82 (s, 1H, H₄), 7.03 (d, 1H, H₇), 7.29 (d, 1H, H₆), 7.63 (d, 2H, H_{2'} & H_{6'}), 7.82 (s, 1H, CONH), 8.64 (s, 1H, N=CH), 9.73 (s, 1H, Ar-NH), 10.38 (Ar-OH); ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ101.33 (C₂),

102.82 (C4), 108.28 (C7), 113.21 (C6), 116.00 (C3' & C5'), 126.03 (C1'), 129.22 (C2' & C6'), 134.08 (C5), 141.59 (C1), 142.94 (C3), 147.50 (N=CH), 153.78 (C=O), 159.35 (COH); 98% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: m/z = 300,0 [M + H]⁺.

3.3. (E)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(2-nitrobenzylidene)hydrazinecarboxamide (6c; LASSBio-1201)

Yield: 89%, yellow solid, m.p.203-205 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3201-3094 (νNH), 1689 (ν CO), 1554 (ν C=N), 1522 & 1335 (ν NO₂); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.97 (s, 2H, H₂), 6.84 (d, 1H, H₇), 7.11 (d, 1H, H₆), 7.27 (s, 1H, H₄), 7.62 (t, 1H, H₅'), 7.77 (t, 1H, H₄'), 8.02 (d, 1H, H₆'), 8.34 (s, 1H, CONH), 8.44 (d, 1H, H₃'), 8.78 (s, 1H, N=CH), 10.96 (s, 1H, Ar-NH); 99% purity in HPLC (R.T.=6.0 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: m/z = 329,1 [M + H]⁺.

3.4. (E)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-nitrobenzylidene)hydrazinecarboxamide (6d; LASSBio-1203)

Yield: 88%, orange solid, m.p.>250 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3196-3085 (νNH), 1682 (ν CO), 1549 (ν C=N), 1507 & 1339 (ν NO₂), ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.97 (s, 2H, H₂), 6.83 (d, 1H, H₇), 7.02 (d, 1H, H₆), 7.27 (s, 1H, H₄), 8.05 (s, 1H, CONH), 8.09 (d, 2H, H₂' & H₆'), 8.23 (d, 2H, H₃' & H₅'), 8.92 (s, 1H, N=CH), 10.96 (s, 1H, Ar-NH); ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 101.44 (C₂), 103.35 (C₇), 108.29 (C₆), 113.92 (C₄), 124.30 (C₂' & C₆'), 128.39 (C₃' & C₅'), 133.64 (C₅), 138.73 (C₁'), 141,47 (C₁), 143.32 (C₃), 147.52 (N=CH), 147.90 (C=O), 153.49 (C₄'). 99% purity in HPLC (R.T.=6.0 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: m/z = 329.1 [M + H]⁺.

3.5. (E)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-isopropylbenzylidene)hydrazinecarboxamide (6e; LASSBio-1206)

Yield: 75%, beige solid, m.p.136-138 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3193-1117(νNH), 1686 (ν CO), 1549 (ν C=N), 740 ν (iPr); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ1.20 (d, 6H, (CH₃)₂), 5.95 (s, 2H, H₂), 6.80 (d, 1H, H₇), 7.03 (d, 1H, H₆), 7.25 (s, 1H H₄), 7.28 (d,

2H, H3', H5'), 7.71 (d, 2H, H2', H6'), 7.89 (s, 1H, CONH), 8.67 (s, 1H, N=CH), 10.50 (s, 1H, Ar-NH); ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ24.25 (CH₃)₂, 33.88 (CH), 101.36 (C2), 102.96 (C7), 108.29 (C6), 113.40 (C4), 127.06 (C3' & C5'), 127.62 (C6' & C2'), 132.68 (C5), 133.98 (C1'), 141.30 (C1), 143.04 (C3), 147.51 (N=CH), 150.47 (C4'), 153.72 (C=O); 98% purity in HPLC (R.T.=13.4 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: *m/z* = 326.2 [M + H]⁺.

3.6. (*E*)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) hydrazine carboxamide (6f; LASSBio-1210)

Yield: 75%, white solid, m.p.198-200 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3193-3100 (νNH), 3349-2841 (νOH), 1666 (νCO), 1549 (νC=N); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ3.85 (s, 3H, CH₃), 5.96 (s, 2H, H2), 6.78 (d, 1H, H7), 6.83 (s, 1H, H4), 7.04 (d, 1H, H6), 7.13 (d, 1H, H6'), 7.31 (d, 1H, H5'), 7.43 (s, 1H, H2'), 7.83 (s, 1H, CONH), 8.68 (s, 1H, N=CH), 9.28 (s, 1H, OH), 10.39 (s, 1H, Ar-NH); ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 56.36 (CH₃), 101.35 (C2), 102.94 (C7), 108.31 (C4), 110.48 (C6), 113.39 (C6'), 115.89 (C5'), 121.95 (C2'), 126.46 (C6), 134.07 (C1'), 141.79 (C3), 142.98 (C1), 147.50 (N=CH), 148.50 (C3'), 148.9 (C4'), 153.80 (C=O); 99% purity in HPLC (R.T.=3.7 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: *m/z* = 330.2 [M + H]⁺.

3.7. (*E*)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-((5-nitrofur-2-yl)methylene) hydrazine carboxamide (6g; LASSBio-1302)

Yield: 90%, orange solid, m.p.221-223 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3155(νNH), 1676 (νCO), 1551 & 1325 (ν NO₂); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.96 (s, 2H, H2), 6.82 (d, 1H, H7), 6.97 (d, 1H, H6), 7.23 (s, 1H, H4), 7.34 (d, 1H, H4'), 7.78 (d, 1H, H3'), 7.88 (s, 1H, CONH), 8.78 (s, 1H, N=CH), 11.08 (s, 1H, Ar-NH); 98% purity in HPLC (R.T.= 4.4 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: *m/z* = 318,9 [M + H]⁺.

3.8. (*E*)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-((5-(4-nitrophenyl)fur-2-yl)methylene)hydrazine carboxamide (6h; LASSBio-1303)

Yield: 95%, orange solid, m.p.226-228 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3095(νNH), 1698 (νCO), 1501 & 1355 (νNO₂), ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ5.96 (s, 2H, H₂), 6.83 (d, 1H, H₇), 7.03 (d, 1H, H₆), 7.12 (d, 1H, H₃'), 7.29 (s, 1H, H₄), 7.41 (d, 1H, H₄'), 7.9 (s, 1H, CONH), 8.02 (d, 2H, C₃" & C₅"), 8.25 (d, 2H, C₂" & C₆"), 8.65 (s, 1H, N=CH), 10.77 (s,1H,Ar-NH); 95% purity in HPLC (R.T.=8.4 min, CH₃CN:H₂O (6:1)); MS: *m/z* = 395.1 [M + H]⁺.

3.9. (E)-N-(4-chlorophenyl)-2-(2-hydroxybenzylidene)hydrazinecarboxamide (7a; LASSBio-1487)

Yield: 89%, white solid, m.p. 197-199 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3435 (νNH), 1696 (νC=O), 1492 (ν O-H), 1013 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10.70 (s, 1H, Ar- NH), 10.10 (s, 1H, OH), 9.02 (s, 1H, CONH), 8.21 (s, 1H, N=CH), 7.93 (d, 1H, H₂'), 7.68 (d, 2H, H₂ & H₆), 7.33 (d, 2H, H₃ & H₅), 7.21 (t, 1H, H₄'); 6.86 (m, 2H, H₃' & H₅'); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ156.1 (CO), 152.9 (N=CH), 139.0 (C₆'),138.2 (C₄), 130.7 (C₁), 128.3 (C₂ & C₆), 127.1 (C₁'), 126.0 (C₂'), 121.3 (C₃ & C₅),120.3 (C₄'), 119.2 (C₅'), 116.0 (C₃'); 99% purity in HPLC (R.T.=11.7 min. CH₃CN:H₂O (1:1)), MS: *m/z* = 288.1 [M - H]⁻.

3.10. (E)-N-(4-chlorophenyl)-2-(4-hydroxybenzylidene)hydrazinecarboxamide (7b; LASSBio-1701)

Yield: 67%, white solid, m.p. 204-206 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3301 (νNH), 1617 (νC=O), 1488 (ν OH); 1015(ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10.59 (s, 1H, Ar- NH), 9.83 (s, 1H, OH), 8.93 (s, 1H, CONH), 7.86 (s, 1H, N=CH), 7.71 (d, 2H, H₂ & H₆), 7.67 (d, 2H, H₃ & H₅), 7.33 (d, 2H, H₂' & H₆'), 6.80 (d, 2H, H₃' & H₅'); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ158.87 (C=O), 153.05 (N=CH), 141.44 (C₄'), 138.25 (C₄), 128.74 (C₂ & C₆), 128.22 (C₂' & C₆'), 125.89 (C₁), 125.36 (C₃ & C₅), 121.17 (C₃' & C₅'), 115.44 (C₁'); 98% purity in HPLC (R.T.=3.9 min. CH₃CN:H₂O (7:1)), MS: *m/z* = 288.1 [M - H]⁻.

3.11. (*E*)-*N*-(4-chlorophenyl)-2-(2-nitrobenzylidene)hydrazinecarboxamide (7c; LASSBio-1490)

The melting point, ¹H NMR, ¹³C NMR and IR data are in agreement with previous reports [29]. Yield: 85%, yellow solid, m.p. 200-202 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3390 (νNH), 1709 (ν C=O), 1537 e 1344 (ν Ar-NO₂), 1013 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 11.15 (s, 1H, Ar-NH), 9.08 (s, 1H, CONH), 9.47 (d, 1H, H5'), 8.37 (s, 1H, N=CH), 8.03 (d, 1H, H2'), 7.78 – 7.58 (m, 2H, H3' & H4'), 7.69 (d, 2H, H2 & H6), 7.35 (d, 2H, H3 & H5); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ152.6 (C=O), 147.8 (N=CH), 137.8 (C6'), 136.0 (C4), 133.2 (C1'), 129.9 (C1), 128.4 (C5'), 128.3 (C3'), 128.2 (C2 & C6), 126.3 (C2'), 124.3 (C4'), 121.4 (C3 & C5); purity calculated by elemental analysis: analysis calculated (C 52.76%, H 3.48%, N 17.58%), experimental analysis (C 52.54%, H 3.41%, N 17.34%); MS: *m/z* = 317.1 [M - H]-.

3.12 (*E*)-*N*-(4-chlorophenyl)-2-(4-nitrobenzylidene)hydrazinecarboxamide (7d; LASSBio-1489)

The melting point, ¹H NMR, ¹³C NMR and IR data are in agreement with previous reports [29]. Yield: 66%, yellow solid, m.p. 248-250 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3086 (νNH), 1684 (ν C=O), 1541 e 1318 (ν Ar-NO₂), 1009 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ11.16 (s, 1H, Ar-NH), 9.19 (s, 1H, CONH), 8.25 (d, 2H, H3' & H5'), 8.15 (s, 1H, N=CH), 8.07 (d, 2H, H2' & H6'), 7.70 (d, 2H, H2 & 5), 7.36 (d, 2H, H3 & H5); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ152.80 (C=O), 147.41 (N=CH), 140.78 (C4'), 138.64 (C4), 137.91(C1'), 128.30 (C2 & C6), 127.91 (C3' & C5'), 126.40 (C1), 123.74 (C2' & C6'), 121.67 (C3e C5); 98% purity in HPLC (R.T.=5.6 min. CH₃CN:H₂O (6:1)), MS: *m/z* = 317.1 [M - H]-.

3.13 (*E*)-*N*-(4-chlorophenyl)-2-(4-isopropylbenzylidene)hydrazinecarboxamide (7e; LASSBio-1486)

Yield: 62%, white solid, m.p. 138-140 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3375 (νNH), 1694 (νC=O), 1012 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ10.77 (s, 1H, Ar-NH), 9.01

(s, 1H, CONH), 7.93 (s, 1H, N=CH), 7.76 (d, 2H, H2 & H6), 7.73 (d, 2H, H3 & H5), 7.34 (d, 2H, H2' & H6'), 7.29 (d, 2H, H3' & H6'), 2.50 (s, 1H, CH), 1.21 (d, 6H, (CH₃)₂); ¹³C NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ153.0 (C=O), 150.0 (N=CH), 141.1 (C4'). 138.1 (C4), 132.0 (C1'), 128.2 (C2 & C6), 127.1 (C2' & C9'), 126.5 (C3' & C8'), 126.0 (C1), 121.3 (C3 & C5); purity calculated by elemental analysis: analysis calculated (C 52.72%, H 3.24%, N 12.30%), experimental analysis (C 52.52%, H 2.9%, N 12.31%); MS: *m/z* = 314.1 [M - H].

3.14 (*E*)-*N*-(4-chlorophenyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)hydrazine carboxamide (7f; LASSBio-1488)

Yield: 90%, white solid, m.p. 218-220 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3410-2835 (νAr-OH), 3334(νNH), 1677 (νC=O), 1092 (νAr-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ10.63 (s, 1H, Ar-H), 9.45 (s, 1H, OH), 9.01 (s, 1H, CONH), 7.87 (s, 1H, N=CH), 7.73 (d, 2H, H2 & H6), 7.49 (s, 1H, H2'), 7.35 (d, 2H, H3 & H5), 7.16 (d, 1H, H7'), 6.82 (d, 1H, H6'), 3.37 (s, 3H, OCH₃); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ153.6 (C=O), 148.9 (N=CH), 148.5 (C5'), 142.2 (C3'), 138.8 (C4), 128.8 (C2 & C6), 126.52(C1), 126.3 (C1'), 122.1 (C6'), 121.8 (C3 & C5), 115.9 (C2'), 110.5 (C7'), 56.3 (C4'); purity calculated by elemental analysis: analysis calculated (C 56.35%, H 4.41%, N 13.14%), experimental analysis (56.35%, H 4.67%, N 12.92%); MS: *m/z* = 318.1 [M - H].

3.15 (*E*)-*N*-(4-chlorophenyl)-2-((5-nitrofuranyl)methylene)hydrazinecarboxamide (7g; LASSBio-1483)

Yield: 80%, yellow crystal, m.p. 182-184°C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3372 (νNH), 1694 (ν C=O), 1532 e 1327 (ν Ar-NO₂), 1013 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ11.28 (s, 1H, Ar-NH), 9.09 (s, 1H, CONH), 7.91 (s, 1H, N=CH), 7.82 (d, 1H, H3'), 7.66 (d, 2H, H2 & H6), 7.35 (m, 3H, H3, H5 & H4'); ¹³C-NMR (200 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ152.6 (C=O), 152.3 (C2'), 151.3 (N=CH), 137.6 (C4), 129.0 (C1'), 128.3 (C2 & C6), 126.4 (C1), 121.4 (C3 & C5), 115.1 (C3'), 112.9 (C4'); purity calculated by elemental analysis: analysis calculated (C 46.69%, H 2.94%, N

18.15%), experimental analysis (C 46.93%, 2.95%, N 18.28%);MS: $m/z = 307.1$ [M - H].

3.16 (E)-N-(4-chlorophenyl)-2-((5-(4-nitrophenyl)furan-2-yl)methylene)hydrazinecarboxamide (7h; LASSBio-1699)

Yield: 64%, yellow solid, m.p. 248-250°C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3365 (νNH), 1688 ($\nu\text{C=O}$), 1532 e 1326 ($\nu\text{ Ar-NO}_2$), 1010 ($\nu\text{ Ar-Cl}$); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz. $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): δ 10.98 (s, 1H, Ar-NH), 8.98 (s, 1H, CONH), 8.28 (d, 2H, H3" & H5"), 8.05 (d, 2H, H2" & H6"), 7.92 (s, 1H, N=CH), 7.72 (d, 2H, H2 & H6), 7.45 (d, 1H, H3), 7.35 (d, 2H, H3 & H5), 7.17 (d, 1H, H2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz. $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): δ 152.65 (C=O), 151.80 (C4"), 151.26 (N=CH), 146.13 (C1"), 137.96 (C4), 135.30 (C1'), 130.56 (C4'), 128.32 (C3" & C5"), 126.18 (C1), 124.40 (C2",C6", C2 & C6), 121.23 (C3 & C5), 114.31(C3'), 112.40 (C2'); 98% purity in HPLC (R.T.=8.7 min. $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ (7:1)), MS: $m/z = 383.1$ [M - H].

Methodology for single crystal X ray diffraction measurements

Orange plate-like crystals of **7g** were obtained by slow evaporation of methanol at room temperature. A well-shaped and suitably-sized single crystal (0.15x0.10x0.04mm) was selected for the X-ray diffraction structure determination experiment. The Xray intensity data were collected at 150 K on a Gemini-Oxford Diffractometer, using $\text{CuK}\alpha$ graphite monochromated radiation. The programs CrysAlis CCD and CrysAlis RED [30] were used for data collection, cell refinement and data reduction. The structure was solved by direct methods using the software Sir-92 [31] and there finement was carried out using SHELXL-2013 [32]. The non-hydrogen atoms were clearly solved and full matrix least-squares refinement of these atoms with an isotropic thermal parameters was carried on. All hydrogen atoms were positioned stereochemically and were refined with fixed individual displacement parameters [$\text{Uiso}(\text{H}) = 1.2 \text{ Ueq}$] using a riding group model with C—H and N-H bond lengths of 0.95 and 0.88 Å, respectively. WINGX software was used to analyze and prepare the data for publication [33]. Molecular graphics were prepared using ORTEP-3 for Windows [34] and Mercury [35]. Crystallographic data for the structural

analysis of the compound discussed here has been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as an supplementary publication under number CCDC 1031516. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB121EZ, UK [fax: +44 1223 336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

Biology

Culture of J774.A1 murine macrophages

These adherent-phenotype macrophage line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% FBS at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂.

Culture of Trypanosoma cruzi epimastigotes

T. cruzi epimastigotes (Tulahuen 2 strain) were cultured at 28 °C for 5-7 days (exponential phase of growth) under aerobiosis in axenic BHI-tryptose milieu (33 g/L brain-heart infusion, 3 g/L tryptose, 0.02 g/L hemin, 0.3 g/L D-(+)-glucose, supplemented with 10% (v/v) calf serum, 200000 units/L penicillin and 0.2 g/L streptomycin).

Culture of L. major promastigotes of L. major

Promastigotes of *L. major* IOC/L0581 (MHOM/SU/1973/5-ASKH) were obtained from Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine at 27° C in BOD incubator.

Cytotoxicity against host cells

To evaluate the cytotoxic activity against the J774.A1 cell line, the host cells were plated in 96-well vessels at 2 x10⁵ cells per well in complete culture medium 10% FBS at 37 °C. After 1 h wells were washed with warm HBSS to remove non-adherent cells, leaving approximately 10⁵ adherent macrophages. All cultures were done in DMEM complete supplemented with 10% FBS. The compounds and pentamidine

were added at serial concentrations (0.1 – 100 µM). The cells were also cultured with medium free from compounds or vehicle (basal growth control) or in media with DMSO 0.1% (vehicle control). Positive control (dead cells) was obtained by cellular lysis with 1% of Triton 100X in DMEM complete. After 48 h, the cytotoxicity was evaluated by the MTT assay [19]. Data obtained from experiments were expressed as the mean ± standard error of the mean (Mean ± S.E.M.) and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. IC₅₀ (concentration required to give 50% death of cells) was calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations [22].

In vitro anti-T. cruzi activity

Parasites were harvested in the late log phase, resuspended in fresh medium, counted in a Neubauer chamber, and placed in 24-well plates (3×10^6 /mL). Parasite growth was followed measuring the absorbance of the culture at 610 nm [24]. Before inoculation, the media were supplemented with the indicated amount of the studied compound from a stock solution in DMSO. The final concentration of DMSO in the culture media never exceeded 0.4% and the control was run in the presence of 0.4% DMSO and in the absence of any compound. No effect on epimastigote growth was observed in the presence of up to 1% DMSO in the culture medium. The percentage of growth inhibition at 100 µM determined at day 5th was calculated as: $PGI = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, where A_p = A600 of the culture containing the compound at day 5; A_{0p} = A600 of the culture containing the compound right after addition of the inocula (day 0); A_c = A600 of the culture in the absence of any compound (control) at day 5; A_{0c} = A600 in the absence of the compound at day 0. To determine IC₅₀, the parasite growth was followed in the absence (control) and presence of increasing concentrations of the corresponding compound (1 -100 µM). The IC₅₀ value was taken as the concentration of compound needed to reduce the absorbance ratio to 50%.

In vitro activity against promastigote forms of Leishmania major

Stock solutions of novel semicarbazone derivatives as well as pentamidine [36] were prepared in DMSO immediately before use. The cytotoxicity of novel semicarbazone derivatives and pentamidine against promastigotes was determined. Stationary phase *L. major* promastigotes were plated in 96-well vessels (Nunc) at 10^5 cells per well, in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine. Each derivatives solution was added at increasing concentrations (10^{-3} – $100\mu\text{M}$). Cells were also cultured in a medium free of compounds or vehicle (basal growth control) or with DMSO 0.1% (vehicle control). After 48 h, extracellular load of *L. major* promastigotes was estimated by counting the parasites in Schneider's medium in a CELM automatic cell counter (model CC530) [37]. Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. IC_{50} (concentration required to give 50% death of cells) was calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations.

In vitro activity against amastigote forms of Leishmania major

To assess the activity of the test derivatives against the amastigote stage of *L. major* were realized model of infection in coverglass [38]. The murine macrophages (J774.A1 cell line) were prepared in 24-well vessels (Corning) at 2×10^5 adherent cells/well, infected with 2×10^6 promastigotes in glass coverslips placed inside 1 ml medium culture. The cultures were cultured or not with the test derivatives or reference drugs (10^{-3} - $100\ \mu\text{M}$), and kept for 24h at $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . After 24h, coverslips were washed, stained with Giemsa-MayGrünwald, and intracellular amastigotes were counted in 100 macrophages. Data obtained from in vitro experiments were expressed as the Mean \pm S.E.M. of duplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a p value < 0.05 or lower were considered significant. IC_{50} (concentration required to give 50% death of cells) was calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations.

Chemical stability assay (adapted from reference 39):

In a 2 mL microfuge tube, were added 1 μ L (0.01 mM) from a concentrated solution of the test compound **7g** (concentration = 25 mM stock solubilized in DMSO) and 249 μ L acid buffer (0.2 M potassium chloride and 0.2 M HCl, pH = 2) or basic (77 mM phosphate dibasic heptahydrate and 22 mM sodium phosphate monobasic monohydrate, pH = 7.4). After vortexing the mixture was placed in a water bath at 37 °C under vigorous stirring for 0, 30, 60 and 240 minutes. After each reaction time was added 249 μ L basic buffer (20 mM potassium phosphate dibasic anhydrous and 77 mM sodium chloride, pH = 8.4) to neutralize the pH. Extraction of the compound was performed by adding 1 ml of acetonitrile and after vigorous vortexing the medium was filtered (Millipore, 0.45 μ m pore size) and analyzed by HPLC-PDA using mobile phase acetonitrile: water, in the equipment Shimadzu LC-20AD, 100-5 Kromasil C18 column (4.6 mm x 250 mm) detector SPD-M20A (Diode Array) and performed to quantify the analyte in wavelength 340 nm, flow rate 1 mL / min with 20 μ L injection. Data were acquired by LC solution software, version 4.0, and the standard HPLC solvents used had acquired by TEDIA®. In the chemical stability test pH = 7.4, does not require neutralizing the reaction medium after each time taking place.

In vitro plasma stability assay (adapted from reference 28):

The *in vitro* plasma stability of compound **7g** (LASSBio-1483) was performed using a pool of rat plasma. Heparinized blood was centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes at 10 °C to obtain plasma. Plasma was diluted to 64% (v/v) with phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.4) at 37 °C. The reaction was started by adding 1 μ L (0.01 mM), of a stock solution 25 mM in DMSO, of sample to 249 μ L of plasma. The plasma samples remained in the water bath at 37 °C under constant agitation at 0 and 240 minutes. After each reaction time was added 500 μ L of cold methanol, 500 μ L of acetonitrile and then left microtube on ice for 10 min. After agitation, samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at room temperature. The supernatant was analyzed by HPLC-PDA (mobile phase: 60% acetonitrile, 40% water), in the equipment Shimadzu LC-20AD, 100-5 Kromasil C18 column (4.6 mm x 250 mm) detector SPD-M20A (Diode Array) and performed to quantify the analyte in wavelength 340 nm, flow rate 1 ml / min with 20 μ L injection. Data were acquired by LC solution software, version 4.0, using as standard methyl biphenyl-4-carboxylate.

Experiments were performed with incubation of plasma with 0.5% DMSO without sample (blank) and validating the approach used was performed using standard methyl biphenyl-4-carboxylate using the same conditions described for the analyzed sample (i.e. compound 7g).

References

- [1] K. Nussbaum, J. Honek, C.M. Cadmus, T. Efferth, Trypanosomatid parasites causing neglected diseases, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1594–1617.
- [2] http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/, accessed in 28/10/2014.
- [3] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D.A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M.J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. VanAken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart, B. Andersson, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science* 15 (2005) 409-15.
- [4] J. A. Sakanari, S. A. Nadler, V. J. Chan, J. C. Engel, C. Leptak, J. Bouvier, *Leishmania major*: Comparison of the Cathepsin L- and B-like Cysteine Protease Genes with Those of Other Trypanosomatids, *Exp. Parasitol.* 85 (1997) 63–76.
- [5] M. H. Branquinha, F. A. Marinho, L. S. Sengenito, S. S. C. Oliveira, K. C. Goncalves, V. Ennes-Vidal, C. M. d'Avila-Levy, A. L. S. Santos, Calpains: Potential Targets for Alternative Chemotherapeutic Intervention Against Human Pathogenic Trypanosomatids, *Curr. Med. Chem.* 25 (2013) 3174-85.
- [6] C. R. Caffrey, D. Steverding, Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases, *Mol. Biochem. Parasit.* 167 (2009) 12–19.

- [7] L. O. Santos, A. S. Garcia-Gomes, M. Catanho, C. L. Sodr e, A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C. M. d'Avila-Levy, Aspartic Peptidases of Human Pathogenic Trypanosomatids: Perspectives and Trends for Chemotherapy, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 3116-3133.
- [8] P. C. Lima, F. C. G. Reis, T. F. R. Costa, Cysteine Peptidase Inhibitors in Trypanosomatid Parasites, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 3152-73.
- [9] D. Steverding, D. W. Sexton, X. Wang, S. S. Gehrke, G. K. Wagner, C. R. Caffrey, *Trypanosoma brucei*: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and arelevant drug target, *Int. J. Parasitol.* 42 (2012), 481-488
- [10] X. Du, C. Guo, E. Hansell, P. S. Doyle, C. R. Caffrey, T. P. Holler, J. H. McKerrow, F. E. Cohen, Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidalthio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain, *J. Med.Chem.* 45 (2002) 2695-2707.
- [11] J. Schröder, S. Noack, R. J. Marh ofer, J. C. Mottram, G. H. Coombs, P. M. Selzer, Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB, *PLoS One*, 8 (2013)e77460.
- [12] N. Raghav, M. Singh, S. Jangra, A. Rohilla, R. Kaur, P. Malik, *In-vitro* studies of various carbonyl derivatives on liver alkaline phosphatase, *J. Chem. Pharm. Res.* 4 (2010) 801-807.
- [13] D. R. Ifa, R. B. de Alencastro, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds, *J. Mol. Struct.* 505 (2000) 11-17.
- [14] N. C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González , Hugo Cerecetto, I. Aldana, S. Pérez-Silanes, Antonio Monge, E.J. Barreiro, L. M. Lima, Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2009) 641–652.
- [15] L. M. Lima, E. J. Barreiro, Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 23-49.
- [16] S. P. Gupte, Process for preparing carbamates by the catalytic transamidation of organic carbonates with ureas, WO 2005063698 A1 20050714 (2005).

- [17] P. Yogeeswari, D. Sriram, R. Thirumurugan, J. V. Raghavendran, K. Sudhan, R. KPavana, J. Stables, Discovery of N-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: Hybrid pharmacophore-based design. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6202-6211.
- [18] C. Sheng, X. Che, W. Wang, S. Wang, Y. Cao, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, Design and synthesis of novel triazole antifungal derivatives by structure-based bioisosterism, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5276–5282
- [19] P. C. Lima, L. M. Lima, K. C. M. da Silva, P. H. O Léda, A. L. P. de Miranda, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural saffrole, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 187-203
- [20] I.J. Bruno, J.C. Cole, M. Kessler, J. Luo, W.D.S. Motherwell, L.H. Purkis, B.R. Smith, R. Taylor, R.I. Cooper, S.E. Harris, A.G. Orpen, Retrieval of crystallographically derived molecular geometry information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44 (2004) 2133-2144.
- [21] F. H. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst. B*, 58 (2002) 380-388.
- [22] R.F. Hussain, A.M. Nouri, R.T. Oliver, A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay, *J. Immunol. Method.* 160 (1993) 89-96.
- [23] R.O. Cosentino, F. Agüero, A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: Discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1777.
- [24] A. Merlino, D. Benítez, S. Chavez, J. Da Cunha, P. Hernández, L.W. Tinoco, N.E. Campillo, J.A. Páez, H. Cerecetto, M. González, Development of second generation amidinohydrazones, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds, *Med. Chem. Comm.* 1 (2010) 216-228.
- [25] V. S. Amato, J. G. de Paula; R. Imamura, V.N. Amato, M. I. Duarte, M. I. Boulos, M. Boulos, A. C. Nicodemo; J. S. de Mendonça, Treatment of american cutaneous leishmaniasis, with lesions in the mucosa, using pentamidine isethionate, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29 (1996) 477-481

- [26] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* 23 (1997) 3–25
- [27] P. Schneider, S.S. Hosseiny, M. Szczotka, V. Jordan, K. Shlitter Rapid solubility determination of the triterpenes oleanoic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents, *Phytochem. Lett.* 2 (2009) 85–87.
- [28] R. Konsoula, M. Jung, *In vitro* plasma stability, permeability and solubility of mercaptoacetamide histone deacetylase inhibitors, *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 19–25.
- [29] S.N. Pandeya, V. Mishra, I. Ponnilarasan, J.P. Stables, Anticonvulsant activity of p-chlorophenyl substituted arylsemicarbazones: the role of primary terminal aminogroup, *Pol. J. Pharmacol.* 52 (2000) 283-90.
- [30] CrysAlisPRO, Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England, 2006.
- [31] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, SIR92 – A program for automatic solution of crystal structures by direct methods. *J. Appl. Cryst.*, 27 (1994) 435-435.
- [32] G. M. Sheldrick, A short history of SHELX. *Acta Cryst. A* 64 (2008) 112-122.
- [33] L. J. Farrugia, WinGX and ORTEP for Windows: an update, *J. Appl. Cryst.* 45(2012) 849-854.
- [34] L. J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows – a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565.
- [35] C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. Van de Streek Wood, P. A. Mercury, CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Cryst.* 41 (2008) 466-470.
- [36] C. P. D. Ribeiro, J. H. D. Sampaio, D. R. Cardoso, R. S. N. Ribeiro, A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mg SbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2003) 356-71
- [37] H. Rangel, F. Dagger, A. Hernandez, A. Liendo, J.A. Urbina, Naturally Azole-Resistant *Leishmania braziliensis* Promastigotes Are Rendered Susceptible in the Presence of Terbinafine: Comparative Study with Azole-Susceptible

Leishmaniamexicana Promastigotes, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 2785–2791.

[38] M.P. Nunes, L. Cysne-Finkelstein, B.C. Monteiro, D.M. De-Souza, N.A. Gomes, G.A. Dos-Reis, CD40 signaling induces reciprocal outcomes in Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu, Microb. Infect. 7 (2005) 78–85.

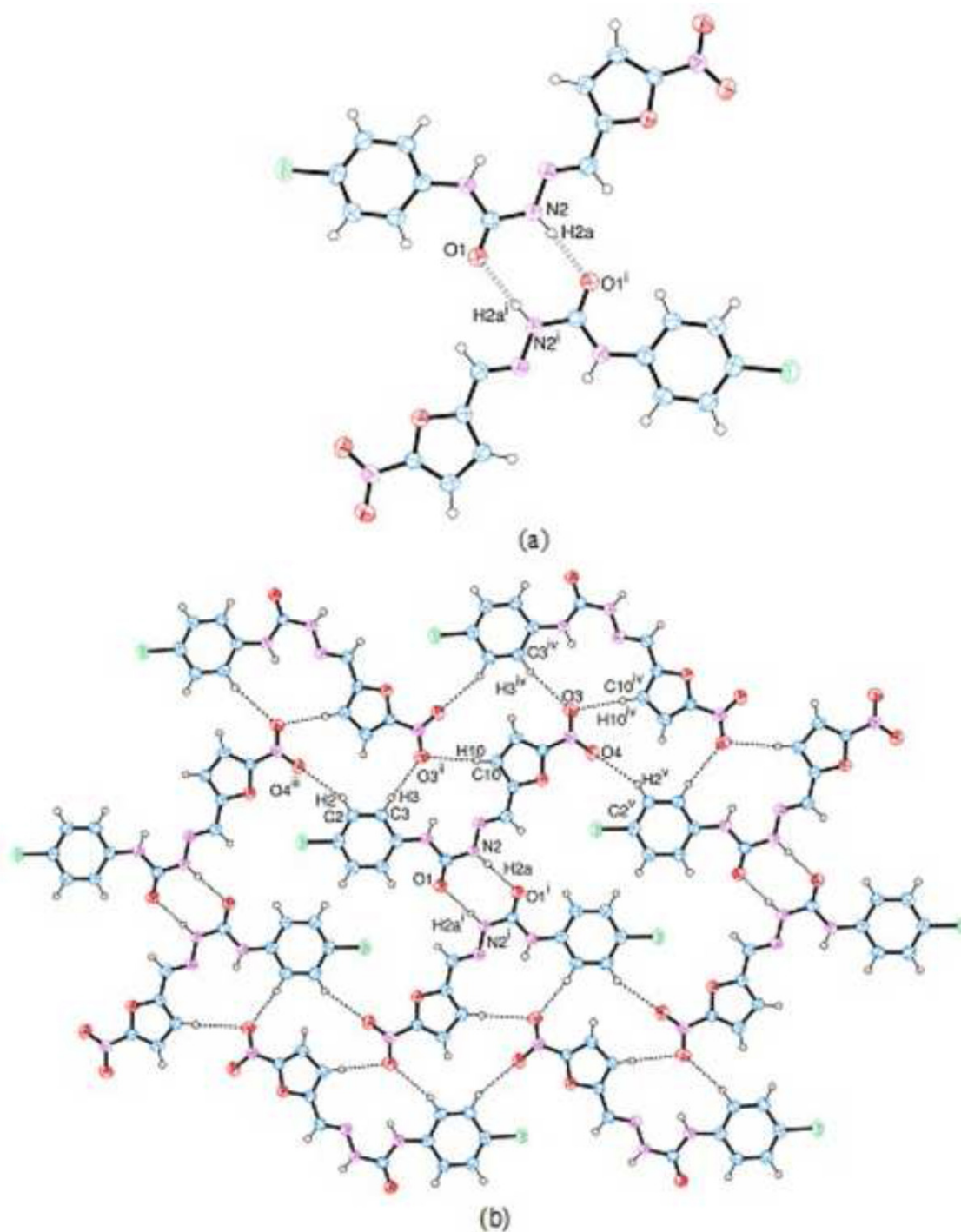
[39] M. D. Perry, E. Carvalho, E. Rosa, J. Iley, Towards an efficient prodrug of the alkylating metabolite monomethyltriazene: Synthesis and stability of *N*-acylamino acid derivatives of triazenes, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1049–1056.

Table 1S. Hydrogen bond angles (°) and distances (Å) for **7g**. The characters “D” and “A” refer to hydrogen bond donor and acceptor.

D – H ... A	d (D – H)	d (H ... A)	d (D ... A)	< (DHA)
N2-H2a...O1 ⁱ	0.88	1.97	2.831(2)	167.2
C3-H3...O3 ⁱⁱ	0.95	2.71	3.569(3)	150.3
C2-H2...O4 ⁱⁱⁱ	0.95	2.57	3.459(3)	155.3
C10-H10...O3 ⁱⁱ	0.95	2.56	3.496(3)	170.0

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms (as Figures 2): (i) -x, -y+1, -z+1; (ii) -x+2, y-1/2, -z+3/2; (iii) x, y-1, z

Figure 1S. (a) View of the centrosymmetric dimer formed for **7g**. (b) 2D network of **7g** stabilized by non-classical hydrogen bonds projected onto (-104)plane. [Symmetry codes: (i) $-x, -y+1, -z+1$; (ii) $-x+2, y-1/2, -z+3/2$; (iii) $x, y-1, z$; (iv) $-x+2, y+1/2, -z+3/2$; (v) $x, y+1, z$].



5 ARTIGO II DERIVADO DA TESE

Original Research Article

Novel Semicarbazone Derivatives As Promising Therapeutic Alternative in Leishmaniasis

Aline C. de Queiroz¹, Marina A. Alves^{2,3}, Luiz Carlos Alves⁴, Fábio André Brayner dos Santos⁴, Eliezer J. Barreiro^{2,3}, Lídia M. Lima^{2,3}, Magna S. Alexandre-Moreira^{1*}

Affiliation

¹*Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-Universidade Federal de Alagoas - UFAL*

²*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ*

³*Programa de Pós -graduação em Química- Instituto de Química - UFRJ*

⁴*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE*

***Corresponding author:**

Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil. Tel.: +55 82 32141527. Email: suzana.magna@gmail.com; magnasuzana@pq.cnpq.br

Abstract.

In this study was investigated the leishmanicidal activity of novel synthetic derivatives, designed from molecular modification on the prototype LASSBio-1064. Leishmanicidal effect against amastigote of *Leishmania amazonensis* were also evaluated at concentration of 100 μ M – 0.01 nM. The derivatives 7e, 7f, 7g and 7g, beyond of the standards miltefosine and pentamidine, significantly diminished the number of amastigotes parasites of the *L. amazonensis* into the macrophage. These derivatives were also actives against amastigotes *L. braziliensis*. As 7g presented a potent leishmanicidal activity against amastigotes of *L. amazonensis* inside macrophage, was also investigated the *in vivo* leishmanicidal activity of this compound against *L. amazonensis*. Then, 10^5 *L. amazonensis* promastigotes were inoculated subcutaneously into the right ear dermis of BALB/c mice and later treated with 7g (p.o. or i.p.), miltefosine (p.o.) or glucantime (i.p.) at 30 μ mol/kg x 28 days. Thus, similar lesion size reduction was observed by administration by oral route ($63.7 \pm 10.1\%$) and intaperitotically ($61.8 \pm 3.7 \%$) of 7g. The larger effect corresponding to treatment with miltefosine ($97.7 \pm 0.4\%$), however glucantime did not exhibit activity at dose used. With regards to the ear parasite load, 7g diminished the number of parasites by p.o ($30.5 \pm 5.1\%$) and i.p. ($33.3 \pm 4.3\%$) administration. In summary, the derivative 7g can be considered lead candidate for antileishmanial drugs since they presented pronounced leishmanicidal activity.

KEYWORDS: Semicarbazone; Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania braziliensis*; apoptosis; autophagy;

Introduction

Leishmaniasis is a major public health problem in new world and causing morbidity and mortality in tropical and subtropical regions of the world. According to WHO reports, it is estimated that 15-20 million infected and annually about three million people will threaten worldwide (1). The infection is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted through the bite of the sand fly vector. This group of diseases is characterized by symptoms that range from localized cutaneous lesions to mucocutaneous tissue destruction and the frequently fatal visceral form (2). Leishmaniasis current therapy is expensive, required long-term treatment and cause severe side effects (3). Therefore, new, efficient, cheap and safe alternatives for the treatment of leishmaniasis are greatly needed and several compounds including synthetic, natural products extracted from plants and marine sources have shown different degrees of efficacy in the treatment of experimental leishmaniasis (4–6).

In recent years, significant attention have been aroused to click chemistry for their easy and efficient synthesis of semicarbazone that has occupied an important position in medicinal chemistry owing to its chemotherapeutic effect such as antimicrobial, pesticide, herbicide, hypnotic, anticonvulsant, anti-leukemia, anti-hypertensive properties, or the ability of some of their Cu(II) complexes to mimic superoxide dismutase (SOD) activity (7). On the other hand, thiosemicarbazones and semicarbazones are classes of compounds with medical interest because of their capacity to inhibit the growth of several pathogens. These compounds present antiprotozoal (8), antitumoral (9), antibacterial (10) and antiviral activities (11).

Accordingly, our strategy to achieve a novel antileishmanial agent, this paper report the anti-leishmanial activity of two series of semicarbazones with interesting tools for the development of the desired compounds, due to their different electronic and lipophilic

properties that could lead to different biological responses (12, 13). In previous study, we demonstrated the antileishmanial (against *L. major*) and antitrypanosomal activity of the novel semicarbazone derivatives without significant toxic effects (14). The present study describes the effect of these compounds on intracellular amastigotes of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, and effect against cutaneous lesions in mice infected with *L. amazonensis*.

Materials and Methods

Parasite culture

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) were obtained from Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos at Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz. Promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM/BR/87/BA788) were obtained from Dra. Valéria de Matos Borges at the Gonçalo Moniz Research Center, Fiocruz-BA. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine at 27° C in BOD incubator.

Culture of J774.A1 murine macrophages

These adherent-phenotype macrophage line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% FBS at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂.

In vitro activity against amastigote forms of Leishmania and nitrite determination

To assess the activity of the test derivatives against the amastigote stage of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, were realized model of infection in coverglass (15). The murine

macrophages (J774.A1 cell line) were prepared in 24-well vessels (Corning) at 2×10^5 adherent cells/well, infected with 2×10^6 promastigotes in glass coverslips placed inside 1 ml medium culture. The cultures were cultured or not with the test derivatives or reference drugs (0.01-100 μM), and kept for 24h at 37 °C, 5% CO_2 . After 24h, coverslips were washed, stained with Giemsa-MayGrünwald, and intracellular amastigotes were counted in 100 macrophages. Data obtained from *in vitro* experiments were expressed as the Mean \pm S.E.M. of duplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a p value <0.05 or lower were considered significant.

Analysis of phospholipids externalization

In addition, double staining with annexin V-PE and 7-AAD was performed to measure the effects of pentamidine or derivatives (100 μM and 10 μM) on the plasma membrane of *Leishmania* promastigote cells. The expression of phospholipids in the outer membrane of treated and untreated *L. amazonensis* promastigote cells was monitored by labeling with annexin V-PE, and staining with 7-AAD was used to measure the permeability of the plasma membrane. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μM and 10 μM) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS and annexin V-PE and 7-AAD were added. Cells were incubated for 30 min in the dark prior to analysis by flow cytometry on Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Estimation of mitochondrial transmembrane electric potential

To determine changes in the mitochondrial membrane potential, we used Muse®, performed according to the manufacturer's instructions. The Muse™ MitoPotential kit utilizes the MitoPotential Reagent to detect changes the mitochondrial membrane potential. A dead cell marker is also used as an indicator of cell membrane structural integrity. It is excluded from live, healthy cells, as well as early apoptotic cells. Quantitative data (percentages and concentrations) is generated for 4 populations of cells: live, depolarized, depolarized/dead, and dead cells. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS and Muse® MitoPotential Reagent and 7-AAD were added. Cells were incubated for 30 min in the dark prior to analysis by flow cytometry on Muse™ Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Determination of Caspase-like proteases

To determine the percentage of caspase-positive cells, we used Muse™ Multicaspase kit, performed according to the manufacturer's instructions. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS. Muse® Multicaspase Reagent and after 7-AAD were added. Data acquisition was carried out using a Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Determination of presence of autophagic LC3

To determine the percentage of caspase-positive cells, we used Muse™ Autophagy LC3-antibody based kit, performed according to the manufacturer's instructions. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS. The cells were permeabilized and after anti-LC3 Alexa Fluor®555 conjugated antibody were added. Data acquisition was carried out using a Muse™ Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Analysis of the cell cycle progression

Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^5 cells) were treated with doses of derivatives of 100 μ M or 10 μ M for 48. After, cells were fixed in chilled 70% ethanol for 3h. After washing the cells in PBS, the resultant pellet was resuspended in 7-AAD and incubated in the dark for 30 min. Data acquisition was carried out using a Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse® 1400 Analysis software.

Scanning Electron Microscopy

Controls (medium or DMSO 0.1%), 7g- or miltefosine-treated promastigotes of *L. chagasi* at 100 were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4% paraphormaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and postfixed in a solution containing 1% OsO₄, 1.25% potassium ferrocyanide and 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. For scanning electron microscopy, promastigotes were dehydrated in ethanol, critical point-dried in CO₂, mounted on stubs, sputtered with a thin gold layer and observed under a JEOL T-200 scanning electron microscope.

In vivo activity against L. amazonensis

This study (protocol number 2013.02) was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil). All animals received humane care in compliance with the 'Principles of laboratory animal care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the care and use of laboratory animals' prepared by the National Academy of Sciences (Washington, DC). Then, 10^5 stationary promastigotes (5 days of culture in Schneider's medium) of *L. amazonensis* were inoculated subcutaneously into the right ear dermis of 6-week-old female BALB/c mice weighing ca. 20 g. and later treated with 7g (i.p. or p.o.), miltefosine (p.o.) or meglumine antimoniate (i.p.) at 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ x 28 days. The lesion size was measured using a paquimeter (16). The parasite loads of infected ears and draining lymph nodes were determined using a quantitative limiting-dilution assay (17). Toxicity of complexes was also evaluated due to alterations on spleen weight and by biochemistry dosages in plasma, performed according to the manufacturer's instructions (Doles, BRA). Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

Results

For evaluation of anti-leishmanial properties of target compounds, the *in vitro* activity was assessed against amastigote (intramacrophage parasite) of *L. amazonensis* at concentration of 30 μM (**Figure 1**) and it was observed that 6g, 7a, 7e, 7f and 7g diminished the number of intracellular amastigotes. Then, considering everyone else *in vitro* results,

some derivatives were selected to determination of IC₅₀ value (*i. e.* the sample concentration causing 50% reduction in survival/viability of the parasites) for intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*. The IC₅₀ values of compounds against amastigotes of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* are presented in **Table 1**.

Interestingly, the derivatives 6g, 7e, 7f and 7g and reference drugs miltefosine and pentamidine decreased the number of intracellular amastigotes of *L. amazonensis* per macrophage (**Table 1**), with IC₅₀ value of 16.7 ± 2.3 , 39.8 ± 8.2 , 3.5 ± 0.6 and 23.8 ± 0.3 μM , while maximum effect were 81.5 ± 1.6 , 66.1 ± 3.4 , 93.2 ± 2.0 and $71.6 \pm 1.6\%$, respectively. It is notable that 7g was the most effective compound against amastigote forms of *L. amazonensis*, presentind efficacy and potency higher than miltefosine and pentamidine. These derivatives were also active against amastigotes *L. braziliensis*. The most active derivatives agaist *L. braziliensis* were 7a and 7e, with IC₅₀ of 2.7 ± 0.3 and 4.2 ± 1.1 μM , which were more potent than pentamidine (IC₅₀ of 78.4 ± 4.7 μM) or miltefosine (IC₅₀ of 32.1 ± 1.1 μM). The other derivatives 7f (IC₅₀ of 81.5 ± 5.9 μM), 7g (IC₅₀ of 31.7 ± 5.8 μM) and 6g (IC₅₀ of 89.7 ± 5.8 μM) were as potent as reference drugs.

Interestingly, the *in vitro* treatments with 7g at 100 μM and 10 μM were able to induce apoptosis in promastigote forms of *L. amazonensis* after 48 h incubation (more than 60% cells with surface binding of annexin V) and caused more than 70% depolarization of mitochondrial membrane of these parasites, such as show the results in **Figure 2A and 2C**. Also, 7g at 100 μM for 48h incresed the percentage of caspase-positive *L. amazonensis* promastigotes, such as pentamidine (**Figure 2D**). Also, 7g induce exacerbated autophagic process too (more than 50%) (**Figure 2D**). Additionally, 7g at 10 μM elevated the number of *L. amazonensis* promastigotes at G0/G1 phase of cell cycle and reduced the population of *L. amazonensis* promastigotes in S phases of cell cycle (**Figure 2E**).

Moreover, 7g did not induced unregulated necrosis which is a widely reported cell death subtype that is classically defined as premature cell death occurring without molecular and morphological markers of apoptosis or autophagy (18). Necrosis is also characterized by irreversible disruption of plasma membrane integrity, organelles breakdown and randomly fragmented DNA death (19). Treatments with 7g (100 μ M and 10 μ M) for 48h did not alter the percentage of cells labeled with 7-AAD (**Figure 2B**), demonstrating that the parasites did not suffer cell membrane damage and, probably, did not undergo a necrotic process.

Despite 7g didn't have leishmanicidal activity against amastigote of *L. chagasi* until 100 μ M (data not shown), scanning electron microscopy revealed that 7g at 100 M for 48h was able to induce dramatic morphological alterations in the promastigote forms of *L. chagasi* compared with untreated parasites, which showed typical characteristics, with an elongated shape and free flagellum. **Figure 3** shows alterations in shape and size and cellular disintegration in 7g treated parasites. The treatment with 7g induced morphological changes reminiscent of axenic amastigotes, including oval cell shape and shortened and retracted flagella. In addition, 7g also caused profound changes in the plasma membrane.

The compound 7g was also chosen to evaluation of its *in vivo* leishmanicidal activity against *L. amazonensis*. Thus, similar lesion size reduction was observed by administration by oral route ($63.7 \pm 10.1\%$) and intaperitotally ($61.8 \pm 3.7\%$) for dose of 30 μ mol/kg x 28 days of 7g (**Figure 4**). The larger effect corresponding to treatment with miltefosine ($97.7 \pm 0.4\%$), however glucantime did not exhibit activity at the dose used. With regards to the ear parasite load (**Figure 5**), 7g diminished the number of parasites by p.o ($30.5 \pm 5.1\%$) and i.p. ($33.3 \pm 4.3\%$) administration. Only miltefosine treatment decreased the parasite load from draining lymph nodes. In addition, *in vivo* treatment with 7g did not induce alterations of alanine

aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine and urea in plasma of animals (**Figure 6**) or spleen weight (**Figure 7**).

Discussion and Conclusion

Semicarbazones present a wide range of biological activities, including the antiprotozoal effect. Generally, the action mechanisms of these compounds involve enzyme inhibition by the complexes formation with endogenous metals, redox reaction, through the DNA interactions or DNA synthesis inhibition (7). The leishmanicidal activity of semicarbazones tested in this study is comparable to that obtained recently by Benítez and co-workers (20), that showed good leishmanicidal activity of semicarbazones and its vanadium complexes against promastigotes and amastigotes of *L. panamensis* and *L. chagasi* with IC₅₀ values ranging from 1.33 to 33.39 µM with and high parasite/mammalian cells selectivities.

Greenbaum and co-workers (8) suggested that the mechanisms of action are complex involving multiple targets, same as enzyme, redox reactions, DNA or inhibition of its synthesis and previous studies on semicarbazones and thiosemicarbazones have proposed their use in the treatment of leishmaniasis, trypanosomiasis and malaria due to their potency to inhibit the cysteine proteases of the protozoan parasite i.e. *Leishmania sp*, *Trypanosoma sp* and *Plasmodium sp*. (21).

In vitro and *in vivo* studies also have demonstrated that the viability of the *Leishmania* parasites is reduced by inhibitors of cysteine proteases (22, 23). Among others, cysteine proteinases play a key role in the penetration of the parasite into host cells, participate in the nutrition of the parasite at the expense of the host, and are involved in the escape mechanisms of the parasite from the host's immune system (24). Like *Trypanosoma* and *Plasmodium*,

Leishmania synthesize cathepsin-L-like cysteine proteases that are essential to their pathogenicity (25). In fact, cysteine protease inhibitors block *Leishmania* replication and differentiation, providing an alternative to traditional therapy in drug-resistant parasites (26).

The cruzain, the major cysteine protease of *T. cruzi*, share sequence similarity with homologous cysteine proteases from *L. major*, *L. mexicana* and *L. pifanoi* (27, 28). Additionally, the substrate recognition of one cysteine protease of *L. mexicana*, named CPB.8 Delta CTE, has been demonstrated to be similar to the substrate preferences of cruzain (29, 30). Therefore, cysteine protease also represent a potential chemotherapeutical target against *Leishmania* infections (21). In addition, thiosemicarbazone moiety has been described as the pharmacophore group of some cruzain inhibitors (8, 31). In 2010, Trossini and co-workers investigated the activity of semicarbazone derivatives against cruzain using molecular modeling and cruzain inhibition assays. They found that the carbonyl group and the catalytic amino acid Cys25 of the enzyme interacted (32). Thus, it seems that the antileishmanial properties of the semicarbazone derivatives verified in this work might be associated, in part, through cysteine protease inhibition.

Further, the semicarbazone series exhibited a specific and consistent structure-activity relationship. In particular, the change of the 4-chlorophenyl moiety into a 1,3-benzodioxole resulted in leakage of activity against amastigote of *L. amazonensis*, with exception of the 5-nitrofurans derivatives 6g. For compounds with 4-chlorophenyl ring, among the different substituents on imine group 4-propylphenyl (7e), 3-hydroxy-4-methoxyphenyl (7f) and 5-nitrofurans (7g) appear to be important to the leishmanicidal compounds against *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. On the other hand, the derivatives with 4-propylphenyl (7e) and 3-hydroxy-4-methoxyphenyl (7f) as substituents on imine group present the best activity

against *L. braziliensis*, what it is indicative that the hydroxyl group is important against amastigotes *L. braziliensis*.

In special, 7g designed as a 5-nitrofuranyl derivative containing 4-chlorophenyl in the semicarbazone, with potent leishmanicidal activity against intramacrophage amastigotes of *Leishmania amazonensis* [IC₅₀ value of 3.5 μ M and maximum effect of 93.2 %], was found to be the most active compound.

The use of nitroheterocycles such as 5-nitrofuranyl derivatives as antibacterial, antifungal and antiprotozoal is well established (33, 34). Aromatic nitro groups, as are present on 6g and 7g, are known to have significant biological redox activity leading to the potentially cytotoxic production of ROS. ROS production, in addition, could be correlated with disruption of mitochondria which was promoted by 7g. The nitrocompounds mode of action involves the biotransformation of the nitro group, releasing intermediates in the redox process (35, 36). Nitroheterocyclic prodrugs must undergo enzyme-mediated activation within the pathogen to have cytotoxic effects, a reaction catalyzed by nitroreductases (37).

Nitroheterocyclics have not been used in the treatment of leishmaniasis, and as a result, relatively little is known about their mechanism of action against leishmania parasites (38). In African trypanosomes, nitroheterocyclic drugs, such as nifurtimox and benznidazole, have the mode of action against the parasite of both drugs is associated with the bioreduction of the nitro moiety and a similar mechanism has been observed for other nitroheterocyclic antiparasitic agents (39).

Initially it was proposed that the trypanocidal action of nifurtimox was due to its ability to induce oxidative stress through 1-electron reduction of its nitrogroup and the subsequent formation of superoxide anions via a futile cycle. However, more recent studies have shown that the above process does not occur to such a degree to cause toxicity to the

parasites and that a type I NADH-dependent nitroreductase (NTR) is responsible for nifurtimox and benznidazole trypanocidal activity. This enzyme mediates a series of 2 electron reduction reactions resulting in the fragmentation of the heterocyclic ring and generation of a cytotoxic, unsaturated open-chain nitrile derivative (40, 41).

Moreover, overexpression of the leishmanial homolog of this nitroreductase in *L. donovani* was found to increase sensitivity to fexinidazole 15-fold, a 2-substituted 5-nitroimidazole in phase II clinical trials for treating visceral leishmaniasis in Sudan, and sensitivity to nifurtimox 19-fold, indicating that similar mechanisms may be involved in *L. donovani* and the African trypanosome, *Trypanosoma brucei*. These data, combined with the observation that the loss of a single chromosomal copy of the *L. donovani* NTR gene resulted in parasites that were mildly resistant to several nitroheterocyclic compounds, confirm that the *Leishmania* NTR plays a pivotal role in the activation of nitro drugs in general (42). Consequently, our hypothesis is that the compound 7g could act *via* a dual mechanism inhibiting enzymes, *via* the semicarbazone moiety, and producing oxidative stress *via* the 4-nitrofuryl moiety, but further studies are needed to prove this mode of action.

Interestingly, 7g also induced apoptosis-like cell death in *L. amazonensis* promastigotes at 100 μ M and 10 μ M after 48 h incubation (the treatment promoted surface binding of annexin V and loss of mitochondrial transmembrane potential). The term apoptosis is a description of the biochemical processes and morphological features leading to controlled cellular self-destruction (43) and this kind of cell death is now considered a prerogative of unicellular organisms, including the trypanosomatids of the genera *Leishmania* spp. Once apoptosis is triggered, a cascade of events common to mammalian apoptosis takes place such as exposition of *phospholipids* in the outer leaflet of the plasma membrane (44). Moreover, the dysfunction of mitochondria is also one of the hallmarks of apoptosis often

associated with changes in mitochondrial membrane potential, a key indicator of mitochondrial function that maybe either a consequence of or an early requirement for apoptosis (45). In trypanosomatids too, both an increase and a decrease in respiration and both hyperpolarisation and loss of mitochondrial membrane potential maybe linked with apoptosis in trypanosomatids demonstrating the importance of maintenance of proper mitochondrial transmembrane potential in these parasites (46).

Additionally, Caspase-like activation occurs in 7g-mediated apoptosis. (**Figure 2D**). Caspases are the main proteases activated during mammalian apoptosis mediating cleavage of a variety of proteins leading ultimately to cell death (47), but it is known that mechanisms concerning life or death decisions in protozoan parasites are still imperfectly understood (48). Comparison with higher eukaryotes has led to the hypothesis that caspase-like enzymes could be involved in death pathways, however *Leishmania* does not encode caspase(s) (49). Moreover, the caspases-like activity may be performed by some other sequence unrelated protease that is still unidentified in *Leishmania* (50). It was related that caspase-3/7-like activation can be induced by a number of stimuli despite the absence of genes encoding caspases within the *L. major* genome. On the other hand, the trigger for this activation of caspases is not clear in *Leishmania* system, but may involve the leakage of cytochrome *c* from mitochondria and activation of a caspase-9-like enzyme to activate caspase-3/7 or, alternatively, the caspase-8-like or caspase-12 enzyme activation could induce caspase-3/7 activation (51, 52).

Another form of regulated cell death is autophagic cell death. In classical apoptosis, or type I programmed cell death, there is early collapse of cytoskeletal elements but preservation of organelles until late in the process. In contrast, in autophagic, or type II, programmed cell death, there is early degradation of organelles but preservation of

cytoskeletal elements until late stages (53) In this study, the anti-LC3 Alexa Fluor®555 conjugated antibody was performed to evaluate a possible autophagic programmed cell death in promastigotes treated with 7g at 100 μ M and 10 μ M for 48h by flow cytometer analysis (**Figure 2E**). The treatment with 7g at 100 μ M for 48h alter the autophagy induction ratio of promastigotes, indicating that antiproliferative activity of these derivatives likely result from an exacerbated autophagic process too.

The visualization of autophagosomes in dying cells has led to the belief that autophagy is a nonapoptotic form of programmed cell death (54). Macroautophagy, generally known as autophagy (55), is an intracellular catabolic mechanism for the degradation of long-lived proteins and organelles and the recycling of their constituents. Despite the plethora of pro-survival roles for autophagy, under certain circumstances it seems to also execute a specific regulated cell death subtype known as autophagic cell death. Indeed, autophagic cell death indeed represents a potential protozoan regulated cell death modality. The cellular apparatus required for autophagy is widely conserved among parasitic protozoa (56). Consistent with other organisms, parasitic protozoa undergo autophagy as a response to nutrient starvation (57). Importantly, however, autophagy also directly influences parasite virulence by mediating cellular remodelling during life cycle differentiation in *Leishmania* spp. and by maintaining mitochondrial function in *L. major* (58, 60).

Several compounds have been also shown to cause ultrastructural alterations in *Leishmania* that can be related to autophagy. *L. chagasi* and *L. amazonensis* promastigotes treated with yangambin also showed features of both apoptosis and autophagy (61). It has been reported that *L. amazonensis* parasites treated with amiodarone presented the formation of large autophagosomes that contained part of the cytoplasm and membrane profiles (62). Antimicrobial peptides were also able to cause the death of *L. donovani* promastigotes with

the appearance of vacuoles that were stained with monodansylcadaverine, a biochemical marker of autophagy (60). Finally, the aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitor 13b induced cell death in *L. major* promastigotes, which presented accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles at an early phase of the dying of the parasites, however death seemed to finally occur by an apoptosis-like death mechanism (63).

Finally, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after treatment with 7g at 100 μ M and 10 μ M for 48h (**Figure 2F**). The treatments of promastigotes of *L. amazonensis* with 7g for 48h were able to induce drastic changes in the cell cycle of the parasites (**Figure 2F**). 7g at 10 μ M induced a significant increase in the proportion of cells in the G0/G1 phase, stage of cell cycle will have one copy of DNA. On the other hand, this treatment also induced a marked reduction in DNA replication, with a decrease in the number of cells in S phase when compared either to control cells or cells exposed only to DMSO.

Although the best *in vitro* model for antileishmania drug screening remains the use of intracellular amastigotes, all *in vitro* data should ideally be confirmed in an *in vivo* model before final conclusions. As 7g had higher leishmanicidal effect than miltefosine and pentamidine against *L. amazonensis* amastigotes, this compound was tested in the experimental model of infection with *L. amazonensis*. Our data reveal a significant effect of 7g in the reduction of ear lesions caused by *L. amazonensis* in BALB/c mice. Effectiveness was apparent not only as reduced swelling and ulceration in treated animals but also as an important reduction in local parasite burden in infected ear, but not systemically in draining lymph node. Although the treatment with miltefosine, at 30 μ mol/kg/day x 28 days, p.o., was unique to reduce both local and sistemical parasite load, *in vivo* leishmanicidal activity of 7g (i.p and p.o.) was higher than glucantime (i.p.) at same dose. This pentavalent antimonial is used as one of the firstline drugs for treatment of leishmaniasis (64) and just had effect against

size lesion and did not decreased parasite load in both ear and limph node at same dose. The lack of clinical or parasitological response to glucantime in *L. amazonensis* BALB/c infected mice has been reported previously (65) and higher dose of this antimonial is necessary to have similar effect of 7g or miltefosine.

Since semicarbazones can be able to inhibit cysteine proteinase and nitrofuran can generate cytotoxic metabolites, these possibility of 7g mode of action is now under investigation. Future experiments will address the effects of these compound on infected macrophages or promastigote forms and dissect the basis for the *in vivo* reduction in parasite number that we report here. Thus, we will continue this study to evaluate the inhibitory effects of theses analogs on cysteine protease and of *Leishmania* as well as other validated chemotherapeutic target, such as topoisomerase.

In summary, the effectiveness of semicarbazones derivatives tested in destroying *L. amazonensis* and *L. braziliensis* *in vitro* at concentrations non toxic to the host cells and *in vivo* by intaperitoneal or oral administration against *L. amazonensis* support further studies of the leishmanicidal activity of the semicarbazone derivatites as an additional choice to available chemotherapies. These datas also opens perspectives to explore the potential of 7g as another option for the chemotherapy of leishmaniasis, encouraging us to extend these studies for treatment of visceral leishmaniasis.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos for kindly provided promastigotes of L. amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016), to Dr. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research for having provided L. braziliensis (MHOM/BR/87/BA788). The authors are grateful to the CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-

INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ (404344/2012-7) and FAPCAL (Pronem 20110722-006-0018-0010) for the joint funding of this research project. The authors wish to thank several of their colleagues working at the UFAL and UFRJ for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACQ MAA LML MSAM. Performed the experiments: ACQ MAA. Analyzed the data: ACQ MAA EJB LML MSAM. Contributed reagents/materials/analysis tools: EJB LML MSAM. Wrote the paper: ACQ MAA.

References

1. **Sereno D, da Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaisi A.** 2007. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol. Int.* **56**: 3-7.
2. **Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M.** 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 873-882.
3. **Sundar S, Chakravarty J.** 2013. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert. Opin. Pharmacother* **14**:53-63.
4. **Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV.** 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* **15**: 525–532.
5. **Sen R, Chatterjee M.** 2011. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* **18**: 1056–1069.

6. **Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG.** 2011. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* **77**: 572–585.
7. **Beraldo H, Gambino D.** 2004. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**: 31-39.
8. **Greenbaum DC, Mackey Z, Hansell E, Doyle P, Gut J, Caffrey CR, Lehrman J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Chibale K.** 2004. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **47**: 3212-3219.
9. **Chorev M, Goodman M.** 1993. A dozen years of retro-inverso peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **26**:266–273
10. **Dobek AS, Klayman DL, Dickson ET, Jr, Scovill JP, Tramont EC.** 1980. Inhibition of clinically significant bacterial organisms in vitro by 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **18**:27–36.
11. **Lam PYS, Jadhav PK, Eyermann CJ, Hodge CN, Ru Y, Bacheler LT, Meek JL, Otto MJ, Rayner MM, Wong YN, Chang C-H, Weber PC, Jackson DA, Sharpe TR, Erickson-Viitanen S.** 1994. Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science* **263**:380- 384.
12. **Cerecetto H, Di-Maio R, Ibarruri G, Seoane G, Denicola A, Peluffo G, Quijano C, Paulino M.** 1998. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. *Farmaco* **53**: 89–94.
13. **Aguirre G, Boiani M, Cabrera E, Cerecetto H, Di-Maio R, González M, Denicola A, Sant’Anna CMR, Barreiro EJ.** 2006. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth-3D-QSAR (COMFA) studies. *Eur. J. Med. Chem.* **41**: 457–466.

14. **Alves MA, Queiroz AC, Alexandre-Moreira MA, Varela J, Cerecetto H, González M, Doriguetto AC, Landre IM, Barreiro EJ, Lima LM.** Design, synthesis and *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities of novel semicarbazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*
15. **Nunes MP, Cysne-Finkelstein L, Monteiro BC, De-Souza DM, Gomes NA, Dos-Reis GA.** 2005. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Microbes and Infection* **7**: 78-85.
16. **Pereira JC, Carregaro V, Costa DL, da-Silva JS, Cunha FQ, Franco DW.** 2010. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. *Eur. J. Med. Chem* **45**: 4180-4187.
17. **Taswell C.** 1986 Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny. *In* Pretlow TC, Pretlow TP(ed), *Cell Separation: Methods and Selected Applications*. Academic Press, New York, pp. 109-145
18. **Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell Death.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell. Death. Differ.* **16**: 3–11.
19. **Guimarães CA, Linden R. Programmed cell deaths.** 2004. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1638–1650.

20. **Benítez J, Becco L, Correia I, Leal SM, Guiset H, Pessoa JC, Lorenzo J, Tanco S, Escobar P, Moreno V, Garat B, Gambino D.** 2011. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements
J. Inorg. Biochem. **105**: 303–312.
21. **Cohen FE, Du X, Guo C, McKerrow JH.** 2002. Thio semicarbazone and semicarbozone inhibitors of cysteine proteases and methods of their use. US Patent US 7495023 B2.
22. **Maekawa Y, Himeno K, Ishikawa H, Hisaeda H, Sakai T, Dainichi T, Asao T, Good RA, Katunuma N.** 1998. Switch of CD4+T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. J. Immunol. **161**: 2120–2127.
23. **Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, Schirmeister T, Moll H.** 2006. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. Antimicrob. Agents. Chemother. **50**: 2439–2447.
24. **Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH.** 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host–parasite interactions. Curr. Opin. Microbiol. **1**: 455–460.
25. **Selzer PM, Chen X, Chan VJ, Cheng M, Kenyon GL, Kuntz ID, Sakanari JA, Cohen FE, McKerrow JH.** 1997. Leishmania major: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. Exp. Parasitol. **87**:212-221.
26. **McKerrow JH.** 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. Int. J. Parasitol. **29**: 833–837.
27. **Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD.** 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of Leishmania mexicana. Mol. Microbiol. **6**:1925-1832.

28. **Rafati S, Sadmanian AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N.** 2001. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**:35-43.
29. **Alves LC, Melo RL, Cezari MH, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH, Juliano L, Juliano MA.** 2001. Analysis of the S(2) subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**:137-143.
30. **Alves LC, Judice WA, St Hilaire PM, Meldal M, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH, Juliano L, Juliano MA.** 2001. Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**:1-9.
31. **Chiyanzu I, Hansell E, Gut J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Chibale K.** 2003. Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 3527-3530.
32. **Trossini GHG, Malvezzi A, Do-Amaral AT, Rangel-Yagui CO, Izidoro MA, Cezari MH, Juliano L, Chung MC, Menezes CMS, Ferreira EI.** 2010. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **25**: 62-67.
33. **Pires JR, Saito C, Gomes SL, Giesbrecht AM, Amaral AT.** 2001. Investigation of 5-nitrofuran derivatives: synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **44**: 3673-3681.
34. **Muelas-Serano S, Perez-Serrano J, Gomez-Barroi A, Aran VJ, Rodriguez-Caabeiro F.** 2002. Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **88**: 97-101.

35. **Kovacic P, Becvar LE.** 2000. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Pharm. Des.* **6**:143-167.
36. **Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien P.** 2005. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *J. Curr. Med. Chem.* **12**: 2601-2623.
37. **Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Chatelain E, Kaiser M, Wilkinson SR, McKenzie C, Ioset JR.** 2012. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-based Amides and Sulfonamides as Potential anti-Trypanosomal Agents. *J. Med. Chem.* **55**: 5554–5565.
38. **Wyllie S, Patterson S, Fairlamb AH.** 2013. Assessing the Essentiality of *Leishmania donovani* Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **57**: 901–906.
39. **Otero L, Maya JD, Morello A, Rigol C, Barriga G, Rodríguez J, Folch C, Norambuena E, González M, Azar CO, Cerecetto H, Gambino D.**2008. Insight into the Bioreductive Mode of Action of Antitrypanosomal 5- Nitrofuryl Containing Thiosemicarbazones. *Med. Chem.* **4**:11-17.
40. **Hall BS, Bot C, Wilkinson SR.** 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* **286**:13088–13095.
41. **Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS.** 2011. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**:2072–2084.
42. **Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FR, Norval S, Kime R, Read KD, Fairlamb AH.**2012. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci. Transl. Med.* **4**:119re1.
43. **Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, MacLeod ET, Lüder CGK, Fasel N, Hurd H.** 2010. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit. Vectors* **3**:104.

44. **Sudhandiran G, Shaha C.** 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **278**: 25120-25132.
45. **Ly JD, Grubb DR, Lawen A.** 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**:115-128.
46. **Mehta A, Shaha C.** 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**:11798-11813.
47. **Li J, Yuan J.** 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**: 6194–6206.
48. **Meslin B, Zalila H, Fasel N, Picot S, Bienvenu AL.** 2011. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit. Vectors* **4**:26.
49. **Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Buttner S, Meisinger C, Kroemer G, Madeo F.** 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell. Death. Differ.* **17**: 763–773.
50. **Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchettin G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De-Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz**

- DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436–442.
51. Chen CY, Juo P, Liou JS, Li CQ, Yu Q, Blenis J, Faller DV. 2001. The recruitment of Fas-associated death domain/caspase-8 in Ras-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.* **12**: 297–306
52. Eichler T, Ma Q, Kelly C, Mishra J, Parikh S, Ransom RF, Devarajan P, Smoyer WE. 2006. Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway. *Toxicol. Sci.* **90**: 392–399.
53. Lockshin RA, Zakeri Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 2405–2419.
54. Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**: 2679–2688.
55. Klionsky DJ, et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**: 445–544.
56. Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA. 2011. Autophagy in protists. *Autophagy* **7**: 127–158.
57. Williams RAM, Smith TK, Cull B, Mottram J C, Coombs GH. 2012. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* **8**: e1002695.

58. **Williams RAM, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH.** 2006. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.* **61**: 655–674.
60. **Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T.** Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.* **127**: 23–35 (2003).
61. **Monte-Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Oliveira MR, Figueiredo RC.** 2011. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Exp. Parasitol.* **127**: 215–221.
62. **deMacedo-Silva ST, de Oliveira-Silva TL, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC.** 2011. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *leishmania amazonensis*. *Mol. Biol. Int.* **2011**: 876021.
63. **Schurigt U, Schad C, Glowa C, Baum U, Thomale K, Schnitzer JK, Schultheis M, Schaschke N, Schirmeister T, Moll H.** 2010. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 5028–5041.
64. **Goto H, Lindoso JA.** 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **8**: 419–433.
65. **Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RC, Cardoso JE, de Oliveira-Silva F, Maciel FC, Rabello A, Ferreira LA.** 2005. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop.* **93**: 161–167.

Figures Legends

Figure 1. Effect of Pentamidine, LASSBio 1064 and semicarbazone derivatives against amastigote forms of *L. amazonensis* at concentrations of 30 μ M.

Figure 2. *L. amazonensis* promastigotes death analysis using flow cytometry upon treatment with pentamidine and 7g for 48h. (A) Phospholipids externalization; (B) Plasma membrane permeabilization by necrosis; (C) Measurement of mitochondrial membrane potential; (D) Determination of presence of Caspase-like proteases; (E) Determination of presence of autophagic LC3; (F) Cell cycle analysis. mitochondrial transmembrane potential and with the DNA-binding dye 7-AAD to investigate plasma membrane integrity by flow cytometry. Values represent means \pm SEMs for three samples.

Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) of *L. chagasi* promastigotes. Control parasites (A) and vehicle control (B) or promastigotes that were treated with miltefosine (C) or 7g (D) at 100 μ M for 48 h.

Figure 4. *In vivo* efficacy of 7g, miltefosine and glucantime treatments (30 μ mol/kg/day x 28 days) in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. A) Progression of lesion thickness of infected ear. Lesion sizes were monitored weekly. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. B) Macroscopical evaluation of lesions in untreated and treated mice at day 28 post-infection.

Figure 5. Parasite burden throughout the course of 7g, miltefosine and glucantime treatments (30 μ mol/kg/dia x 28 days) in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*.

(A) Log₁₀ of parasites loads of the infected ear. (B)) Log₁₀ of parasites loads of the draining lymph node. The parasite loads of infected ears and draining lymph nodes were determined using a quantitative limiting-dilution assay. Values are the mean of parasites loads in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

Figure 6. *In vivo* effect of 7g, miltefosine and glucantime treatments (30 μ mol/kg/dia x 28 days) on serum ALT (A), AST (B), creatinine (C) and urea (D) levels of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Lesion sizes were monitored weekly. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

Figure 7. *In vivo* effect of 7g, miltefosine and glucantime treatments (30 μ mol/kg/dia x 28 days) in spleen weight of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Spleen weight was verified in last day of treatment. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

Figure 1

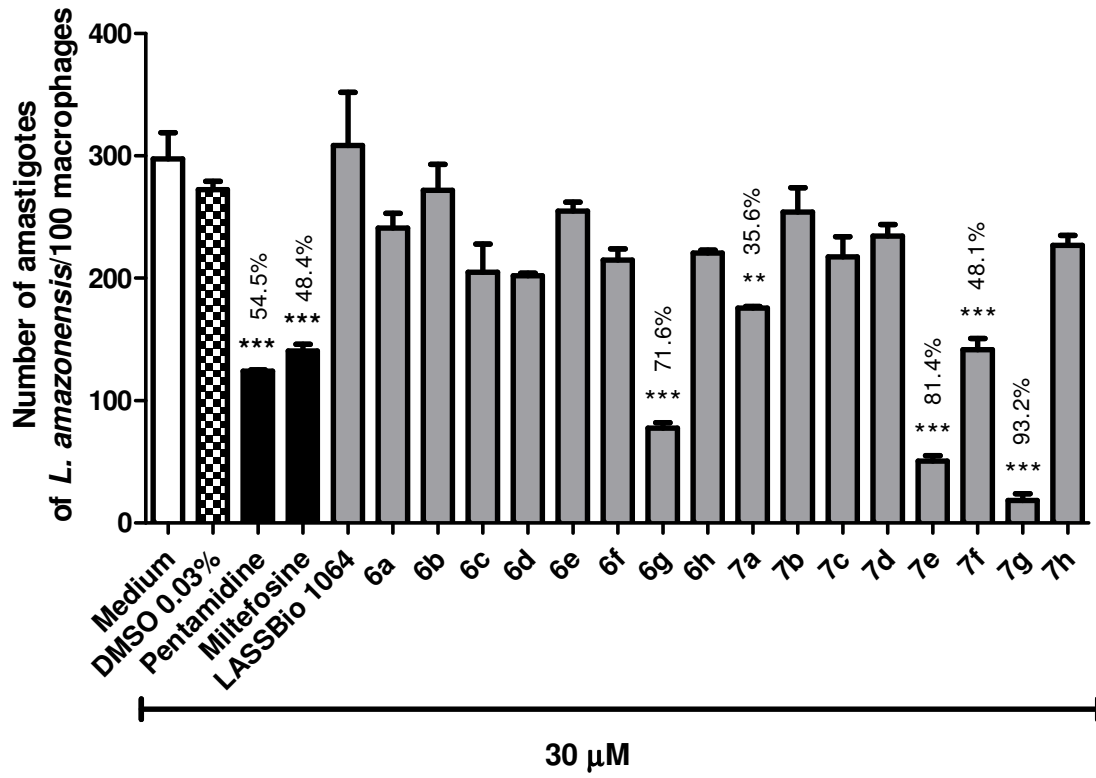
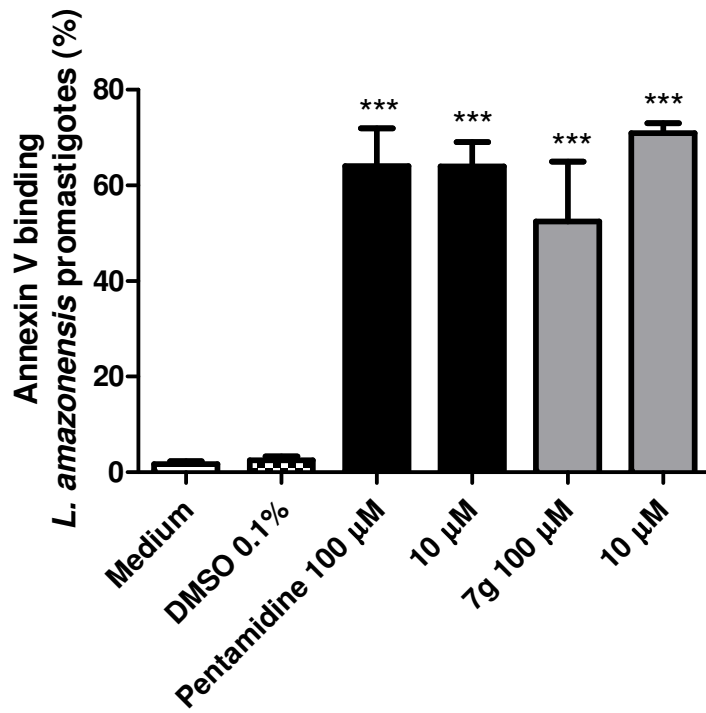
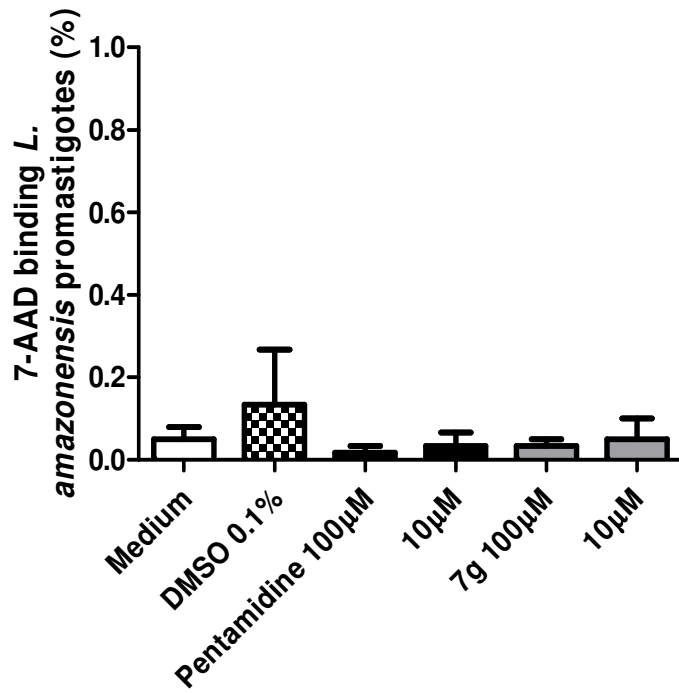


Figure 2

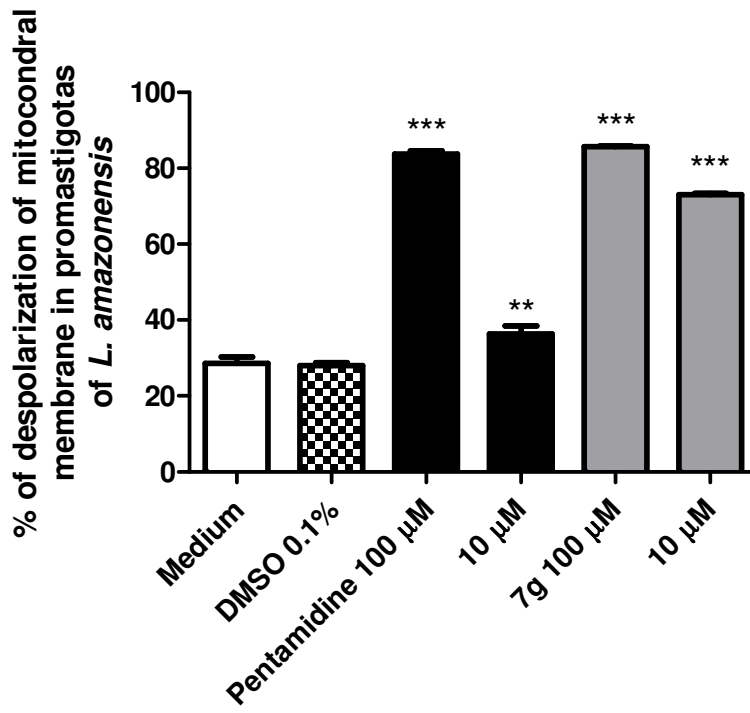
(A)



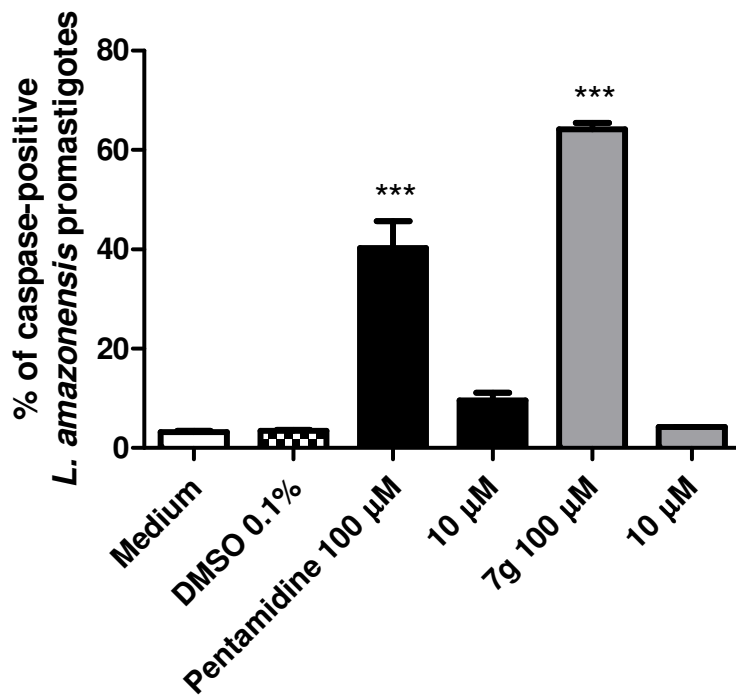
(B)



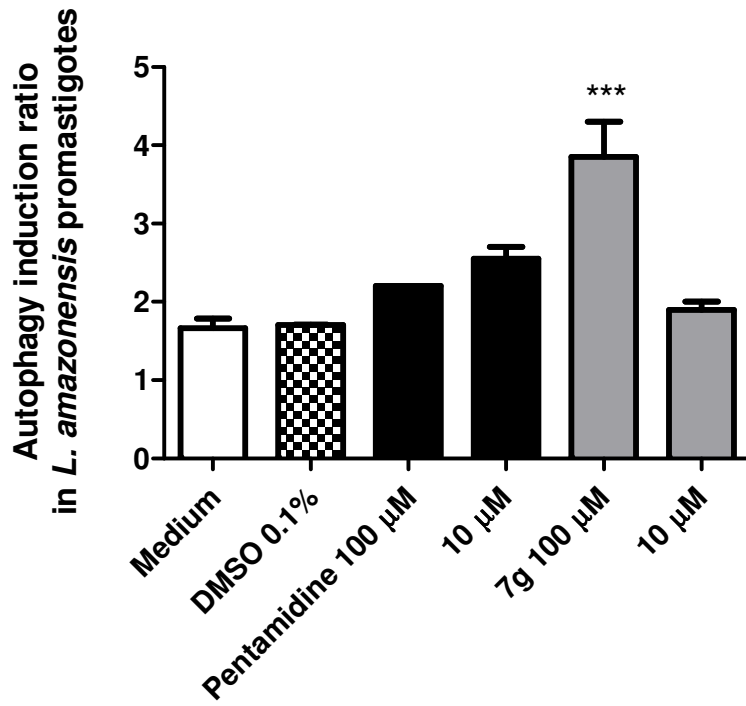
(C)



(D)



(E)



(F)

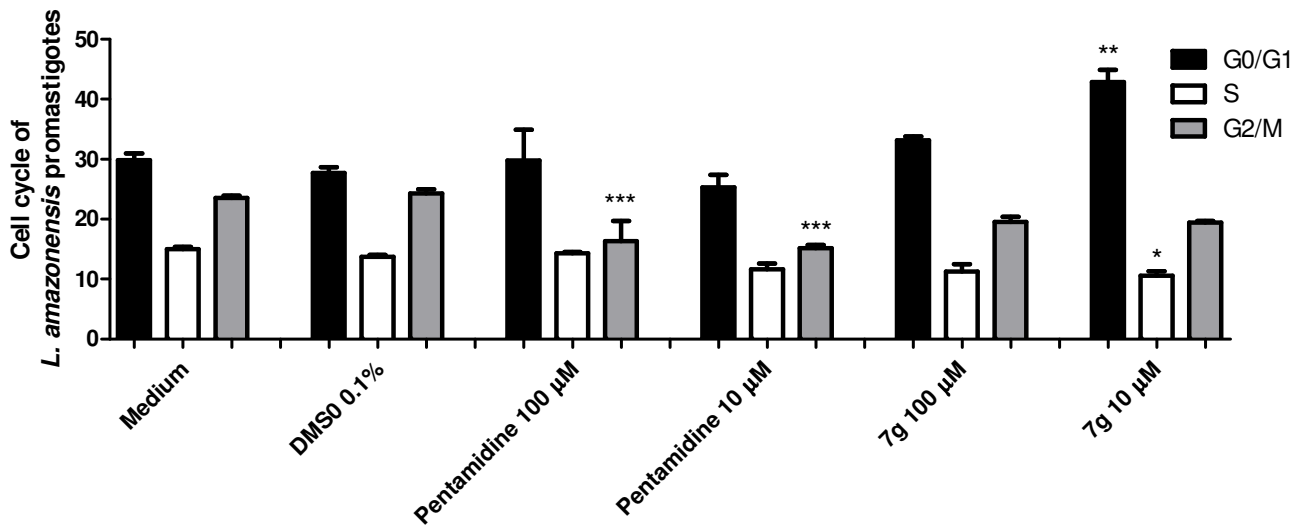
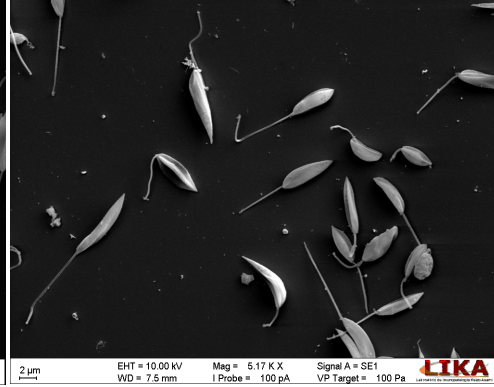


Figure 3

(A)



(B)



(C)



(D)

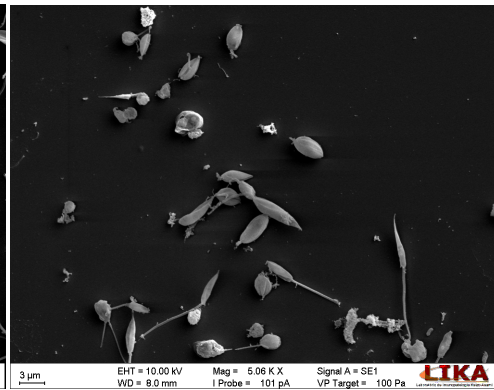
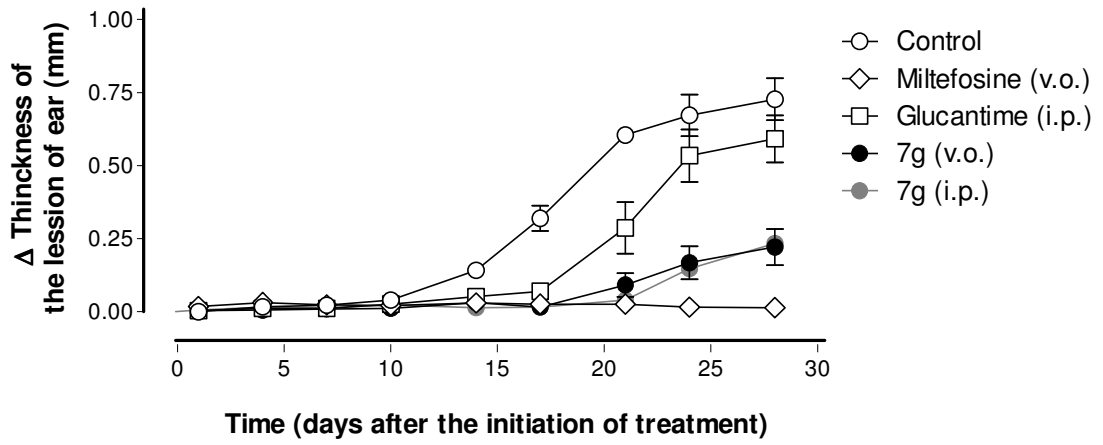


Figure 4

(A)



(B)

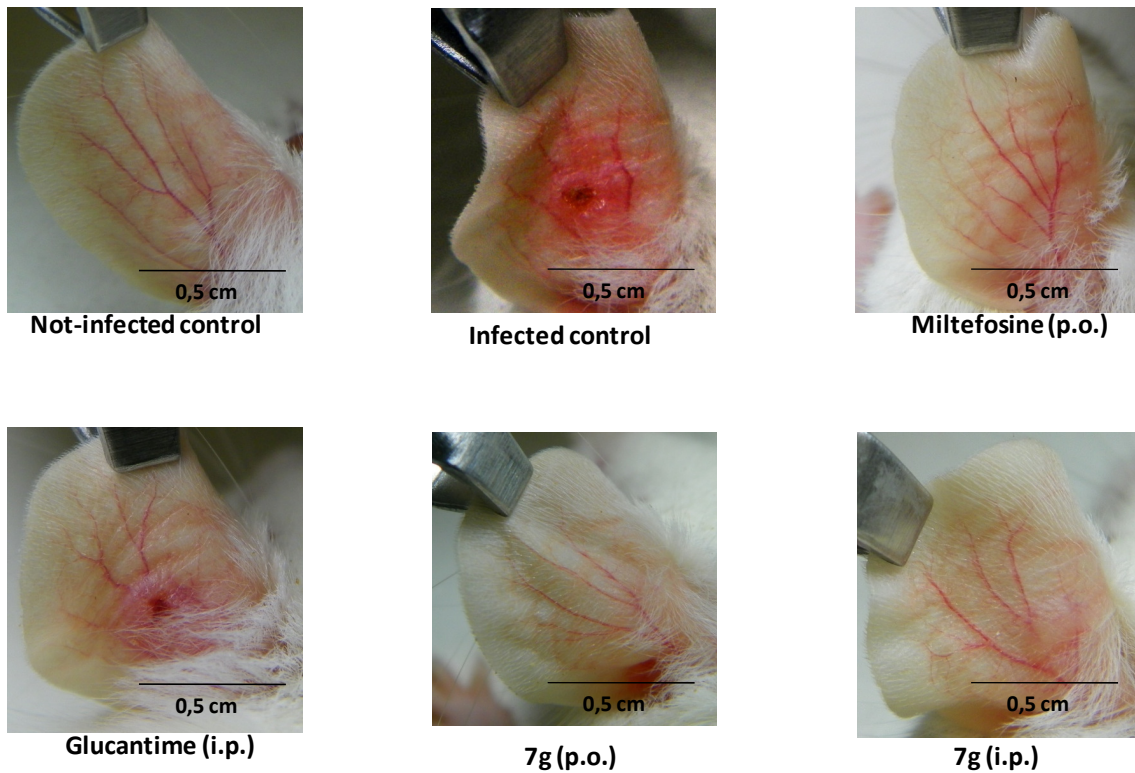


Figure 5

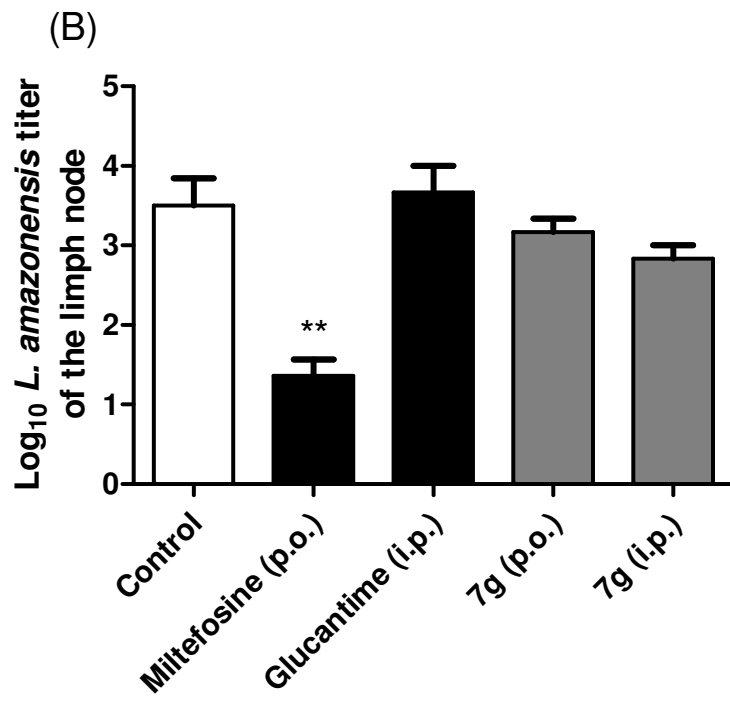
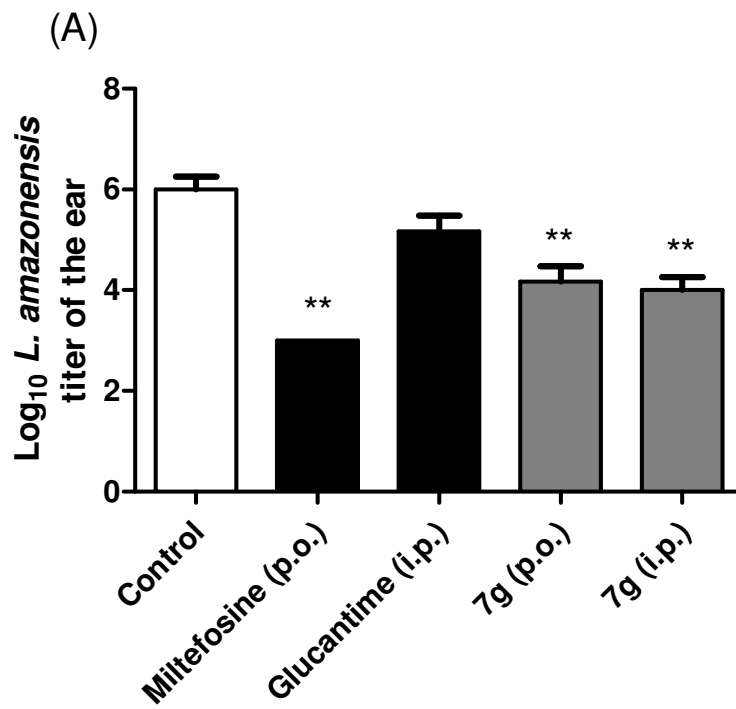
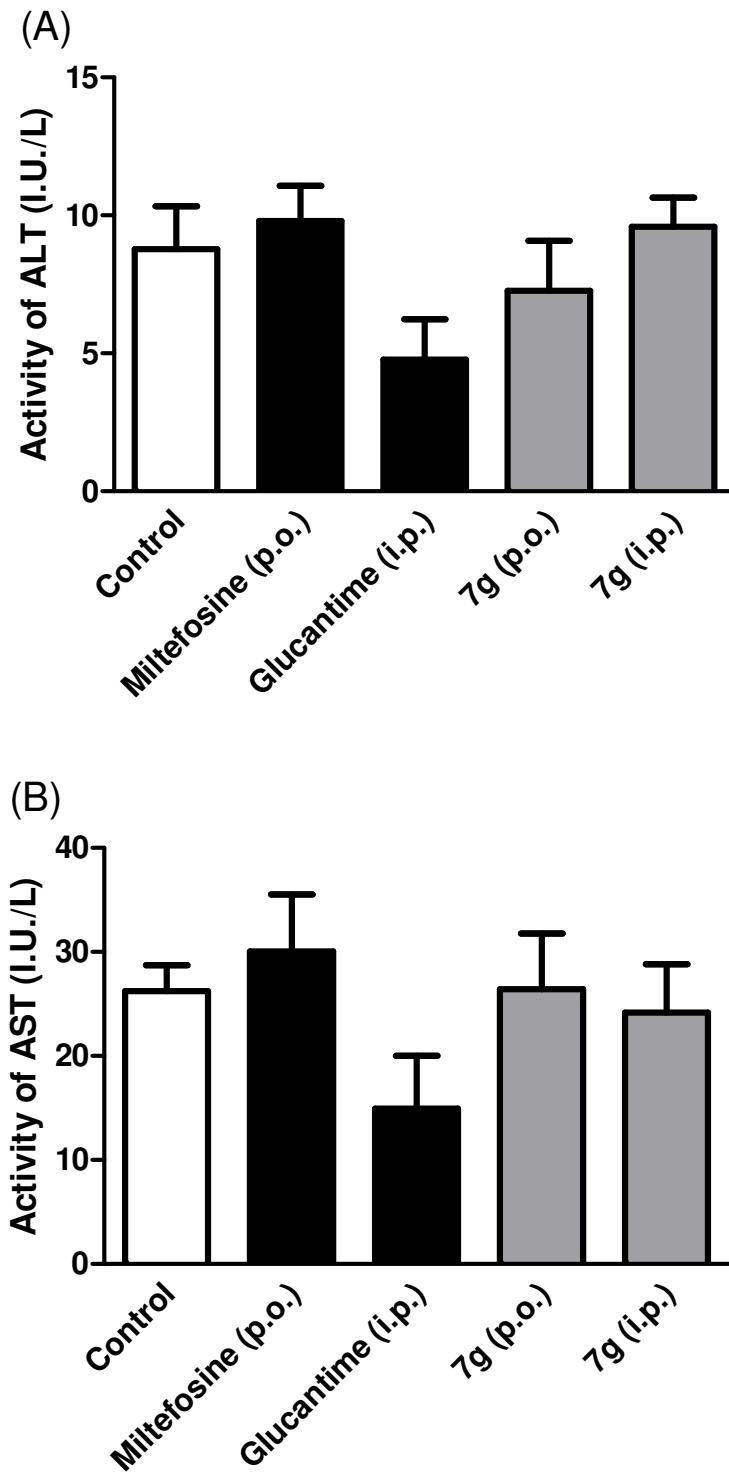


Figure 6



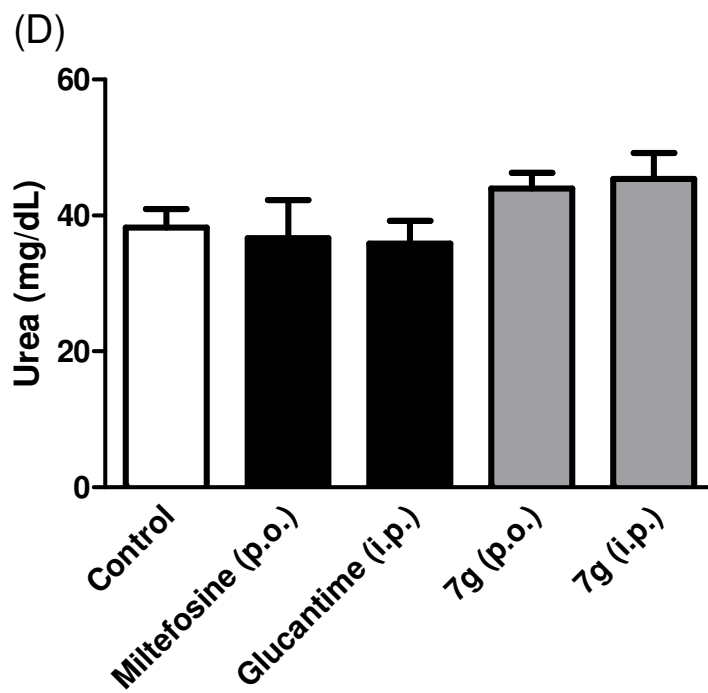
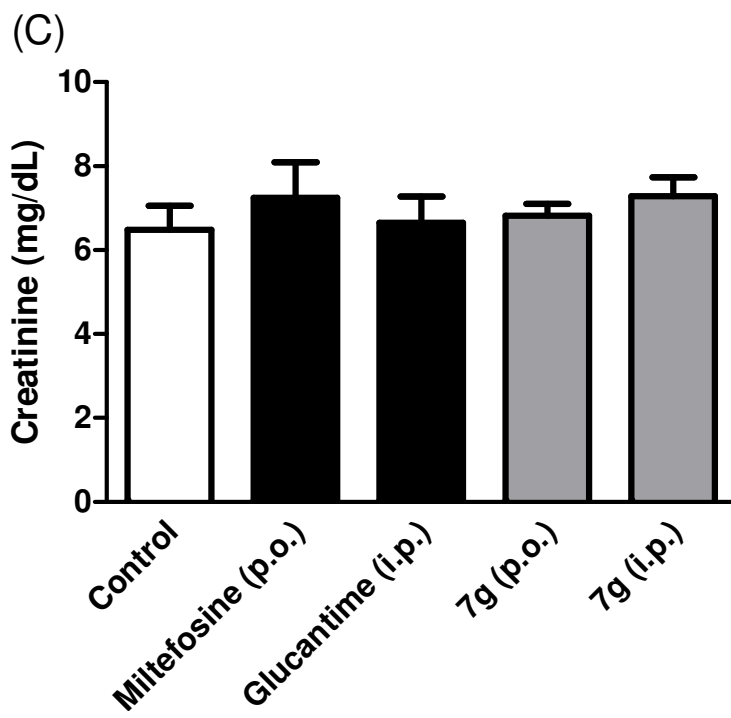
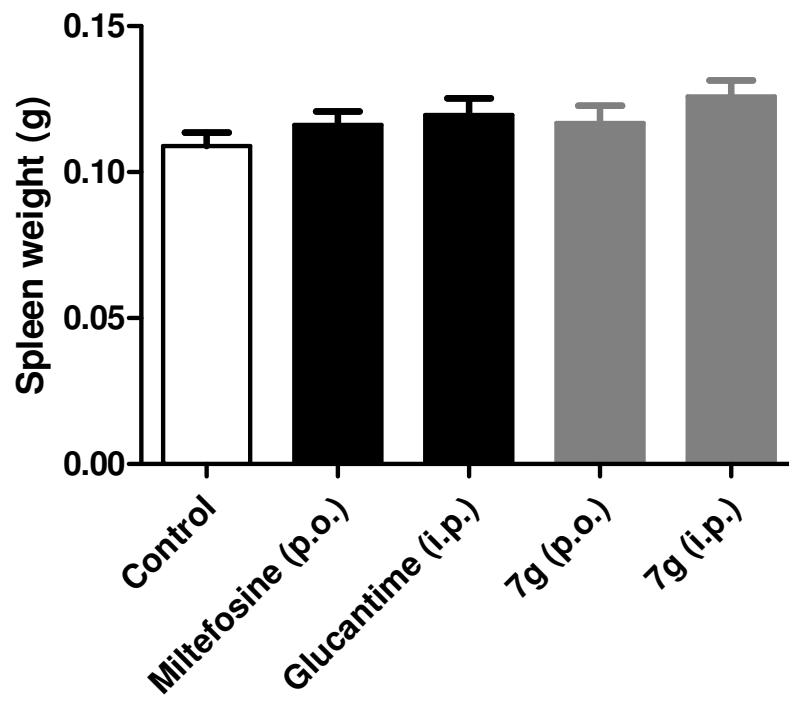


Figure 7



Tables

Table 1. Determination of the cytotoxicity of semicarbazonic derivatives against amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*.

Substance	Amastigotes of <i>L. amazonensis</i>		Amastigotes of <i>L. braziliensis</i>	
	IC ₅₀ ^a ± s.e.m.) (µM)	Maximum cytotoxicity (% ± s.e.m.)	IC ₅₀ ^a ± s.e.m.) (µM)	Maximum cytotoxicity (% ± s.e.m.)
Miltefosine	22.0 ± 1.8	59.1 ± 5.6***	78.4 ± 4.7	61.7 ± 2.2**
Pentamidine	32.8 ± 4.6	58.1 ± 4.9***	32.1 ± 1.1	84.0 ± 1.5**
LASSBio 1064	>100	NA	>100	NA
6g	23.8 ± 0.3	71.6 ± 1.6***	89.7 ± 5.8	52.9 ± 2.4**
7a	>100 µM	35.6 ± 0.5**	2.7 ± 0.3	74.6 ± 2.8**
7e	16.7 ± 2.3	81.5 ± 1.6***	4.2 ± 1.1	74.6 ± 8.8**
7f	39.8 ± 8.2	66.1 ± 3.4***	81.5 ± 5.9	56.7 ± 2.4**
7g	3.5 ± 0.6	93.2 ± 2.0***	31.7 ± 5.8	65.8 ± 1.2**

Data are reported as means ± S.E.M. The asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.

Differences with a ***P<0.001 were considered significant in relation to DMSO 0.1% group. NA: When the compound isn't active at 100 µM.^a:IC₅₀ is the concentration required to give 50% inhibition of grown of amastigote forms, calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations (100, 10, 1, 0.1 and 0.01 µM).

Original Research Article

In Vitro/In Vivo Antileishmanial Effects of Novel Hydrazide-*N*-Acyldrazone Derivatives

Marina A. Alves^{1,2}, Aline C. de Queiroz³, Eliezer J. Barreiro^{1,2}, Magna S. Alexandre-Moreira³, Lídia M. Lima^{1,2*}

Affiliation

¹Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio de Janeiro(UFRJ)

²Programa de Pós -graduação em Química- Instituto de Química- UFRJ

³Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-Universidade Federal de Alagoas(UFAL)

*Corresponding author:

Dr. Lídia Moreira Lima, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco B, sala 14, PO Box 68024, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, ZIP Code: 21941-971
PH/FAX 55-21-39386503. Email: lidia@lassbio.icb.ufrj.br or lmlima23@gmail.com

Abstract

The current treatment leishmaniasis includes limitations of toxicity, variable efficacy, high costs and inconvenient doses and treatment schedules. These observations prompted us to investigate the leishmanicidal activity of novel hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives. These derivatives showed anti-leishmanial activity against promastigotes of *L. major* and amastigotes of *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. They were also effective against *L. amazonensis in vivo*, specially LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736. Taken together, these results suggest that LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 may represent a valuable source for therapeutic control of leishmaniasis in humans and animals.

KEYWORDS: *Hydrazide-N-acylhydrazone; Leishmaniasis; Leishmania major; Leishmania amazonensis; Leishmania braziliensis;*

Introduction

Parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) are responsible for several pathologies affecting humans and animals and are most abundant in developing countries in Middle East, Asia and South America, but also are endemic in the sub-Mediterranean basin.¹ Parasites display two developmental forms depending on the phase of their life cycle. *Leishmania* spp. residing within vacuoles in macrophages of mammalian hosts, appear as small unflagellated forms known as amastigotes.² Parasites are transmitted from mammals to mammals via female sandfly (genus *Phlebotomus* in the Old World localities of Europe, Africa and Asia, and *Lutzomyia* in the New World – Americas and Oceania), in which they exist in motile forms known as promastigotes in the intestinal tract of the vector.^{3,4}

Leishmaniasis remains a major public health problem worldwide, considering they are endemic in 98 countries or territories with more than 350 million people at risk⁵, and is classified as Category I by the TDR/WHO, mainly due to the absence of control. In humans, the disease displays different clinical manifestations, ranging from asymptomatic or subclinical infection to disfiguring forms of cutaneous leishmaniasis (cutaneous forms presenting in a spectrum ranging from cutaneous, mucosal and diffuse cutaneous) or potentially fatal visceral disease. They have emerged as one of the most important opportunistic agents in AIDS patients.^{6,7}

The cutaneous leishmaniasis has social and economic impact and is a stigmatizing disease as most lesions are on exposed regions of the skin, for example, face, arms and legs. Over 15 species of *Leishmania* cause cutaneous leishmaniasis in humans, with species such as *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania aethiopica* in the Old World and *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* and *Leishmania guyanensis* in the New World.^{5,7}

Despite this very strong data, leishmaniasis is largely ignored in discussions of tropical disease priorities and is one of the most neglected tropical diseases in terms of drug discovery and development.^{8,9} The control of *Leishmania* infection relies primarily on chemotherapy till date. At present, the following drugs are used to treat human leishmaniasis: pentavalent antimonials, paromomycin, amphotericin, miltefosine and pentamidine. Most antileishmanial

drugs are highly toxic, present resistance issues or require hospitalization, being therefore not adequate to the field.¹⁰

For many years, the pentavalent antimonials remain the first-line treatment for visceral and cutaneous leishmaniasis in most parts of the world. Pentavalent antimonials have variable efficacy against different *Leishmania* species and require injectable administration. Due to side effects such as high cardiotoxicity, pancreatitis and nephrotoxicity, patients should be hospitalized and monitored, as treatment may need to be suspended.¹¹⁻¹³ Resistance to pentavalent antimonials also is now widespread in Indian subcontinents. New drug formulations like amphotericin B, its lipid formulations, and miltefosine have shown great efficacy to treat leishmaniasis but their high cost and therapeutic complications limit their usefulness. Other drugs like paramomycin and pentamidine have shown some usefulness and could be a potential supplement in the drugs regimen but their use and availability in disease endemic regions is limited.¹⁴

In context to the limited drug options and unavailability of either preventive or prophylactic candidates, current therapy for leishmaniasis is far from ideal and new drugs are still urgently needed.¹⁰ Taking into account all of the aforementioned and due to the urgent need for innovative drugs based on new molecular scaffolds and the increased interest on new antileishmanial agents due to the lack of effective drugs, we decided to synthesize and test the efficiency of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives for antileishmanial activity. We synthesized of novel LASSBio 1064 derivatives and tested against 3 species of pathogenic *Leishmania*, including both Old World and New World *Leishmania*. These derivatives were tested against both promastigotes of *L. major* and intracellular amastigotes of *L. major*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. Finally, we demonstrate that intraperitoneal treatment with three of the novel derivatives is highly effective in treating *L. amazonensis* infected mice.

The planning of the series of derivatives (**3 a-e** and **4 a-e**) was performed by applying the molecular hybridization strategy among LASSBio-1111 (1) and LASSBio-1064 (2) prototypes. This process was proposed hybridization of arilidrazida subunit LASSBio-1111 (A,1) with acylhydrazone functionalized LASSBio-1064 (B,2), for the construction of new molecular standard that could combine the properties anti trypanosomatid previously identified. Subsequently, in order to construct a series congener has been proposed to replace

the 2-hydroxybenzylidene subunit and substituents regioisomeric 3-hydroxybenzylidene, 4-hydroxybenzylidene; with 4-trifluoromethylbenzylidene unit and the system 5-nitrofur.

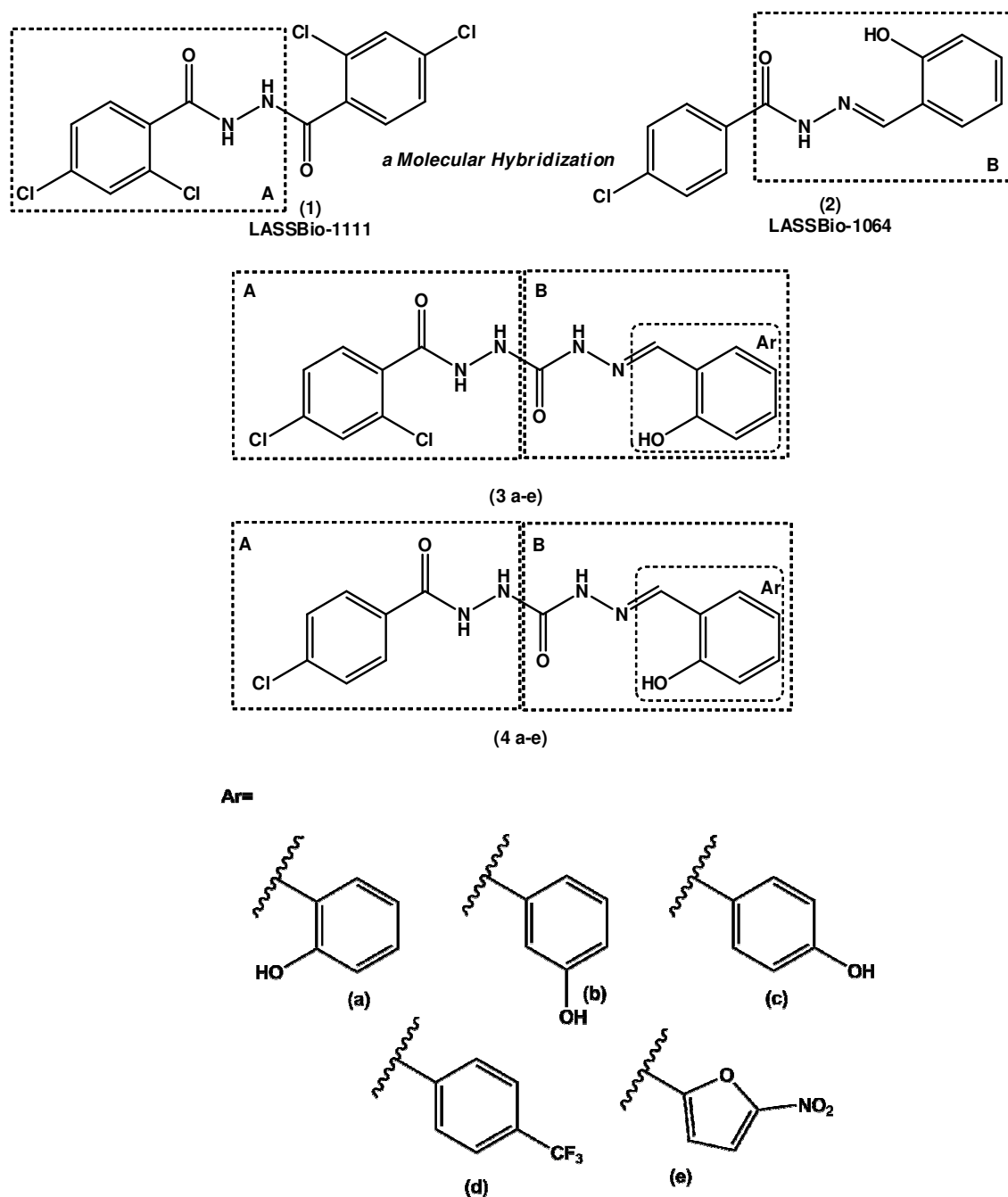
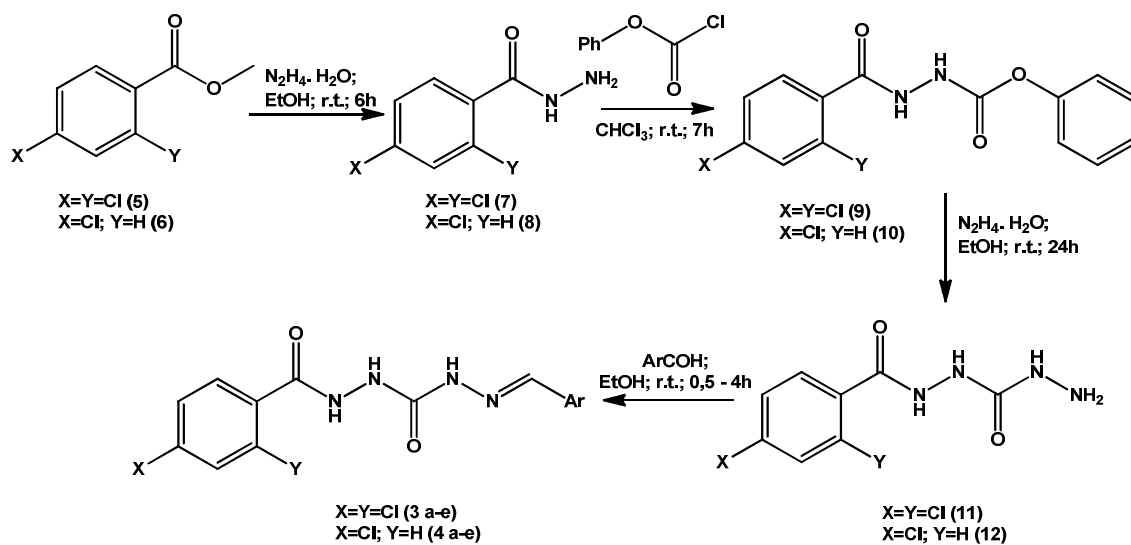


Chart 1: Design concept of hydrazone-N-acylhydrazone compounds **3 (a-e)** and **4 (a-e)** from molecular modifications on prototype **1** and **2**

Results

Compounds **3a-h** and **4a-h** were synthesized in four linear steps from the esters **5** and **6**, obtained commercially (Scheme 1). The first step of the synthetic methodology for obtaining the compounds chlorophenylhydrazide (**7** and **8**) from the hydrazinolysis reaction of esters, employing hydrazine hydrate and ethanol as solvent at room temperature.¹⁵ Subsequently, to obtain the intermediate **9** or **10** condensation reaction was performed with phenyl chloroformate, using chloroform as solvent.¹⁶ From the carbamate **9** and **10** was possible to synthesize key hydrazide intermediate by a another hydrazinolysis step, that after the condensation reaction with aldehydes previously selected,¹⁷ generating two new series of hydrazide-*N*-acylhydrazone compounds **3 (a-e)** and **4 (a-e)**. The chemical structure of the compounds **3a-e** and **4a-e** was elucidated by ¹H and ¹³C NMR, IR and mass spectrometry. All compounds were synthesized as a single diastereoisomer. This was observed by analyzing the ¹H and ¹³C NMR spectra of these compounds, because revealed the presence of only one signal relative to the hydrogen and carbon of imine double bond (N=CH). The unequivocal characterization of the relative configuration of imine double bond (*E* or *Z*) was performed using X-ray diffraction study. However, considering the difficulty of getting compounds **3a-h** and **4a-h** in crystalline form, only derivative **4d** (LASSBio-1491), obtained as crystal solid, was used in X-ray experiment. As shown in Figure 1, this experiment revealed that compound **4d** was obtained as diastereoisomer *E*. Based on these data and considering the similarity in chemical shifts of imine hydrogen in ¹H NMR spectra of compounds **3a-e** and **4a-e**, is reasonable to propose that all hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives (**3a-e** and **4a-e**) were obtained with the same stereochemistry (N=CH; configuration *E*).



Scheme 1: Synthesis of hydrazide-*N*-acylhydrazone compounds **3** (a-e) and **4** (a-e) from the amines **5** and **6**

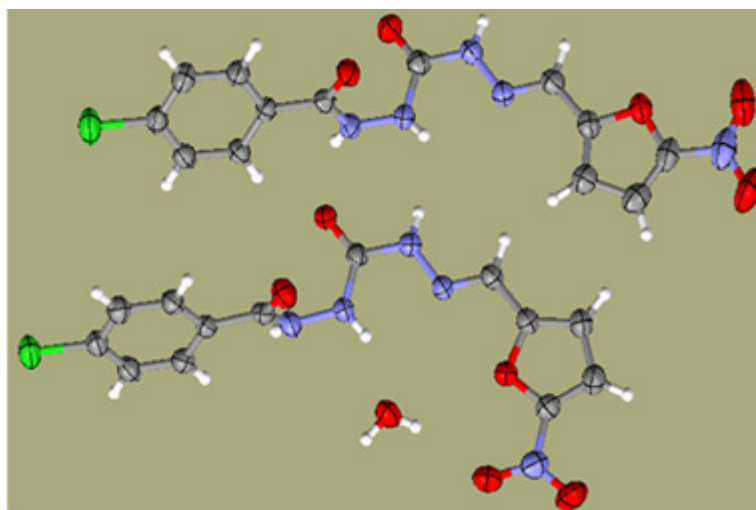


Figure 1: View of representative hydrazide-*N*-acylhydrazone derivative **4e** obtained as diastereoisomer *E*.

Initially, J774.A1 cell line (macrophages) were exposed to different concentrations (0.1 – 100 μ M) of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives of LASSBio 1604 and their effect cytotoxic was determined after 48h by using an MTT-based assay. The effect cytotoxic of these derivatives of LASSBio 1604 treatment to host cells are presented in **Table 1**. The

compounds LASSBio 1704 (**4a**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**), LASSBio 1708 (**3b**), LASSBio 1709 (**4b**) and LASSBio 1736 (**3d**) at concentration of 100 μM , after 48 h of incubation, showed deleterious activity to J774 cell line evidenced. Treatment with LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**) and LASSBio 1709 (**4b**) showed the greatest cytotoxicity with LC_{50} of 78.1 μM , 86.2 μM and 85.2 μM . On the other hand, the other treatments with derivatives, lead compound or reference drugs did not affect the viability of host cells at 100 μM .

The effects of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives of LASSBio 1604 in promastigote forms of *L. major* were studied and their intrinsic parasite cytotoxicity was determined. **Table 1** also shows that after 48 h of incubation with parasites, verified a concentration-dependent growth inhibition to the most of the derivatives compared with control cells (grown in the absence of treatment with compounds or reference drugs), with maximal effect greater than 50%. Indeed, the unique compound that did not affect the viability of promastigotes of *L. major* at 100 μM was LASSBio 1737 (**3c**). In this form, the IC_{50} values of LASSBio 1491 (**4e**), LASSBio 1492 (**9**), LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1702 (**10**), LASSBio 1703 (**3e**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**), LASSBio 1707 (**3c**), LASSBio 1708 (**3b**), LASSBio 1709 (**4b**), LASSBio 1710 (**12**) and LASSBio 1736 (**3d**) against promastigotes of *L. major* were 7.5 μM , 3.7 μM , 0.2 nM, 13.2 μM , 8.7 μM , 0.5 nM, 0.6 μM , 3.9 μM , 0.3 μM , 0.8 μM , 33.7 nM and 0.4 μM , respectively.

The compounds with selectivity index greater than 1000 for *L. major* promastigotes were also assayed against intracellular amastigote form of the *L. major* (Table 1). The treatments with LASSBio 1491 (**4e**), LASSBio 1492 (**9**), LASSBio 1705 (**3a**) and LASSBio 1707 (**12**) presented high anti-amastigote activity of 67.5 ± 4.8 , 52.0 ± 3.5 , 68.0 ± 2.0 and 73.8 ± 2.0 , with IC_{50} values of 7.3 μM , 4.5 μM , 8.5 μM and 15.9 μM , respectively. Moreover, the treatment with these four compounds were more potent than the use of miltefosine (IC_{50} of 85.3 μM) or the lead compound LASSBio 1064 (IC_{50} of 70.4 μM). In general, the compounds were more active against *L. major* promastigotes than reducing the number of amastigotes in infected macrophages.

The compounds were assayed against *L. amazonensis* amastigotes at concentration of 30 μM (**Figure 1**) and observed LASSBio 1492 (**9**), LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1704 (**4a**), LASSBio 1706 (**4c**), LASSBio 1707 (**3c**), LASSBio 1708 (**3b**) and LASSBio 1736 (**3d**) diminished the number of intracellular amastigotes. Then, considering everyone else *in vitro*

results, some derivatives were selected to determination of IC₅₀ value for intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* (**Table 2**). In this case, the most active compounds were LASSBio 1704 (IC₅₀ of 85.3 μM and maximum effect of 55.6 ± 1.4%) and LASSBio 1736 (IC₅₀ of 84,0 μM and maximum effect of 57.6 ± 0.2%), both presented similar efficacy to standard drugs miltefosine (58.1 ± 4.9%) and pentamidine (59.1 ± 5.6%).

Compounds were also evaluated against *L. braziliensis* amastigotes, as can be seen in **Table 2**. The addition of LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**) and LASSBio 1736 (**3d**) at different concentrations (1–100 μM) produced a dose-dependent reduction in the growth of the intracellular amastigote forms of *L. braziliensis*, presenting maximum effect in the range of 57.2 - 70.4%. The IC₅₀ values for amastigotes *L. braziliensis* were 7.7 μM, 8.0 μM, 3.6 μM and 5.3 μM, respectively. Indeed, these four compound were more potent than miltefosine (IC₅₀ of 78.4 μM), pentamidine (IC₅₀ of 32.1 μM) or LASSBio 1064 (IC₅₀ of 64.2 μM) and as effective than miltefosine (61.7 ± 2.2%) and LASSBio 1064 (66.7 ± 4.2%). However significant variations in the activity of compounds were observed against the intracellular amastigote of these three *Leishmania* species, which are probably due differences between them. Finally, it is important to mention that parasites cultivated in presence of 0.1% DMSO, the maximum concentration added in the cultures, it is not toxic for the parasite growth or J774 cell line.

Considering the *in vitro* results, the compounds LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**), LASSBio 1707 (**3c**), LASSBio 1710 (**12**) and LASSBio 1736 (**3d**) were also chosen to evaluation of its *in vivo* leishmanicidal activity against *L. amazonensis*. The treatment with these derivatives at 30 μmols/kg/day x 28 days, intraperitoneally, diminish of size lesion of infected ear on third week after initiation of the treatment (**Figure 2** and **3**), beyond LASSBio 1705 (**3a**) and LASSBio 1736 (**3d**) decrease parasite load in infected ear and the treatment with LASSBio 1707 (**3c**) and LASSBio 1736 (**3d**) diminish the *L. amazonensis* titer in draining lymph node similar to the treatment with miltefosine (oral route) at same dose (**Figure 4**).

However, treatment with LASSBio 1705 (**3a**) and LASSBio 1706 (**4c**), such as meglumine antimoniate induced the mortality of 20% of the animals in these groups (**Figure 5**). In addition, *in vivo* treatment with derivatives assayed did not induce variation spleen weight (**Figure 6**) or alterations of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CREA) and urea (**Figure 7**) in plasma of animals.

Discussion and Conclusions

Given the worldwide prevalence of *Leishmania* infection in countries that have low budgets for health care, finding a safe and inexpensive treatment for leishmaniasis is still an unmet need.⁶ Therefore, there has been a considerable interest in trying to find novel approaches to drug design and biological targets, as new ways of combating the parasite.¹⁸ In this study, the novel hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives were evaluated against promastigotes and amastigotes from 3 species of *Leishmania*, recognized worldwide as major etiological agents of cutaneous leishmaniasis. Thus, for the first time, we have demonstrated that these derivatives with new molecular scaffolds are effective against *Leishmania* species *in vitro* and *in vivo*.

This study indicates that some hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives have *in vitro* anti-leishmanial activity and that this activity is not limited to a single species. Tests against intracellular amastigotes are more relevant to infer the sensitivity of anti-leishmanial drugs, since this is the parasite stage found in the vertebrate host.¹⁹ In the present study, significant differences were observed regarding the sensitivity of the different *Leishmania* species to each tested compound, such as shown **Table 1** and **2**. The best derivatives were the derivatives LASSBio 1491 (**4e**), LASSBio 1492 (**9**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1707 (**3c**) against *L. major*, such as LASSBio 1704 (**4a**) and LASSBio 1736 (**3d**) against *L. amazonensis* and LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**) and LASSBio 1736 (**3d**) against *L. braziliensis*, indicating also a lower susceptibility of *L. amazonensis* strain to the derivatives. These results are consistent with the known fact that patients infected with *L. amazonensis* are less responsive to the available anti-*Leishmania* treatments.²⁰

Additionally, it is well known that *N*-Acylhydrazone moiety is a repeated functional group present in several prototypes and drug candidates for these neglected diseases. Alkahraman and co-workers²¹ showed the results of antileishmanial, antibacterial and antifungal activities of some hydrazones and *N*-(diaryl)acyl hydrazones derived from benzophenones and the high *in vitro* antileishmaniasis activity against *L. major* of these compounds makes them promising leads for development of effective therapeutic agents. Hernández et al.²² also reported the synthesis and biological evaluation of new hybrid

furoxanyl *N*-acylhydrazones as antimicrobial and antiparasitic agents to treat neglected diseases, as these compounds presented good biological behaviour against *M. tuberculosis*, *T. cruzi*, and *L. amazonensis*.

Regarding, *in vitro* anti-*Leishmania* activity, we identified excellent molecular hits with similar or higher potency than the reference drugs pentamidine or miltefosine. Thus, it was initially observed that the derivatives hydrazone-*N*-acylhydrazone with 2,4-dichlorophenyl was usually more active than 4-chlorophenyl derivatives against amastigote forms, with exception of the nitroderivatives [LASSBio 1491 (**4e**) and LASSBio 1703 (**3e**)]. In general, the best hybrid compounds were LASSBio 1736 (**3d**) with 4-trifluoromethylbenzylidene as substituent of the imine function and LASSBio 1705 (**3a**) presented 2-hydroxybenzylidene group.

Considering the *in vitro* results, the compounds LASSBio 1493 (**11**), LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1706 (**4c**), LASSBio 1707 (**3c**), LASSBio 1710 (**12**) and LASSBio 1736 (**3d**) were also chosen to evaluation of its *in vivo* leishmanicidal activity against *L. amazonensis*. The treatment with LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1707 (**3c**) and LASSBio 1736 (**3d**) were highly effective against the usually refractory species *L. amazonensis in vivo*.

Although it is possible that the LASSBio 1705 (**3a**) mediated changes in disease progression presented here are the result of direct toxicity on *L. amazonensis* itself, this possibility is considered to be unlikely. One reason is that in this study was also found no changes in amastigote parasite proliferation or infectivity when exposed to this derivative at concentration of 100 μ M *in vitro* (**Table 2**).

Therefore, from the point of view of medicinal chemistry, *N*-acylhydrazones are endowed with the interesting capacity of being able to interact with diverse bioreceptors, owing to their ability to establish H-bonding sites and the theoretical feasibility of adopting a unique conformational orientation.²³ Studies comparing the inhibitory effect of *N*-acylhydrazones and chalcones on well-known parasitic cysteine proteases, such as cruzain, falcipain, and trypanopain, have been conducted.²⁴ Cysteine proteases are key enzymes in many parasitic biochemical pathways and constitute potential targets in the search for drugs against several tropical infectious diseases.^{25, 26} It was also recognized that imine insaturation of acylhydrazone could be had the hydrophobic anchors function for protozoa enzymatic active site. In order to avoid this undesirable pharmacological profile, the replacement of a peptide backbone by a more rigid central scaffold has been considered and, in this

scenario, *N*-acylhydrazones have provided medicinal chemists with a solid strategy for the design of parasite cysteine protease inhibitors, including *Leishmania* CPB.²⁷ Thus, we will continue this study to evaluate the inhibitory effects of these analogs on cysteine protease and of *Leishmania* as well as other validated chemotherapeutic target, such as topoisomerase.

In conclusion, initial investigation of the medicinal chemistry of anti-*Leishmania* agents resulted in the identification of new bioactive compounds. Among these, *N*-acylhydrazones LASSBio 1705 (**3a**), LASSBio 1707 (**3c**) and LASSBio 1736 (**3d**) are especially worthy of note, as they proved to be potent antileishmanial agents and of low toxicity both in vitro and in vivo, assuming the position of lead-compounds which can be used in the discovery of new therapies for *Leishmania* infections.

Experimental Section

Chemistry

Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers. The reactions were monitored by thin layer chromatography, which was performed on aluminum sheets pre-coated with silica gel 60 (HF-254, Merck) to a thickness of 0.25 mm. The chromatograms were viewed under ultraviolet light (254–265 nm). ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were determined in deuterated dimethyl sulfoxide using a Bruker DPX-200 at 200 MHz, Varian Mercury-300 (300MHz), Varian MR-400 (400 MHz). Signal multiplicities are represented by: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) and br (broad signal). Infrared (IR) spectra were obtained with a FTLA 2000–100 spectrophotometer using potassium bromide plates. Melting points of final products were determined with a Quimis 340 apparatus and are uncorrected. The purity of compounds were determined by HPLC (>95%) using the Shimadzu –LC20AD apparatus, a Kromasil 100-5C18 (4.6 mm X 250 mm) column and the SPD-M20A detector (Diode Array) at 254 nm for quantification of analyte in a 1 mL/min constant flux. The injector was programmed to inject a volume of 20 μL. The mobile phases used were: CH₃CN:H₂O 1:1; 4:1; 6:4 and 7:3. The results of elemental analysis were obtained FlashEA 1112 Series instrument (Thermo Scientific) from samples previously dried under vacuum. Ultraviolet spectroscopy was performed using Femto spectrophotometer. The wavelength used in solubility assay was determined by the λ max characteristic of each compound. Spectra were analyzed in FemtoScan software. Mass spectrometry was obtained

by positive and negative ionization at Esquire 6000- ESI Ion Trap MSⁿ System Bruker Daltonics and data analyzed in Compass 1.3.SR2 software.

1. Procedure for the preparation of intermediate hidrazyde 7 and 8

(adapted from reference 28)

In 2.5 g (12mmol) of methyl chlorobenzoate (5 or 6) were added 25 ml of ethanol and 7.3 ml (0.146mols; 12eq) in 64% N₂H₄. The mixture was stirred at room temperature for 6 hours, as indicated completion of the reaction monitored by TLC (eluent: dichloromethane: methanol 10%). The volume was reduced in vacuo and ice added to precipitate the product which was vacuum filtered and washed with water.

1.1. Procedure for the preparation of intermediate 2,4-dichloro benzohydrazide (7)

Yield: 70%, white solid, m.p. 190-192 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): **3309** (ν NH); 1663 (ν C=O); 1616 (δ N-H); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 9,62 (s, 1H, CONH); 7,62 (d, 1H, H6', *J*= 2Hz); 7,46 (d, 1H, H5', *J*= 2Hz); 7,43 (s, 1H, H3'); 4,52 (s, 2H, NH₂); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 164,73 (C=O); 134,61 (C2'); 134,45 (C4'); 131,57 (C6'); 130,48 (C1'); 129,13 (C3'); 127,23 (C5'); 98% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, CH₃CN:H₂O (6:1))

1.2. Procedure for the preparation of intermediate 4-chloro benzohydrazide (8)

Yield: 70%, white solid, m.p. 190-192 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): **3310** (ν NH); 1656 (ν C=O); 1591 (δ N-H); 1008 (ν C-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):; 98% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, CH₃CN:H₂O (6:1))

2. Procedure for the preparation of intermediate carbamates 9 and 10

(adapted from references 29 and 30)

In 20 ml of chloroform was added 4.9 ml of phenylchloroformate (6 mmol, 1.2eq). The solution was stirred at room temperature and added slowly a suspension of 1 g (5mmols) of intermediate **7** or **8** in 50 ml of chloroform. After 7 hours of agitation was observed complete consumption of the starting product, followed by TLC (eluent: dichloromethane: methanol 5%). Then, 10 ml hexane was added to the reaction, keeping it under stirring for 10 minutes and then it was vacuum filtered and washed with hexane to give the product 9 or 10.

2.1. Procedure for the preparation of intermediate phenyl 2-(2,4-chlorobenzoyl)hydrazinecarboxylate (9; LASSBio-1492)

Yield: 80%, white solid, m.p. 182-184 °C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3247 (v NH); 1741 e 1661 (v C=O); 1033 (v Ar-Cl); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,49 (s, 1H, Hb); 10,05 (s, 1H, Hc), 7,74 (d, 1H, H6', $J=2\text{Hz}$); 7,58-7,14 (m, 5H, H3', H5', H2, H4 e H6); 6,89 (d, 2H, H3 e H5, $J=6\text{ Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz. DMSO- d_6) δ (ppm): δ 163,12 (Cd, C=O), 154,24 (Ca, C=O); 150,61 (C2'); 135,42 (C4'), 133,15 (C6'); 131,71 (C1'); 130,54 (C1); 129,51 (C2 e C6); 129,45 (C3 e C5); 127,48 (C3'); 125,44 (C5'); 121,50 (C4); 98% purity in HPLC (R.T.=4.25 min, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (7:1)).

2.2. Procedure for the preparation of intermediate phenyl 2-(4-dichlorobenzoyl)hydrazinecarboxylate (10; LASSBio-1702)

Yield: 51%, white solid, m.p. 182-185 °C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3277 (v NH); 1730 e 1661 (v C=O); 1010 (δ Ar-Cl); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,66 (s, 1H, Hb); 9,92 (s, 1H, Hc); 7,91 (d, 2H, H2' e H6', $J=10\text{ Hz}$); 7,60 (d, 2H, H3' e H5', $J=10\text{ Hz}$); 7,40 (d, 2H, H2 e H6, $J=8\text{ Hz}$); 7,26 (d, 1H, H4, $J=6\text{ Hz}$); 7,18 (d, 2H, H3 e H5, $J=8\text{ Hz}$); MS: $m/z= 300,1$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; 97% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (6:1))

3. Procedure for the preparation of intermediate hidrazyde 11 and 12

(adapted from reference 28)

Was added in 7 ml of ethanol, 0.3 g (1 mmol) of intermediate 9 or 10 and 1.20ml of hydrazine hydrate 80% (0.03mol, 30 eq). After 32 hours was observed the end of the reaction by TLC (eluent: dichloromethane: methanol 5%). The reaction volume was reduced in vacuum system and after addition of ice occurred formation precipitated, which was filtered under vacuum, and the product was obtained.

3.1. Procedure for the preparation of intermediate X (11; LASSBio- 1493) Yield: 62%, white solid, m.p. 192-194 °C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3297 (v NH); 1698 (v C=O); 1651 (δ N-H); 1041 (vC-Cl); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,17 (sl, 1H, Hb); 8,24 (s, 1H, Hc); 7,70 (d, 1H, H6'); 7,60-7,50 (m, 3H, H3', H5' e He); 4,15 (s, 2H, NH₂); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz. DMSO- d_6) δ (ppm): 165,08 (Ca, C=O); 159,38 (Cd, C=O); 135,05 (C2'); 133,57

(C4'); 131,75 (C6'); 130,89 (C1'); 128,38 (C3'); 127,21 (C5'); MS: $m/z=263,0$ [M + H]⁺; 97% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, CH₃CN:H₂O (6:1))

3.2. Procedure for the preparation of intermediate X (12; LASSBio- 1710)

Yield: 64%, white solid, m.p. 187-190 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3328 (ν NH); 1676 e 1597 (ν C=O); 1013 (δ Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,24 (sl, 1H, H_b); 8,17 (s, 1H, H_c); 7,89 (d, H_{2'} e H_{6'}, *J*=8); 7,63 (s, 1H, H_e); 7,55 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, *J*=8); 4,17 (sl, 2H, NH₂); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,7 (Ca, C=O); 160,3 (Cd, C=O); 136,9 (C4'); 132,0 (C1'); 129,9 (C2' e C6'); 128,9 (C3' e C5'); MS: $m/z227$; 97% purity in HPLC (R.T.=3.6 min, CH₃CN:H₂O (6:1))

4. Procedure for the preparation of hydrazide-*N*-acyhydrazone derivatives (3a-e and 4a-e)

In 0.1g of intermediate 10 or 11, was added under shake at room temperature, 10 ml of ethanol and 0.43mmol (1eq) previously selected from aldehyde, followed by 1 drop of concentrated hydrochloric acid. A solution remained under stirring for 1-4 hours when TLC (dichloromethane: 5-10% methanol) indicated the completion of reaction. The volume of the reaction medium was reduced under reduced pressure (2/3 of volume), and after addition of ice was observed precipitation of the product which was vacuum filtered and washed with cold water.

4.1. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (2-hydroxybenzylidene) -5- (2,4-dichlorobenzoyl) carbonohidrazida (3a; LASSBio-1705)

Yield: 78%, white solid, m.p. 210-213 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3436-1852 (ν OH); 3232 (ν NH); 1708 (ν C=O); 1655 (δ N-H); 1046 (ν C-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,66 (s, 1H_b); 10,16 (s, 1H_c); 10,03 (s, 1H, OH); 9,11 (s, 1H, H_e); 8,23 (s, 1H, N=CH); 7,92 (d, 1H, H_{6'}, *J*= 8); 7,73 (s, 1H, H_{3'}); 7,60 (m, 2H, H₂ e H_{5'}); 7,20 (t, 1H, H₄, *J*=6); 6,90-6,80 (m, 2H, H₃ e H₅); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,3 (Cd, C=O); 155,9 (Ca, C=O); 154,8 (N=CH); 139,1 (C₆); 135,1 (C_{2'}); 133,5 (C_{4'}); 131,7 (C_{6'}); 130,8 (C₂); 130,5 (C_{1'}); 129,4 (C₄); 127,3 (C_{3'}); 127,1 (C_{5'}); 120,3 (C₁); 119,1 (C₅); 116,0 (C₃); MS: $m/z365$; 99% purity in HPLC (R.T.=3.52 min, CH₃CN:H₂O (7:1)).

4.2. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (3-hydroxybenzylidene) -5- (2,4-dichlorobenzoyl) carbonohidrazida (3b; LASSBio-1708)

Yield: 95%, white solid, m.p. 223-225 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): ; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,62 (s, 1H_b); 10,12 (s, 1H_c); 9,48 (s, 1H, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,80 (s, 1H, N=CH); 7,71 (s, 1H_{3'}); 7,70-7,50 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 7,18 (t, 3H, H₂, H₃ e H₄); 6,76 (d, 1H₆); ¹³C-NMR (50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm):: MS: *m/z*365; 98% purity in HPLC (R.T.=3.12 min, CH₃CN:H₂O (7:1)).

4.3. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (4-hydroxybenzylidene) -5- (2,4-dichlorobenzoyl) carbonohidrazida (3c; LASSBio-1707)

Yield: 90%, white solid, m.p. 225-227 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3362 (ν NH); 1694 (ν C=O); 1651 (δN-H); 1098 (νC-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,53 (s, 1H, H_b); 10,16 (s, 1H, H_c); 9,83 (s, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,84 (s, 1H, N=CH); 7,76 (s, 1H, 1H_{3'}); 7,67 (d, 2H, H₂ e H₆, *J*=10 Hz); 7,58 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 6,82 (d, 2H, H₃ e H₅, *J*=10Hz); ¹³C-NMR(50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,3 (Cd, C=O); 158,7 (Ca, C=O); 155,0 (N=CH); 141,2 (C₄); 135,1 (C_{2'})133,6 (C_{4'}); 131,7 (C_{6'}); 130,8 (C_{1'}); 129,4 (C₁); 128,5 (C₂ e C₆); 127,3 (C_{3'}); 125,5 (C_{5'}); 115,41 (C₃ e C₅); MS: *m/z*365; 99% purity in HPLC (R.T.=3.05 min, CH₃CN:H₂O (7:1)).

4.4. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (4- (trifluoromethyl) benzylidene) -5- (2,4-dichlorobenzoyl) carbonohidrazida (3d; LASSBio-1736)

Yield: 90%, white solid, m.p. 225-227 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3555 (ν NH); 1703 (ν C=O); 1655 (δN-H); 1015 (νC-Cl); 1164-1105 (C-F); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,93 (s, 1H, H_b); 10,17 (s, 1H, H_c); 9,34 (s, 1H, H_e); 8,07 (d, 2H, H₃ e H₅, *J*=10Hz); 7,97 (s, 1H, N=CH); 7,77 (s, 1H, H_{3'}), 7,74 (m, 2H, H₂ e H₆); 7,55 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); ¹³C-NMR(50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,33 (Cd, C=O); 154,71 (Ca, C=O); 139,19 (N=CH); 138,54 (C₄); 135,20 (C₃ e C₅); 133,59 (C₂ e C₆); 131,77 (C_{2'}); 130,80 (C_{4'}); 128,68 (C_{6'}); 128,05 (C_{1'}); 127,45 (C_{3'}); 127,36 (C_{5'}); 125,38 (C₁); 121,47 (CF₃); MS: *m/z*417; 99% purity in HPLC (R.T.=5.82 min, CH₃CN:H₂O (6:1)).

4.5. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (2,4-dichlorobenzoyl) -5 - ((5-nitrofurano-2-yl) metilene) carbonohidrazida (3e; LASSBio-1703)

Yield: 87%, yellow solid, m.p. 222-225 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): : 3387 (ν NH); 1727 (ν C=O); 1667 (δ N-H); 1015 (ν C-Cl); 1244 e 1281 (N=O); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.22 (s, 1H, H_b) 10,22 (s, 1H, H_c); 9.18 (s, 1H, H_e); 7.86 (s, 1H, N=CH); 7.79 (d, 1H, H₃, *J*= 4Hz); 7.71 (s, 1H, H₃′); 7.57 (m, 2H, H₅′ e H₆′); 7.32 (d, 1H, H₄, *J*=4 Hz); ¹³C-NMR(50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,2 (Cd); 154,0 (Ca); 152,7 (C₂); 151,2 (N=CH); 135,1 (C₂′); 133,3 (C₄′); 131,7 (C₁); 130,7 (C₆′); 129,3 (C₅′); 129,1 (C₁′); 127,2 (C₃′); 115,0 (C₃); 112,5 (C₄);); MS: *m/z*384; 99% purity in HPLC (R.T.=3.41 min, CH₃CN:H₂O (7:1)).

4.6. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (2-hydroxybenzylidene) -5- (4-chlorobenzoyl) carbonohidrazida (4a; LASSBio-1704)

Yield: 53%, white solid, m.p. >250 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3309(ν NH); 1701 e 1545 (ν C=O); 1664 e 1484 (δ N-H); 1011 (δ Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):10,65 (s, 1H, H_b); 10,30 (s, 1H, H_c); 10,02 (sl, 1H, OH); 8,98 (s, 1H, H_e); 8,22 (s, 1H, N=CH); 7,91 (d, 2H, H₂′ e H₆′, *J*=8Hz); 7,84 (d, 1H, H₂); 7,57 (d, 2H, H₃′ e H₅′, *J*=8Hz); 7,17 (t, 1H, H₄, *J*=6Hz); 6,88-6,81 (m, 2H, H₃ e H₅); ¹³C-NMR(50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165,2 (Cd, C=O), 156,0 (Ca, C=O); 155,1 (N=CH); 136,5 (C₆); 131,5 (C₄′); 130,4 (C₁′); 129,3 (C₂′ e C₆′); 128,5 (C₃′-C₅′ e C₂); 127,1 (C₄); 120,2 (C₁); 119,17 (C₅); 116,0 (C₃); MS: *m/z*331; 98% purity in HPLC (R.T.=4.86 min, CH₃CN:H₂O (4:1)).

4.7. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (3-hydroxybenzylidene) -5- (4-chlorobenzoyl) carbonohidrazida (4b; LASSBio-1709)

Yield: 91%, white solid, m.p. 225-227 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3342(ν NHCO); 1692 (ν C=O); 1655 (ν N-H); 1015 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 10,62 (s, 1H, H_b); 10,28 (s, 1H, H_c); 9,47 (s, 1H, OH); 9,12 (s, 1H, H_e); 7,90 (d, 2H, H₂′ e H₆′, *J*=4Hz); 7,80 (s, 1H, N=CH); 7,57 (d, 2H, H₅′ e H₃′, *J*=4Hz); 7,17 (m, 3H, H₃, H₄ e H₅); 6,77 (d, 1H, H₂);); ¹³C-NMR (50 MHz. DMSO-*d*₆) δ (ppm); MS: *m/z*331; 98% purity in HPLC (R.T.=4.24 min, CH₃CN:H₂O (1:1)).

4.8. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (4-hydroxybenzylidene) -5- (4-chlorobenzoyl) carbonohidrazida (4c; LASSBio-1706)

Yield: 86%, white solid, m.p. 223-225 °C; I.R. (KBr) (cm⁻¹): 3369(ν NH); 1701 (ν C=O); 1651 (ν N-H); 1014 (ν Ar-Cl); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,49 (s, 1H, H_b);

10,28 (s, 1H, Hc); 9,77 (s, 1H, OH); 8,92 (s, 1H, He); 7,90 (d, 2H, H2'e H6', $J=8\text{Hz}$); 7,79 (s, 1H, N=CH); 7,59 (m, 4H, H3'-H5' e H2 e H6); 6,77 (d, 2H, H3 e H5); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,2 (Cd, C=O); 158,7 (Ca, C=O); 155,3 (N=CH); 141,2 (C4); 136,5 (C4'); 131,5 (C2'e C6'); 129,3 (C2 e C6); 128,5 (C3-C5 e C1'); 125,6 (C3'e C5'); 115,4 (C1); MS: m/z 331; 99% purity in HPLC (R.T.=2.95 min, CH₃CN:H₂O (7:1)).

4.9. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (4- (trifluoromethyl) benzylidene) -5- (4-chlorobenzoyl) carbonohidrazida (4d; LASSBio-1737)

Yield: 84%, white solid, m.p. 201-203 °C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3338(ν NH); 1701 (ν C=O); 1663 (ν N-H); 1015 (ν Ar-Cl); 1131 e 1100 (C-F); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,95 (s, 1H, Hb); 10,34 (s, 1H, Hc); 9,24 (s, 1H, He); 8,05 (d, 2H, H2 e H6, $J=8\text{Hz}$); 7,96 (d, 2H, H2'e H6', $J=8\text{Hz}$); 7,90 (s, 1H, N=CH); 7,35 (d, 2H, H3 e H5, $J=8\text{Hz}$); 7,59 (d, 2H, H3'e H5', $J=8\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,2 (Cd, C=O); 155,0 (Ca, C=O); 139,1 (N=CH); 138,5 (C4); 136,5 (C3 e C5); 131,4 (C2 e C6); 129,30 (C2'e C6'); 128,5 (C3'e C5'); 127,3 (C4'); 125,3 (C1); 125,3 (C1'); 121,4 (CF₃);); MS: m/z 383; 99% purity in HPLC (R.T.=5.95 min, CH₃CN:H₂O (6:1)).

4.10. Procedure for the preparation of compound (E) -1- (4-chlorobenzoyl) -5 - ((5-nitrofurano-2-yl) methylene) carbonohidrazida (4e; LASSBio-1491)

Yield: 87%, yellow solid, m.p. 217-220 °C; I.R. (KBr) (cm^{-1}): 3246 (ν NH); 1659 e 1504 (ν C=O); 1596 e 1351 (δ Ar-NO₂); 1015 (δ Ar-Cl); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 11,24 (s, 1H, Hb), 10,39 (s, 1H, Hc); 9,12 (s, 1H, He); 7,91 (m, 3H, N=CH e H2'e H6'); 7,80 (d, 1H, H3, $J=4$); 7,58 (d, 2H, H3'e H5', $J=8$); 7,31 (d, 1H, H4, $J=4$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,32 (Cd, C=O); 154,57 (Ca, C=O); 152,84 (N=CH); 152,40 (C2); 136,69 (C4'); 131,38 (C1'); 129,38 (C2'e C6'); 129,22 (C1); 128,62 (C3'e C5'); 115,16 (C3); 112,62 (C4); MS: m/z 350; 98% purity in HPLC (R.T.=3.81 min, CH₃CN:H₂O (6:1)).

Biology

5. Parasite culture

Promastigotes of *L. major* IOC/L0581 (MHOM/SU/1973/5-ASKH) were obtained from Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute-Fiocruz. Promastigotes of *L.*

amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016) were obtained from Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos at Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz. Promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) were obtained from Dr. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine at 27° C in BOD incubator.

6. Culture of J774.A1 murine macrophages

These adherent-phenotype macrophage line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% FBS at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂.

7. Cytotoxicity against host cells

To evaluate the cytotoxic activity against the J774.A1 cell line, the host cells were plated in 96-well vessels at 2×10^5 cells per well in complete culture medium 10% FBS at 37 °C. After 1 h wells were washed with warm HBSS to remove non-adherent cells, leaving approximately 10^5 adherent macrophages. All cultures were done in DMEM complete supplemented with 10% FBS. The compounds and pentamidine were added at serial concentrations (0.1 – 100 µM). The cells were also cultured with medium free from compounds or vehicle (basal growth control) or in media with DMSO 0.1% (vehicle control). Positive control (dead cells) was obtained by cellular lysis with 1% of Triton 100X in DMEM complete. After 48 h, the cytotoxicity was evaluated by the MTT assay.³¹ Data obtained from experiments were expressed as the mean ± standard error of the mean (Mean ± S.E.M.) and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

8. *In vitro* activity against promastigote forms of *Leishmania*

Stock solutions of novel semicarbazone derivatives as well as pentamidine or miltefosine (reference leishmanicidal drugs) were prepared in DMSO immediately before use. The cytotoxicity of LASSBio 1064, pentamidine and miltefosine against promastigotes was determined. Stationary phase *L. major* promastigotes were plated in 96-well vessels (Nunc) at 1×10^5 cells per well, in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine. Each derivatives solution was added at increasing concentrations (10^{-7} – 100µM). Cells

were also cultured in a medium free of compounds or vehicle (basal growth control) or with DMSO 0.1% (vehicle control). After 48 h, extracellular load of *L. major* promastigotes was estimated by counting the parasites in Schneider's medium in a CELM automatic cell counter (model CC530).³² Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

9. *In vitro* activity against amastigote forms of *Leishmania*

To assess the activity of the test derivatives against the amastigote stage of *L. major*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* were realized model of infection in coverglass.³³ The murine macrophages (J774.A1 cell line) were prepared in 24-well vessels (Corning) at 2×10^5 adherent cells/well, infected with 2×10^6 promastigotes in glass coverslips placed inside 1 ml medium culture. The cultures were cultured or not with the test derivatives or reference drugs (0.01-100 μ M), and kept for 24h at 37 °C, 5% CO₂. After 24h, coverslips were washed, stained with Giemsa-MayGrünwald, and intracellular amastigotes were counted in 100 macrophages. Data obtained from *in vitro* experiments were expressed as the Mean \pm S.E.M. of duplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a p value <0.05 or lower were considered significant.

11. *In vivo* activity against *L. amazonensis*

This study (protocol number 2013.02) was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil). All animals received humane care in compliance with the 'Principles of laboratory animal care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the care and use of laboratory animals' prepared by the National Academy of Sciences (Washington, DC). Then, 1×10^5 stationary promastigotes (5 days of culture in Schneider's medium) of *L. amazonensis* were inoculated subcutaneously into the right ear dermis of 6-week-old female BALB/c mice weighing ca. 20 g. and later treated with LASSBio 1483 (i.p. or p.o.), miltefosine (p.o.) or meglumine antimoniate (i.p.) at 30 μ mol/kg x 28 days. The lesion size was measured using a paquimeter.³⁴ The parasite loads of infected ears and draining lymph nodes were determined using a quantitative limiting-dilution assay.³⁵ Toxicity of complexes was also evaluated due

to alterations on spleen weight and by biochemistry dosages in plasma, performed according to the manufacturer's instructions (Doles, BRA). Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

Acknowledgment: The authors would like to thank Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute, Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos at Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz and Dr. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz for having provided Leishmania species. The authors are grateful to the CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ (404344/2012-7) and FAPESP (Pronem 20110722-006-0018-0010) for the joint funding of this research project. The authors wish to thank several of their colleagues working at the UFAL and UFRJ for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.

References

- (1) Denise, H.; Poot, J.; Jiménez, M.; Ambit, A.; Herrmann, D. C.; Vermeulen, A. N.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol.Biol.* **2006**, 7, 42.
- (2) Kaye, P.; Scott, P.. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9, 604–615.
- (3) Portillo, G.; Finlay, B. B. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol.* **1995**, 3(10), 373–380.
- (4) Bogdan, C.; Röllinghoff, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* **1998**, 28, 121–134.
- (5) Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **2012**, 7, e35671.

- (6) WHO (2010) Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- (7) Murray, H.W.; Berman, J.D.; Davies, C.R.; Saravia, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **2005**, 366, 1561-77.
- (8) Hotez, P.J.; Remme, J.H.; Buss, P.; Alleyne, G.; Morel, C.; Breman, J.G. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38, 871-8.
- (9) Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich-Sachs, S.; Sachs, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* **2006**, 3, e102.
- (10) Freitas-Junior, L.H.; Chatelain, E.; Kim, H.A.; Siqueira-Neto, J.L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.* **2012**, 2, 11-9.
- (11) Matoussi, N.; Ameer, H.B.; Amor, S.B.; Fitouri, Z.; Becher, S.B.; Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. *Med. Mal. Infect.* **2007**, 37 (Suppl 3), S257–S259.
- (12) Shahian, M.; Alborzi, A. Effect of meglumine antimoniate on the pancreas during treatment of visceral leishmaniasis in children. *Med. Sci. Monit.* **2009**, 15, CR290–293.
- (13) Zaghloul, I.Y.; Al-Jasser, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2004**, 98, 793–800.
- (14) Davis, A.J.; Kedzierski, L. Recent advances in leishmanial drug development. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2005**, 6, 163-169.
- (15) Lima, P. C. L., L. M.; Silva, K. C. M.; Léda, P. H. O.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 187.
- (16) Yogeewari, P. et. al. Discovery of N-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: hybrid pharmacophore-based design. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6202-6211.
- (17) Lima, P. C.; Lima, L. M.; da Silva, K. C. M.; Léda, P. H. O.; de Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 187-203

- (18) de Azevedo-Jr, W.F.; Soares, M.B. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Curr. Drug. Targets.* **2009**, 10(3), 193-201.
- (19) Croft, S.L.; Seifert, K.; Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Ind. J. Med. Res.* **2006**, 123, 399–410.
- (20) Marsden, P. D.; Jones, T. C. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of leishmaniasis. In *Human Parasitic Diseases, Leishmaniasis*, vol. 1; Chang, K. P., Bray, R. S., Eds.; Elsevier Science: New York, 1985; pp. 183–198
- (21) Al-kahraman, Y.M. S. A.; Yasinzai, M.; and Singh, G.S. Evaluation of Some Classical Hydrazones of Ketones and 1,2-Diketones as Antileishmanial, Antibacterial and Antifungal Agents. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, 35(6), 1009-1013.
- (22) Hernández, P.; Rojas, R.; Gilman, R.H.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; González, M. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 64-74.
- (23) Fraga, C.A.; Barreiro, E.J. Medicinal chemistry of *N*-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13(2), 167-198.
- (24) Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; Mckerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Med.* **2000**, 6, 660-669.
- (25) Mckerrow, J. H.; Engel, J. C.; Caffrey, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 639-644.
- (26) Mckerrow, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.* **1999**, 29, 833-837.
- (27) Ifa, D.R.; Rangel, C.R.; Alencastro, R.B.; Fraga, C.A.M.; Barreiro E.J.; A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. *J. Mol. Struct.* **2000**, 505, 11-17.
- (28) Sheng, C.; Che, X.; Wang, W.; Wang, S.; Cao, Y.; Miao, Z.; Yao, J.; Zhang, W. Design and synthesis of novel triazole antifungal derivatives by structure-based bioisosterism, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 5276–5282.

- (29) Gupte, S. P. Process for preparing carbamates by the catalytic transamidation of organic carbonates with ureas, WO 2005063698 A1 20050714, **2005**.
- (30) Yogeewari, P.; Sriram, D.; Thirumurugan, R.; Raghavendran, J. V.; Sudhan, K.; Pavana, R. K. ; Stables, J. Discovery of N-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: Hybrid pharmacophore-based design. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6202-6211.
- (31) Hussain, R.F.; Nouri, A.M.; Oliver, R.T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Method.* **1993**, 160, 89-96.
- (32) Rangel, H.; Dagger, F.; Hernandez, A.; Liendo, A.; Urbina, J.A. Naturally Azole-Resistant *Leishmania braziliensis* Promastigotes Are Rendered Susceptible in the Presence of Terbinafine: Comparative Study with Azole-Susceptible *Leishmania mexicana* Promastigotes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1996**, 40, 2785–2791.
- (33) Nunes, M.P.; Cysne-Finkelstein, L.; Monteiro, B.C.; De-Souza, D.M.; Gomes, N.A.; Dos-Reis, G.A. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Microbes and Infection* **2005**, 7, 78-85.
- (34) Pereira, J.C.; Carregaro, V.; Costa, D.L.; da-Silva, J.S.; Cunha, F.Q.; Franco, D.W. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 4180-4187.
- (35) Taswell, C. Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny. In *Cell Separation: Methods and Selected Applications*; Pretlow, T.C., Pretlow, T.P., Eds.; Academic Press: New York, 1986;, pp. 109-145.

Tables

Table 1. Cytotoxicity of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against macrophages (MTT assay) and promastigote forms of *L. major*

Compound	J774 cell line		<i>L. major</i> Promastigotes			<i>L. major</i> A	
	LC ₅₀ ^a	Cytotoxicity (% ± s.e.m.) ^b	IC ₅₀ ^a	Maximum Effect (% ± s.e.m.) ^b	SI ^c	IC ₅₀ ^a	M
Miltefosine	> 100 μM	NC	3.1 ± 0.2 μM	88.1 ± 0.1**	>32.3	85.3 ± 14.7 μM	
Pentamidine	> 100 μM	NC	0.8 ± 0.1 μM	72.6 ± 2.0**	>125	17.1 ± 5.6 μM	
LASSBio 1064	> 100 μM	NC	>100 μM	NA	-	70.4 ± 5.1 μM	
LASSBio 1491 (4e)	> 100 μM	NC	7.5 ± 0.3 μM	68.4 ± 0.1**	>13.3	7.3 ± 0.6 μM	
LASSBio 1492 (9)	> 100 μM	NC	3.7 ± 0.1 μM	67.5 ± 0.1**	>27.0	4.5 ± 2.9 μM	
LASSBio 1493(11)	> 100 μM	NC	0.2 ± 0.1 nM	75.7 ± 5.8**	>500000	>100 μM	
LASSBio 1702(10)	> 100 μM	NC	13.2 ± 8.6 μM	78.9 ± 2.7**	>7.6	>100 μM	
LASSBio 1703 (3e)	> 100 μM	NC	8.7 ± 1.2 μM	53.0 ± 3.1**	>11.5	>100 μM	
LASSBio 1704 (4a)	> 100 μM	48.2 ± 9.1*	>100 μM	46.3 ± 8.2**	-	NT	
LASSBio 1705 (3a)	78.1 ± 4.5 μM	70.2 ± 2.6**	0.5 ± 0.1 nM	75.7 ± 5.0**	156200	8.5 ± 0.8 μM	
LASSBio 1706 (4c)	86.2 ± 8.7 μM	54,3 ± 6,3**	0.6 ± 0.2 μM	54.5 ± 10.0**	143,7	NT	
LASSBio 1707 (3c)	> 100 μM	NC	3.9 ± 0.4 μM	70.0 ± 1.2**	>25,6	15.9 ± 4.1 μM	
LASSBio 1708 (3b)	> 100 μM	42.9 ± 15.5*	0.3 ± 0.1 μM	62.6 ± 1.6**	>333.3	NT	
LASSBio 1709 (4b)	85.2 ± 2.3 μM	59.3 ± 0.9**	0.8 ± 0.1 μM	63.8 ± 1.8**	106,5	NT	
LASSBio 1710 (12)	> 100 μM	NC	33.7 ± 18.5 nM	72.5 ± 5.1**	>2967,4	>100 μM	
LASSBio 1736 (3d)	> 100 μM	48.1 ± 0.3*	0.4 ± 0.2 μM	77.6 ± 4.2**	>250	NT	
LASSBio 1737 (4d)	> 100 μM	NC	>100 μM	NA	-	NT	

^aLethal Concentration 50% (LC₅₀) and Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀) were calculated by concentration-response curves toxic and expressed as mean ± standard error of the mean calculated by concentration-response curves toxic. ^bCytotoxicity or Maximum Effect (ME) are expressed as mean ± standard error of maximum toxicity average of triplicates of a representative experiment. in triplicates of a representative experiment. The values of cytotoxicity or maximum effect were considered significant when * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to the DMSO group; NC: substance presents no significant lethal activity to cell until the concentration of 100 μM in compared to DMSO group. NA: substance presents no significant inhibitory activity for the parasite to the concentration of 100 μM compared to DMSO group. NT: substance not tested.

Table 2. Determination of the cytotoxicity of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*.

Compound	<i>L. amazonensis</i> Amastigotes			<i>L. braziliensis</i> Amastigotes		
	IC ₅₀ ^a (μM) ^a	Maximum Effect (% ± s.e.m.) ^b	SI ^c	IC ₅₀ ^a (μM) ^a	Maximum Effect (% ± s.e.m.) ^b	SI ^c
Miltefosine	22.0 ± 1.8	58.1 ± 4.9**	>4.5	78.4 ± 4.7	61.7 ± 2.2**	>1.3
Pentamidine	32.8 ± 4.6	59.1 ± 5.6**	>3.0	32.1 ± 1.1	84.0 ± 1.5**	>3.1
LASSBio 1064	>100	NA	-	64,2 ± 5,8	66.7 ± 4.2**	>1.6
LASSBio 1491 (4e)	>100	NA	-	>100	47.5 ± 2.2**	-
LASSBio 1492 (9)	>100	49.4 ± 4.7**	-	>100	47.5 ± 2.2**	-
LASSBio 1493 (11)	>100	51.9 ± 4.7**	-	7.7 ± 1.4	66.6 ± 0.3**	>13.0
LASSBio 1704 (4a)	85.3 ± 5.0	55.6 ± 1.4**	>1.2	>100	48.1 ± 4.5**	-
LASSBio 1705 (3a)	>100	NA	-	8.0 ± 0.4	67.1 ± 7.4**	9.8
LASSBio 1706 (4c)	>100	NA	-	3.6 ± 0.6	70.4 ± 1.9**	23.9
LASSBio 1707 (3c)	>100	44.4 ± 0.2**	-	>100	NA	-
LASSBio 1708 (3b)	>100	31.0 ± 1.7**	-	>100	NA	-
LASSBio 1710 (12)	>100	42.7 ± 5.3**	-	>100	32.6 ± 3.3*	-
LASSBio 1736 (3d)	84,0 ± 0,3	57.6 ± 0.2**	>1.2	5.3 ± 2.6	57.2 ± 5.2**	>18.9

^aInhibitory Concentration 50 (IC₅₀) was calculated by concentration-response curves toxic and expressed as mean ± standard error of the mean. ^bMaximum Effect (ME) is expressed as mean ± standard error of maximum toxicity average of triplicates of a representative experiment. The values of maximum effect were considered significant when * p <0.05, ** p <0.01 compared to the 0.1% DMSO group; NT: substance presents no significant inhibitory activity for the parasite to the concentration of 100 μM compared to DMSO group.

Figures Legends

Figure 1. Effect of Pentamidine, LASSBio 1064 and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against amastigote forms of *L. amazonensis* at concentrations of 30 μ M.

Figure 2. *In vivo* efficacy of meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493 (A), LASSBio 1705 (B), LASSBio 1706 (C), LASSBio 1707 (D), LASSBio 1710 (E) and LASSBio 1736 (F) treatments (30 μ mol/kg/day x 28 days) in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Lesion sizes were monitored weekly. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean.

Figure 3. Images of lesions after of treatment of BALB/c mice infected with *L. amazonensis* untreated and treated with meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 at dose 30 mg/kg/day x 28 days. Photographs were taken on the first day after end of treatment. In the control groups, infected control, meglumine antimoniate and LASSBio 1706, the lesions showed an intense swelling and ulcerated by after treatment cessation. In animals with LASSBio 1493, LASSBio 1707, LASSBio 1710 treatments, the photographs showed less inflammation and oedema in the infected ear. In groups treated with miltefosine, LASSBio 1705 and LASSBio 1736, the photographs revealed a complete healing of the nodules and ulcers.

Figure 4. Parasite burden throughout the course of meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 treatments (30 μ mol/kg/day x 28 days, i.p.) in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. (A) Log₁₀ of parasites loads of the infected ear. (B) Log₁₀ of parasites loads of the draining lymph node. The parasite loads of infected ears and draining lymph nodes were determined using a quantitative limiting-dilution assay. Values are the mean of parasites loads in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. ***P < 0.001 vs. control.

Figure 5. Survival of BALB/c mice infected with *L. amazonensis* untreated and treated with meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 at dose 30 mg/kg/day x 28 days. CLP mice treated with IL-33 with or without the CXCR2 inhibitor SB225002 (10 mg per kg body weight). Data are from representative experiments, $n = 5$ mice per group. Treatment with meglumine antimoniate, LASSBio 1705 and LASSBio 1706 induced the 20% of mortality in the group and other treatments presented survival rate of 100%.

Figure 6. *In vivo* effect of meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 treatments (30 μ mol/kg/day x 28 days, i.p.) in spleen weight of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Spleen weight was verified in last day of treatment. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 7. *In vivo* effect of meglumine antimoniate, miltefosine, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 treatments (30 μ mol/kg/day x 28 days, i.p.) on serum ALT (A), AST (B), creatinine (C) and urea (D) levels of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Lesion sizes were monitored weekly. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

Figure 1

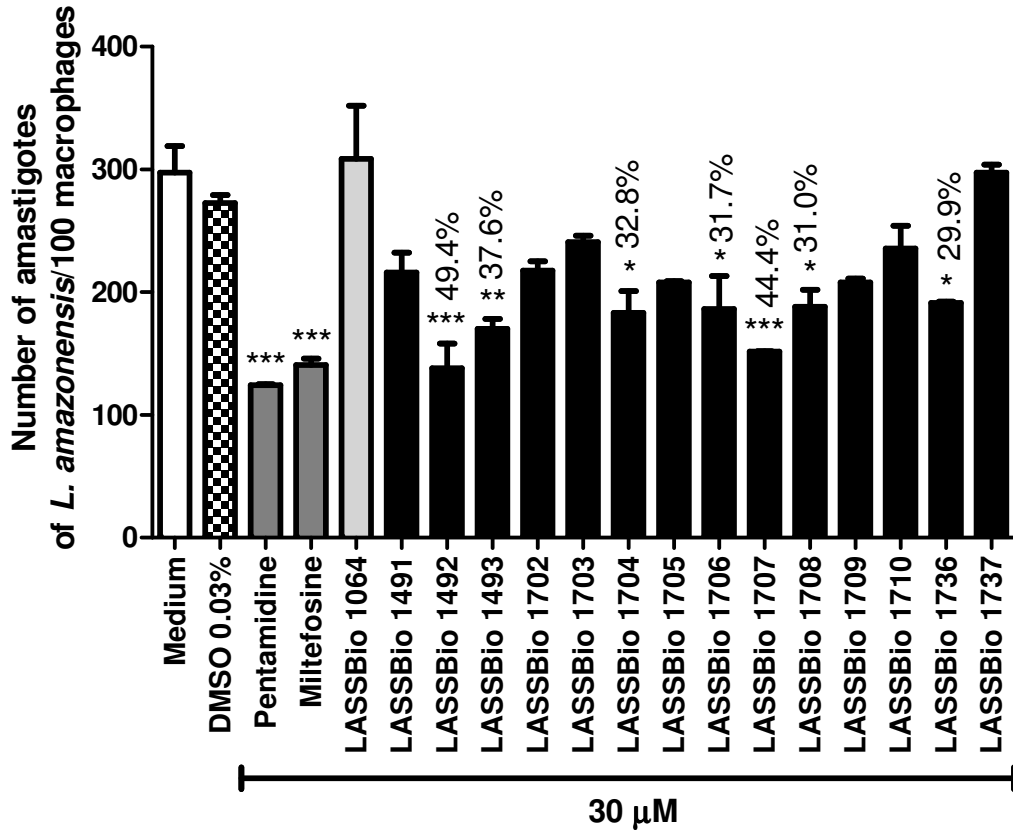
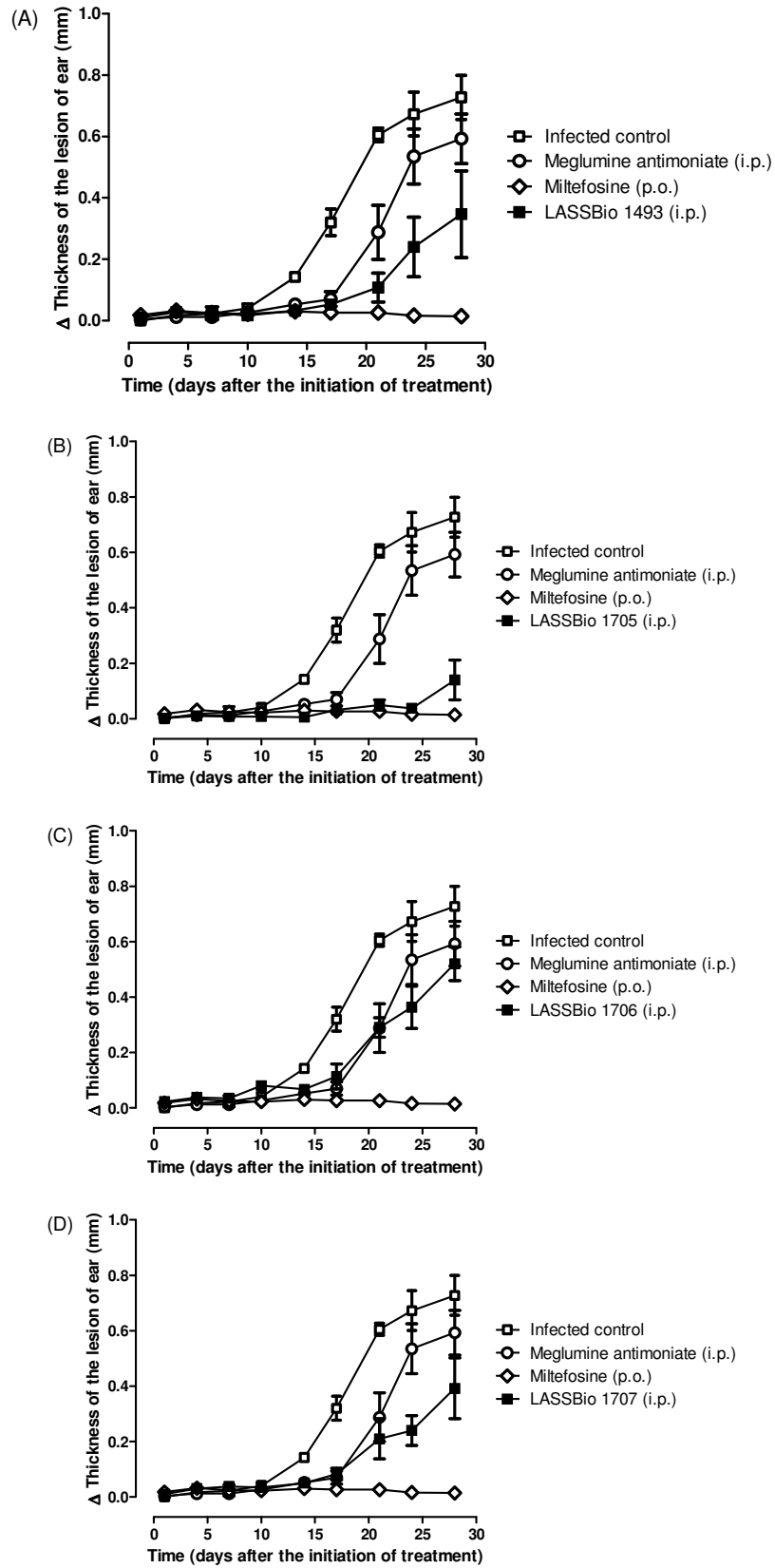


Figure 2



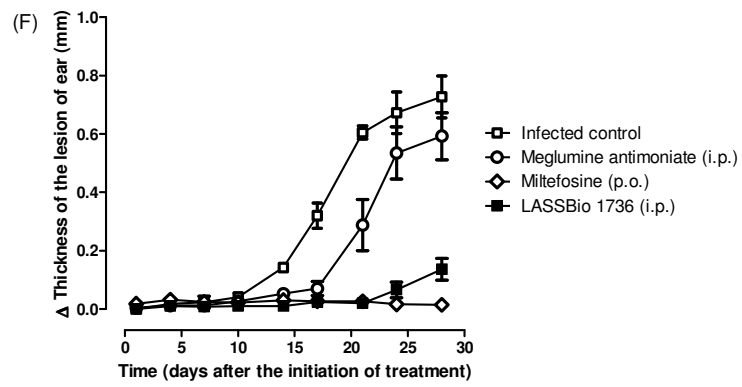
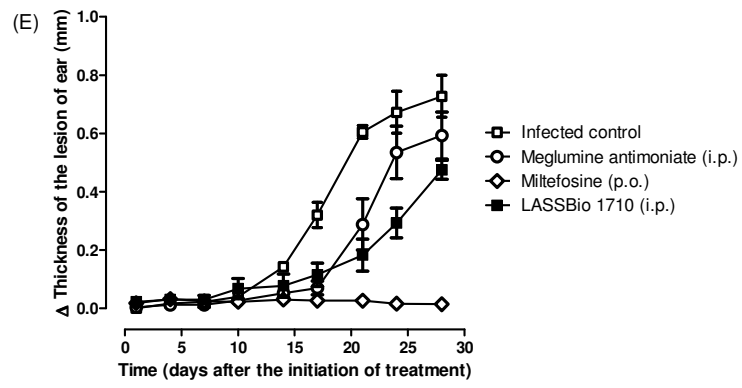


Figure 3

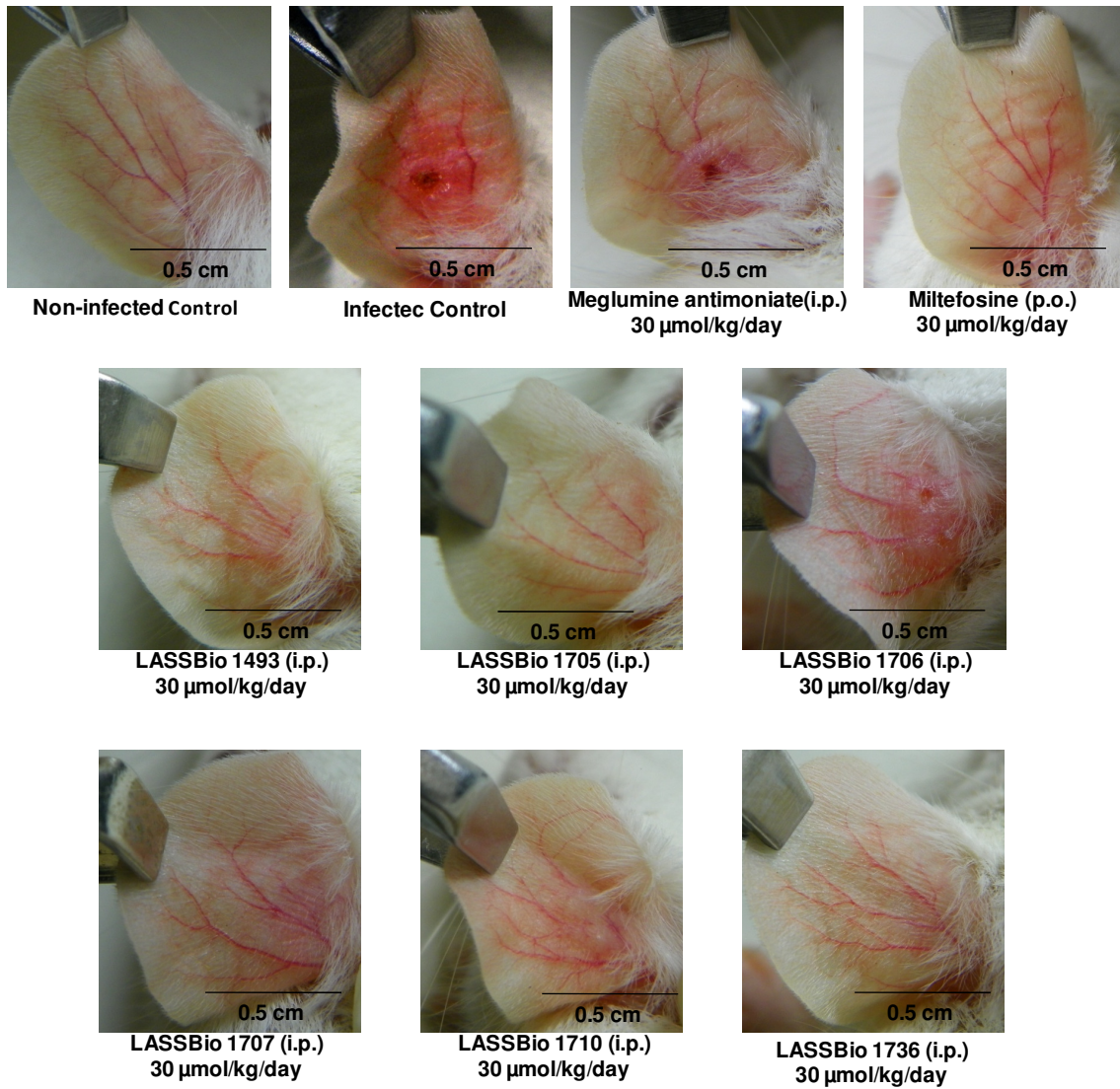
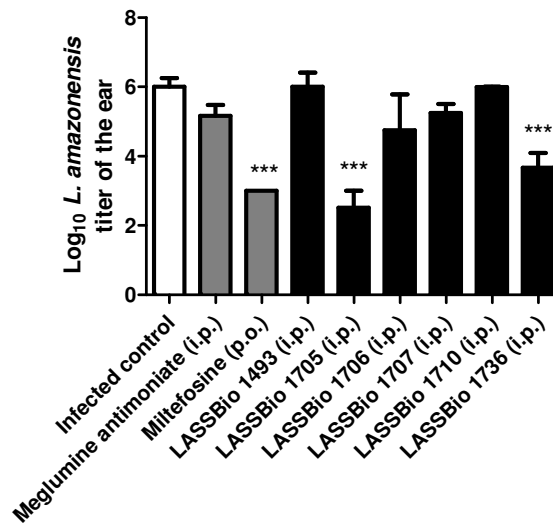


Figure 4

(A)



(B)

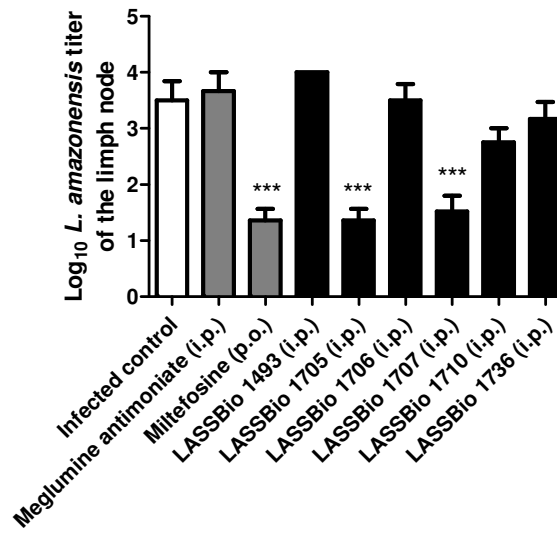
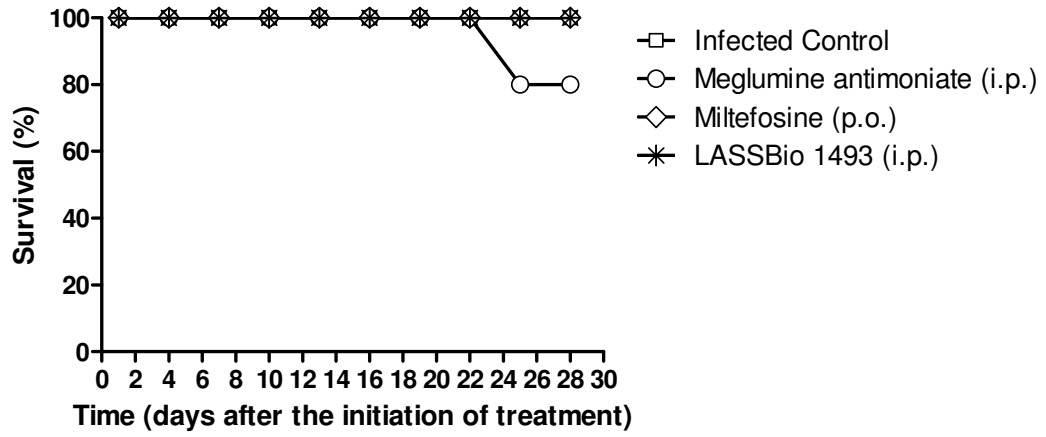
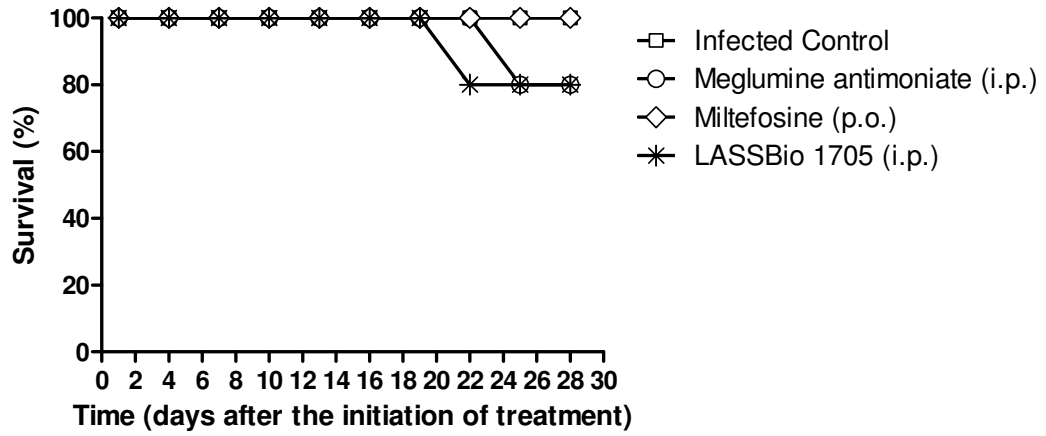


Figure 5

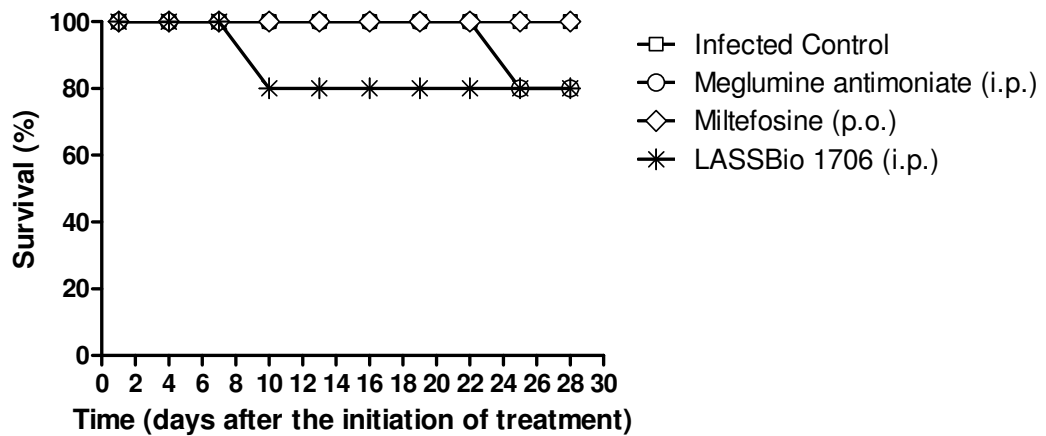
(A)



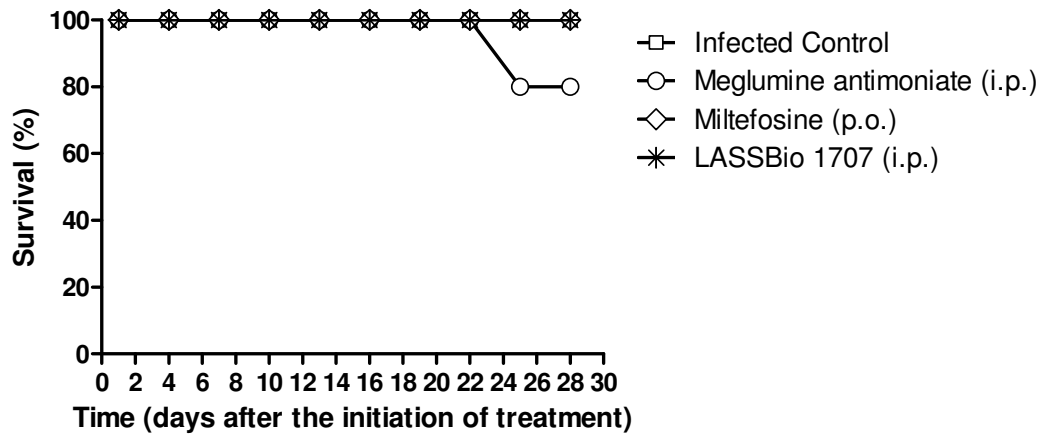
(B)



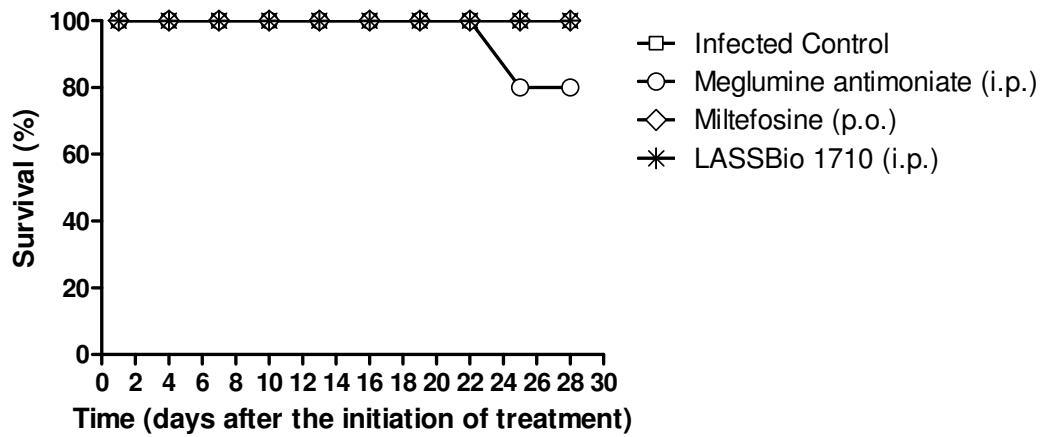
(C)



(D)



(E)



(F)

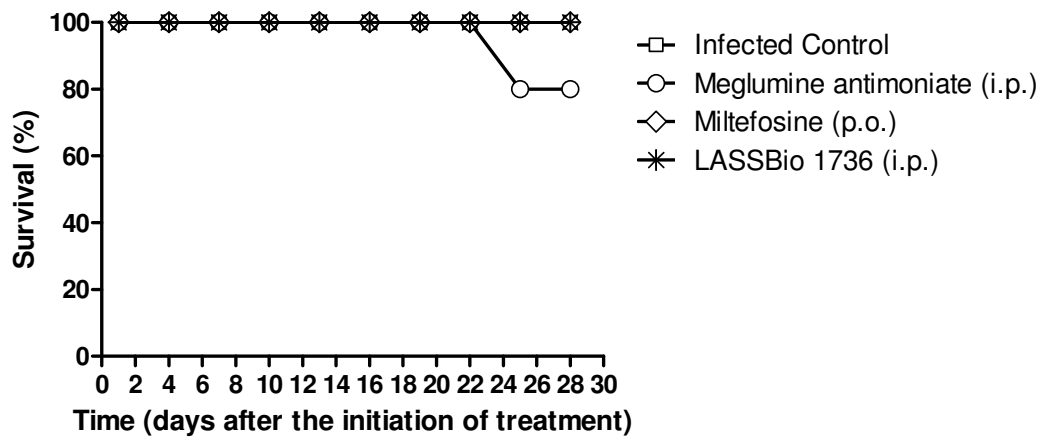


Figure 6

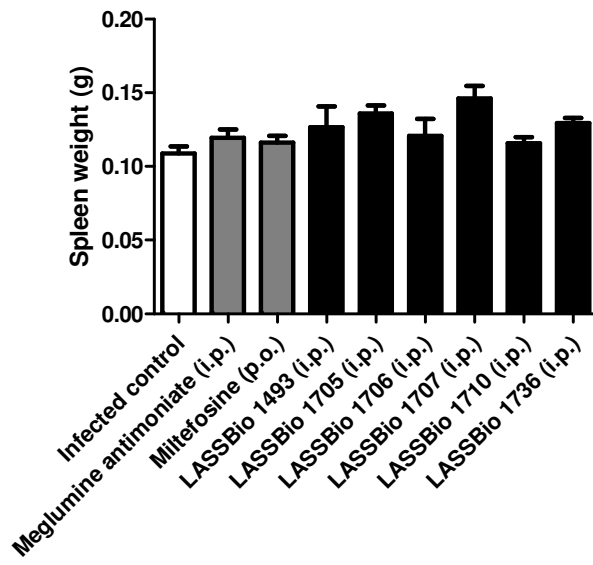
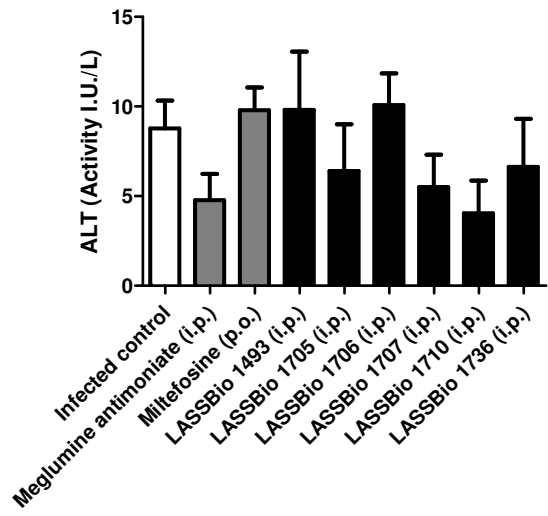
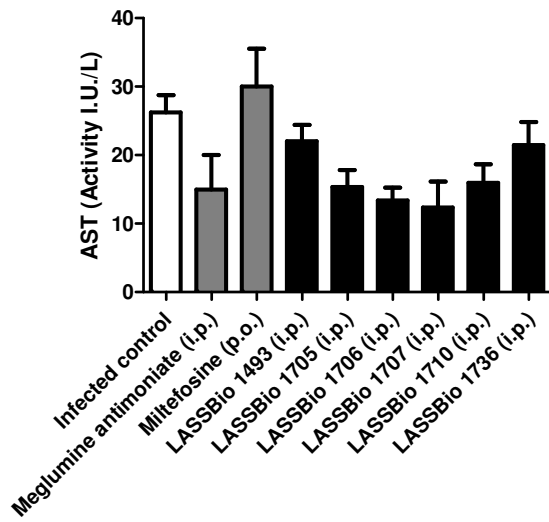


Figure 7

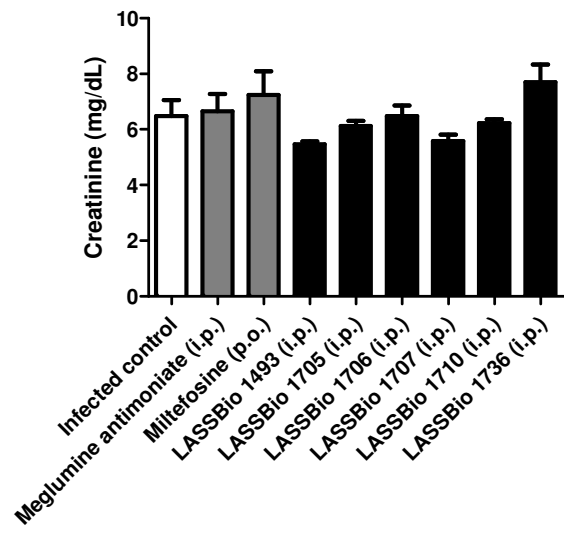
(A)



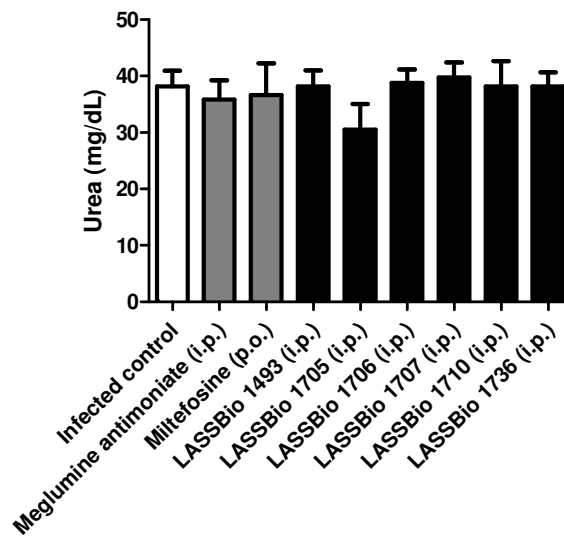
(B)



(C)



(D)



Original Research Article

Leishmanicidal and apoptotic activity of a novel synthetic hydrazide-*N*-acyhydrazone derivatives in *Leishmania amazonensis*

Aline C. de Queiroz¹, Marina A. Alves^{2,3}, Eliezer J. Barreiro^{2,3}, Lídia M. Lima^{2,3}, Magna S. Alexandre-Moreira^{1*}

Affiliation

¹*Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-Universidade Federal de Alagoas(UFAL)*

²*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio de Janeiro(UFRJ)*

³*Programa de Pós -graduação em Química- Instituto de Química- UFRJ*

***Corresponding author:**

Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil. Tel.: +55 82 32141527. Email: suzana.magna@gmail.com; magnasuzana@pq.cnpq.br

Abstract.

Leishmaniasis is a very relevant parasitic disease, especially in the tropical and subtropical regions of the world and is closely associated with poverty. The arsenal of drugs available for treating *Leishmania* infections is limited. Therefore, new, effective, and less toxic leishmaniasis treatments are still needed. We verified cell death in promastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by the treatment with hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives that presented high activity against these parasites *in vitro* and *in vivo*. The *L. amazonensis* promastigotes were treated with LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 at 100 μ M and 10 μ M. After 48h of incubation, it was investigated the occurrence of annexin-V binding and effects on the integrity of the plasma membrane, mitochondrial membrane potential, activation of caspases, autophagy or cycle cell, using flow cytometry. The leishmanicidal activity of derivatives LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 were mediated via apoptosis as evidenced by externalization of phosphatidylserine, despolarization of mitochondrial membrane and elevation of the number of caspase-positive cells. Also, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 did not induce necrosis or exacerbated autophagic process. Moreover, LASSBio 1736 reduced the percentage of cells in S and G2/M phases of cell cycle too. Taken together, these results suggest that LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 may represent a valuable source for therapeutic control of leishmaniasis in humans and animals.

KEYWORDS: *Hydrazide-N-acylhydrazone; Leishmaniasis; Leishmania amazonensis; apoptosis; Leishmanicidal activity; Cell death.*

Introduction

Leishmaniasis are tropical anthro-po-zoonotic diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. More than 12 million people are affected in 98 countries (1) and it is considered by the WHO as one of the six major infectious diseases, with a high incidence and ability to produce deformities. It is also a poverty-related disease and has become a serious impediment to socioeconomic development (2, 3).

This infectious disease is caused by the obligate intracellular parasites belonging to the order Kinetoplastida (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976) and family Trypanosomatidae (Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905), genus *Leishmania* and is transmitted to vertebrate hosts by sand fly vectors (4).

Parasites of that genus have been co-evolving with their mammal and insect hosts for thousands of years. It is not surprising, therefore, that they are well adapted to these hosts and vectors, persisting and replicating in their tissues, subverting the immune response of the vertebrate host, and spreading to other hosts of the same or of another species. In the mammalian host, the *Leishmania* survives and replicates as amastigotes, mainly inside macrophages (5).

Leishmaniasis presents various clinical aspects including cutaneous leishmaniasis, the most common form, muco-cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis the most severe form, lethal in untreated patients (6). For example, *Leishmania amazonensis* infection results in diverse clinical manifestations, ranging from cutaneous to mucocutaneous or visceral involvement (7). This is attributable to the genetic diversity of *L. amazonensis* strains, and this divergence extends to variations of chromosome size (8).

The cutaneous form of leishmaniasis is the most common and has an occurrence rate of 0.7 to 1.2 million cases per year (1). The most affected countries include Afghanistan, Algeria, Iran, and Brazil. Cutaneous leishmaniasis usually induces skin ulcers on exposed parts of the body. If left untreated, cutaneous leishmaniasis leaves permanent scars and may cause disfigurement. This disease is widespread in both the Old World and the New World (9).

Waiting for successful vector management and effective vaccines in humans, control of the disease is based on chemotherapy. Unfortunately, there are nowadays very few drugs available for treating leishmaniasis (10). Chemotherapy with antimonials is the first choice to treat leishmaniasis; however, the treatment is prolonged, expensive and not very effective, and

may have severe side effects. The second-line drugs, such as amphotericin B and pentamidine, may even be more toxic (11).

The discovery of new, safe, and effective leishmanicidal agents is urgently necessary since most of the drugs currently in use demonstrate problems that make treatment difficult, such as variable efficacy, undesirable and serious side effects, the need to be used during long-term therapy, the presence or induction of resistance to drugs and high costs (12).

Investigations of potentially active molecules are important to discover less toxic drugs that are viable economic alternatives for the treatment of leishmaniasis (13). In the course of our work devoted to discover new compounds in the leishmaniasis chemotherapy, we previously identified three hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives (LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736) that presented significant antileishmanial activity *in vitro* against several species of *Leishmania* that cause cutaneous leishmaniasis. Also, the *in vivo* efficacy of these compounds against cutaneous leishmaniasis in a mouse model was also demonstrated (14). In this new work, we verified cell death in promastigote forms of *L. amazonensis* induced by these derivatives .

Materials and Methods

Parasite culture

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) were obtained from Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos at Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine at 27° C in BOD incubator.

Analysis of phospholipid externalization and plasma membrane permeabilization

In addition, double staining with annexin V-PE and 7-AAD was performed to measure the effects of pentamidine or derivatives (100 µM and 10 µM) on the plasma membrane of *Leishmania* promastigote cells. The expression of phospholipid in the outer membrane of treated and untreated *L. amazonensis* promastigote cells was monitored by labeling with annexin V-PE, and staining with 7-AAD was used to measure the permeability of the plasma membrane. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 µM and 10 µM) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of

the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS and annexin V-PE and 7-AAD were added. Cells were incubated for 30 min in the dark prior to analysis by flow cytometry on Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Estimation of mitochondrial transmembrane electric potential

To determine changes in the mitochondrial membrane potential, we used Muse®, performed according to the manufacturer's instructions. The Muse™ MitoPotential kit utilizes the MitoPotential Reagent to detect changes the mitochondrial membrane potential. A dead cell marker is also used as an indicator of cell membrane structural integrity. It is excluded from live, healthy cells, as well as early apoptotic cells. Quantitative data (percentages and concentrations) is generated for 4 populations of cells: live, depolarized, depolarized/dead, and dead cells. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS and Muse® MitoPotential Reagent and 7-AAD were added. Cells were incubated for 30 min in the dark prior to analysis by flow cytometry on Muse™ Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Determination of Caspase-like proteases

To determine the percentage of caspase-positive cells, we used Muse™ Multicaspase kit, performed according to the manufacturer's instructions. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives (100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS. Muse® Multicaspase Reagent and after 7-AAD were added. Data acquisition was carried out using a Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Determination of presence of autophagic LC3

To determine the percentage of caspase-positive cells, we used Muse™ Autophagy LC3-antibody based kit, performed according to the manufacturer's instructions. *L. amazonensis* promastigotes were grown to 1×10^5 cells/ml and then treated with pentamidine or derivatives

(100 μ M and 10 μ M) and incubated at 26°C. After 48h, 1 mL of the culture was pelleted and resuspended in 1mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS. The cells were permeabilized and after anti-LC3 Alexa Fluor®555 conjugated antibody were added. Data acquisition was carried out using a Muse™ Cell Analyzer and analysed using Muse™ 1400 Analysis software.

Analysis of the cell cycle progression

Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^5 cells) were treated with doses of derivatives of 100 μ M or 10 μ M for 48. After, cells were fixed in chilled 70% ethanol for 3h. After washing the cells in PBS, the resultant pellet was resuspended in 7-AAD and incubated in the dark for 30 min. Data acquisition was carried out using a Muse® Cell Analyzer and analysed using Muse® 1400 Analysis software.

Results

Initially, considering the *in vivo* results, the compounds LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 were chosen to evaluation of the mechanism of cell death against *L. amazonensis* promastigotes because they previously showed high activity against parasites *in vivo* (14). In order to investigate if the tested molecules induced apoptosis in the assayed *L. amazonensis* strain, cells were treated with 100 μ M and 10 μ M and stained using the Muse™ Annexin V and Dead Cell Assay Kit – annexin V-PE and 7-AAD. Interestingly, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (100 μ M and 10 μ M) were able to induce apoptosis in promastigote forms of *L. amazonensis* after 48 h incubation (more than 60% cells with surface binding of annexin V), such as show the results in **Figure 1A**. The possible action of these derivatives at 100 μ M and 10 μ M *Leishmania* membrane was studied using 7-AAD. This dye is a high-affinity nucleic acid stain that penetrates cells with damaged plasma membranes and enhances its fluorescence by more than 500-fold upon nucleic acid binding. Our data clearly demonstrated that the membrane damage don't occur after 48h of incubation with LASSBio 1705, LASSBio 1707, and LASSBio 1736 (**Figure 1B**). In fact, the treatment with LASSBio 1705 at 100 μ M for 48h induced membrane damage on 1.0% of promastigotes.

LASSBio 1705 and LASSBio 1736 at 100 μ M for 48h also induced depolarization of mitochondrial membrane of these parasites (**Figure 2**). Depolarization of the mitochondrial

membrane is a characteristic feature of apoptosis induction. The mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometer analysis using the Muse™ MitoPotential kit (**Figure 2**). **Figure 2** demonstrated that the treatment with LASSBio 1705 and LASSBio 1736 also induced depolarization of mitochondrial membrane of these parasites decreased the *L. amazonensis* mitochondrial membrane potential when treated 100 µM for 48h. Furthermore, mitochondria are the main target of injury after stresses leading to programmed cell death and necrosis. Moreover, it is important to mention that the observation of this event is a pre-apoptotic event (15). Moreover, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 at 100 µM for 48h increased the percentage of caspase-positive *L. amazonensis* promastigotes, such as pentamidine (**Figure 3**).

Also, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (100 µM and 10 µM for 48h) did not induce exacerbated autophagic process (**Figure 4**). Additionally, LASSBio 1707 at 100 µM elevated the number of *L. amazonensis* promastigotes at S phase of cell cycle (**Figure 5**). On the other hand, LASSBio 1736 at 100 µM reduced the percentage of *L. amazonensis* promastigotes in S and G2/M phases of cell cycle (**Figure 5**).

Discussion and Conclusions

The novel hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives were previously evaluated against promastigotes and amastigotes from 3 species of *Leishmania*, recognized worldwide as major etiological agents of cutaneous leishmaniasis. Thus, for the first time, we had demonstrated in our previous study that these derivatives with new molecular scaffolds are effective against *Leishmania* species *in vitro* and *in vivo*, indicating that some hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives have *in vitro* anti-leishmanial activity and that this activity is not limited to a single species (14).

To exert an antiproliferative effect against *Leishmania*, agents need to induce morphological, biochemical or molecular alterations that lead to parasite death or prevent its proliferation (16). Considering the *in vivo* results, the compounds LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 were chosen for evaluation of the mechanism of cell death against *L. amazonensis* promastigotes because they showed high activity against parasites *in vivo*. In addition, apoptosis/necrosis events, effects on the cell cycle and exacerbation of the autophagic process were studied.

Cell death pathways may be generally classified into: apoptosis, necrosis and exacerbation of the autophagic process (17). In order to determine the manner by which LASSBio 1705, LASSBio 1707, and LASSBio 1736 exerted its antiproliferative activity, we performed flow cytometry analyses using 7-AAD dye to identify cell membrane disruption (in necrotic cells) and annexin-V PE to investigate the externalization of phospholipids, typical feature of apoptotic cells (18), such as shown in the **Figure 1A**.

Necrosis is an unregulated process characterized by irreversible disruption of plasma membrane integrity, organelles breakdown and randomly fragmented DNA death (18). Treatments with crescent concentrations of LASSBio 1705, LASSBio 1707, and LASSBio 1736 (100 μ M and 10 μ M) did not alter the percentage of cells labeled with 7-AAD (data not shown), demonstrating that the parasites did not suffer cell membrane damage and, probably, did not undergo a necrotic process.

Interestingly, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (100 μ M and 10 μ M) was able to induce apoptosis in promastigote forms of *L. amazonensis* after 48 h incubation (more than 60% cells with surface binding of annexin V) (**Figure 1A**). During apoptosis, there are drastic changes in the phospholipid composition of both leaflets in the plasma membrane. Binding of annexin V to the cell surface of *Leishmania* parasites is therefore likely to be a consequence of changes in the plasma membrane lipid arrangement. In addition, annexin V has been reported to bind phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol (19). Also, the phosphatidylserine exposure has also been implicated as an apoptotic marker (20).

Apoptosis is a process of programmed cell death required in multicellular organisms for normal tissue development and homeostasis, as it eliminates cells that are damaged, infected or no longer needed. A number of the biochemical and morphological events that define apoptosis have been described in the *Leishmania* (21, 22). The apoptosis-like processes reported to occur in these kinetoplastid parasites include internucleosomal DNA fragmentation, activation of peptidases, phospholipid exposure on the external surface of the plasma membrane, release of cytochrome C, translocation of endonuclease G and the loss of mitochondrial transmembrane potential (22-24). Since the maintenance of mitochondrial transmembrane potential is essential for the survival of a single mitochondrion parasite, we evaluated the mitochondrial integrity of promastigotes by testing the mitochondrial membrane

potential by Muse Mitopotencial assay. Our data show that LASSBio 1705 and LASSBio 1736 at 100 μ M also induced apoptosis by depolarization of mitochondrial membrane of these parasites, such as show the results in **Figure 2**.

Mitochondria are the power house of the cell where the cellular ATP is generated by oxidative phosphorylation process. Mitochondrion is an important organelle for cell's survival; therefore, any damage or dysfunction to this organelle leads to cell death. This makes the mitochondria a prime target for destruction in order to achieve programmed cell death or necrosis (25). In mammalian cells after induction of apoptosis, healthy mitochondria ensure compensation for the injured ones. But for organisms with single mitochondria like *Leishmania*, there is no possibility for the compensation of injured mitochondria and survival depends on proper functioning of a single organelle. In the absence of proper functional mitochondria, the cells would reduce to synthesize ATP from their mitochondrial source and cause a rapid decrease at the cell size (26).

Moreover, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 increased the percentage of caspase-positive *L. amazonensis* promastigotes, such as pentamidine (**Figure 3**). It switches on the cascade of caspase like proteases, which causes genomic DNA fragmentation and further leads to death by means of apoptosis. Caspase like proteases seem to have role in cascading apoptosis process in *Leishmania* as the cell lysate of apoptotic *Leishmania* parasite can cleave caspase substrate (27, 28). In particular, caspases, which have an essential role in the execution of apoptosis in higher eukaryotes, are absent from genomes of *Leishmania* (29). In *Leishmania*, metacaspases, distinctly related to caspases, are thought to be responsible for caspase like activity. Metacaspases are caspase family cysteine peptidases that have been implicated in cell death processes in plants, fungi and protozoa. Metacaspases have also been suggested to be involved in cell cycle control, differentiation and clearance of aggregates, but recently metacaspases of *Leishmania* were reported to have trypsin like activity rather than caspase like activity, indicating no role of metacaspases in apoptotic cell death in *Leishmania* (30-32). In addition, Caspase-3/7-like activation can be induced by a number of stimuli despite the absence of genes encoding caspases within the *L. major* genome. Hence, in *Leishmania*, the caspases like activity may be performed by some other sequence unrelated protease that is still unidentified (29).

Caspase-like activation occurs in LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736-mediated apoptosis. The trigger for this activation is unclear in *Leishmania* system, but may

involve the leakage of cytochrome *c* from mitochondria and activation of a caspase-9-like enzyme, which activates caspase-3/7. Alternatively caspase-8-like enzyme activation, via a death signal equivalent to that which occurs by activation of the Fas/FADD system, could trigger caspase-3/7 activation. Moreover, the activated caspase-12 can activate caspase-3/7 (33, 34).

In addition, anti-LC3 Alexa Fluor®555 conjugated antibody was performed to evaluate a possible autophagic programmed cell death in promastigotes treated with LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (100 µM and 10 µM) by flow cytometer analysis (**Figure 4**). The exacerbation of the autophagic process, whereby cells remove or remodel damaged cellular structures, but that under certain conditions can induce an intense cytoplasmic vacuolization and dismantling of the cellular organization resulting in cell death (17). However, treatment with LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 did not alter the autophagy induction ratio of cells, indicating that antiproliferative activity of these derivatives likely does not result from an exacerbated autophagic process.

Finally, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after treatment with derivatives at 100 µM and 10 µM by 48h (**Figure 5**). Analysis of cell population at different cell cycle stages is possible after staining with 7-AAD and subsequent flow cytometric analysis. Cells at G0/G1 stage of cell cycle will have one copy of DNA, while G2 stage will have two copies of DNA. Thus, the fluorescence of G2 phase cells will be double of G1 phase after 7-AAD staining. Synthesis phase (S-phase) will have intermediate fluorescence intensity (35). In control cells, the G1, S, and G2/M populations remained almost the same. The treatments of promastigotes of *L. amazonensis* with LASSBio 1707 or LASSBio 1736 by 48h were able to induce drastic changes in the cell cycle of the parasites (**Figure 5**). LASSBio 1707 at 100 µM induced a significant increase in the proportion of cells in the S phase. On the other hand, LASSBio 1736 at 100 µM induced a marked reduction in DNA replication and mitosis, with a decrease in the number of cells in G2/M phase and S phase when compared either to control cells or cells exposed only to DMSO.

In conclusion, *N*-acylhydrazones LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 proved to be potent antileishmanial agents and of low toxicity both in vitro and in vivo and induced apoptosis primarily associated with the activation of caspase-like through the mitochondrial pathway, assuming the position of lead-compounds which can be used in the discovery of new therapies for *Leishmania* infections. Nevertheless, further studies are needed

in order to validate this hypothesis by studying characteristic signals of this pathway such as ROS generation, DNA fragmentation, ATP levels and induction of protein expression, such as caspases and metacaspases.

Acknowledgment: The authors would like to thank Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute for having provided L. major IOC/L0581 (MHOM/SU/1973/5-ASKH). The authors are grateful to the CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ (404344/2012-7) and FAPESP (Pronem 20110722-006-0018-0010) for the joint funding of this research project. The authors wish to thank several of their colleagues working at the UFAL and UFRJ for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.

References

1. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team.** 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* **7**: e3571.
2. **World Health Organization.** 2010. Control of the leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series **949**: 1-186.
3. **Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M.** 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment *J Am Acad Dermatol* **63**: 309–322.
4. **Ross R.** 1903. Note on the bodies recently described by *Leishman* and *Donovan*. *BMJ* **2**: 1261–1262.
5. **Alexander J, Satoskar AR, Russell DG.** 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 2993–3002.
6. **World Health Organization.** Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (accessed January 3, 2015).
7. **Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro De Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson Júnior WD.** 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* **44**: 536–546.

8. **Oliveira JPC, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, Oliveira CI.** 2007. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCRbased analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis* **6**:5.
9. **Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S.** 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **7**:581–596.
10. **Sundar S, Chakravarty J.** 2013. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* **14**: 53-63.
11. **Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TP, Beijnen JH, Vanaerschot M, Decuypere S, Dhakal SS, Das ML, Karki P, Singh R, Boelaert M, Dujardin JC.** 2013. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin Infect Dis* **56**: 1530–1538.
12. **Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA.** 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* **118**:87–96.
13. **Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, Canto-Cavalheiro MM, Silva AJM, Costa PR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC.** 2011. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **66**: 1555–1559.
14. **Alves MA, Queiroz AC, Barreiro EJ, Alexandre-Moreira MA, Lima LM.** In Vitro/In Vivo Antileishmanial Effects of Novel Hydrazide-*N*-Acyhydrazone Derivatives. *J. Med. Chem.*
15. **Dolai S, Pal S, Yadav RK, Adak S.** 2011. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca²⁺-dependent and caspase-independent mechanism. *J Biol Chem* **15**: 13638–13646.
16. **Adade CM, Chagas GSF, Souto-Padrón T.** 2012. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **139**: 1444-1461.
17. **Guimarães CA, Linden R.** 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* **271**: 1638–1650.
18. **Debrabant A, Nakhasi H.** 2003. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol and Dis* **2**: 7.

19. **Weingärtner A, Kemmer G, Müller FD, Zampieri RA, Gonzaga dos Santos M, et al.** 2012. Leishmania Promastigotes Lack phosphatidylserine but Bind Annexin V upon Permeabilization or Miltefosine Treatment. PLoS One **7**: e42070.
20. **Mehta A, Shaha C.** 2004. Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. J Biol Chem **279**: 11798–11813.
21. **Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 231–241.
22. **Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL.** 2003. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Int J Parasitol **33**: 257–267.
23. **Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL.** 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. Cell Death Differ **9**: 53–64.
24. **Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC.** 2008. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. Cell Death Differ **15**: 113–122.
25. **Kang J, Pervaiz S.** 2012. Mitochondria: Redox Metabolism and Dysfunction. Biochem Res Int **2012**: ID 896751.
26. **Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder HK.** 2004. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. Cell Death Differ **11**: 924–36.
27. **Das M, Mukherjee SB, Shaha C.** 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. J Cell Sci **114**: 2461–2469.
28. **Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL.** 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. Cell Death Differ **9**: 53–64.
29. **Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchettin G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler**

- C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436–442.
30. Tsiatsiani L, Van-Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. 2011. Metacaspases. *Cell Death Differ* **18**: 1279–1288.
31. Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyan A, Debrabant A. 2007. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1745–1757.
32. Castanys-Muñoz E, Brown E, Coombs GH, Mottram JC. 2012. *Leishmania mexicana* metacaspase is a negative regulator of amastigote proliferation in mammalian cells. *Cell Death Dis* **3**: e385.
33. Chen CY, Juo P, Liou JS, Li CQ, Yu Q, Blenis J, Faller DV. 2001. The recruitment of Fas-associated death domain/caspase-8 in Ras-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* **12**: 297–306
34. Eichler T, Ma Q, Kelly C, Mishra J, Parikh S, Ransom RF, Devarajan P, Smoyer W E. 2006. Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway. *Toxicol Sci* **90**: 392–399.
35. Saudagar P, Saha BP, Saikia BAK, Dubey VK. 2013. Molecular mechanism underlying antileishmanial effect of oxabicyclo[3.3.1]nonanones: Inhibition of key redox enzymes of the pathogen. *Eur J Pharm Biopharm* **85**: 569–577.

Figures Legends

Figure 1. *L. amazonensis* promastigotes death analysis using flow cytometry upon treatment with pentamidine, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 at 100 μ M and 10 μ M for 48h. (A) Phospholipids externalization; (B) Plasma membrane permeabilization by necrosis.

Figure 2. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential on *L. amazonensis* promastigotes using flow cytometry upon treatment with pentamidine, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736. Cells were treated at 100 μ M and 10 μ M for 48 h.

Figure 3. Determination of presence of Caspase-like proteases in *L. amazonensis* promastigotes using flow cytometry upon treatment with pentamidine, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736. Cells were treated at 100 μ M and 10 μ M for 48 h.

Figure 4. Determination of presence of autophagic LC3 in *L. amazonensis* promastigotes using flow cytometry upon treatment with pentamidine, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736. Cells were treated at 100 μ M and 10 μ M for 48 h.

Figure 5. The effect of pentamidine, LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 on cell cycle of *L. amazonensis* promastigotes. Cells were treated at 100 μ M and 10 μ M for 48 h.

Figure 1

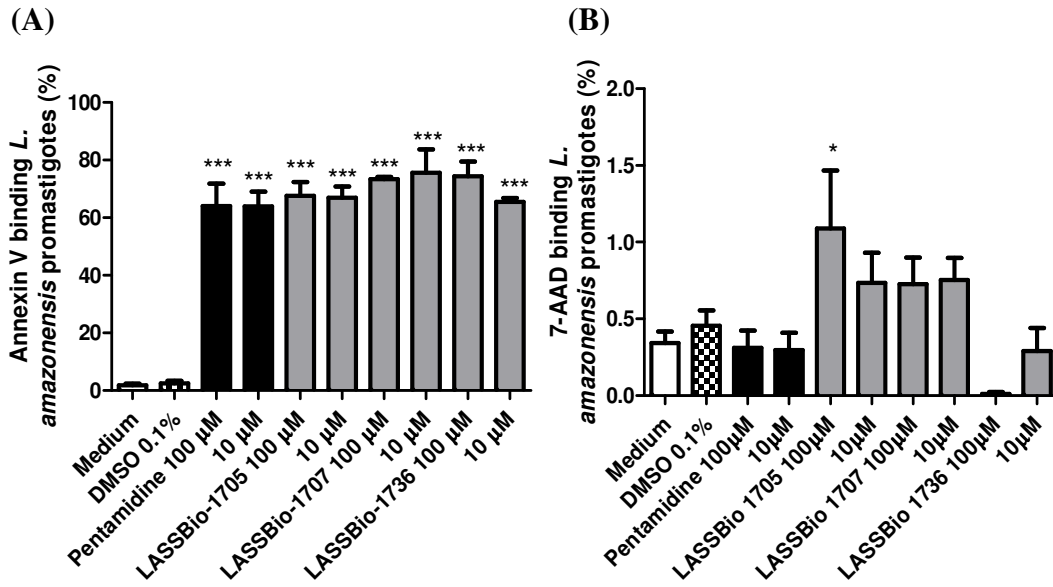


Figure 2

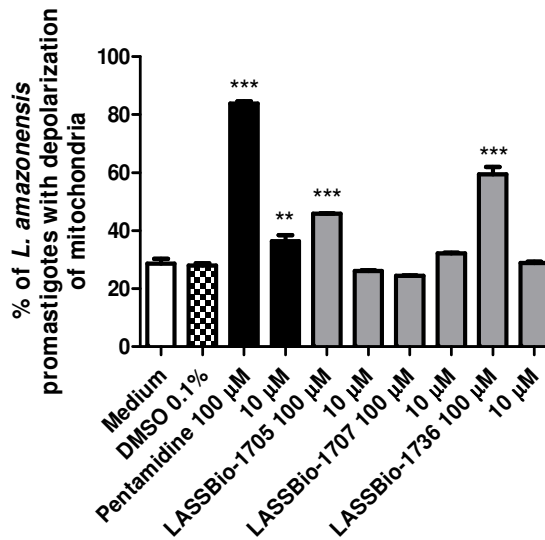


Figure 3

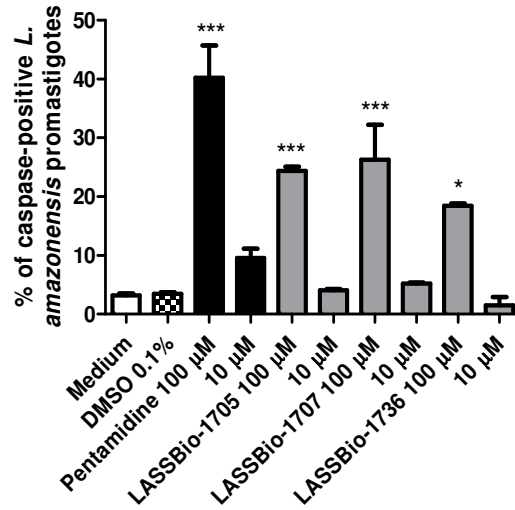


Figure 4

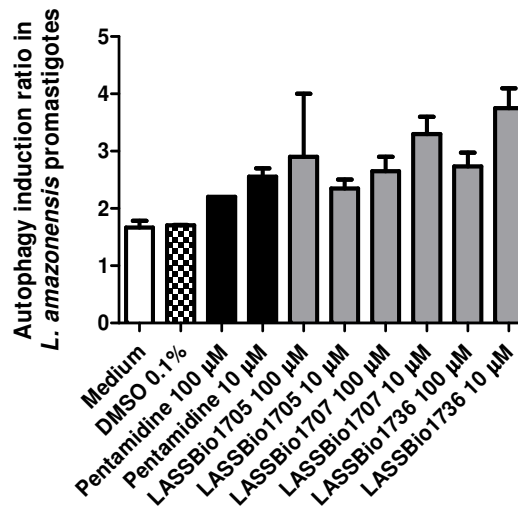
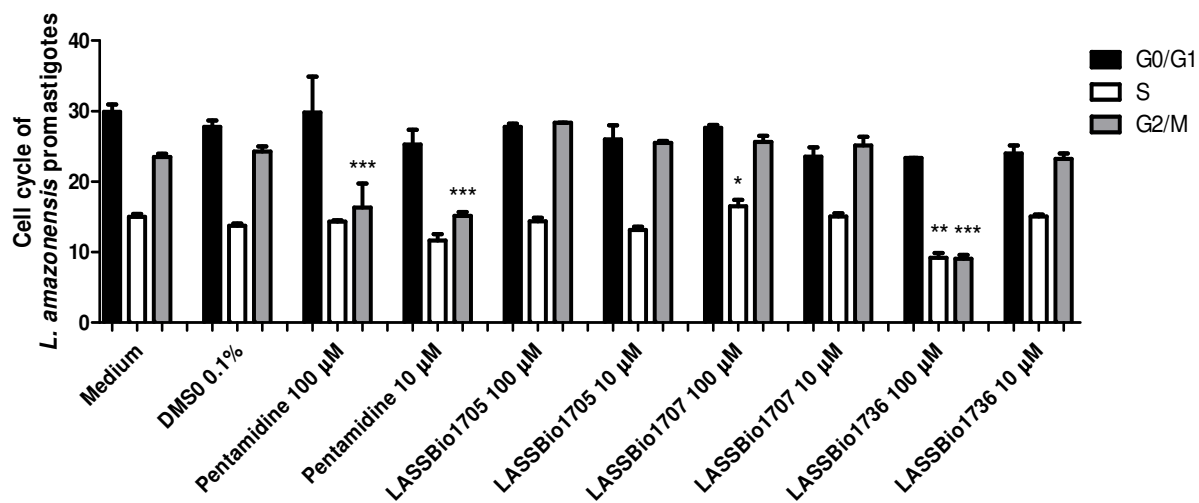


Figure 5



Original Research Article

In vitro* and *in vivo* activity of hydrazide-N-acylhydrazone derivatives on *Leishmania chagasi

Aline C. de Queiroz¹, Marina A. Alves^{2,3}, Luiz Carlos Alves⁴, Fábio André Brayner dos Santos⁴, Eliezer J. Barreiro^{2,3}, Lídia M. Lima^{2,3}, Magna S. Alexandre-Moreira^{1*}

Affiliation

¹*Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-Universidade Federal de Alagoas(UFAL)*

²*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio de Janeiro(UFRJ)*

³*Programa de Pós -graduação em Química- Instituto de Química- UFRJ*

⁴*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE*

***Corresponding author:**

Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil. Tel.: +55 82 32141527. Email: suzana.magna@gmail.com; magnasuzana@pq.cnpq.br

Abstract.

The *N*-acylhydrazone derivatives have shown several biological properties and recently the leishmanicidal effect of hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives were demonstrated by us. These findings led us to test the effect of these hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives on *Leishmania chagasi*, the agent of visceral leishmaniasis in Latin America. *In vitro* assays were performed in *L. chagasi*-infected peritoneal macrophages treated with different concentrations of these derivatives. In *in vivo* experiments, Golden hamsters were infected with *L. chagasi* and injected with LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (at 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ x 15 days, i.p) whereas control animals received either Glucantime (same dose) or PBS. The ultrastructural morphological effects of LASSBio 1736 on *L. chagasi* promastigotes were also verified. The main findings were: 1) The derivatives LASSBio 1492, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 showed deleterious activity against intracellular parasites at micromolar concentrations (IC_{50} between 53.3 ± 2.6 to 58.3 ± 2.0 μM); 2) treatment of *L. chagasi*-infected hamsters with LASSBio 1707 and LASSBio 1736 led to a significant reduction of parasite burden when compared to controls that received PBS; 3) the treatment with these derivatives did not result in hepatic or renal toxicity in *L. chagasi*-infected hamsters. The present results demonstrated that LASSBio 1707 and LASSBio 1736 are able to destroy *L. chagasi* *in vitro* and *in vivo* at concentrations that are non toxic to the host. We believe these findings support further study of the potential of LASSBio 1707 and LASSBio 1736 as a possible alternative for the chemotherapy of visceral leishmaniasis.

KEYWORDS: *Hydrazide-N-acylhydrazone; Leishmaniasis; Leishmania chagasi; Leishmanicidal activity.*

Introduction

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by several species of *Leishmania* and expresses a variety of clinical symptoms. In addition, this group of diseases is the third largest among infectious diseases transmitted by vectors, behind malaria and filariasis (1). Human leishmaniasis is endemic in 98 countries, with a global incidence estimated at approximately 0.2-0.4 million visceral leishmaniasis cases and 0.7-1.2 million cutaneous leishmaniasis cases occurring each year. It is estimated that 20,000-40,000 leishmaniasis deaths occur per year. Leishmaniasis is widespread protozoan diseases that affect mostly poor and marginal populations in Latin America, Africa, and Asia. Brazil is among the 10 countries with the highest estimated case counts (2).

The visceral leishmaniasis (Kala-azar) is the most serious of these diseases and is extremely important in veterinary medicine because dogs are considered the main domestic reservoir for human infection (3). The visceral leishmaniasis, often fatal if patients were not correctly treated, in which vital organs of the body are affected (4,5). The visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi* (= *Leishmania infantum*) or *Leishmania donovani* and affects mainly primary and secondary lymphoid organs, such as spleen, bone marrow, liver and lymph nodes (6).

Neglected by big pharmaceutical companies, the chemotherapy of this diseases involves highly toxic drugs. For more than 60 years, pentavalent antimonials have been the first-line drugs in the treatment for all types of leishmaniasis in most countries. Two organic salts, meglumine antimoniate (Glucantime) and sodium stibogluconate (Pentostam) are mainly used (7-9). The treatment is lengthy, potentially toxic and painful (5). In the case of relapse, patients need treatment with second-line medicines such as pentamidine and amphotericin B. These drugs are toxic and may show a serious of side effects such as nephrotoxicity (7-10). Newly developed, liposomal amphotericin B is highly effective, has almost no side effects and requires only a short course of treatment but it is too expensive to be a viable treatment option in most developing nations (5).

Therefore, there is still an urgent need for novel drug candidates in the interest of public health. These observations prompted us to investigate the *in vitro* and *in vivo* activity against *L. chagasi* of promissory hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives with notorious

leishmanicidal activity against *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis, as previously described by our research group (11).

Materials and Methods.

Parasite culture

Promastigotes of *L. chagasi*(MCAN/BR/89/BA262) were obtained from Dr. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 20% FBS and 2% human urine at 27° C in BOD incubator.

In vitro activity against amastigote forms of L.chagasi

This study (protocol number 2013.02) was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil). All animals received humane care in compliance with the 'Principles of laboratory animal care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the care and use of laboratory animals' prepared by the National Academy of Sciences (Washington, DC). Six-to-eight-week old female swiss mice were euthanized and injected intraperitoneally with a 5 mL of a sterile phosphate-buffered saline (PBS). The total leukocyte into the peritoneal cavity was harvested by peritoneal lavages with PBS and counted with a hemacytometer (12). To assess the activity of the test derivatives against the amastigote stage of *L. chagasi* were realized model of infection in coverglass (13). The murine macrophages (peritoneal macrophages) were prepared in 24-well vessels (Corning) at 2×10^5 adherent cells/well, infected with 2×10^6 promastigotes in glass coverslips placed inside 1 ml medium culture. The cultures were cultured or not with the test derivatives or reference drugs (0.01-100 μ M), and kept for 24h at 37 °C, 5% CO₂. After 24h, coverslips were washed, stained with Giemsa-MayGrünwald, and intracellular amastigotes were counted in 100 macrophages. Data obtained from *in vitro* experiments were expressed as the Mean \pm S.E.M. of duplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a p value <0.05 or lower were considered significant.

Scanning electron microscopy

Logarithmic-phase promastigotes (5×10^7 /mL), washed twice with PBS pH 7.2, or tissue fragments, were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 24 h at 4°C. After fixation, the material was adhered to poly-L-lysine-coated coverslips, post-fixed for 30 min in a solution containing 1% OsO₄, 1.25% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer, washed in the same buffer, dehydrated in ethanol series, critical point dried, and coated with gold in JFC-1100 (Jeol). Cells were observed under a JEOL T-200 field emission scanning electron microscope operating at 5 kV.

In vivo activity against L. chagasi

This study (protocol number 2013.02) was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil). All animals received humane care in compliance with the 'Principles of laboratory animal care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the care and use of laboratory animals' prepared by the National Academy of Sciences (Washington, DC). Then, 1×10^7 stationary promastigotes (5 days of culture in Schneider's medium) of *L. chagasi* were inoculated intraperitoneally in 8-week-old male Syrian Golden Hamsters weighing ca. 100 g. and 45 days later treated with LASSBio 1705, LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (i.p.) or glucantime (i.p.) at 30 μ mol/kg x 15 days. The parasite loads of infected spleen were determined using a quantitative limiting-dilution assay (14-16). Toxicity of complexes was also evaluated due to alterations on spleen weight and by biochemistry dosages in plasma, performed according to the manufacturer's instructions (Doles, BRA). Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

Results.

Initially, considering everyone else previous results, some derivatives were selected to determination of IC₅₀ value for intracellular amastigote forms of *L. chagasi* (**Table 1**). The results of degree of cytotoxicity against *L. chagasi* are shown in **Table 1**. The compounds

LASSBio 1092, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 showed deleterious activity to amastigote of *L. chagasi*. In this case, the most active compounds were LASSBio 1492 (IC₅₀ of 58.3 μM and maximum effect of 57.7 ± 4.9%), LASSBio 1707 (IC₅₀ of 53.3 μM and maximum effect of 63.3 ± 3.1%), LASSBio 1710 (IC₅₀ of 55.0 μM and maximum effect of 58.9 ± 4.9%) and LASSBio 1736 (IC₅₀ of 57.6 μM and maximum effect of 57.0 ± 1.9%) presented similar efficacy and potency to standard drugs pentamidine (IC₅₀ of 65.1 μM and maximum effect of 66.4 ± 3.7%).

Considering the *in vitro* results, the compounds LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 were also chosen to evaluation of its *in vivo* leishmanicidal activity against *L. chagasi*. The treatment with these derivatives at 30 μmol/kg/day x 15 days, intraperitoneally, decrease parasite load in spleen. The treatment with Glucantime at same dose did not diminish the *L. chagasi* titer in spleen (**Figure 1**). The compounds LASSBio-1707 and LASSBio-1736 at concentration of 30 μmol/kg/day x 28 also showed immunomodulatory effect because these derivatives induce variation spleen weight (**Figure 2**). In addition, *in vivo* treatment with derivatives assayed did not induced alterations of, aspartate aminotransferase (AST), creatinine and urea (**Figure 3B, 3C and 3D**) and presented protective effect to hepatic damage of the visceral leishmaniasis because this treatment prevented alterations of alanine aminotransferase (ALT) levels on serum due to disease (**Figure 3A**).

Moreover, scanning electron microscopy revealed that LASSBio 1736 at 100 M for 48h was able to induce dramatic morphological alterations in the promastigote forms of *L. chagasi* compared with untreated parasites, which showed typical characteristics, with an elongated shape and free flagellum. **Figure 4** shows alterations in shape and size and cellular disintegration in LASSBio 1736 treated parasites. The treatment with LASSBio 1736 induced morphological changes reminiscent of axenic amastigotes, including oval cell shape and shortened and retracted flagella. In addition, LASSBio 1736 also caused profound changes in the plasma membrane.

Discussion

This work was driven by the necessity of finding a new therapeutic scheme for a visceral leishmaniasis patient. Visceral leishmaniasis is ranked second in mortality and fourth

in morbidity among tropical diseases, with 20,000 to 40,000 deaths per year and over 2 million DALYs (disability-adjusted life years) lost (2,17). Typical manifestations of VL include weight loss, fever, hepatosplenomegaly, and pancytopenia resulting from replication of *Leishmania* amastigotes in macrophages mainly in the liver, spleen, and bone marrow (18). The discovery of new, safe, and effective leishmanicidal agents is urgently necessary since most of the drugs currently in use demonstrate problems that make treatment difficult. (19). Thus, the present study focused on the *in vitro* and *in vivo* activity of the hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives on *L. chagasi*.

Within the mammalian host, *Leishmania* infect macrophages, cells that play a critical role in regulation of immune system and in host defense (20). Infection of macrophages by the intracellular protozoan *Leishmania* leads to down-regulation of a number of macrophage innate host defense mechanisms, thereby allowing parasite survival and replication (21). For example, essential macrophage activation signaling molecules and pathways such as PKC, MAPK, JAK/STAT as well as the transcription factor AP-1 and NF- κ B are deactivated following infection with *Leishmania*. In addition, molecules such as SHP-1 are activated during *Leishmania* infection causing SHP-1 mediated JAK2 inactivation in macrophages. Thus *Leishmania* evolved several strategies to inhibit macrophage activation, the ability to present antigens on their surface as well as to interfere the communication of macrophages with cells from the adaptive immune system (22). Moreover, the inhibition of macrophage activation enables pathogen replication and survival (23). Thus, *in vitro* tests against intracellular amastigotes are more relevant to infer the sensitivity of anti-leishmanial drugs, since this is the parasite stage found in the vertebrate host (24).

Our data showed the leishmanicidal activity of LASSBio 1092, LASSBio 1707, LASSBio 1710 and LASSBio 1736 against intracellular amastigotes of *L. chagasi*, whereas similar leishmanicidal effect was observed with pentamidine. The leishmanicidal activity of these derivatives is comparable to that reported for several compounds tested against visceralizing *Leishmania* species like the chalcones-like compounds (25), sakuranetin (26) and nimodipine (27). The initial evaluation of leishmanicidal activity against *L. chagasi* indicated that amastigotes of this specie was less susceptible to *in vitro* treatment with hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives when compared with other species tested (*L. major*, *L. braziliensis* and *L. amazonensis*). Moreover, these compounds showed low cytotoxicity in mammalian cells, such as shown by our previous work (11).

The hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives LASSBio 1707 and LASSBio 1736 also were highly effective against the usually refractory species *L. amazonensis* *in vivo*, in our previous work. Thus, infections of BALB/C with *L. amazonensis* parasites responded to LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (30 μ mol/kg/day x 28days, i.p.), with animals presented less parasite burden at the end of treatment (11). The efficiency of LASSBio 1707 and LASSBio 1736 in destroying *L. chagasi* *in vivo* was also demonstrated in the present study. Treatment of *L. chagasi*-infected hamsters with LASSBio 1707 and LASSBio 1736 (at 30 μ mol/kg/day x 15 days, i.p) led to a significant reduction of parasite load in animal spleens when compared to controls that received PBS. On the other hand, treatment with these derivatives did not result in hepatic or renal toxicity in *L. chagasi*-infected hamsters as demonstrated by biochemical assays.

It is well reported that leishmanicidal mediators released in large amounts may cause morphological and/or functional injuries to the liver. Moreover, *Leishmania chagasi* infection activates macrophages, which release several microbicidal agents, including peptidases, to eliminate the parasite in the liver (28). Thus, the *in vivo* treatment with LASSBio 1707 and LASSBio 1736 also presented protective effect to hepatic damage of the visceral leishmaniasis because this treatment prevented alterations of alanine aminotransferase (ALT) levels on serum due to disease, such as shown **Figure 3A**.

Therefore, the hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives LASSBio 1707 and LASSBio 1736 presented in this work have shown *in vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity against *L. chagasi*. Considering all results to leishmanicidal activity against *L. major*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* (related in previous work) and *L. chagasi* (demonstrated in the present study), in general, the best hybrid compounds to leishmanicidal activity were LASSBio 1736 with 4-(trifluoromethyl)-benzyl as substituent of the imine function.

Moreover, the literature evidence that the *N*-acylhydrazone subunit has been described as a privileged structure to design new compounds with different pharmacological effects, including antiparasitic activity (29). Several studies have demonstrated that this subunit is the pharmacophoric group to develop cysteinyl protease inhibitors (30-32). Cysteine proteases are key enzymes in many parasitic biochemical pathways and, therefore, constitute potential targets in the search for drugs against several tropical infectious diseases (33,34).

In conclusion, the effectiveness of LASSBio 1707 and LASSBio 1736 in destroying *L. chagasi* *in vitro* and *in vivo* at concentrations non toxic to the host opens perspectives to

explore the potential of these derivatives as an additional option for the chemotherapy of visceral leishmaniasis, one of the most lethal neglected tropical diseases and is closely associated with poverty, encouraging us to extend these studies for treatment of canine visceral leishmaniasis.

Acknowledgments. The authors would like to thank Dr. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz for having provided *L. chagasi* (MCAN/BR/89/BA262). The authors are grateful to the CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ (404344/2012-7) and FAPESP (Pronem 20110722-006-0018-0010) for the joint funding of this research project. The authors wish to thank several of their colleagues working at the UFAL and UFRJ for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.

References

1. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* **165**: 1–18.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, the WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* **7**: 1-12.
3. Gramiccia M, Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* **35**: 1169–1180.
4. Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* **27**: 305-318.
5. Crompton DWT, Peters P. 2010. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases, p. 91–96. WHO Press, Geneva, Switzerland.
6. Liese B, Rosenberg M, Schratz A. 2010. Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. *Lancet* **375**:67–76.

7. **Cavalli A, Bolognesi ML.**2009. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania. *J Med Chem* **52**:7339-7359.
8. **Graebin CS, Uchoa FD, Bernardes LSC, Campo VL, Carvalho I, Eifler-Lima VL.** 2009. Antiprotozoal Agents: an Overview. *Antiinfect Agents Med Chem***8**: 345-366.
9. **Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M.** 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* **63**: 309-322.
10. **Croft SL, Yardley V.** 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002 **8**: 319-342.
11. **Alves MA, Queiroz AC, Barreiro EJ, Alexandre-Moreira MA, Lima LM.** In Vitro/In Vivo Antileishmanial Effects of Novel Hydrazide-*N*-Acyhydrazone Derivatives. *J. Med. Chem.*
12. **Wang HW, Babic AM, Mitchell HA, Liu K, Wagner DD.** 2005. Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice. *FASEB J* **19**: 1018-1020.
13. **Nunes MP, Cysne-Finkelstein L, Monteiro BC, de Souza DM, Gomes NA, DosReis GA.** 2005. Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Micro Infect***7**: 78-85.
14. **Denise H, Poot J, Jiménez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC.** 2006. Studies on the CPA cysteine peptidase in the Leishmania infantum genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* **7**:42-48.
15. **Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG.** 1997. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. *Parasitol Today* **13**: 80–82.
16. **Taswell C.** 1986. Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny, p. 109-145. *In* Pretlow TC Pretlow TP (ed.), *Cell Separation: Methods and Selected Applications*. Academic Press, Nova York, NY.
17. **Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD.** 2007. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis* **1**: e114 doi:10.1371/journal.pntd.0000114.

18. **Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R.** 2014. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e3021. doi:10.1371/journal.pntd.0003021
19. **Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA.** 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* **118**:87–96.
20. **Moradin N, Descoteaux A.** 2012. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 121.
21. **MarrAK, MacIsaac JL, Jiang R, Airo AM, Kobor MS, McMaster WR.**2014. Leishmania donovani Infection Causes Distinct Epigenetic DNA Methylation Changes in Host Macrophages. *PLoS Pathog* **10**: e1004419. doi:10.1371/journal.ppat.1004419
22. **Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, Abu-Dayyeh I, Olivier M.** 2012. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med* **2012**: 819512.
23. **Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B.** 2010. Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 109189.
24. **Croft SL, Seifert K, Yardley V.** 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Ind J Med Res* **123**: 399–410.
25. **Barbosa TP, Sousa SC, Amorim FM, Rodrigues YK, de Assis PA, Caldas JP, Oliveira MR, Vasconcellos ML.** 2011. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. *Bioorg Med Chem* **19**:4250-4256.
26. **Grecco SS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Cunha RL, Romoff P, Ferreira MJ, Fávero OA, Lago JH.** 2012. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Exp Parasitol* **130**:141-145.
27. **Tempone AG, Taniwaki NN, Reimão JQ.** 2009. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res* **105**: 499-505.
28. **Costa JD, Nogueira de Melo AC, Vermelho AB, Meirelles Mde N, Porrozzini R.** 2008. In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Trop* **106**: 175-183.

29. . **Hernández P, Rojas R, Gilman RH, Sauvain M, Lima LM, Barreiro EJ, González M, Cerecetto H.** 2013. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *Eur J Med Chem* **59**:64–74.
30. **Ifa DR, Rodrigues CR, de Alencastro RB, Fraga CAM, Barreiro EJ.** 2000. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. *J. Mol. Struct. Theochem* **505**:11–17.
31. **Romeiro NC, Aguirre G, Hernández P, González M, Cerecetto H, Aldana I, Pérez-Silanes S, Monge A, Barreiro EJ, Lima LM.** 2009. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 641–652.
32. **Li R, Chen X, Gong B, Selzer PM, Li Z, Davidson E, Kurzban G, Miller RE, Nuzum EO, McKerrow JH, Fletterick RJ, Gillmor SA, Craik CS, Kuntz ID, Cohen FE, Kenyon GL.** 1996. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **4**: 1421–1427.
33. **McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR.** 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem***7**: 639-644.
34. **McKerrow JH.** 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *IntJ Parasitol***29**: 833-837.

Figure legends

Figure 1. Parasite burden throughout the course of glucantime (100 or 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.), LASSBio 1707 and LASSBio 1736 treatments (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.) in Golden Syrian hamster infected with *L. chagasi*. The parasite loads of infected spleen were determined using a quantitative limiting-dilution assay. Values are the mean of parasites loads in five hamsters in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. control.

Figure 2. *In vivo* effect of of glucantime (100 or 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.), LASSBio 1707 and LASSBio 1736 treatments (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.) in spleen weight of Golden Syrian hamster infected with *L. chagasi*. Spleen weight was verified in last day of treatment. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. control.

Figure 3. *In vivo* effect of glucantime (100 or 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.), LASSBio 1707 and LASSBio 1736 treatments (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 days, i.p.) on serum ALT (A), AST (B), Creatinine (C) and Urea (D) levels of Golden Syrian hamster infected with *L. chagasi*. Lesion sizes were monitored weekly. Values are the mean of lesion sizes in five mice in each group and bars represent the standard error of the mean. *P < 0.05, vs. control.

Figure 4. Scanning electron microscopy of *L. chagasi* promastigotes after LASSBio 1736 treatments.

Figures

Figure 1

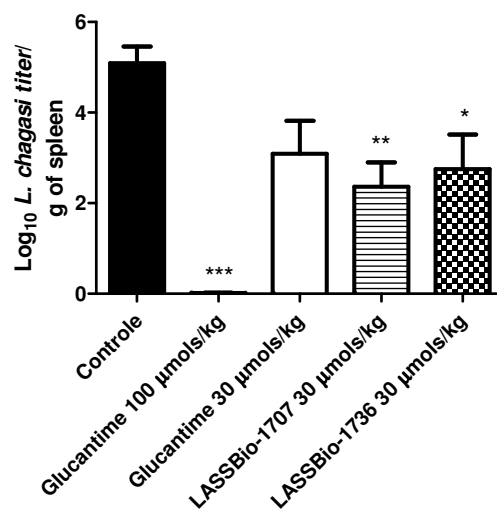


Figure 2

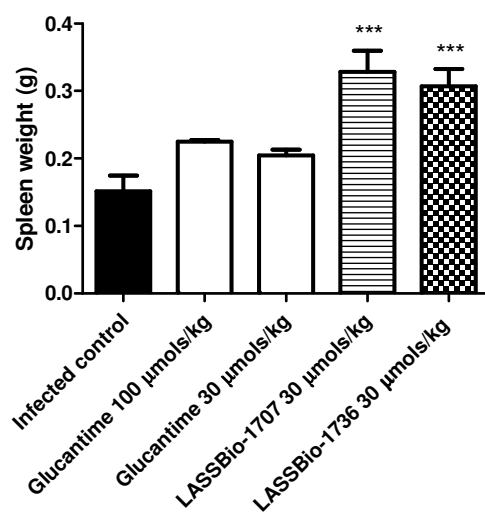


Figure 3

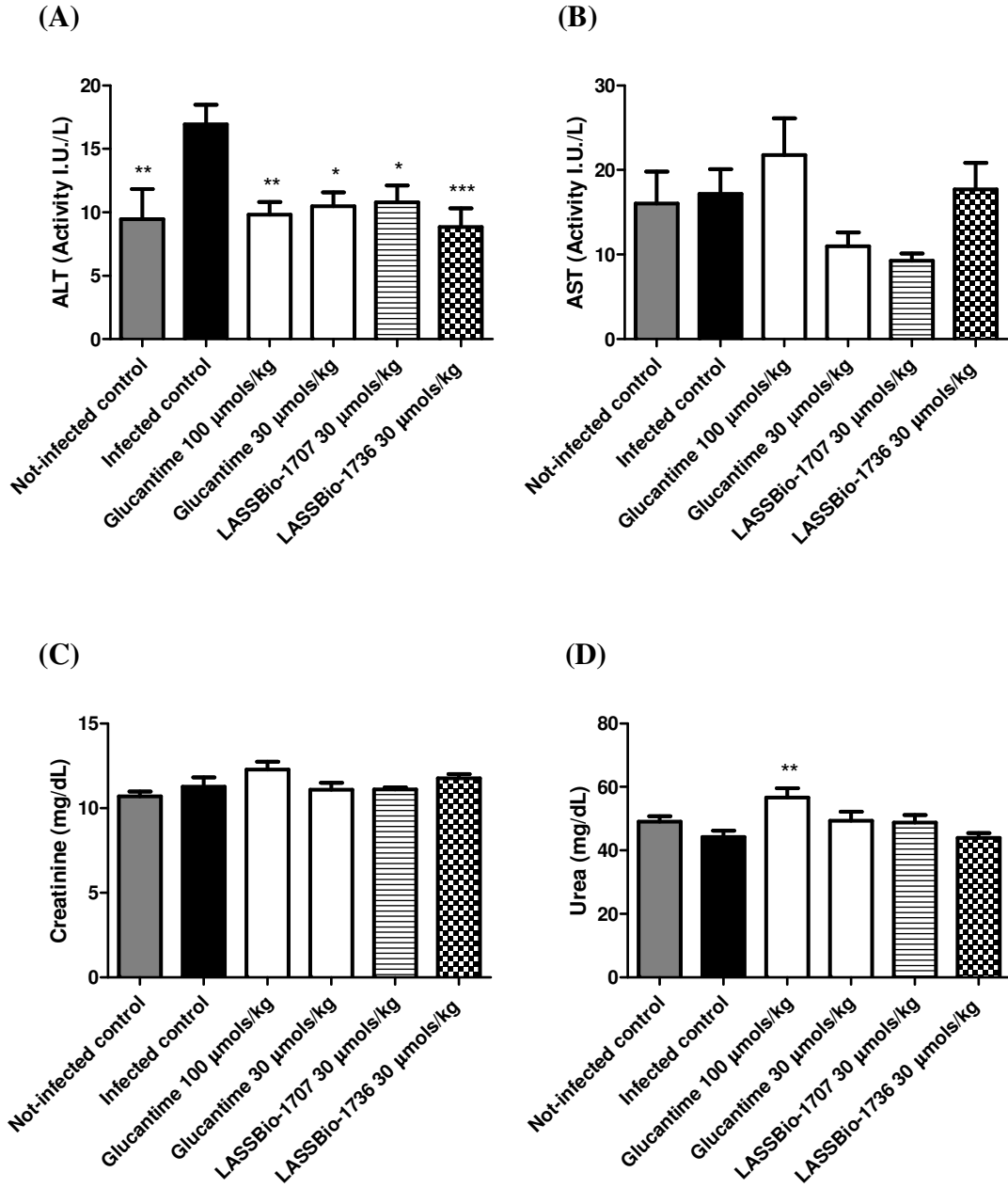
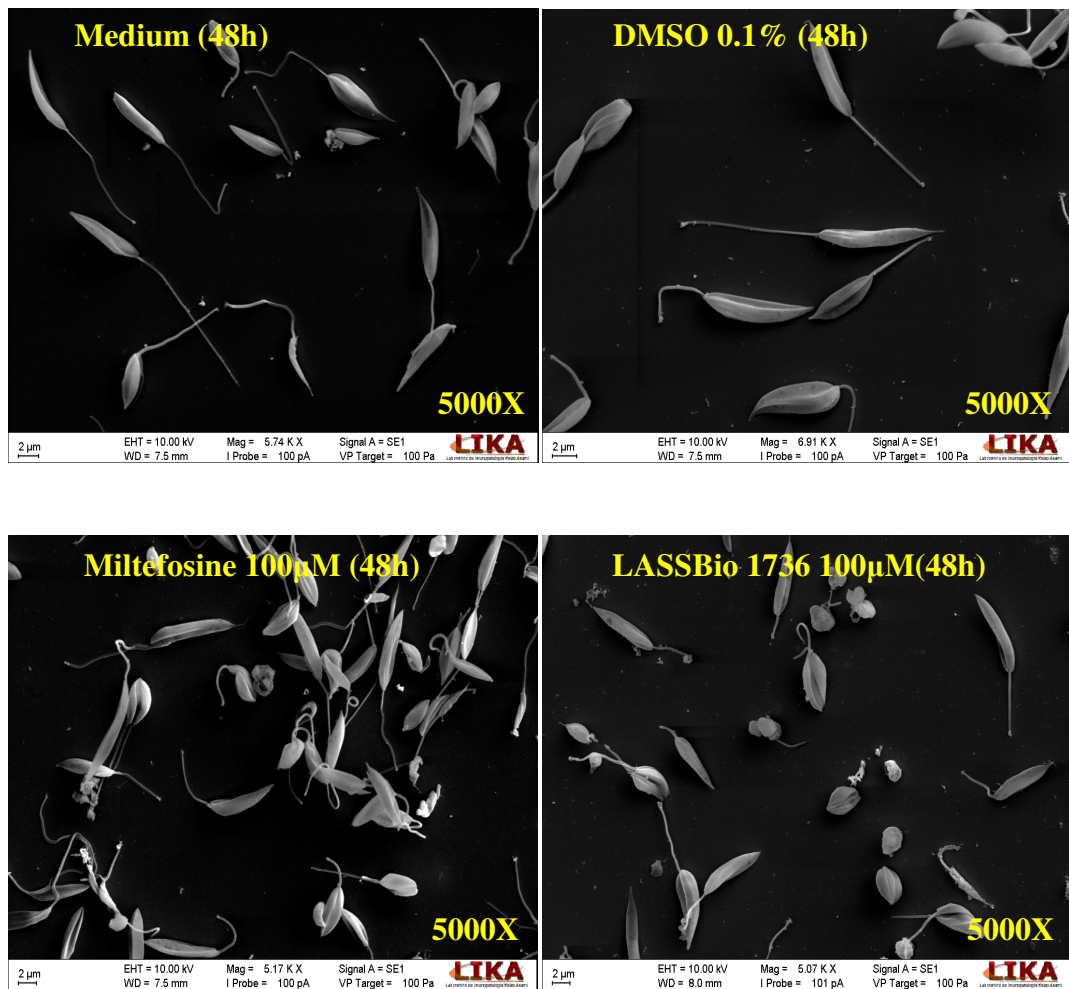


Figure 4



Tables

Table 1. Activity of standard drugs and LASSBio 1064 analogues against amastigote forms of *L. chagasi*.

Substance	LC₅₀^a ($\mu\text{M} \pm \text{S.E.M}$)	Maximum Effect (% \pm S.E.M.)
Miltefosine	76.7 \pm 2.9	85.1 \pm 0.6**
Pentamidine	65.1 \pm 4.9	66.4 \pm 3.7**
LASSBio 1064	>100	NA
LASSBio 1492	58.3 \pm 2.0	57.7 \pm 4.9**
LASSBio 1493	>100	36.9 \pm 2.8*
LASSBio 1705	>100	42.8 \pm 2.6**
LASSBio 1707	53.3 \pm 2.6	63.3 \pm 3.1**
LASSBio 1706	>100	NA
LASSBio 1710	55.0 \pm 4.0	58.9 \pm 4.9*
LASSBio 1736	57.6 \pm 5.2	57.0 \pm 1.9**

Data are reported as means \pm S.E.M. Differences with a ** $p < 0.01$ were considered significant in relation to DMSO 0.1% group. a: LC₅₀ is the concentration required to give 50% inhibition, calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations; NA: When the compound isn't active; - : substance not tested.

Original Research Article

***In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against *Leishmania major* LV39**

¹Queiroz, A.C.; ²Alves, M. A.; ³Carregaro, V.; ³da Silva, J.S.; ²Barreiro, E. J.; ²Lima, L. M.;
¹Alexandre-Moreira, M. S.

Affiliation

¹*Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI), Setor de Fisiologia e Farmacologia - ICBS - UFAL, Brasil*

²*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – Faculdade de Farmácia – UFRJ, Brasil*

³*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil*

***Corresponding author:**

Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil. Tel.: +55 82 32141527. Email: suzana.magna@gmail.com; magnasuzana@pq.cnpq.br

Abstract

Leishmaniasis is a public health issue and is among the five parasitic diseases worldwide. The current treatment disease includes limitations of toxicity, variable efficacy, high costs and inconvenient doses and treatment schedules. These observations prompted us to investigate the leishmanicidal activity of semicarbazone e hydrazide-*N*-acylhydrazone synthetic derivatives, designed from molecular modification on the prototype LASSBio 1064. The spleen cells viability was determined with the Propidium Iodide Kit. Leishmanicidal effect against amastigotes of *Leishmania major* (LV39) was evaluated at concentrations of 100, 50, 25, 10 and 1 μ M. Nitric oxide (NO) production was indirectly evaluated by Griess reaction. Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. of triplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the vehicle groups of *in vitro* experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a $p < 0.05$ were considered significant. The most activity compound was select to *in vivo* assay on *Leishmania*-infected BALB/c mice. The compounds **LASSBio 1483**, **LASSBio 1485**, **LASSBio 1491** and **LASSBio 1492** and **pentamidine** not affected the viability of spleen cells until the concentration of 100 μ M, evidenced by propidium iodide incorporation. The inhibitory effects of pentamidine (IC_{50} value = $8.1 \pm 0.9 \mu$ M and $E_{MAX} = 63.2 \pm 2.9\%$) and LASSBio 1491 (IC_{50} value of $8.3 \pm 0.3 \mu$ M and $E_{MAX} = 60.2 \pm 1.9\%$) on the growth of the amastigote form were found to be similar. In contrast, LASSBio 1483 and LASSBio 1492 were inactive against the intracellular form of *L. major* LV39. According to the *in vitro* evaluation on intramacrophage amastigotes growth, LASSBio 1491 was the unique was able to increase NO production by BALB/c mice macrophages infected with *L. major* LV39 at concentrations of 100, 50 and 25 μ M. Considering the *in vitro* results, **LASSBio 1491** was selected to evaluate its *in vivo* leishmanicidal activity using ear model of *L. major* infection. The BALB/c mice infected with *L. major* LV39 were treated with **LASSBio 1491** (at 10 μ mol/kg/day x 35 days) and glucantime (as standard drug at 30 μ mol/kg/day x 35 days), both intraperitoneally. In these conditions, LASSBio-1491 did not reduce the size of the lesions at the site of cutaneous inoculation, however it was able to decrease parasite load in infected ear and draining lymph node similar to the treatment with the standard glucantime. These results indicate **LASSBio-1491** as a new lead-candidate for antiparasitic drug with original structure pattern, pronounced leishmanicidal activity, with no cytotoxic effect to mammalian cells.

KEYWORDS: *Hydrazide-N-acylhydrazone; Semicarbazone; Leishmaniasis; Leishmania major; Leishmanicidal activity.*

Introduction

Leishmaniasis is a major group of neglected tropical diseases caused by the protozoan parasite *Leishmania*. Currently it affects 12 million people in 98 countries and around 350 million people worldwide are at risk of infection [1]. The different manifestations of leishmaniasis are always linked to the marginal poorest sectors of the population from low-income countries [2].

Leishmaniasis infection is mainly divided into three forms: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis [3]. The cutaneous leishmaniasis is the most common and least fatal form of the disease and it is divided into two forms based on the parasite infection: Old World (southern Europe, the Middle East, Asia and Africa) and New World leishmaniasis (Latin America) [4, 5]. Based on most recent estimates, about 0.7 to 1.2 million new cutaneous leishmaniasis cases occur annually [1]. In the Old World, CL is caused mainly by *Leishmania major*, *Leishmani atropica* and *Leishmania aethiopica*, whereas in the New World *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* and *Leishmania mexicana* are the main causative agents [6].

Moreover, the climate changes, environmental alterations, human behaviour and pet travel are factors that might contribute to the spread of leishmaniasis from endemic to non-endemic regions. Thus, cutaneous leishmaniasis is an infection that has spread to non-endemic regions, stimulating recent interest for the enhanced understanding of this disease [7].

Cutaneous leishmaniasis as caused by *L. major* is a zoonotic infection with wide epidemiological impact. The protozoan parasite *L. major* is an important causative agent of cutaneous leishmaniasis in Eurasia and Africa and causes localised, self-healing skin lesions that leave severe scarring [8]. Therefore, medical treatment is not always recommended, however, if lesions do not spontaneously heal, within six months or when the lesions are especially disfiguring in a cosmetically sensitive area, treatment is required. Even though lesions may eventually heal in the absence of treatment, the process is often long and produces significant scare; thereby it justifies the use of chemotherapy. The goal of treating

cutaneous leishmaniasis is two-fold, eradication of amastigotes as well as reducing the size of the lesions; so that healing will take place with minimal scarring [9, 10].

Since an effective vaccine against leishmaniasis is not available, chemotherapy is the only way to treat all forms of the disease. The recommended first-line therapies for leishmaniasis includes pentavalent antimonials, pentamidine, amphotericin B, miltefosine and paromomycin, all of which have different types of limitation including efficacy, toxicity, price and emerging resistance, which emphasizes the importance of development new drugs against leishmaniasis [11].

We have previously designed and synthesized a set of semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives of LASSBio 1064 as inhibitors of the *Leishmania*'s cysteine protease. In view of this structural resemblance and with the intention of identifying potential anti-leishmanial drugs, we analyzed the anti-leishmanial activity of a series of semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives. Many compounds assayed found to display activity against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. major*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, without cytotoxicity to host cell (macrophages) [12-14].

Our earlier study revealed that these novel analogues of LASSBio-1064 exert anti-leishmania effects in *L. major*-infected macrophages (J774.A1 cell line), which was accompanied by increased production of nitric oxide (NO) with treatment using LASSBio 1491 [11, 14]. In the present study, we utilized the other difference *L. major* substrain. We assume that the LV39 (MRHO/SU/59/P) strain is more virulent than MHOM/SU/73-5-ASKH, which was previously used by us. Alternatively, the MHOM/SU/73-5-ASKH strain may be more susceptible to NO than LV39 (MRHO/SU/59/P). Differences in susceptibility to *L. major* substrains have also been observed in IL-4R-deficient mice [15]. Moreover, in this study we use *L. major*-infected BALB/c mice model to examine if these derivatives could control the disease development. Thus, the aim of this study was to determine whether the *in vitro* effect of semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives of LASSBio 1064 (shown in **Figure 1**) against amastigotes forms of other *L. major* substrains and their *in vivo* activity.

Materials and methods

Parasite culture

L. major promastigotes LV39 (MRHO/SU/59/P) were grown in a Schneider's medium (SigmaAldrich, St. Louis, MO) supplemented with 500 U/ml of penicillin, 500 mg/ml of streptomycin (Invitrogen e Gibco, Carlsbad, CA, USA), 20% heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), and 2% sterile male human urine.

Cytotoxicity against spleen cells

Spleen cells of BALB/C mice were adjusted to 5×10^5 cells per well onto polystyrene 96-well flat-bottom microtiter plates and then incubated in a complete medium of RPMI-1640 containing different concentrations of derivatives for 24 h at 37°C, 5% CO₂. After this incubation time, the cells were handled and treated according to the protocol provided with the Propidium Iodide Kit (Sigma, Copenhagen, Denmark). The cells were harvested and washed once with PBS and later suspended again in 1X phosphate-buffered saline. A 500 µL aliquot of the cell suspension was stained with 10 µL of propidium iodide (PI) in cytometer tubes for 10 min at room temperature and protected from light. The cells were then analyzed using a flow cytometer FACSCantoII (BD Biosciences, San Jose, CA) by counting 100,000 events. The data files were automatically saved by a FACSDiva software (BD Biosciences). A Flow Jo (Three Star, Ashland, OR, USA) was used to perform quadrant analysis. The derivatives cytotoxicity was estimated by comparing the propidium iodide incorporation of macrophages incubated in the presence of the drugs to that of control incubated in the complete RPMI medium only. Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm standard error of the mean (Mean \pm S.E.M.) and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

Thioglycolate induced peritonitis

Six-to-eight-week old female BALB/c mice were injected intraperitoneally with a 1 mL of a 3% sterile sodium thioglycolate (SigmaAldrich) and euthanized 96 h later. The total leukocyte elicited into the peritoneal cavity was harvested by peritoneal lavages with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and counted with a hemacytometer [16].

In vitro activity against amastigote forms of Leishmania and nitrite determination

To assess the activity of the test derivatives against the amastigote stage of *L. major* were realized model of infection in coverglass [17]. The peritoneal macrophages were prepared in 24-well vessels (Corning) at 2×10^5 adherent cells/well, infected with 2×10^6 promastigotes in glass coverslips placed inside 1 ml medium culture. The cultures were cultured or not with the test derivatives or reference drugs (100, 50, 25, 10 and 1 μM), and kept for 24h at 37°C , 5% CO_2 . After 24h, coverslips were washed, stained with Giemsa-MayGrünwald, and intracellular amastigotes were counted in 100 macrophages. Data obtained from *in vitro* experiments were expressed as the Mean \pm S.E.M. of duplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a p value <0.05 or lower were considered significant. IC_{50} (concentration required to give 50% death of cells) was calculated by linear regression analysis from the Kc values at employed concentrations. *In vitro* nitrite accumulation in supernatants from *L. major* macrophages-infected, as an indicator of NO production, was measured using Griess reagent [18]. Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. of triplicate cultures of representative assays. Statistical differences between the treated and the vehicle groups of *in vitro* experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests. Differences with a $p < 0.05$ were considered significant.

In vivo activity against L. major

This study (protocol number 2013.02) was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil). All animals received humane care in compliance with the 'Principles of laboratory animal care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the care and use of laboratory animals' prepared by the National Academy of Sciences (Washington, DC). Then, 1×10^5 stationary promastigotes (5 days of culture in Schneider's medium) of *L. major* were inoculated subcutaneously into the right ear dermis of 6-week-old female BALB/c mice weighing ca. 20 g. and later treated with LASSBio 1491 (i.p.) at 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ x 28 days. or meglumine antimoniate (i.p.) at 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ x 28 days. The lesion size was measured using a paquimeter [19]. The parasite loads of infected ears and draining lymph nodes were determined using a quantitative limiting-dilution assay [20]. Data obtained from experiments were expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical differences between the treated and the vehicle groups of experiments were evaluated by ANOVA and Dunnett hoc tests.

Results

Before starting the evaluation of the leishmanicidal activities against *L. major* substrain LV39 of LASSBio 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 and LASSBio 1492, the eventual cytotoxic profile of these compounds against mammalian cells was investigated by iodide propidium stain method, using the spleen cells. The cells were treated with the substances and compared with the vehicle (DMSO 0.1%). **Table 1** shows the results for the derivatives tested and pentamidine (reference drugs). As can be seen, after 24 h of incubation, all compounds did not affect the viability of spleen cells at 100 μ M.

For evaluation of anti-leishmanial properties of target compounds, the *in vitro* activity was assessed against amastigote (intramacrophage parasite) of *L. major* LV39. The IC₅₀ values (*i. e.* the sample concentration causing 50% reduction in survival/viability of the parasites) of compounds against amastigotes of *L. major* LV39 are presented in **Table 2**. As a parameter for antileishmanial activity, the maximum effect and IC₅₀ value were used (**Table 2**).

The inhibitory effects of **pentamidine** (IC₅₀ value = $8.1 \pm 0.9 \mu$ M and E_{MAX} = $63.2 \pm 2.9\%$), **LASSBio 1485** (IC₅₀ value of $37.9 \pm 0.7 \mu$ M and E_{MAX} = $74.2 \pm 1.5\%$ to LV39 and IC₅₀ value of $13.2 \pm 8.7 \mu$ M and E_{MAX} = $54.8 \pm 1.6\%$ to 5-ASKH) and **LASSBio 1491** (IC₅₀ value of $8.3 \pm 0.3 \mu$ M and E_{MAX} = $60.2 \pm 1.9\%$) on the growth of the amastigote form were found to be similar. In contrast, **LASSBio 1483** and **LASSBio 1492** were inactive against the intracellular form of *L. major* LV39. According to the *in vitro* evaluation on intramacrophage amastigotes growth, **LASSBio 1491** was the unique was able to increase NO production by BALB/c mice macrophages infected with *L. major* at concentrations of 100, 50 and 25 μ M (**Figure 2**).

Considering the *in vitro* results, **LASSBio 1491** was selected to evaluate its *in vivo* leishmanicidal activity using ear model of *L. major* LV39 infection, such as show **Figure 3**. The BALB/c mice infected with *L. major* LV39 were treated with **LASSBio 1491** and **glucantime**, as standard drug, both at 10 μ mol/kg/day x 35 days (*i.p.*). In these conditions, **LASSBio-1491** did not reduce the size of the lesions at the site of cutaneous inoculation, however it was able to decrease parasite load in infected ear and draining lymph node similar

to the treatment with the standard glucantime. These results indicate **LASSBio-1491** as a new lead-candidate for antiparasitic drug with original structure pattern, pronounced leishmanicidal activity, with no cytotoxic effect to mammalian cells.

Discussion

Semicarbazones present a wide range of biological activities, including the antiprotozoal effect and the action mechanisms of these compounds involve the DNA interactions, DNA synthesis inhibition or enzyme inhibition by endogenous metal complexes formation or redox reaction [21]. Additionally, it is well known that *N*-acylhydrazone moiety is a repeated functional group present in several prototypes and drug candidates for these neglected diseases [22, 23]. Thus, previously, we studied anti-leishmanial activity of novel semicarbazone and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives and these compounds showed to be quite promising pharmaceuticals since they have *in vitro* anti-leishmanial activity and that this activity is not limited to a single species and also did not exhibit cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* conditions [12-14].

In the present study, we verified leishmanicidal activity against intramacrophage amastigotes, because these are the parasite stage most relevant to human disease resides within an acidic parasitophorous vacuole inside host cells, and the parasite bears a glycoinositolphospholipid coat that could limit uptake of xenoantibiotics [24-26].

However, it was observed a significant differences of the sensitivity to LASSBio 1483, LASSBio 1485 and LASSBio 1492 against intracellular amastigotes of *L. majors* substrain LV39 (MRHO/SU/59/P) in this work, when compared to previous work using *L. majors* substrain 5-ASKH (MHOM/SU/73-5-ASKH) strain. These derivatives were less active to substrain LV39 than the World Health Organization reference strain 5-ASKH (Turkmenskaya, MHOM/SU/73/5-ASKH). The substrain LV39 (MRHO/SU/59/P) is a southern Russia strain, more virulent and less susceptible to NO than MHOM/SU/73-5-ASKH [15, 27].

On other the hand, LASSBio 1491 presented similar activity against amastigotes of two different *L. major* substrains and this derivative was also the unique was able to increase NO production by BALB/c mice macrophages infected with *L. major* LV39

(MRHO/SU/59/P). Thus, apart from its direct leishmanicidal activity, LASSBio 1491 mode of action *in vitro* against intracellular amastigotes of *L. major* could involve increase in NO production, which is a major host defense mechanism against *Leishmania* spp.

Leishmania parasites reside in the form of amastigotes inside macrophage mammalian cells, the innate and adaptive immune responses are responsible for controlling the infection [28]. The increase in levels of cytokines, such as interferon gamma (IFN- α) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), activates NO synthase 2 (NOS2) to produce NO in a micromolar concentration, which kills the trpomastigote and the intracellular amastigote forms of *Leishmania* [29].

In addition, NOS2 is regulated in response to infection by Nlrp3 inflammasome-driven interleukin-1 β production increased host resistance to infection, as signaling through MyD88 and IL-1 receptor (IL-1R) [30]. The NOS2 has an important role in *Leishmania* infection. It was demonstrated previously that NOS2 mutant mouse strains were highly susceptible to *Leishmania* infection [31].

However, as a defense mechanism, phagolysosomal amastigotes decrease NO production in infected macrophages by inhibition of NOS2. Thus, amastigotes forme of *L. major* also exhibits this defense mechanisms, which may increase the resistance of *L. major* to the antimicrobial macrophages mechanisms [32-34,].

Therefore, LASSBio 1491 was able to increase production of NO, which is very well known to have a crucial function in the defense mechanism of the host cells against *Leishmania* spp. [30, 35]. The molecular mechanism whereby NO exerts its cytotoxic activity is not completely understood. Some studies have proposed that NO effects are due to the inhibition of mitochondrial respiration, glycolysis, peroxidation of membrane lipids, inactivation of peroxidases and arginases, disruption of Fe-S clusters and zinc fingers, mutation of DNA and/or inhibition of DNA synthesis and repair [36-38]. According to the *in vitro* evaluation on intramacrophage amastigotes growth, the other derivatives which does not increase NO production, did not present any significant antileishmanial effect against *L. majors* substrain LV39, with exception of LASSBio 1485.

Then, given the existing clinical need for cutaneous leishmaniasis, we tested the efficacy of LASSBio 1491 in a validated mouse model of Old World (*L. major*) cutaneous leishmaniasis. Thus, the efficiency of LASSBio 1491 as an antiparasitic agent was evaluated

using glucantime as a reference. This pentavalent antimony, a drug used in the treatment of leishmaniasis, presents the same parasite growth inhibition as LASSBio 1491 but only at a dose 3 fold higher than that used for the LASSBio 1491.

LASSBio 1491 is a hydrazide-*N*-acylhydrazone derivative with 5-nitrofurans as substituent group in the imine function. The use of nitroheterocycles such as 5-nitrofurans derivatives as antibacterial, antifungal and antiprotozoal is well established [39,40]. The aromatic nitro groups are well known to have significant biological redox activity leading to the potentially cytotoxic production of ROS. However, LASSBio 1483 is also a 5-nitrofurans derivative, but it has semicarbazone moiety, what suggests that the hydrazide-*N*-acylhydrazone moiety is important to leishmanicidal activity of LASSBio 1491 against *L. major* substrain LV39.

Therefore, from the point of view of medicinal chemistry, *N*-acylhydrazones are endowed with the interesting capacity of being able to interact with diverse bioreceptors and the inhibitory effect of *N*-acylhydrazones on parasitic cysteine proteases have been investigated [41,42]. Cysteine proteases from *Leishmania* are important virulence factors and, therefore, interesting drug targets and *N*-acylhydrazones have provided medicinal chemists with a solid strategy for the design of parasite cysteine protease inhibitors, including *Leishmania* cysteine protease B [43]. Studies on inhibitors against these enzymes during *L. major* infection in mice had shown that host equivalents of these proteases are also affected, namely cathepsin B and cathepsin L. The inhibition of cathepsin B resulted in immune-mediated protection, while inhibition of cathepsin L caused susceptibility to the parasite [44]. Thus, we will continue this study to evaluate the inhibitory effects of LASSBio 1491 on cysteine protease and of *Leishmania* as well as other validated chemotherapeutic target, such as topoisomerase.

In summary, according to the previously exposed data, LASSBio 1491 exhibit antileishmanial effect *in vitro* and *in vivo* against *L. major* LV39 at concentrations non toxic to spleen cells and *in vivo* by intraperitoneal administration against *L. major* support further studies of the leishmanicidal activity of the hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives as an additional choice to available chemotherapies. In addition, LASSBio 1491 was found to exhibit a significant *in vivo* effect against *L. major* LV39 and also proved to be at least 3 times more efficient than glucantime. In all, the observed results strongly suggest that LASSBio

1491 is active against the growth of *L. major* and thus provides a promising new platform to be explored for the treatment of leishmaniasis and it also opens perspectives to explore the potential of LASSBio1491 for treatment of visceral leishmaniasis.

Acknowledgements: *The authors are grateful to the CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ (404344/2012-7) and FAPESP (Pronem 20110722-006-0018-0010) for the joint funding of this research project. The authors wish to thank several of their colleagues working at the UFAL and UFRJ for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.*

References

- [1] Alvar, J., *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*. **7**: e35671 (2012).
- [2] Croft, S.L., Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.***17**: 1478–1483 (2011).
- [3] Grevelink, S.A., Lerner, E.A. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.***34**: 257–272 (1996).
- [4] Reithinger, R., *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **7**: 581–596 (2007).
- [5] Schwartz, E., Hatz, C., Blum, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect. Dis.***6**: 342–349 (2006).
- [6] Goto, H., Lauletta-Lindoso, J.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.***26**: 293–307 (2012).
- [7] Ready, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro. Surveill.***15**: 19505 (2010).
- [8] Bifeld, E., *et al.* Geographical sequence variation in the *Leishmania major* virulence factor P46. *Infect. Genet. Evol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.029> (2015).
- [9] John, D.T., Petri, A.J. *Markell and Voge's Medical parasitology*. 9th ed. (Elsevier, - Philadelphia, 2006).
- [10] Cunningham, M.W., Fujinami, R. *Immunologic Mechanisms in Leishmania. Effects of microbes on the Immune system*. (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000).
- [11] Seifert, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med. Chem. J.***5**: 31-39 (2011).

- [12] Alves, M.A. *et al.* Design, synthesis and *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities of novel semicarbazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*
- [13] Queiroz, A.C. *et al.* Novel Semicarbazone Derivatives As Promising Therapeutic Alternative in Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- [14] Alves, A.C. *et al.* In Vitro/In Vivo Antileishmanial Effects of Novel Hydrazone-*N*-Acyhydrazone Derivatives. *J. Med. Chem.*
- [15] Noben-Trauth, N., Paul, W. E. Sacks, D. L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J. Immunol.* **162**: 6132–6140 (1999).
- [16] Wang, H.W., Babic, A.M., Mitchell, H.A., Liu, K., Wagner, D.D. Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice. *FASEB J.* **19**: 1018-1020 (2005).
- [17] Nunes, M.P., *et al.* CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Microbes Infect.* **7**: 78-85 (2005).
- [18] Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* **212**: 56–58 (1981).
- [19] Pereira, J.C., *et al.* Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **45**: 4180-4187 (2010).
- [20] Taswell, C. in *Cell Separation: Methods and Selected Applications. Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny* (eds Pretlow, T.C., Pretlow, T.P.) 109-145 (Academic Press, New York, 1986).
- [21] Beraldo, H., Gambino, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**: 31-39 (2004).
- [22] Al-kahraman, Y.M.S.A., Yasinzai, M., Singh, G.S. Evaluation of Some Classical Hydrazones of Ketones and 1,2-Diketones as Antileishmanial, Antibacterial and Antifungal Agents. *Arch. Pharm. Res.* **35**: 1009-1013 (2012).
- [23] Hernández, P., *et al.* Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *Eur. J. Med. Chem.* **59**: 64-74 (2013).
- [24] Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Ind. J. Med. Res.* **123**: 399–410 (2006).

- [25] Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.***6**: 392–401 (1998).
- [26] Novozhilova, N. M., Bovin, N. V. Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. cell surface. *Biochem.* **75**, 686–694 (2010).
- [27] Sacks, D., Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* **2**:845-58 (2002).
- [28] Mougneau, E., Bihl, F., Glaichenhaus, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.***240**:286–296 (2011).
- [29] Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.***173**:17–26 (2000).
- [30] Lima-Junior, D.L., *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med.***19**: 909-915 (2013).
- [31] Wei, X.Q., *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature***375**:408–411 (1995).
- [32] Balestieri, F.M.P., *et al.* *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.***4**:23–29 (2002).
- [33] Bogdan, C., Röllinghoff, M. Parasitol. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today.***15**: 22-28 (1999).
- [34] Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A. in *Nitric Oxide and Infection. Nitric oxide in leishmaniasis.* (eds Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A., Fang, F.C.) 361-377 (Kluwer and A.P. Publishers, New York, 1999).
- [35] Salvati, L., *et al.* NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1545**: 357-366 (2001).
- [36] Mael, J., Ransijn, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.***87**:98–111 (1997).
- [37] Mael, J., Ransijn, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.***87**:98–111 (1997).
- [38] Gradoni, L., Ascenzi, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia***46**:101–103 (2004).

- [39] Pires, J.R., Saito, C., Gomes, S.L., Giesbrecht, A.M., Amaral, A.T. Investigation of 5-nitrofurans derivatives: synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.***44**: 3673-3681 (2001).
- [40] Muelas-Serano, S., Perez-Serrano, J., Gomez-Barroi, A., Aran, V.J., Rodriguez-Caabeiro, F. Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.***88**: 97-101 (2002).
- [41] Fraga, C.A., Barreiro, E.J. Medicinal chemistry of *N*-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr. Med. Chem.* **13**: 167-198 (2006).
- [42] Troeberg, L., *et al.* Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Med.***6**: 660-669 (2000).
- [43] Ifa, D.R., Rangel, C.R., Alencastro, R.B., Fraga, C.A.M., Barreiro E.J. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. *J. Mol. Struct.***505**: 11-17 (2000).
- [44] Gonzalez-Leal, I.J., *et al.* Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during *Leishmania major* Infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3194 (2014).

Figure legends

Figure 1. Chemical structures of LASSBio 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 and LASSBio 1492.

Figure 2. Effect of the treatment with semicarbazone and hydrazine-*N*-acylhydrazonic derivatives in the production of nitrite in culture of peritoneal macrophages infected with *L. major* LV39.

Figure 3. Parasite burden throughout the course of LASSBio 1491 (10 μ mol/kg/dia x 28 days) and glucantime treatments (30 μ mol/kg/dia x 28 days) in BALB/c mice infected with *L. major* LV39.

Figures

Figure 1

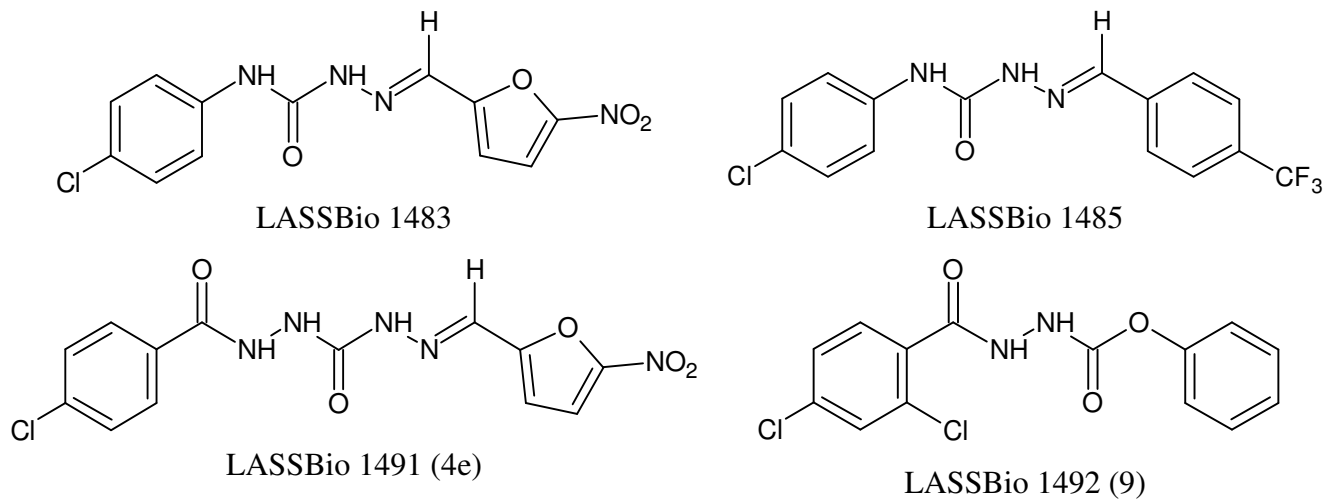


Figure 2

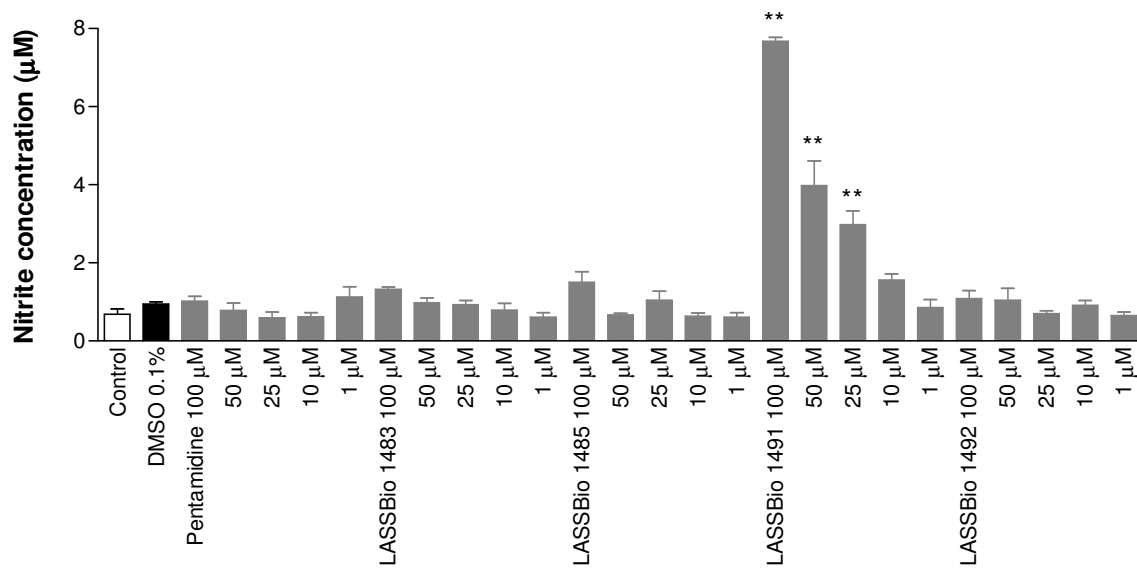
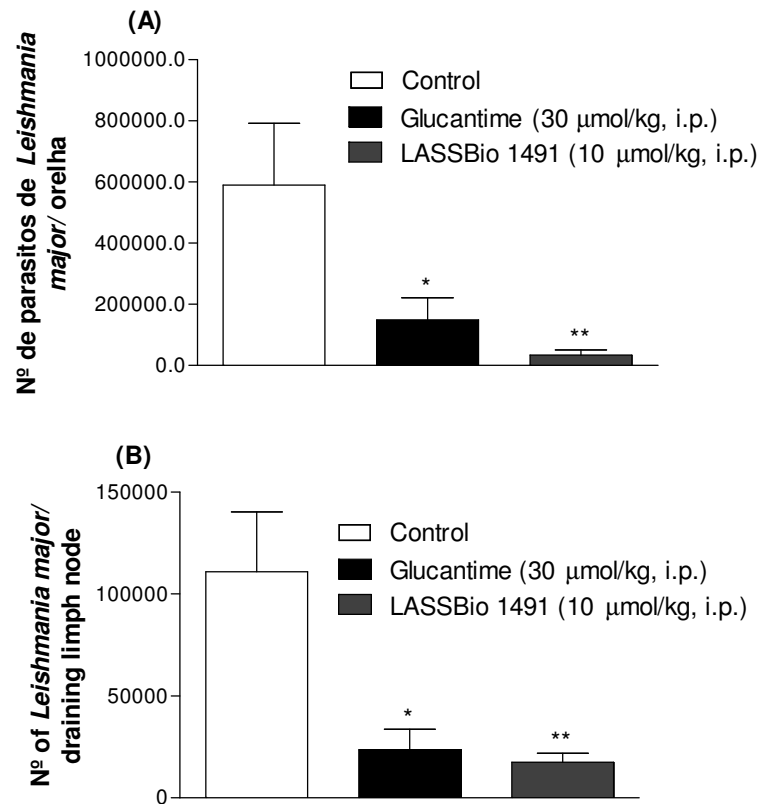


Figure 3



Tables

Table 1. In vitro effect of semicarbazide and hydrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against spleens cells viability.

Compound	Concentration	% of cells IP positive Medium \pmSEM
Medium	-	7.22 \pm 0.48
Tween 0.5%	0.50%	74.78 \pm 2.34 ^{##}
DMSO 0.1%	0.10%	9.71 \pm 0.62
Pentamidine	100 μ M	7.39 \pm 0.58
	50 μ M	7.01 \pm 0.88
	25 μ M	8.34 \pm 0.82
	10 μ M	9.95 \pm 0.23
	1 μ M	10.64 \pm 0.49
	0,1 μ M	11.22 \pm 0.34
	LASSBio 1483	100 μ M
50 μ M		9.07 \pm 0.30
25 μ M		10.41 \pm 1.82
10 μ M		8.32 \pm 0.34
1 μ M		8.83 \pm 0.64
0,1 μ M		8.01 \pm 0.20
LASSBio 1485	100 μ M	7.87 \pm 0.38
	50 μ M	8.78 \pm 0.65

LASSBio 1491	25 μ M	7.80 \pm 0.24
	10 μ M	7.87 \pm 0.70
	1 μ M	7.61 \pm 0.67
	0,1 μ M	7.30 \pm 0.47
	100 μ M	6.56 \pm 0.53
	50 μ M	7.48 \pm 0.52
LASSBio 1492	25 μ M	6.79 \pm 0.56
	10 μ M	7.69 \pm 0.26
	1 μ M	8.09 \pm 0.58
	0,1 μ M	8.18 \pm 0.12
	100 μ M	7.55 \pm 0.22
	50 μ M	9.14 \pm 0.55
	25 μ M	8.04 \pm 0.39
10 μ M	7.50 \pm 0.23	
1 μ M	8.63 \pm 0.33	
0,1 μ M	10.85 \pm 1.9	

Data are reported as means \pm S.E.M. The asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. Differences with a $**P < 0.01$ were considered significant in relation to DMSO 0.1% group.

Table 2. Determination of the cytotoxicity of semicarbazone and hidrazide-*N*-acylhydrazone derivatives against amastigote forms of *L. major* LV39.

Substance	IC₅₀^a (CI_{95%}^b at μM)	Maximum cytotoxicity (% ± s.e.m.)
Pentamidina	8.1	63.2
LASSBio 1483	-	40.7
LASSBio 1485	37.9	74.2
LASSBio 1491	8.3	60.2
LASSBio 1492	-	47.6

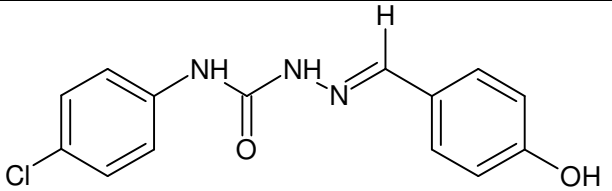
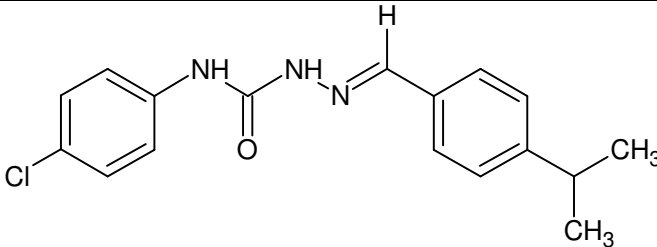
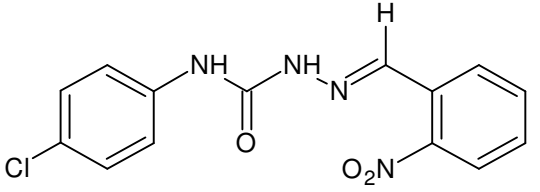
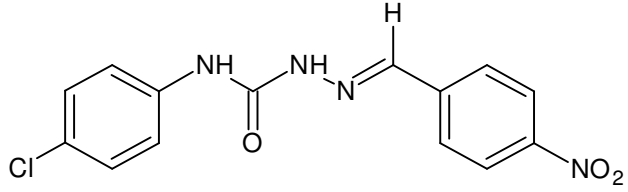
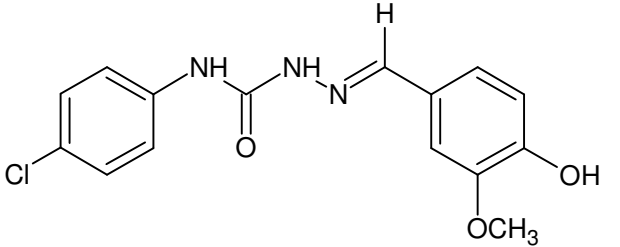
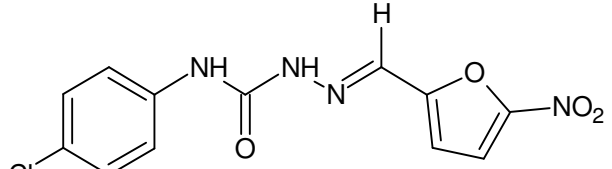
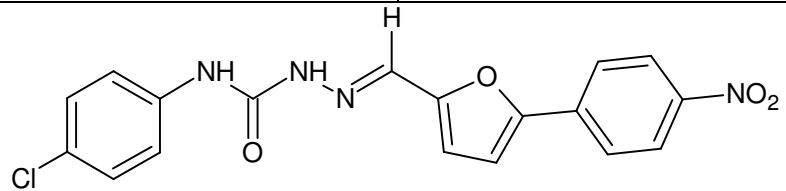
Data are reported as means ± S.E.M. The asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. Differences with a **P<0.01 were considered significant in relation to DMSO 0.1% group.

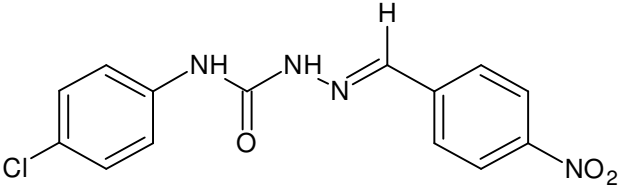
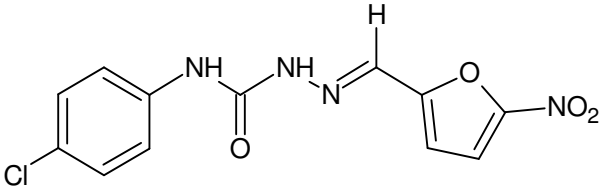
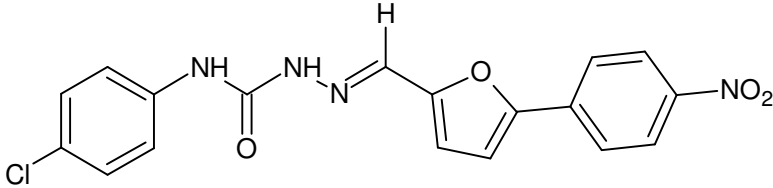
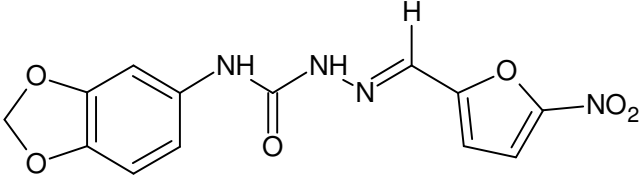
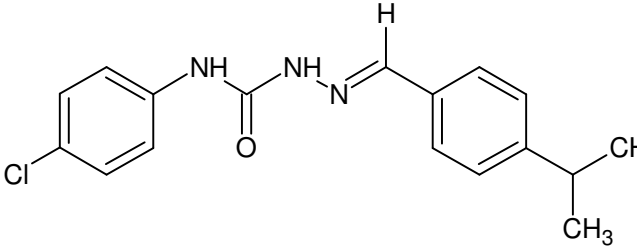
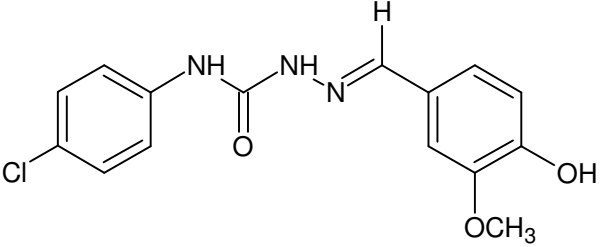
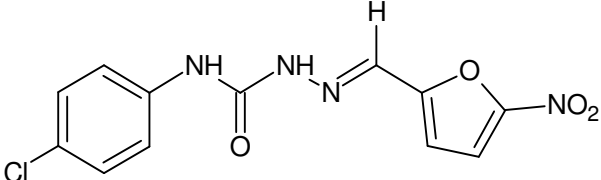
10 DISCUSSÃO

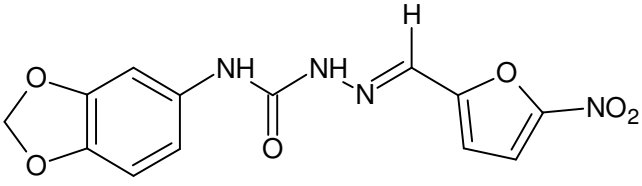
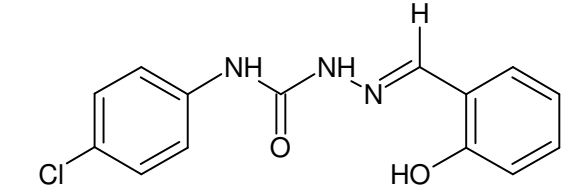
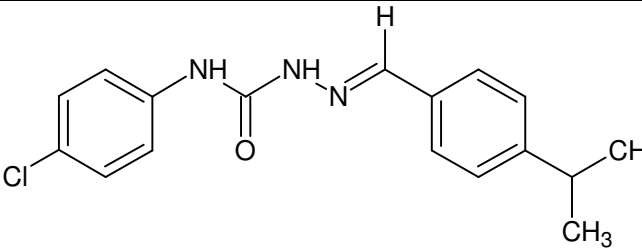
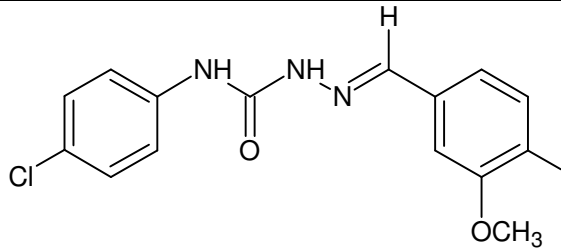
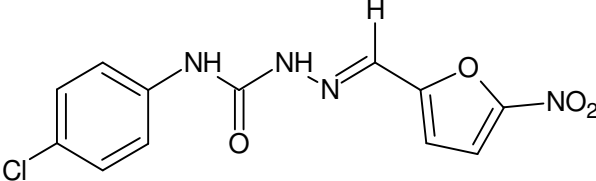
Dada a alta prevalência mundial da infecção por *Leishmania* spp., principalmente em países com baixos orçamentos para os cuidados da saúde, bem como o limitado arsenal terapêutico disponível para o tratamento da leishmaniose, encontrar um tratamento seguro e de baixo custo para doença ainda continua sendo uma necessidade premente (OMS, 2010). Portanto, há um interesse considerável na tentativa de encontrar novas abordagens terapêuticas como forma alternativa de combater o parasito (DE-AZEVEDO-JR, 2009). Neste sentido, no presente estudo, novos derivados semicarbazônicos e hidrazida-*N*-acilhidrazônicos sintéticos, planejados como eventuais inibidores de proteases de parasitos (em especial, cisteína proteases lisossomais), foram avaliados contra várias espécies de *Leishmania*. Assim, pela primeira vez, foi demonstrado que estes derivados são eficazes *in vitro* e *in vivo* contra os agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e visceral.

Inicialmente, duas subséries de derivados semicarbazônicos (6a-h e 7a-h), com modificações estruturais nos anéis ligados à carbonila do tipo amida(CONH) e ao grupo imina (N = CH), foram avaliadas quanto sua atividade leishmanicida. O Quadro 1 destaca as semicarbazonas com maior citotoxicidade para célula hospedeira e diversas espécies de *Leishmania*.

Quadro 1. Estrutura química dos derivados semicarbazônicos com maior citotoxicidade contra macrófagos da linhagem J774.A1, promastigotas de *L. major* e amastigotas de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Citotoxicidade para linhagem de macrófagos J774.A1:	
 <p>LASSBio 1701 (7b) $CI_{50} = 71,2 \mu M$</p>	 <p>LASSBio 1486 (7e) $CI_{50} = 35,7 \mu M$</p>
Citotoxicidade para promastigotas de <i>L. major</i> :	
 <p>LASSBio 1490 (7c) $CI_{50} = 6,9 \mu M$</p>	 <p>LASSBio 1489 (7d) $CI_{50} = 9,4 \mu M$</p>
 <p>LASSBio 1488 (7f) $CI_{50} = 12,6 \mu M$</p>	 <p>LASSBio 1483 (7g) $CI_{50} = 18,5 \mu M$</p>
 <p>LASSBio 1699 (7h) $CI_{50} = 9,7 \mu M$</p>	

Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. major</i> :	
 <p>LASSBio 1489 (7d) CI₅₀ = 74,0 μM</p>	 <p>LASSBio 1483 (7g) CI₅₀ = 1,5 μM</p>
 <p>LASSBio 1699 (7h) CI₅₀ = 0,6 μM</p>	
Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. amazonensis</i> :	
 <p>LASSBio 1302 (6g) CI₅₀ = 23,8 μM</p>	 <p>LASSBio 1486 (7e) CI₅₀ = 16,7 μM</p>
 <p>LASSBio 1488 (7f) CI₅₀ = 39,8 μM</p>	 <p>LASSBio 1483 (7g) CI₅₀ = 3,5 μM</p>

Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. braziliensis</i> :	
 <p>LASSBio 1302 (6g) CI₅₀ = 89,7 μM</p>	 <p>LASSBio 1487 (7a) CI₅₀ = 2,7 μM</p>
 <p>LASSBio 1486 (7e) CI₅₀ = 4,2 μM</p>	 <p>LASSBio 1488 (7f) CI₅₀ = 81,85 μM</p>
 <p>LASSBio 1483 (7g) CI₅₀ = 31,7 μM</p>	

Antes de iniciar a avaliação das atividades leishmanicidas das novas séries de semicarbazonas, dividida em duas séries (6a-h e 7a-h), o perfil citotóxico eventual destes compostos contra as células de mamíferos foi investigado por ensaio de MTT (HUSSAIN et al., 1993), visto que um composto para ser candidato a um novo antiprotozoário deve apresentar toxicidade seletiva, ou seja, interferir no crescimento ou matar o protozoário sem causar danos consideráveis ao hospedeiro.

A citotoxicidade er candidato a um novo antira a célula inmas também apresentar toxicidade seletiva, ou seja, orfologia e da proliferação celulares (EISENBRAND et al., 2002). O ensaio do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] é3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] bém apresentar toxicidade seletiva, ou seja, orfovel de atividade mitocondrial. Esse ensaio se baseia principalmente na

redução mitocondrial enzimática de MTT. 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. O MTT veiculado em solução salina apresenta coloração amarela, sendo um sal de tetrazólio hidrossolúvel. 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. O produto formazan é impermeável à membrana das células e, portanto, se acumula nas células saudáveis (AMARAL, 2004; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006). Desta forma, a habilidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (DENIZOT e LANG, 1986; MOSMANN, 1983).

Neste estudo, macrófagos murinos da linhagem celular J774.A1 foram tratados com derivados 6a-h e 7a-h em diversas concentrações (0,1-100 μM) e a concentração inibitória de 50% do crescimento celular (CI_{50}) foi determinada. Apenas os compostos LASSBio 1701 (7b) e LASSBio 1486 (7e) mostraram atividade citotóxica para células de mamífero com $\text{CI}_{50} = 71,2$ e $35,7 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 2 do artigo 1 originado da tese). Esses derivados são pertencentes à série 2 (grupo 4-clorofenila ligado ao grupo NH da função semicarbazona) e apresentavam o grupo 4-hidroxifenila e 4-isopropilfenila ligados à região imínica da semicarbazona, respectivamente.

A investigação da atividade leishmanicida de novos derivados é realizada por método de cultura do parasito, sendo que as formas promastigotas são frequentemente mais usadas, principalmente, para avaliação inicial do efeito direto sobre esses protozoários (PLOCK *et al.*, 2001). A capacidade dos derivados 6a-h e 7a-h para inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. major* 5-ASKH foi investigada, utilizando pentamidina como fármaco-padrão (SALEHEEN *et al.*, 2002).

Além disso, os derivados com valores de CI_{50} menor a 100 μM para formas promastigotas de *L. major* 5-ASKH foram selecionados para avaliação do potencial leishmanicida sobre formas amastigotas intracelulares de *L. major* 5-ASKH. Sabe-se que no hospedeiro mamífero, parasitos do gênero *Leishmania* infectam macrófagos, células que desempenham um papel crítico na regulação do sistema imunitário e na defesa do hospedeiro (MORADIN e DESCOTEAUX, 2010). A infecção de macrófagos pelo protozoário *Leishmania* intracelular leva a sub-regulação de um número de mecanismos de defesa inato

dos macrófagos, permitindo assim a sobrevivência e replicação do parasito (MARR et al., 2014). Por exemplo, a sinalização nos macrófagos relativa às vias da PKC, MAPK, Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT), bem como os fatores de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1) e NF- κ B são desativados após a infecção com *Leishmania*. Além disso, moléculas como a tirosina fosfatase contendo o domínio SH2 do tipo 1 (SHP-1) são ativadas durante a infecção por *Leishmania* spp., culminando na inativação de Janus quinase 2 (JAK2) em macrófagos. Assim, os parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram diversas estratégias para inibir a ativação de macrófagos, a capacidade para apresentar antígenos na sua superfície, bem como a comunicação de macrófagos com células do sistema imune adaptativo (SHIO et al., 2012).

A inativação de macrófagos permite a replicação do patógeno e sobrevivência (BHARDWAJ et al., 2010). Desta forma, testes *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares são mais relevantes para inferir a sensibilidade da substância-teste como potencial protótipo leishmanicida, uma vez que esta é a forma do parasito encontrado no hospedeiro vertebrado (CROFT et al., 2006). Além da verificação da atividade leishmanicida contra amastigotas intramacrofágicas ser a mais relevante no desenvolvimento de novos fármacos, essa forma parasitária de *Leishmania* também reside dentro de um vacúolo parasitóforo ácido nas células hospedeiras, sendo o parasito protegido por uma camada de glicoinositolfosfolípídeo, que pode limitar a absorção de xenoantibióticos (NOVOZHILOVA et al., 2010; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002).

Dentre as séries de semicarbazonas estudadas, observou-se que todos os derivados que contêm a unidade metilenodioxila (6a-h) foram inativos como leishmanicidas, fato que evidencia a importância da porção 4-clorofenila ligada ao grupo NH da função semicarbazona ($\text{ArNHCONHN}=\text{CHAr1}$) presentes nos derivados LASSBio 1490 (7c), LASSBio 1489 (7d), LASSBio 1488 (7f), LASSBio 1483 (7g) e LASSBio 1699 (7h), os quais mostraram atividade citotóxica contra promastigotas de *L. major* 5-ASKH, embora com potência inferior do que quando comparados a pentamidina. Desta forma, evidenciou-se que para a atividade leishmanicida não há bioisosterismo não-clássico entre a unidade benzodioxola e *p*-clorofenila. Além disso, dentre os cinco derivados ativos contra promastigotas de *L. major* 5-ASKH, apenas LASSBio 1488 (7f) não é um nitroderivado, apresentando como substituinte da unidade imina um grupo 3-hidroxi-4-metoxifenila.

Sabe-se que nitroderivados podem exercer ação leishmanicida por uma via de redução do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais do parasito, gerando desta forma dano causado por estresse oxidativo, ou ligação covalente da espécie nitroso a macromoléculas endógenas. Desta forma, o grupo nitro se torna essencial para atividade leishmanicida dos derivados LASSBio 1490 (7c), LASSBio 1489 (7d), LASSBio 1483 (7g) e LASSBio 1699 (7h) contra promastigotas de *L. major* 5-ASKH. A formação dos radicais livres provenientes do processo de biorredução do grupo nitro pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA (PAULA *et al.*, 2009; RANDO *et al.*, 2010). Por fim, é bem relatado na literatura o uso de nitroheterociclos, tais como o 5-nitrofurano também presente em LASSBio 1483 (7g), em agentes antibacterianos, antifúngicos e antiprotozoários (MUELAS-SERANO *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2001). Entre estes derivados, apenas os nitroderivados LASSBio 1489 (7d) ($IC_{50} = 74,0 \mu M$), LASSBio 1483 (7g) ($IC_{50} = 1,5 \mu M$) e LASSBio 1699 (7h) ($IC_{50} = 0,6 \mu M$) foram ativos contra as formas amastigotas de *L. major* 5-ASKH, sendo os derivados LASSBio 1483 (7g) e LASSBio 1483 (7h) mais potentes do que a pentamidina ($IC_{50} = 17,1 \mu M$) (Tabela 2 do artigo 1 originado da tese). Além disso observo-se também que os derivados LASSBio 1490 (7c), LASSBio 1489 (7d) e LASSBio 1488 (7f) foram mais seletivos para formas promastigotas de *L. major* 5-ASKH e que os nitroderivados LASSBio 1483 (7g) e LASSBio 1699 (7h) foram mais ativos contra amastigotas dessa cepa (índice de seletividade mais que 10).

O modo de ação de nitrocompostos envolve a biotransformação do grupo nitro, libertando intermediários no processo redox (KOVACIC e BECVAR, 2000; KOVACIC *et al.*, 2005). Pró-fármacos nitroheterocíclicos devem sofrer ativação mediada por enzima dentro do patógeno para exercer seus efeitos citotóxicos, sendo essa reação catalisada por nitrorredutases (PAPADOPOULOU *et al.*, 2012). Nitroheterociclos não são utilizados no tratamento de leishmaniose, e como um resultado, relativamente pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação contra parasitos de *Leishmania* spp. (WYLLIE *et al.*, 2013). Em tripanossomas africanos, fármacos nitroheterociclos, como nifurtimox e benzonidazol, tem o mecanismo de ação contra o parasito associado com a bio-redução da porção nitro. Além disso, um mecanismo similar foi observado para outros agentes antiparasitários nitroheterociclos (OTERO *et al.*, 2008).

Inicialmente, foi proposto que a ação tripanocida do nifurtimoxera devido a sua capacidade de induzir estresse oxidativo através da redução de um elétron de seu grupo nitro e subsequente formação de ânions superóxido (BERALDO e GAMBINO; 2004; CHOREV e GOODMAN, 1993; GREENBAU et al., 2004; SEN e CHATTERJEE, 2011; TEMPONE et al., 2011). No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que o processo acima descrito não ocorre a um grau elevado capaz de causar toxicidade para os parasitos e que um tipo de nitrorredutase I dependente de NADH (NTR) é responsável pela ativação do nifurtimox e benzonidazol para que estes exerçam sua atividade tripanocida. Esta enzima faz a mediação de uma série de reações de redução de 2 elétrons, resultando na fragmentação do anel heterocíclico e geração de um agente citotóxico, um derivado nitrilo-insaturado de cadeia aberta (HALL et al., 2011; WILKINSON et al., 2011). Além disso, a superexpressão do homólogo desta nitrorredutase presente em *L. donovani* aumenta a sensibilidade à fexinidazola (um 5-nitroimidazol em fase II de ensaios clínicos para o tratamento de leishmaniose visceral no Sudão) em 15 vezes e em 19 vezes para o nifurtimox. Esses achados são um indicativo que mecanismos semelhantes podem estar envolvidos em *L. donovani* e o tripanossoma africano, *Trypanosoma brucei* (WYLLIE et al., 2012).

Estes dados, combinados com a observação de que a perda de uma única cópia cromossômica do gene que codifica a NTR de *L. donovani* resultou em parasitos que eram levemente resistentes a muitos dos derivados nitroheterociclos, confirmando que a NTR de *Leishmania* desempenha um papel central na ativação geral de nitrocompostos (WYLLIE et al., 2012). Consequentemente, a nossa hipótese é que o composto LASSBio 1483 (7g) pode atuar através da inibição de enzimas por meio da subunidade de semicarbazona e produzindo o estresse oxidativo através do grupo nitrofurano. A partir destas duas séries, o derivado LASSBio 1483 (7g) destacou-se por mostrar, *in vitro*, atividades dupla tripanossomicida (verificada através de ensaios realizados por Javier Varela, Hugo Cerecetto e Mercedes González da Universidade de la República-Uruguai) e leishmanicida (Tabela 2 do artigo 1 originado da tese), com potência semelhante aos fármacos nifurtimox e pentamidina. Estes dados, em conjunto com a seu bom perfil do tipo fármaco (do inglês druglikeness) *in silico*, além de sua alta estabilidade química e plasmática (ensaios realizados pela doutoranda Marina Amaral Alves do LASSBio-UFRJ), permite identificar o derivado LASSBio 1483 (7g) como novo protótipo com propriedades leishmanicida e tripanomicida, cuja atividade antiparasitária *in vivo* foi posteriormente determinada.

O derivado LASSBio 1483 (7g) é um composto semicarbazônico que possui o sistema 4-nitrofurano. Por ser um nitrocomposto, é importante considerar que LASSBio 1483 (7g) também pode exercer ação leishmanicida por uma via de redução do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados, a partir desta reação, com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitos. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo. A formação dos radicais livres provenientes do processo de biorredução do grupo nitro pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA (PAULA *et al.*, 2009; RANDO *et al.*, 2010).

A facilidade de biorredução de alguns nitrofuranos parece envolver a interrupção do fluxo normal de elétrons da cadeia respiratória, o que interfere na degradação de carboidratos, na transposição de prótons e na produção de energia. Este mecanismo poderia ocorrer por meio da inibição de algumas enzimas, pertencentes ao ciclo do ácido cítrico, envolvidas na formação de acetil coenzima A, CoA-SH, a partir do ácido pirúvico, e no subsequente processo de respiração celular. Outro mecanismo de ação proposto para os nitrocompostos se caracteriza pela ligação de intermediários do processo de redução a grupos tióis de enzimas essenciais de alguns parasitas e bactérias, o que resulta em decréscimo e inativação destas enzimas (PAULA *et al.*, 2009).

Com o objetivo de estudar a ação destes derivados sobre espécies clinicamente importantes no Brasil, avaliou-se o efeito leishmanicida destes derivados contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Desta forma, inicialmente, verificou-se a atividade anti-amastigota dos derivados semicarbazônicos contra *L. amazonensis* na concentração de 30 μM (Figura 1 do artigo 2 originado da tese) e, posteriormente, após a seleção dos derivados mais ativos, os mesmos foram ensaiados para obtenção da CI_{50} contra amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Tabela 1 do artigo 2 originado da tese). Os derivados LASSBio 1302 (6g), LASSBio 1483 (7g), LASSBio 1486 (7e) e LASSBio 1488 (7f) apresentaram efeito máximo de $71,6 \pm 1,6$, $93,2 \pm 2,0$, $81,5 \pm 1,6$ e $66,1 \pm 3,4\%$ e CI_{50} de 23,8 μM , 3,5 μM , 16,7 μM , 39,8 μM , respectivamente, contra amastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, os derivados LASSBio 1302 (6g), LASSBio 1483 (7g) e LASSBio 1488 (7f) foram os mais ativos contra amastigotas *L. braziliensis* na proporção de $52,9 \pm 2,4$, $65,8 \pm 1,2$ e $56,7 \pm 2,4\%$ e com CI_{50} de 89,7 μM , 31,7 μM e 81,5 μM , respectivamente. Verificou-se também que o

derivado LASSBio 1487 (7a) foi mais seletivo para amastigotas de *L. braziliensis* quando comparado a *L. amazonensis*, apresentando um índice de seletividade maior que 10. Em contraste, LASSBio 1483 foi mais seletivo para amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* em relação a *L. braziliensis*.

Em particular, a alteração da subunidade 4-clorofenila pelo sistema 1,3-benzodioxola resultou, novamente, na perda da atividade leishmanicida, desta vez contra amastigotas de *L. amazonensis*, com exceção do nitrocomposto LASSBio 1302 (6g). Para os derivados que apresentam a unidade 4-clorofenila, observou-se a importância da contribuição do substituinte ligado ao carbono imínico (N=CH). Os substituintes 4-isopropilfenila (7e), 3-hidroxi-4-metoxifenila (7f) e o 5-nitrofurano (7g) parecem os mais relevantes para a atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Por outro lado, os derivados com 2-hidroxifenila (7e) e 3-hidroxi-4-metoxifenila (7f) foram os de melhor atividade contra *L. braziliensis*, o que é indicativo de que o grupo hidroxila contribua para a atividade contra amastigotas de *L. braziliensis*.

Sabe-se que diferenças na sensibilidade de várias espécies de *Leishmania* a compostos tem sido relatada na literatura. Escobar e colaboradores (2002) demonstraram diferenças de sensibilidade analisando miltefosina, edelfosina e anfotericina B em diferentes espécies desse parasito. Os autores verificaram que as formas promastigotas e amastigotas de *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. major* possuem menor sensibilidade à miltefosina e edelfosina do que *L. tropica*, *L. aetiopica*, *L. panamensis* e *L. donovani*. Machado e colaboradores (2007) observaram valores de CI_{50} de pentamidina contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), *L. chagasi* (MCAN/BR/97/P142) e *L. major* (amostra de cão) de $4,7 \pm 1,6$; $13,4 \pm 1,4$; $34,2 \pm 2,5$ e $11,5 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$ (determinação em câmara de Neubauer).

Além disso, a atividade leishmanicida de semicarbazonas testadas neste estudo é comparável à obtida recentemente por Benítez e colaboradores (2013), que mostraram atividade leishmanicida de semicarbazonas e seus complexos de vanádio contra promastigotas e amastigotas de *L. panamensis* e *L. chagasi* com valores de CI_{50} que variam $1,33$ - $33,39$ μM e com alta seletividade para parasito em relação às células de mamíferos. Além disso, Greenbaum e colaboradores (2004) sugeriram o estudo da utilização de semicarbazonas e tiosemicarbazonas como alternativa ao tratamento de leishmaniose, tripanossomíase e

malária, devido à sua potência para inibir as cisteína proteases dos protozoários *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp. e *Plasmodium* sp. (COHEN et al., 2002).

A subunidade tiossemicarbazona tem sido descrita como o grupo farmacóforico de alguns inibidores de cruzaina (CHIYANZU et al., 2003; GREENBAUM et al., 2004). A cruzaina, principal cisteína protease de *T.cruzi*, apresenta grande similaridade quanto à sequência de aminoácidos de cisteína proteases homólogas em *L. major*, *L. mexicana* e *L. pifanoi* (MOTTRAM et al., 1992; RAFATI et al., 2001). Além disso, o reconhecimento do substrato de uma cisteína protease de *L. mexicana*, denominada Delta CPB.8 CTE, é semelhante aos substratos preferenciais de cruzaina (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b). Em 2010, Trossini e co-autores (2010) investigaram a atividade de derivados semicarbazônicos contra cruzaina utilizando modelagem molecular e ensaios bioquímicos de inibição da cruzaina. Eles descobriram que o grupo carbonil de 5-nitrofuraldeído semicarbazonas (nitrofurazona) e de seus derivados interage com o resíduo Cys25 no sítio catalítico da enzima. Assim, parece que as propriedades leishmanicidas dos derivados semicarbazônicos verificados neste trabalho pode estar associado, em parte, à inibição da cisteína protease.

Novamente, verificou-se que o nitrocomposto LASSBio 1483 (7g) foi o mais ativo contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* (valor de CI_{50} de 3,5 μ M e o efeito máximo de 93,2%), Grupos nitro-aromáticos, como estão presentes em LASSBio 1302 (6g) e LASSBio 1483 (7g), são conhecidos por terem atividade biológica significativa redox que leva à produção de espécies reativas de oxigênio potencialmente citotóxico. A produção de espécies reativas de oxigênio, em adição, pode ser correlacionada com a interrupção da função da mitocôndria, que foi promovida por LASSBio 1483 (7g).

Análises ultraestruturais através de microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L. chagasi* tratadas com 100 μ M do derivado LASSBio 1483 (7g) por 48h mostraram significativas alterações morfológicas nos parasitos. Dentre as alterações observadas, destacamos a perda do formato alongado do corpo celular do parasito, com promastigotas apresentando forma oval e presença de flagelo retraído ou ausente, sendo indicativo de citotoxicidade para o parasito (Figura 3 do artigo 2 originado da tese). Alguns trabalhos na literatura também descrevem perfis similares de alteração da morfologia de promastigotas de *Leishmania* spp., a exemplo da incubação destes parasitos com extrato em

diclorometano de folhas de *Tithonia diversifolia* (TOLEDO et al., 2014) e com o inibidor de calpaína MDL28170 (MARINHO et al., 2014).

Para exercer um efeito antiproliferativo contra *Leishmania* spp., os agentes precisam induzir alterações morfológicas, bioquímicas ou moleculares que levam à morte do parasito ou impedi-lo de se proliferar (ADADE et al., 2012). As vias de morte celular podem ser geralmente classificadas em: apoptose, necrose e exacerbação do processo autofágico (GUIMARÃES e LINDEN, 2004). A fim de determinar a maneira pela qual LASSBio 1483 (7g) exerce sua atividade antiproliferativa, foram realizadas análises de citometria de fluxo utilizando corante de 7-AAD para identificar ruptura da membrana celular (em células necróticas) e anexina V-PE para investigar o externalização de fosfolipídeos, característica típica da apoptose em leishmanias (DEBRABANT e NAKHASI, 2003; WEINGÄRTNER et al., 2012).

A necrose é um processo caracterizado por uma perturbação desregulada e irreversível da integridade da membrana plasmática, colapso de organelas e fragmentado de DNA aleatória e morte celular (DEBRABANT e NAKHASI, 2003). Os tratamentos com LASSBio 1483 (7g), nas concentrações de 100 μM e 10 μM , não alteraram a percentagem de células marcadas com 7-AAD, demonstrando que os parasitos não sofreram danos na membrana da célula e não foram submetidos a um processo de necrose, assim como pode ser visto na Figura 2B do artigo 2 originado da tese.

Curiosamente, LASSBio 1483 (7g) induziu morte celular via indução de apoptose em promastigotas de *L. amazonensis* a 100 μM e 10 μM , após 48h de incubação (o tratamento proporcionou ligação de anexina V na superfície de promastigotas, perda de potencial transmembranar mitocondrial e ativação da via das caspases), como demonstrado nas Figuras 2A, 2C e 2D do artigo 2 originado da tese, respectivamente.

O termo apoptose é uma descrição dos processos bioquímicos e características morfológicas que levam à autodestruição controlada da célula (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010) e este tipo de morte celular é agora considerada uma prerrogativa de organismos unicelulares, incluindo os tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* spp. Esse tipo de morte é caracterizada pela fragmentação de DNA internucleossômica, ativação de peptidases como caspases, mudança na composição de fosfolipídeos na superfície externa da membrana plasmática, liberação do citocromo C, translocação de endonuclease G e perda de potencial

transmembranar mitocondrial (LEE et al., 2002; DEBRABANT et al., 2003; AMBIT et al., 2008).

É importante mencionar que, em *Leishmania* spp., a exposição de fosfatidilserina tem sido tanto como um marcador de apoptose (MEHTA e SHAHA, 2004), bem como, na infectividade do parasito. No entanto, a exposição de fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática de *Leishmania* spp. tem sido considerada indetectável através da utilização de anexina V como ligante. Sabe-se que durante a apoptose ocorre mudanças drásticas na composição de fosfolipídeos na porção interna e externa da membrana plasmática. Desta forma, a ligação de anexina V na superfície dos parasitos é consequência dessas alterações lipídicas na membrana plasmática, sendo relatada a ligação de anexina V a fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, bisfosfato de 4,5-fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinosital (WEINGÄRTNER et al., 2012).

Além disso, a disfunção da mitocôndria, como a ocasionada por LASSBio 1483 (7g) (Figura 2C do artigo 2 originado da tese), é também uma das marcas de apoptose, muitas vezes associada a alterações no potencial de membrana mitocondrial, o qual é um indicador-chave da função mitocondrial e do início da apoptose (LY et al., 2003). A mitocôndria é a fonte de energia da célula, onde o ATP celular é gerado pelo processo de fosforilação oxidativa. A mitocôndria é uma organela importante para a sobrevivência da célula; portanto, qualquer dano ou disfunção a esta organela leva à morte celular. Isto faz das mitocôndrias um dos principais alvos para a destruição, a fim de alcançar a morte celular programada ou necrose (KANG e PERVAIZ, 2012).

Em células de mamíferos após a indução de apoptose, as mitocôndrias saudáveis asseguram uma compensação para as danificadas. Mas para organismos com mitocôndrias individuais, como *Leishmania* spp., não há nenhuma possibilidade de compensação das mitocôndrias danificadas e a sobrevivência desse parasito depende do bom funcionamento de uma única organela. Na ausência de mitocôndrias funcionais apropriadas, as células cessam a síntese de ATP, essencial para o funcionamento celular (SEN et al., 2004). Em tripanosomatídeos, pode ocorrer tanto um aumento como uma diminuição na respiração celular. Desta forma, tanto a hiperpolarização como a perda do potencial de membrana mitocondrial talvez estejam relacionados com apoptose em tripanosomatídeos, o que demonstra a importância da manutenção adequada do potencial transmembranar mitocondrial nestes parasitos (MEHTA e SHAHA, 2004).

Além disso, a apoptose desencadeada pelo tratamento com LASSBio 1483 (7g) é dependente da ativação de caspases. As caspases são as principais proteases ativadas durante a apoptose de mamíferos e mediam a clivagem de uma variedade de proteínas que conduzem, em última instância, à morte celular (LI e YUAN, 2008). Enquanto algumas caspases atuam principalmente iniciando a cascata de eventos intracelulares que desencadeiam a apoptose, outras caspases, chamadas de efetoras (caspase-3 e caspase-7), agem diretamente promovendo o colapso celular através de clivagem de proteínas estruturais (SHALINI et al., 2014). Neste trabalho, identificamos que o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com LASSBio 1483 (7g) induziu a ativação da via das caspases envolvidas na apoptose (Figura 2D do artigo 2 originado da tese).

No entanto, os mecanismos relativos à indução de morte em parasitos protozoários ainda não são totalmente compreendidos (MESLIN et al., 2010). Caspases parecem ter um papel no processo de apoptose em *Leishmania* spp., já que essas células em apoptose pode clivar substratos de caspases (DAS et al., 2001; LEE et al., 2002). Foi relatado que a ativação de caspase-3/7 pode ser induzida por inúmeros estímulos, apesar dos genes que codificam as caspases ainda não terem sido identificados no genoma de espécies de *L. major* (IVENS et al., 2005). Por exemplo, a indução da ativação das caspase-3/7 pode envolver a liberação citosólica de citocromo c pelas mitocôndrias, bem como a ativação de caspase-9 ou, alternativamente, a ativação caspase-8 ou caspase-12, as quais também podem induzir a ativação de caspase-3/7 (CHEN et al., 2001; EICHLER et al., 2006).

Outra forma de morte celular regulamentada é a autofágica. Sabe-se que processo autofágico é importante para que as células danificadas removam ou remodelam as estruturas celulares, no entanto sob certas condições podem induzir uma intensa vacuolização citoplasmática e desorganização da célula, resultando em morte celular (GUIMARÃES e LINDEN, 2004). Se por um lado, na apoptose clássica há colapso precoce de elementos do citoesqueleto, mas a preservação de organelas até o final do processo; por outro lado, na morte por autofagia há degradação precoce de organelas e preservação de elementos do citoesqueleto até fases tardias (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004).

Neste trabalho, o anticorpo conjugado anti-LC3 Alexa Fluor®555 foi utilizado para avaliar a possível indução de morte celular autofágica em promastigotas tratadas com LASSBio 1483 (7g) nas concentrações de 100 µM e 10 µM durante 48 horas, através de análise de citometria de fluxo. O tratamento com LASSBio 1483 (7g) em 100 µM durante 48

h alterou a razão de indução de autofagia de promastigotas, indicando que a atividade antiproliferativa destes derivados provavelmente é também resultado de um processo de autofagia exacerbado (Figura 2E do artigo 2 originado da tese).

A visualização de autofagossomas de células em fase de morte celular levou à crença de que a autofagia é uma forma não-apoptótica de morte celular programada (LEVINE e YUAN, 2005). Macroautofagia, geralmente conhecido como autofagia (KLIONSKY et al., 2012), é um mecanismo catabólico para degradação intracelular de proteínas e organelas de vida longa, bem como de reciclagem dos seus constituintes. Apesar da infinidade de papéis pró-sobrevivência para a autofagia, em certas circunstâncias também executa um subtipo de morte celular específica conhecida como morte celular autofágica.

Na verdade, a morte celular autofágica representa de fato uma modalidade de morte celular potencial em protozoário. O aparelho celular necessária para autofagia é largamente conservada entre protozoários parasitos (DUSZENKO et al., 2011), que normalmente sofrem autofagia exacerbado devido a privação nutricional (WILLIAMS et al., 2006). É importante ressaltar, no entanto, que a autofagia também influencia diretamente a virulência parasitária em *Leishmania* spp. devido, principalmente, ao seu papel no remodelamento celular durante a diferenciação do ciclo de vida e na manutenção da função mitocondrial em *L. major* (BERA et al., 2003; WILLIAMS et al., 2006).

Da mesma forma que LASSBio 1483 (7g), várias substâncias têm sido relatados como indutores de apoptose e autofagia em *Leishmania* spp.. Por exemplo, pomastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* tratadas com iangambina mostraram características de morte celular por apoptose e autofagia (MONTE-NETO et al., 2011). Normalmente, esses derivados induzem alterações ultra-estruturais, que pode ser relacionado com a autofagia, como as que têm sido relatadas quando *L. amazonensis* tratadas com amiodarona, apresentando a formação de grandes autofagossomas que continham partes do citoplasma e membrana (DE-MACEDO-SILVA et al., 2011). Peptídeos antimicrobianos também foram capazes de causar a morte de promastigotas de *L. donovani* com formação de grandes vacúolos, que foram corados com monodansilcadaverina, um marcador bioquímico de autofagia (BERA et al., 2003). Por fim, o inibidor de cisteína protease 13b, um derivado aziridina-2,3-dicarboxilato, induziu morte celular em promastigotas de *L. major*, que apresentaram acúmulo de detritos em vacúolos relacionados à autofagia em fase precoce da morte dos parasitos, no entanto a morte parecia finalmente ocorrer por um mecanismo apoptótico (SCHURIGT et al., 2010).

Finalmente, os efeitos do tratamento com LASSBio 1483 (7g) (10 μ M por 48 h) no ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 2F do artigo 2 originado da tese). Análise da população de células em diferentes fases do ciclo celular, é possível, após coloração com 7-AAD e subsequente análise por citometria de fluxo. O tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com LASSBio 1483 (7g) por 48h foi capaz de induzir mudanças drásticas no ciclo celular dos parasitos. O derivado LASSBio 1483 (7g) à 10 μ M induziu um aumento significativo na proporção das células na fase G0/G1 e diminuição do número de parasitos na fase S quando comparado com células expostas apenas ao meio de cultura ou ao veículo DMSO (0,1%). Estes dados sugerem que essas células não estão prosseguindo da fase G0/G1 para fase S do ciclo celular. Além disso, esses resultados também são um forte indicativo de interrupção na síntese de DNA durante a fase S. Essa diminuição da síntese de DNA induzida por LASSBio 1483 (7g) em promastigotas de *L. amazonensis* pode ocorrer devido à inibição de topoisomerase, visto que tem sido reportado que a subunidade semicarbazona interage fortemente com o sítio ativo de topoisomerase II de linhagens cancerígenas humanas (SHUKLA et al., 2012), sendo esta enzima de *Leishmania* spp. possível alvo do derivado LASSBio 1483 (7g), já que apresentam alta homologia com a topoisomerase humana (BANERJEE et al., 2011).

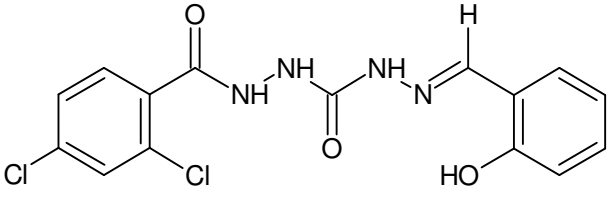
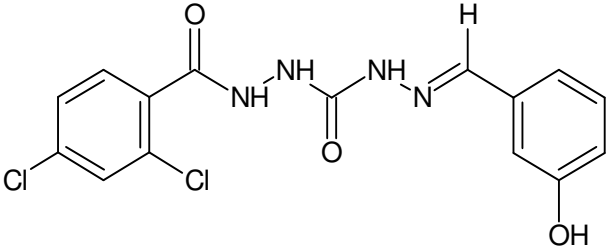
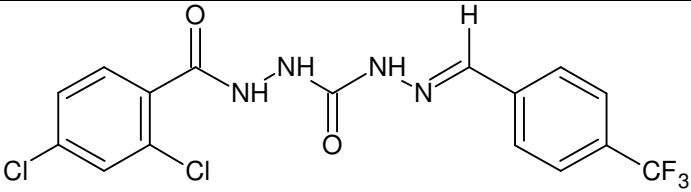
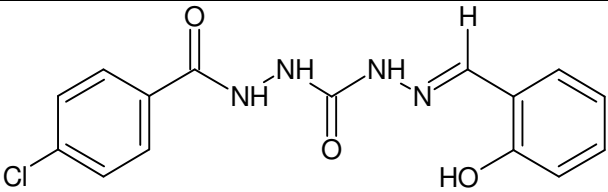
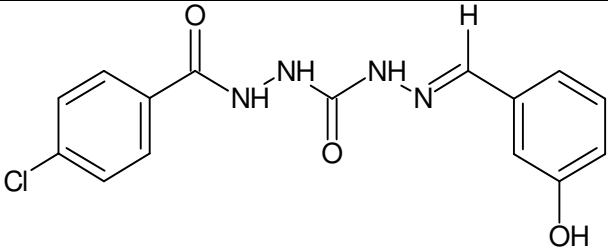
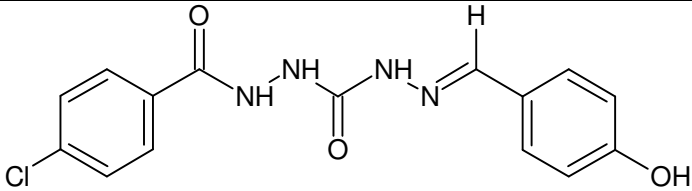
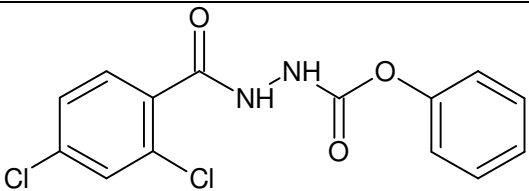
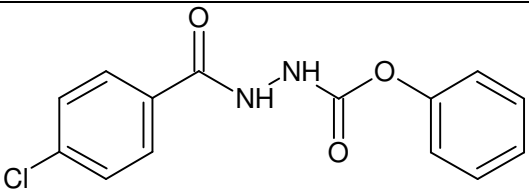
Como LASSBio 1483 (7g) teve, de forma geral, o maior efeito leishmanicida observado dentre os derivados semicarbazônicos, este composto foi testado no modelo experimental de infecção com *L. amazonensis*. Nossos dados revelam um efeito significativo de LASSBio 1483 (7g) na redução das lesões de orelha de camundongos BALB/c causadas por *L. amazonensis* (Figura 4 do artigo 2 originado da tese).

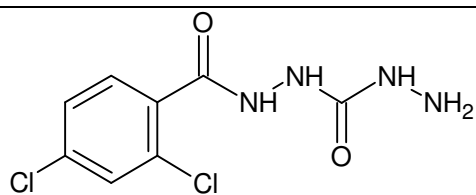
A eficácia do tratamento *in vivo* com LASSBio 1483 (7g) na dose de 30 μ mol/kg/dia x 28 dias, por via intraperitoneal (i.p.) e oral (v.o.), contra *L. amazonensis* foi evidente, não só reduziu o inchaço e o tamanho da ulceração nos animais tratados, como foi observada uma importante redução na carga parasitária local da orelha infectada (diminuição do número de parasitos na proporção de 33,3% e 30,5%, respectivamente), mas não sistemicamente no linfonodo drenante (Figura 5 do artigo 2 originado da tese). Embora o tratamento com miltefosina, em 30 μ mol/kg/dia x 28 dias, por via oral, tenha sido o único tratamento que diminui a carga parasitária local (50%) e sistêmica (61,1%), a atividade leishmanicida de LASSBio 1483 (7g) (i.p.e v.o.) foi maior que do glucantime (i.p.) na mesma dose (redução de 14% da carga parasitária na orelha infectada). Este antimonial pentavalentes é usado como um

dos medicamentos da primeira linha de escolha para o tratamento de leishmaniose (GOTO e LINDOSO, 2010) e apenas teve efeito na redução do tamanho da lesão e não diminuiu a carga parasitária, em ambos, orelha infectada e linfonodo drenante na dose de 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{dia}$ x 28 dias, por via intraperitoneal. Tem sido relatado na literatura que uma dose maior de glucantime é necessária para ser observada eficácia contra a carga parasitária de *L. amazonensis* em camundongos BALB/c infectados (GONÇALVES et al., 2005). Desta forma, uma dose mais alta de antimônio é necessária para ter um efeito similar de LASSBio 1483 (7g) ou miltefosina.

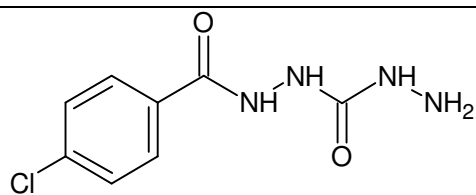
Desde que semicarbazonas podem ser capazes de inibir cisteína protease e nitrofuranos podem gerar metabólitos citotóxicos, esta possibilidade de modo de ação de LASSBio 1483 (7g) estão sob investigação. Futuramente, pretende-se estudar o mecanismo pelo qual LASSBio 1483 (7g) exerce seus efeitos em macrófagos infectados ou contra formas promastigotas, bem como o efeito *in vivo* que relatamos aqui. Assim, como perspectivas desse estudo, pretende-se avaliar os efeitos inibidores destes análogo em cisteína proteases de *Leishmania* spp., bem como seu efeito em outros alvos terapêuticos validados para o desenho de fármacos leishmanicidas, tal como a topoisomerase e tripanotiona redutase. Neste trabalho, também realizou-se a avaliação da série de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos. Com relação às *N*-acilidrazonas, esse grupo de substâncias apresentam também amplo espectro de aplicações potenciais, incluindo a atividade antiprotozoária, sendo esta atividade provavelmente derivada de um mecanismo de inibição de cisteína protease (RANDO et al., 2010). Neste contexto, um sistema inédito obtido pela união de hidrazidas e *N*-acilidrazonas, originou a série denominada hidrazida-*N*-acilidrazonas, que dado ao ineditismo desta classe química, não há precedentes da atividade farmacológica descrita. Entretanto, considerando que seu planejamento agregou as unidades hidrazida e *N*-acilidrazona, previamente descritas com propriedades antiparasitárias e antimicrobianas, decidiu-se investigar o efeito leishmanida desta nova série original. O **Quadro 2** destaca as hidrazida-*N*-acilidrazonas com maior citotoxicidade para célula hospedeira e diversas espécies de *Leishmania*.

Quadro 2. Estrutura química dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos e intermediários sintéticos com maior citotoxicidade *in vitro* contra macrófagos da linhagem J774.A1, promastigotas de *L. major* e amastigotas de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

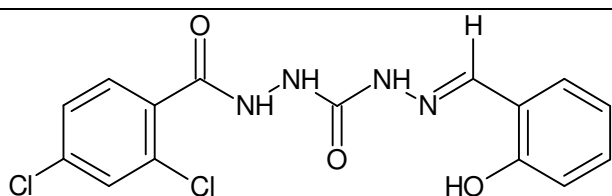
Citotoxicidade para linhagem de macrófagos J774.A1:	
 <p>LASSBio 1705 (3a) CI₅₀ = 78,1 μM</p>	 <p>LASSBio 1708 (3b) CI₅₀ > 100 μM</p>
 <p>LASSBio 1736 (3d) CI₅₀ > 100 μM</p>	 <p>LASSBio 1704 (4a) CI₅₀ > 100 μM</p>
 <p>LASSBio 1709 (4b) CI₅₀ = 85,2 μM</p>	 <p>LASSBio 1706 (4c) CI₅₀ = 86,2 μM</p>
Citotoxicidade para promastigotas de <i>L. major</i> 5-ASKH:	
 <p>LASSBio 1492 (9) CI₅₀ = 3,7 μM</p>	 <p>LASSBio 1702 (10) CI₅₀ = 13,2 μM</p>



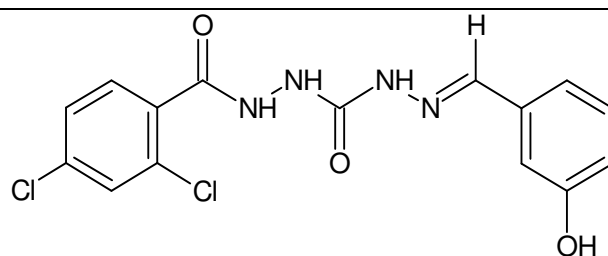
LASSBio 1493 (11)
 $CI_{50} = 0,2 \text{ nM}$



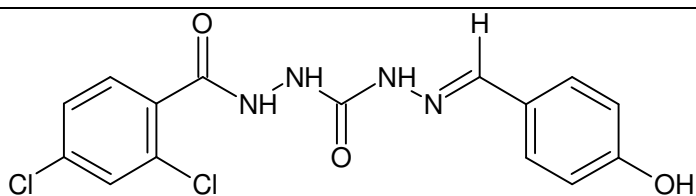
LASSBio 1710 (12)
 $CI_{50} = 33,7 \text{ nM}$



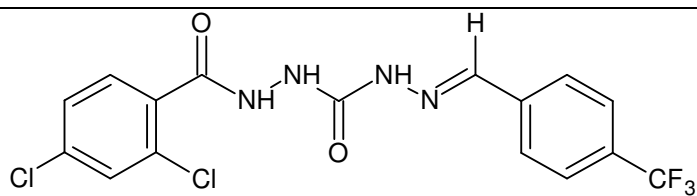
LASSBio 1705 (3a)
 $CI_{50} = 0,5 \text{ nM}$



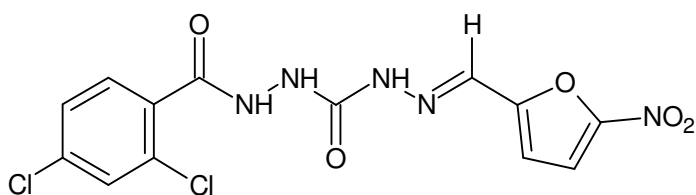
LASSBio 1708 (3b)
 $CI_{50} = 0,3 \text{ }\mu\text{M}$



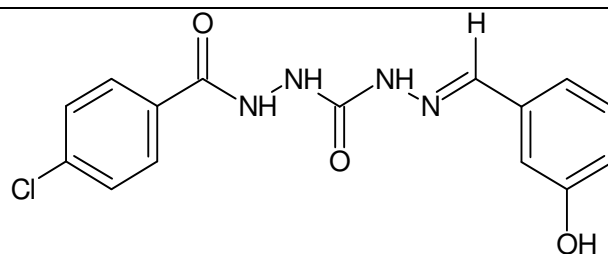
LASSBio 1707 (3c)
 $CI_{50} = 3,9 \text{ }\mu\text{M}$



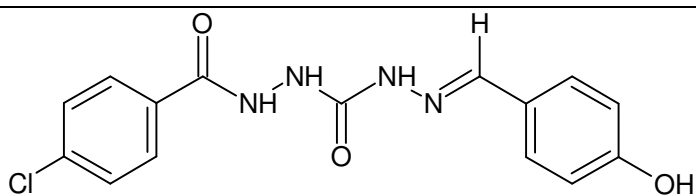
LASSBio 1736 (3d)
 $CI_{50} = 0,4 \text{ }\mu\text{M}$



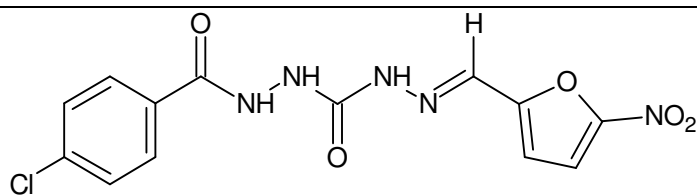
LASSBio 1703 (3e)
 $CI_{50} = 8,7 \text{ }\mu\text{M}$



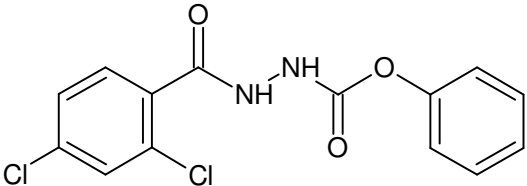
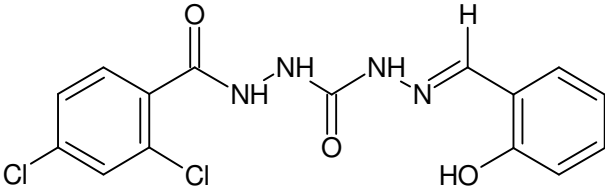
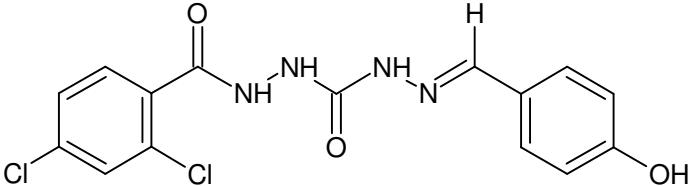
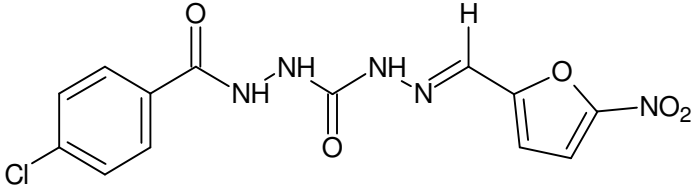
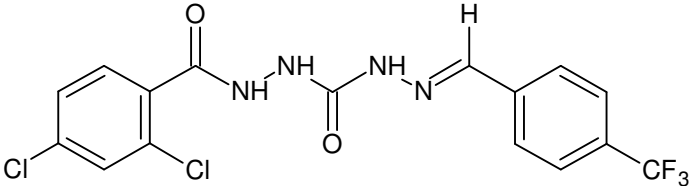
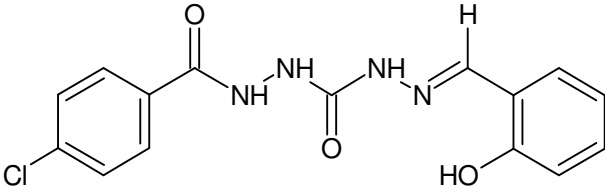
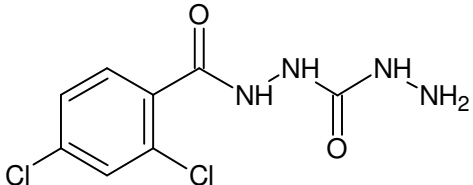
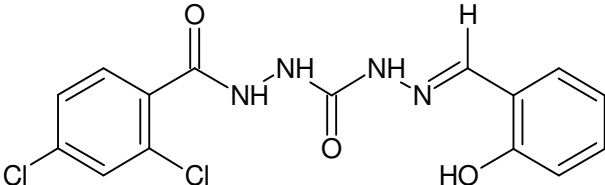
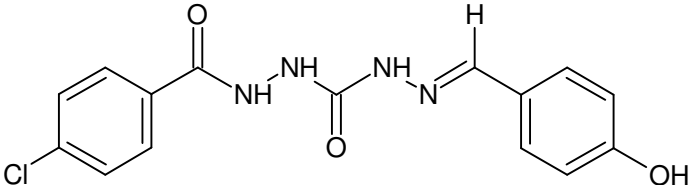
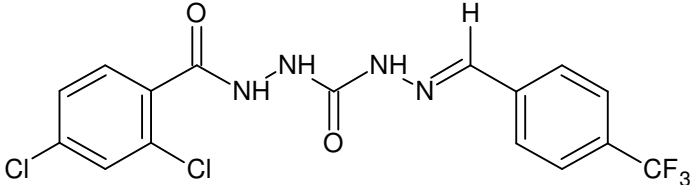
LASSBio 1709 (4b)
 $CI_{50} = 0,8 \text{ }\mu\text{M}$



LASSBio 1706 (4c)
 $CI_{50} = 0,6 \text{ }\mu\text{M}$



LASSBio 1491 (4e)
 $CI_{50} = 7,5 \text{ }\mu\text{M}$

Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. major</i> 5-ASKH:	
 <p>LASSBio 1492 (9) CI₅₀ = 4,5 μM</p>	 <p>LASSBio 1705 (3a) CI₅₀ = 8,5 μM</p>
 <p>LASSBio 1707 (3c) CI₅₀ = 15,9 μM</p>	 <p>LASSBio 1491 (4e) CI₅₀ = 7,3 μM</p>
Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. amazonensis</i> :	
 <p>LASSBio 1736 (3d) CI₅₀ = 84,0 μM</p>	 <p>LASSBio 1704 (4a) CI₅₀ = 85,3 μM</p>
Citotoxicidade para amastigotas de <i>L. braziliensis</i> :	
 <p>LASSBio 1493 (11) CI₅₀ = 7,7 μM</p>	 <p>LASSBio 1705 (3a) CI₅₀ = 8,0 μM</p>
 <p>LASSBio 1706 (4c) CI₅₀ = 3,6 μM</p>	 <p>LASSBio 1736 (3d) CI₅₀ = 5,3 μM</p>

Inicialmente, foi investigada a citotoxicidade das séries de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos sobre as células de mamíferos, através do método do MTT, em culturas de macrófagos da linhagem J774.A1 tratados por um período de 48 horas, como mostra a Tabela 1 do artigo 3 originado da tese. Os derivados LASSBio 1704, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1709 e LASSBio 1736 apresentaram atividade deletéria para a célula hospedeira. Através do método do MTT, observou-se que o tratamento com os derivados LASSBio 1491, LASSBio 1492, LASSBio 1493, LASSBio 1702, LASSBio 1703, LASSBio 1707, LASSBio 1710 e LASSBio 1737, até a concentração de 100 µM em cultura de macrófagos da linhagem J774.A1 tratados por um período de 48 horas, não foi capaz de diminuir a capacidade de redução de mitocondrial celular, já que os dados mostram que as substâncias apresentam valores de absorbância semelhante as células tratadas com DMSO e, desta forma, não apresentaram efeito citotóxico sobre macrófagos. O veículo utilizado para solubilizar todos os derivados (DMSO 0,1%), não apresentou efeito tóxico significativo para a célula, quando comparado ao controle negativo (células cultivadas apenas em meio de cultura). Entretanto, os derivados LASSBio 1704, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1708, LASSBio 1709 e LASSBio 1736 apresentaram citotoxicidade para macrófagos dessa linhagem até a concentração máxima de 100 µM. Além disso, os derivados LASSBio 1705, LASSBio 1706 e LASSBio 1709 foram dentre as substâncias testadas as que apresentaram maior efeito deletério para célula hospedeira, apresentando valores de CI₅₀ de 78,1 µM, 86,2 µM e 85,2 µM e efeito citotóxico máximo de 68,44 ± 2,4 e 70,25 ± 2,6 e 54,28 ± 6,3 %, respectivamente.

Diante destes resultados, observou-se a importância da unidade hidroxibenzilideno para citotoxicidade contra a célula hospedeira, visto que apenas um único derivado (LASSBio 1707, que apresenta o radical hidroxila ligado em *para* à fenila) que continha esse substituinte não induziu efeito deletério a macrófagos da linhagem J774.A1 até a máxima concentração testada. Os demais derivados contendo o grupo hidroxibenzilideno (LASSBio 1704, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1708, LASSBio 1709) induziram efeito citotóxico, não importando desta forma a posição do radical hidroxila (*orto*, *meta* ou *para*), nem o fato de pertencerem a série 3 (presença de 2,4-diclorofenila ligada a carbonila da região hidrazida) ou série 4 (presença de 4-clorofenila ligada a carbonila da região hidrazida). O único derivado citotóxico para às células hospedeiras que não apresentava em sua estrutura química a função

hidroxibenzilideno foi o derivado LASSBio 1736, que apresentava como ligante da função imina a unidade trifluormetila ligada ao anel benzilidênico na posição 4, além de apresenta o grupo 2,4-diclorofenila em sua estrutura química.

Posteriormente, calculou-se a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do crescimento de promastigotas dos derivados no ensaio de viabilidade de formas promastigotas de *L. major* em várias concentrações (100, 50, 25, 10, 1, 0,1 e 0,01 µM). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1 do artigo 3 originado da tese), os derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos apresentaram pronunciada atividade anti-promastigota contra *L. major* 5-ASKH, com exceção da substância LASSBio 1737, destacando-se os derivados LASSBio 1491, LASSBio 1492, LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1707, LASSBio 1708, LASSBio 1709, LASSBio 1710 e LASSBio 1736, que apresentaram eficácia anti-leishmania similar ao fármaco miltefosina, com efeito máximo de 68,4 ± 0,1, 67,5 ± 0,1, 75,7 ± 5,8, 75,7 ± 5,0, 70,0 ± 1,2, 62,6 ± 1,6, 63,8 ± 1,8, 72,5 ± 5,1, e 77,6 ± 4,2%, respectivamente. Interessantemente, a única diferença entre as estruturas químicas de LASSBio 1736 e LASSBio 1737 é a substituição do átomo de cloro na posição 2 no anel aromático ligado à função hidrazida pelo hidrogênio, modificação química suficiente para abolir a atividade anti-promastigota contra *L. major* 5-ASKH.

Além disso, os derivados LASSBio 1491, LASSBio 1492, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1708, LASSBio 1709 e LASSBio 1736 (CI₅₀ de 7,5 µM, 3,7 µM, 0,6 µM, 3,9 µM, 0,3 µM, 0,8 µM e 0,4 µM, respectivamente) mostraram potência equivalente a da miltefosina e pentamidina. A miltefosina e a pentamidina apresentaram eficácia máxima de 88,1 ± 0,1 e 72,6 ± 2,0, com CI₅₀ de 3,1 µM e 0,8 µM, respectivamente. Já os intermediários sintéticos LASSBio 1493 [2,4-dicloro-*N'*-(hidrazinilcarbonil)benzohidrazida] e LASSBio 1710 [4-cloro-*N'*-(hidrazinilcarbonil)benzohidrazida] e o derivado hidrazida-*N*-acilidrazônico LASSBio 1705 se mostraram mais potentes que pentamidina e miltefosina com valores de CI₅₀ de 0,2 nM, 33,7 nM e 0,5 nM, respectivamente. Assim, dentre os derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos, LASSBio 1705 foi o derivado mais potente contra promastigotas *L. major* 5-ASKH, apresentando a unidade 2,4-diclorofenila ligada à carbonila hidrazídica e o 2-hidroxibenzilideno ligado à região imínica. Além disso, a despeito do fato de LASSBio 1705 ser citotóxico para as células hospedeiras na concentração de 100 µM, este apresentou elevado índice de seletividade para promastigotas de *L. major* 5-ASKH (cento e

cinquenta e seis mil e duzentas vezes mais seletivo para o parasito), com elevada potência e eficácia leishmanicida e alto índice de seletividade citotóxica.

Como testes contra amastigotas intracelulares são mais relevantes para inferir a sensibilidade de fármacos antileishmania, uma vez que esta é a forma do parasito encontrado no hospedeiro vertebrado (CROFT et al., 2006), os derivados que apresentaram atividade contra promastigotas com ampla janela terapêutica foram selecionados para serem avaliados quanto à atividade leishmanicida em várias concentrações (100, 30, 10, 1 e 0,1 μM) em modelo de infecção de macrófagos em lamínula para mensurar a possível inibição sobre a forma intracelular do parasito (amastigota) de *L. major* 5-ASKH. A determinação da CI_{50} , bem como a eficácia máxima das substâncias-teste em estudo contra formas amastigotas de *L. major* 5-ASKH evidenciam que todos os derivados testados apresentaram atividade anti-amastigota, destacando-se o carbamato LASSBio 1492 [CI_{50} de 4,5 μM] e os derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos LASSBio 1491 (CI_{50} de 7,3 μM), LASSBio 1705 (CI_{50} de 8,5 μM) e LASSBio 1707 (CI_{50} de 15,9 μM), assim como mostrado na Tabela 1 do artigo 3 originado da tese. Esses quatro derivados mostraram potência maior que da miltefosina (CI_{50} de 85,3 μM) e na mesma ordem de grandeza a da pentamidina (CI_{50} de 17,1 μM). Além disso, os efeitos máximos desses derivados contra amastigotas de *L. major* 5-ASKH (porcentagem de inibição do crescimento de amastigota de $54,8 \pm 7,6$, $67,7 \pm 6,9$, $67,5 \pm 4,8$ e $52,0 \pm 3,5\%$, respectivamente) foram similares que a pentamidina ($53,8 \pm 1,1\%$) e miltefosina ($53,6 \pm 1,3\%$). Verificou-se que LASSBio 1491 e LASSBio 1492 foram tão potentes contra amastigotas quanto para promastigotas de *L. major* 5-ASKH. Já os intermediários sintéticos LASSBio 1493 e LASSBio 1710, bem como os derivados LASSBio 1703, LASSBio 1705 foram seletivos para promastigotas em relação a amastigotas de *L. major* 5-ASKH. O derivado LASSBio 1491 é o único pertencente a série 4, sendo também o único nitrocomposto (apresentando a unidade 5-nitrofurano) dentre os três derivados com atividade anti-amastigota para *L. major* 5-ASKH. Os outros dois derivados, LASSBio 1705 e LASSBio 1707, pertencem à série 3, apresentando dois cloros nas posições 2 e 4 do anel fenila ligado à carbonila da região hidrazídica, além de apresentarem a hidroxila ligada em *orto* ou *para* no anel benzilidênico, respectivamente.

Desta forma, a adição desse grupamento hidroxila nas posições *orto* e *para*, respectivamente, parece ser importante para melhor atividade destes derivados contra promastigotas e amastigotas de *L. major* 5-ASKH e para controlar a infecção da célula

hospedeira, semelhante ao observado na série de semicarbazonas estudadas e comentadas anteriormente. Por exemplo, com relação à atividade leishmanicida de LASSBio 1705, esta pode ser decorrente da possibilidade de formação de tautômeros, gerando espécies do tipo quinona-metídeo, que tem sido relatada como fator estrutural responsável pela inibição enzimática encontrada em derivados *N*-acilidrazônicos com a subunidade 2-hidroxibenzilideno, havendo assim a transferência do próton tautomérico do grupo 2-hidroxifenila para o nitrogênio vinílico da *N*-acilidrazona. Este tautomesrismo, permite o ataque nucleofílico do resíduo de cisteína proteases de protozoários ao carbono eletrofílico do intermediário *o*-quinona-metídeo (BABINE e BENDER, 1997; IFA et al., 2000).

Verificou-se ainda a atividade anti-amastigota contra *L. amazonensis* na concentração de 30 µM (Figura 1 do artigo 3 originado da tese) e, posteriormente, após a seleção dos derivados mais ativos, os mesmos foram testados para obtenção da CI₅₀ contra amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Tabela 2 do artigo 3 originado da tese). Os resultados obtidos indicam que alguns derivados de hidrazina-*N*-acilidrazônicos têm atividade anti-leishmania *in vitro* e que esta atividade não esteja limitado a uma única espécie. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas em relação à sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* para cada composto testado. As maiores atividades leishmanicidas foram as dos derivados LASSBio 1704 (pertencente a série 4) e LASSBio 1736 (pertencente a série 3) contra *L. amazonensis*; assim como do intermediário sintético LASSBio 1493 e dos derivados LASSBio 1705, LASSBio 1706 e LASSBio 1736 contra *L. braziliensis*, indicando também uma menor suscetibilidade de *L. amazonensis* para os derivados. Desta forma, os intermediários sintéticos LASSBio 1492 e LASSBio 1710, bem como o derivado LASSBio 1491 foram seletivos apenas para amastigotas de *L. major* em relação à *L. amazonensis* e *L. major*; LASSbio 1705 foi tão potente contra amastigotas de *L. major* quanto para *L. braziliensis*; LASSBio 1493 foi mais potente contra amastigotas de *L. major*, seguida de *L. braziliensis*, não apresentando efeito contra *L. amazonensis*; e LASSBio 1736 foi mais seletivo para *L. braziliensis* em relação a *L. amazonensis*, apresentando um índice de seletividade maior que 10. Estes resultados são consistentes com o fato conhecido que pacientes infectados com *L. amazonensis* são menos sensíveis aos tratamentos anti-leishmania disponíveis (MARSDEN et al., 1985).

No que diz respeito à atividade *in vitro* antileishmania, identificamos derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos com uma potência semelhante ou maior do que a pentamidina ou

miltefosina, usados como fármacos de referência. Foi inicialmente observado que os derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos contendo a unidade 2,4-diclorofenila (série 3) eram, geralmente, mais ativos contra formas amastigotas do que os derivados correspondentes da série apresentando o grupo 4-clorofenila (série 4), com exceção dos nitroderivados (LASSBio 1491 e LASSBio 1703). Em geral, os melhores derivados híbridos foram LASSBio 1736 com 4-trifluorometilfenila ligada à região iminíca da região acilidrazônica; e LASSBio 1705, este último apresentando o grupo 2-hidroxibenzilideno ligado à região *N*-acilidrazônica.

Considerando os resultados *in vitro*, os derivados LASSBio 1493, LASSBio 1705, LASSBio 1706, LASSBio 1707, LASSBio 1710 e LASSBio 1736 também foram escolhidos para avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. amazonensis*. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os derivados 1493 (i.p.), 1705 (i.p.), 1706 (i.p.), 1707 (i.p.), 1710 (i.p.) e 1736 (i.p.) possuem efeito sobre o curso da infecção da orelha *in vivo* com *L. amazonensis* na dose de 30 µmol/kg/dia x 28 dias (Figura 2 e 3 do artigo 3 originado da tese).

Todos os derivados testados tiveram efeito sobre o curso da infecção, diminuindo o tamanho da lesão na orelha infectada, com destaque para os derivados LASSBio 1705 e LASSBio 1736, onde observou-se a maior remissão da lesão, como pode ser observado nas Figuras 2 e 3 do artigo 3 originado da tese. Para avaliação da carga parasitária *in vivo*, foram realizadas quantificação de parasitos nas orelhas infectadas e linfonodos drenantes pela análise de diluições limitantes (ADL), como demonstrado na Figura 4 do artigo 3 originado da tese. Os derivados 1705 (i.p.) e 1736 (i.p.) controlaram a infecção *in vivo* com *L. amazonensis* na orelha infectada com a dose de 30 µmol/kg/dia x 28 dias, apresentando efeito de 58,1% e 38,9%, respectivamente; enquanto que os derivados LASSBio 1705 (i.p.) e LASSBio 1707 reduziram a carga parasitária nos linfonodos drenantes na proporção de 61,1% e 56,5%, respectivamente.

Embora seja possível que o LASSBio 1705 induza alterações na progressão da doença aqui apresentadas por toxicidade direta sobre a *L. amazonensis* em si, esta possibilidade é considerada improvável. Uma razão é que, no presente estudo, também foi observada que esse derivado não gerou nenhuma alteração na proliferação de amastigotas de *L. amazonensis in vitro* quando os parasitos foram expostos a esse derivado a uma concentração de 100 µM, podendo ser um pró-fármaco ou ser um forte imunomodulador, promovendo desta forma sua ação leishmanicida.

Além disso, a toxicidade do(s) composto(s) também foi determinada através de dosagens bioquímicas no plasma dos animais. Observou-se que nenhum dos tratamentos realizados causou alterações plasmáticas nos parâmetros bioquímicos avaliados, indicando que não houve dano hepático ou renal (Figura 7 do artigo 3 originado da tese). No entanto, da mesma forma que os derivados LASSBio 1705 e LASSBio 1706 foram citotóxicos para célula hospedeira, esses derivados hidroxibenzilidênicos também ocasionaram a morte de 20% dos animais referentes aos grupos experimentais tratados com as referidas substâncias, apresentando o mesmo percentual de morte encontrado no grupo que recebeu tratamento com a mesma dose de glucantime, fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença, sendo um dos fármacos menos tóxicos existente no mercado. Diante da elevada toxicidade do arsenal terapêutico destinado ao tratamento da doença, os resultados referentes à mortalidade de animais induzida por LASSBio 1705 não é um fator limitante para a continuação dos estudos com este derivado e pode ter pouca significância clínica, haja vista os dados comparativos com o padrão glucantime.

Desta forma, o tratamento com LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 foi altamente eficaz *in vivo* contra a espécie normalmente refratária *L. amazonensis*. Esses três derivados fazem parte da série 3, ou seja, apresentam em sua estrutura química o grupo 2,4-diclorofenila. Além disso, LASSBio 1705 e LASSBio 1707 também apresentam radical hidroxila ligado ao anel benzilidênico na posição *orto* e *para*, respectivamente. De forma muito interessante, LASSBio 1707 foi menos tóxico que LASSBio 1705, não induzindo morte dos animais, nem alterações de ALT, AST, creatinina e uréia, apesar de ter o grupo 4-hidroxibenzilideno, sendo também o único derivado com o grupo hidroxibenzilideno que não foi citotóxico *in vitro* para macrófagos da linhagem J774.A1, como anteriormente mencionado. Além disso, a substituição do cloro na posição 2 do anel aromático ligado à região hidrazida, bem como a presença da hidroxila na posição *meta*, fez com que o derivado LASSBio 1706 tivesse menor atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. amazonensis* quando comparado a LASSBio 1705 e LASSBio 1707.

Por fim, LASSBio 1736 é um derivado hidrazida-*N*-acilidrazônico com um grupo 4-trifluorometilfenila como substituinte da imina presente na região acilidrazônica. Sabe-se que o emprego de moléculas fluoradas aumenta a lipossolubilidade e a estabilidade metabólica dos fármacos. A inserção do grupo CF₃ na estrutura da substância pode aumentar o caráter hidrofóbico dos complexos e, provavelmente, facilitar a permeação da membrana celular.

Frequentemente, o flúor substituinte ocasiona em um leve aumento da afinidade pela proteína por aumento na lipofilicidade da molécula. Esse efeito pode ser direto (interação do ambiente fluorado com a proteína) ou indireto (modulação da polaridade de outros grupos que interagem com a proteína) (MAFFEI, 2009).

Além disso, a partir do ponto de vista da química medicinal, *N*-acilidrazonas são dotados com a capacidade interessante de interagirem com diversos biorreceptores por estabelecer pontos de ligação-de-hidrogênio e a possibilidade teórica de adotar uma orientação conformacional única (FRAGA e BARREIRO, 2006). Carvalho e co-autores (2014) mostraram o efeito leishmanicida de *N*-acilidrazonas cinâmicas com CI_{50} entre 6,27 a 33,3 μ M contra amastigotas axênicas de *L. donovani*. Estudos comparando do efeito inibidor de *N*-acilidrazonas e chalconas em cisteína proteases parasitárias, tais como cruzaina, falcipaina, e tripanopaina (TROEBERG et al., 2000) também demonstraram que a insaturação imínica de *N*-acilidrazonas pode ser o local que realiza a ligação hidrofóbica com o sítio ativo enzimático (IFA et al., 2000). Tem sido relatado também que um derivado bisnaftil-*N*-acilidrazônico induz potente inibição de cisteína proteases do tipo catepsina L de *L. major* ($CI_{50} = 0,5 \mu$ M) (SELZER et al., 1997). Assim, em continuidade ao presente estudo, pretende-se avaliar os efeitos de derivados de hidrazida-*N*-acilidrazônicos em cisteína protease de *Leishmania* spp., bem como a sua ação em outros alvos para atividade leishmanicida.

Considerando os resultados *in vivo*, os derivados LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 foram escolhidos para avaliação do mecanismo de morte celular contra promastigotas de *L. amazonensis*, porque mostraram alta atividade contra os parasitos *in vivo*. Assim, os eventos de apoptose/necrose, os efeitos no ciclo celular e a exacerbação do processo de autofagia foram estudados.

Os tratamentos com LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 (100 μ M e 10 μ M) não alteraram a percentagem de células marcadas com 7-AAD, demonstrando que os parasitos não sofreram danos na membrana da célula e, provavelmente, não foram submetidos a um processo de necrose (Figura 1B do artigo 4 originado da tese). Além disso, LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 (100 μ M e 10 μ M) foram capazes de induzir apoptose em formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 48 h de incubação (mais de 60% das células apresentaram ligação com anexina V na sua superfície celular) (Figura 1A do artigo 4 originado da tese). Como a manutenção do potencial transmembranar mitocondrial é essencial

para a sobrevivência do parasito com uma única mitocôndria, avaliou-se a integridade mitocondrial de promastigotas através da análise do potencial de membrana mitocondrial, utilizando o kit Muse Mitopotencial. Foi verificado que houve despolarização da membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com pentamidina, LASSBio 1705 e LASSBio 1736 a 100 μM (Figura 2 do artigo 4 originado da tese), o que é um forte indício da indução de morte por apoptose desses parasitos.

Como a indução da apoptose está ligada também a ativação da cascata de caspase, que são proteases que provoca a fragmentação do DNA genômico, culminando nessa forma de morte celular programada. Desta forma, investigou-se a ativação da via das caspases nesses parasitos (Figura 3 do artigo 4 originado da tese). Assim, foi também verificado que LASSBio 1705, LASSBio1707 e LASSBio 1736 também foi capaz de aumentar a porcentagem de promastigotas de *L. amazonensis* positivas para caspase, assim como o tratamento com pentamidina, indicando que ativação de apoptose mediada por LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 é induzida de forma dependente da via de enzimas semelhantes a caspases.

Além disso, o anticorpo conjugado anti-LC3 Alexa Fluor®555 foi utilizado para avaliar uma possível indução de morte celular programada autofágica em promastigotas tratados com LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 (100 μM e 10 μM), através de análise de citometria de fluxo. No entanto, o tratamento com LASSBio 1705, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 não alterou a taxa de indução de autofagia das células, o que indica que a atividade antiproliferativa destes derivados provavelmente não resulta de um processo autofágico exacerbado (Figura 4 do artigo 4 originado da tese).

Finalmente, a distribuição do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo após tratamento com derivados a 100 μM e 10 μM por 48h. Assim, os tratamentos de promastigotas de *L. amazonensis* com LASSBio 1707 ou LASSBio 1736 a 100 μM por 48h provocaram mudanças drásticas no ciclo celular dos parasitos. LASSBio 1707 a 100 μM induziu um aumento significativo na proporção das células na fase S. Por outro lado, LASSBio 1736 a 100 μM induziu uma acentuada redução na replicação do DNA e da mitose, com uma diminuição no número de células na fase S e G2/M quando comparada com células de controle expostas apenas a meio ou DMSO (Figura 5 do Capítulo 5).

A necessidade de encontrar um novo esquema terapêutico para o paciente leishmaniose visceral, motivou o estudo da atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados hidrazida-

N-acilidrazônicos contra *L. chagasi*. Inicialmente, calculou-se a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do crescimento de amastigotas intracelulares de *L. chagasi* dos derivados no modelo de infecção de macrófago em lamínula de vidro (Tabela 1 do artigo 5 originado da tese). Assim, observou-se que os derivados LASSBio 1492, LASSBio 1707, LASSBio 1710 e LASSBio 1736 apresentam atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. chagasi*, com valores CI₅₀ de 58,3 ± 2,0, 53,3 ± 2,6, 55,0 ± 4,0 e 57,6 ± 5,2 µM, respectivamente. Pentamidina e miltefosina também foram eficazes contra amastigotas intracelulares de *L. chagasi*, apresentando IC₅₀ de 65,1 ± 4,9 e 76,7 ± 2,9 µM, respectivamente.

Esses resultados mostraram que a atividade leishmanicida de LASSBio 1492, LASSBio 1707, LASSBio 1710 e LASSBio 1736 contra amastigotas intracelulares de *L. chagasi* foi semelhante ao observado com a pentamidina. Além disso, a atividade leishmanicida destes derivados é comparável à relatada para várias substâncias testadas contra espécies de *Leishmania* viscerotrópicas, assim como algumas chalconas (BARBOSA et al., 2011), sakuranetina (GRECCO et al., 2012) e nimodipina (TEMPONE et al., 2009). A grande relevância nesses resultados consiste no fato da *L. chagasi* ser o agente etiológico da leishmaniose visceral de ciclo antropozoonótico na Europa, Norte da África e América Latina (MAURICIO et al., 2000; (QUINNELL e COURTENAYL., 2009). A leishmaniose visceral ou calazar é a forma mais grave dentre todas as infecções de *Leishmania* spp. e pode ser fatal, se não tratada. (SAMPAIO et al., 2010). Assim, se torna imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos úteis no tratamento contra leishmanias viscerotrópicas. Por outro lado, a avaliação da atividade leishmanicida contra *L. chagasi* também indicou que amastigotas desta espécie eram menos suscetível ao tratamento *in vitro* com derivados hidrazida-*N*-acilhidrazônicos quando comparado com outras espécies testadas (*L. major*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*).

A eficiência de LASSBio 1707 e LASSBio 1736 em destruir *L. chagasi in vivo* também foi demonstrada no presente estudo. O tratamento com LASSBio 1707 e LASSBio 1736 (em 30 µmols/kg/dia x 15 dias, ip) de hamsters infectados com *L. chagasi* levou a uma redução significativa da carga de parasitas no baço desses animais de 53,6% e 46,0%, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle que receberam PBS (Figura 1 do artigo 5 originado da tese). Desta forma, além de representarem moléculas inovadoras para atividade farmacológica em questão e de terem atividade *in vitro* contra diversas espécies de *Leishmania*, LASSBio 1707 e LASSBio 1736 também continuaram

apresentando efeito leishmanicida *in vivo* contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*, fato que evidencia o sucesso no planejamento desses derivados. Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade destes derivados, como perspectiva do presente trabalho, pretende-se avaliar a atividade farmacológica *in vivo* de formulação farmacêuticas lipossomais de LASSBio 1736, as quais estão em fase de preparação.

Por outro lado, o tratamento com estes derivados não resultou em toxicidade hepática ou renal em hamsters infectados com *L. chagasi* como demonstrado por meio de dosagens bioquímicas dos níveis séricos de alanina transferase (ALT), aspartato transferase (AST), creatinina e uréia (Figura 3 do artigo 5 originado da tese). É também relatado na literatura que os mediadores leishmanicidas liberados em grandes quantidades durante a infecção por *L. chagasi* podem causar lesões morfológicas e/ou funcionais para o fígado. Além disso, *L. chagasi* ativa macrófagos, que libertam vários agentes microbicidas, incluindo peptidases, para eliminar o parasita no fígado (COSTA et al., 2008). Assim, também foi observado que o tratamento *in vivo* com LASSBio 1707 e LASSBio 1736 também apresentou efeito protetor de dano hepático da leishmaniose visceral porque este tratamento previnem as alterações dos níveis de ALT no soro desencadeados pela doença (Figura 3A do artigo 5 originado da tese).

Avaliou-se também as alterações ultraestruturais morfológicas geradas com o tratamento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* na concentração de 100 µM por 48h, através da análise dos parasitos em microscópio eletrônico de varredura Zeiss 900. Os tratamentos com LASSBio 1736 na concentração de 100 µM por 48h induziu alterações morfológicas nas promastigotas de *L. chagasi* que lembram amastigotas axênicas, tais como a forma oval da célula e o encurtamento ou retraimento do flagelo. Além disso, observou-se a presença de promastigotas diflageladas e multisseptadas, sendo estas alterações consistentes com a diminuição da viabilidade celular (Figura 4 do artigo 5 originado da tese). Esse tipo de alterações na morfologia de promastigotas tem sido relatadas quando as mesma estão em processo de morte por apoptose (VANNIER-SANTOS e DE-CASTRO, 2009). É importante mencionar que as análises das alterações ultraestruturais através de microscopia eletrônica de transmissão estão sendo realizadas para obtenção de informações adicionais sobre a ação leishmanicida deste derivado.

Para comprovar o efeito não citotóxico dos derivados LASSBIO 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 e LASSBio 1492, a capacidade de induzir dano celular também foi avaliada em células do baço tratadas ou não com várias concentrações dos derivados

selecionados, através do método de incorporação de iodeto de propídeo (Tabela 1 do artigo 6 originado da tese).

O método tradicional de incorporação de iodeto de propídeo é utilizado para avaliar a viabilidade celular e dano à membrana citoplasmática (CHO *et al.*, 2008). As células saudáveis são delimitadas por uma membrana citoplasmática que lhes permite comunicar seletivamente com o ambiente que as rodeia. Os sistemas de transporte ativo geram um gradiente eletroquímico, que é fundamental para o perfeito funcionamento da célula. O iodeto de propídeo é um marcador que é excluído de células sadias, sendo capaz de penetrar em membranas não íntegras e ligar em ácidos nucleicos, tornando-se assim fluorescente (MACKLIS e MADISON, 1990). As células marcadas com iodeto de propídeo apresentam membrana citoplasmática despolarizada e permeabilizada devido ao processo de morte celular. Desta forma, o iodeto de propídeo consegue atravessar células em processo de necrose ou em processo de morte celular programada tardia, visto que a membrana plasmática celular sofre colapso e se torna permeável a este corante fluorescente (MIRANDA, 2009).

Com base nos dados obtidos, apenas o grupo tratado com Tween 0,5% (padrão de morte celular) foi capaz de aumentar significativamente o número de células do baço positivas para iodeto de propídeo em relação ao grupo DMSO 0,1% e controle negativo (células cultivadas apenas com meio de cultura), respectivamente. O veículo utilizado para solubilizar todas as substâncias (DMSO 0,1%), não apresentou efeito citotóxico significativo para a célula, quando comparado ao controle negativo (células cultivadas apenas em meio de cultura). É importante ressaltar que a pentamidina não foi capaz de diminuir a viabilidade das células do baço de forma significativa, mesmo na máxima concentração utilizada (100 µM), assim como observado na Tabela 1 do do artigo 6 originado da tese.

Por fim, avaliou-se a sensibilidade de outra cepa de *L. major* denominada LV39 (MRHO/SU/59/P) ao tratamento *in vitro* com os derivados LASSBio 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 e LASSBio 1492 (Tabela 2 do do artigo 6 originado da tese), substâncias que anteriormente apresentaram maiores potências contra amastigotas da cepa de *L. major* 5-ASKH (Turquia, MHOM/SU/73/5-ASKH) de referência da OMS (Tabela 2 do do artigo 1 originado da tese e Tabela 1 do do artigo 2 originado da tese). Diante dos resultados obtidos, observou-se uma diferença significativa da sensibilidade à LASSBio 1483, LASSBio 1485 e LASSBio 1492 contra amastigotas intracelulares de *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P) quando comparado ao efeito leishmanicida contra a cepa *L. major* 5-ASKH (MHOM/SU/73-5-

ASKH) anteriormente usada. Estes derivados eram menos ativos para cepa LV39 do que para a cepa de referência da OMS. A cepa LV39 (MRHO/SU/59/P) é uma cepa prevalente no sul da Rússia, mais virulenta e menos suscetível ao NO do que MHOM/SU/73-5-ASKH (NOBEN-TRAUTH et al., 1999; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 1999). No entanto, surpreendentemente, LASSBio 1491 apresentou atividade semelhante contra amastigotas das duas cepas de *L. major*.

Como NO é a molécula chave para atividade antimicrobiana de macrófagos, incluído defesa contra *Leishmania*, além de ser produzido quando há inibição de cisteína protease, bem como para tentar desvendar o mecanismo de ação dos derivados aqui estudados, realizou-se a dosagem de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais infectados com *L. major* LV39 e tratados com os derivados LASSBio 1483, LASSBio 1485, LASSBio 1491 e LASSBio 1492 (Figura 2 do do artigo 6 originado da tese). De todos os quatro derivados ensaiados, apenas o LASSBio 1491 foi o único capaz de aumentar os níveis de óxido nítrico de forma concentração em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P). Assim, além da sua atividade leishmanicida direta *in vitro*, o mecanismo de ação de LASSBio 1491 contra formas amastigotas de *L. major* LV39 envolve aumento da produção de NO, o que é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra *Leishmania* spp.

O mecanismo molecular pelo qual NO exerce a sua atividade citotóxica não é completamente compreendido. Alguns estudos têm proposto que os efeitos do NO são devidos a inibição da respiração mitocondrial, glicólise, peroxidação de lípideos da membrana, inativação de peroxidases e arginases, perturbações de agregados de Fe-S e mutação do DNA e/ou a inibição da síntese e reparo do DNA (MAUEL e RANSIJN, 1997; GRADONI e ASCENZI, 2004).

Os demais derivados, assim como a pentamidina, não induziram aumento de NO. A observação de que a pentaminidina não aumenta a produção de óxido nítrico já era esperada. Tem sido reportado também que este fármaco de referência não interfere na formação de NO por macrófagos ativado da linhagem RAW 264.7, embora tenha a capacidade de inibir óxido nítrico sintase cerebral (BAER et al., 1995). Genestra e colaboradores (2003) também demonstraram que a pentamidina não foi capaz de diminuir significativamente a produção de NO por formas amastigotas axênicas e promastigotas metacíclicas. Tem sido sugerido que a

produção de NO por esses parasitos pode modular a atividade da enzima NOS2 dos macrófagos, além de estar associada com a infectividade e interiorização dos parasitos nos macrófagos (BRAGA, 2008).

Então, dada a necessidade de desenvolver fármacos úteis no tratamento da leishmaniose cutânea, foi avaliada a eficácia de LASSBio 1491 (10 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 35 dias, i.p.) em um modelo murino validado de leishmaniose cutânea do Velho Mundo (*L. major* LV39). Assim, a eficiência de LASSBio 1491 como um agente antiparasitário foi avaliada usando o glucantime como fármaco de referência. Este antimônio pentavalente, que é um medicamento utilizado no tratamento de leishmaniose, apresentou a mesma inibição do in vivo crescimento do parasita que o tratamento com LASSBio 1491, no entanto em uma dose de 3 vezes maior que a usada para a LASSBio 1491. Desta forma, camundongos tratados com o antimoniatto de meglumina (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) ou com LASSBio 1491 (10 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) apresentaram uma redução no tamanho da lesão na terceira semana após o início do tratamento (quarta semana de infecção, respectivamente). Após 35 dias de tratamento os animais foram sacrificados e a carga parasitária foi determinada nas orelhas infectadas e nos linfonodos drenantes dos animais tratados com PBS, antimoniatto de meglumina (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.), LASSBio 1491 (10 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.). Com relação à carga parasitária, observou-se que o antimoniatto de meglumina e as substâncias LASSBio 1491 foram capazes de diminuir o número de parasitos na orelha e no linfonodo drenante (Figura 2 do do artigo 6 originado da tese).

LASSBio 1491 é um derivado de hidrazida-*N*-acilidrazônico com 5-nitrofurano como grupo substituinte na função imina. Como já mencionado, o uso de nitroheterociclos, tais como os derivados 5-nitrofurano, como agentes antibacterianos, antifúngicos e antiprotozoários é bem estabelecido (PIRES et al., 2001; MUELAS-SERANO et al., 2002). Os grupos nitro aromáticos são bem conhecidos como tendo atividade redox biológica significativa, conduzindo à produção de EROs citotóxicas. No entanto, LASSBio 1483 é também um derivado de 5-nitrofurano, mas com a subunidade semicarbazona, o que sugere que o grupo hidrazida-*N*-acilidrazona é importante para a atividade de leishmanicida de LASSBio 1491 contra *L. major* LV39.

Desta forma, os derivados LASSBio 1483 (semicarbazônico), LASSBio 1707 e LASSBio 1736 (hidrazida-*N*-acilidrazônicos) foram os que apresentaram, em geral, melhor atividade leishmanicida, representando candidatos a protótipos de fármacos que podem ser

utilizados na descoberta de novas alternativas terapêuticas para leishmanioses. A elevada eficácia desses derivados contra várias espécies de *Leishmania* dá suporte para continuação da investigação detalhada de seu mecanismo de ação, bem como do seu potencial para o tratamento da leishmaniose visceral canina.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em resumo, a investigação de agentes anti-*Leishmania* resultou na identificação de novos derivados bioativos. Dentre estes, a semicarbazona LASSBio 1483 (7g) e os derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos LASSBio 1705 (3a), LASSBio 1707 (3e) e LASSBio 1736 (3d) provaram ser potentes agentes leishmanicidas contra diversas espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, além de possuírem baixa toxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, assumindo a posição de compostos líderes que podem ser utilizados na descoberta de novas terapias para leishmanioses. Além disso, LASSBio 1483 (7g), LASSBio 1705 (3a), LASSBio 1707 (3e) e LASSBio 1736 (3d) exercem seu efeito leishmanicida através de indução de apoptose dependente da ativação de enzimas semelhantes a caspases e através da via mitocondrial. A eficácia leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de LASSBio 1707 (3e) e LASSBio 1736 (3d) contra *L. chagasi*, em concentrações não tóxicas para o hospedeiro, dando suporte para exploração do potencial desses derivados como uma opção adicional para a quimioterapia de visceral leishmaniose, uma das doenças tropicais negligenciadas mais letais e que está intimamente associada à pobreza, sendo um forte estímulo para estender esses estudos para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Além disso, temos também como perspectiva estender esses estudos para avaliar o potencial leishmanicida de LASSBio 1483 para tratamento da leishmaniose visceral.

Por fim, de acordo com resultados obtidos, LASSBio 1491 (4e) exibem efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* contra *L. major* LV39, uma cepa mais virulenta que a cepa de referência da OMS, em concentrações não tóxicas, proporcionando uma nova plataforma promissora para ser explorado para o tratamento de leishmaniose.

Entre as perspectivas deste trabalho, pretende-se avaliar o potencial leishmanicida *in vivo* de LASSBio 1483 (7g) e de formulações lisossomais de LASSBio 1707 (3e) e LASSBio 1736 (3d) contra *L. chagasi*, bem como determinar as alterações ultraestruturais nas estruturas celulares de promastigotas dessa espécie de *Leishmania*, através de análise em microscópio eletrônico de transmissão, além de realizar a análise histológica dos órgãos coletados dos animais utilizados nos ensaios *in vivo* já realizados. Pretende-se ainda dar continuidade a este trabalho, investigando outros sinais característicos da apoptose, tais como a produção de EROs, a fragmentação do DNA, níveis de ATP e a indução da expressão da proteína, tais como as caspases e metacaspases. Objetiva-se também avaliar o efeito de LASSBio 1483

(7g), LASSBio 1705 (3a), LASSBio 1707 (3e) e LASSBio 1736 (3d) sobre a produção de EROs e indução das vias de MAPK e ERK, bem como da enzima arginase em macrófagos infectados com *L.amazonensis* e *L. chagasi*. Além disso, faz-se necessário o estudo do mecanismo de ação destes derivados, que poderão ser realizados através de ensaios bioquímicos e de biologia molecular, visando determinar o efeito destes derivados, principalmente, em cisteína proteases, serina proteases, tubulinas, tripanotona redutase e topoisomerasas do parasito. Por fim, pretende-se ainda investigar a indução de fragmentação de DNA através de análises em citometria de fluxo, bem como a possível interferência da transcrição de genes e tradução de transcritos de *Leishmania* spp, através de ensaios de microarray e western blot.

REFERÊNCIAS

- ADADE, C.M.; CHAGAS, G.S.F.; SOUTO-PADRÓN, T. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, p. 1444-1461, 2012.
- AKILOV, O.E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v.46, p.132–42, 2007.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, p. 265–268, 2009.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper 1/ T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Frontiers in immunology*. **Microb. Immun.**, v. 3, p. 1-13, 2012.
- ALEXANDER, J.; MCFARLANE, E. Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent? **Microbes Infect.**, v. 10, n. 9, p. 953–959, 2008.
- AL-KAHRAMAN, Y.M.S. A.; YASINZAI, M.; SINGH, G.S. Evaluation of Some Classical Hydrazones of Ketones and 1,2-Diketones as Antileishmanial, Antibacterial and Antifungal Agents. **Arch. Pharm. Res.**, v. 35, p. 1009-1013, 2012.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.57, p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J., et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p.334–59, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ALVAR, J, CROFT S, OLLIARO P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 61, p. 223–74, 2006.

ALVES, L.C. et al. Analysis of the S(2) subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, p. 137-143, 2001a.

ALVES, L.C. et al. Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 116, p.1-9, 2001b.

AMARAL, K. F. **Análise da citotoxicidade do EDTA e do ácido cítrico aplicados em cultura de macrófagos peritoneais residentes.** Dissertação (mestrado em Odontologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AMBIT, A. et al. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ.**, v. 15, p.113–122, 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, p. 699–705, 2010.

ANTOINE, J.C. et al. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 764–775, 1991.

ARAÚJO, V.E. et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 11, p. e2540, 2013.

ASHUTOSH et al. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 143–153, 2007.

BABINE, R.E.; BENDER, S.L. Molecular Recognition of Proteinminus signLigand Complexes: Applications to Drug Design. **Chem Rev.**, v. 97, p.1359-1472, 1997.

BAER, H.P. et al. Pentamidine does not interfere with nitrite formation in activated RAW 264.7 macrophages but inhibits constitutive brain nitric oxide synthase. **Life Sci.**, v. 57, n. 21, p. 1973-1980, 1995.

BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 2603–2612, 2009.

BANERJEE, B.; SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Identification of a Functional Type IA Topoisomerase, Ld TopIII β , from Kinetoplastid Parasite *Leishmania donovani*. **Enzyme Res.**, v. 2011, p. 230542, 2011.

BANULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1–109, 2007.

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

BARRETT, M.P.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. **Trends. Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 82-88, 1999.

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.

BEATTIE, L. et al. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000805, 2010.

BELO, V.S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013.

BENÍTEZ, J. et al. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, p. 303–312, 2011.

BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, p. 23–35, 2003.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quím. Nova**, v. 3, p. 461-469, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 4, p. 31-39, 2004.

BERMAN, J. Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Curr. Infect. Dis. Res.**, v. 7, p. 33–38, 2005.

BERN, C. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 917–24, 2006.

BHARDWAJ, S. et al. Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 109189. 2010.

BIRNBAUM, R.; CRAFT N. Innate immunity and Leishmania vaccination strategies. **Dermatol. Clin.**, v. 29, p. 89–102, 2011.

BITTENCOURT, A.L. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 32, p. 802–805, 1993.

BLOS, M. et al. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p.1224–1234, 2003.

BOELAERT, M. et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 72–77, 2004.

BOGDAN, C. Reactive oxygen and reactive nitrogen metabolites as effector molecules against infectious pathogens. In: KAUFMANN, S.H.E.; MEDZHITOV, R.; GORDON, S. **The Innate Immune Response to Infection**. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2004. Pág 357–396.

BRAGA, F. G. **Atividades de derivados purínicos sobre *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi***. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários. **NOTA TÉCNICA 38-2014: SUSPENSÃO LICENÇA de fabricação e comercialização do produto leishmune**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Produtos%20Veterin%C3%A1rios/NOTA%20TECNICA%20DFIP%2038-14%20LEISHMUNE.pdf >. Acesso em: 19 de janeiro de 2015.

BRITTO, C. et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, p. 107–117, 1998.

CALVOPINA, M. et al. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania* (Viannia) panamensis in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. **Int. J. Dermatol.**, v. 45, p. 116–120, 2006.

CARDOSO, M.V.O. **Síntese e Avaliação de Tiossemicarbazonas e Tiazolinonas como inibidores da protease cruzaina do *Trypanossoma cruzi* (TCC)**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

CARMODY, M. et al. Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 34420-34426, 2005.

CARVALHO, S.A. et al. Antiprotozoal Activity of (*E*)-Cinnamic *N*-Acylhydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 19, p. 20374-20381, 2014.

CHAKRABORTY, D. et al. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. **J. Immunol.**, v. 175, p.3214–3224, 2005.

CHAN, M. M.; ADAPALA, N.; CHEN, C. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Polarization of Macrophages in *Leishmania* Infection. **P. P. A. R. Research**, v. 2012, p. 11, 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 874-882, 2007.

CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathog.**, v.6, p. e1000755, 2010.

CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circ. Res.**, v. 106, n. 10, p. 1559–1569, 2010.

CHEN, C.Y. et al. The recruitment of Fas-associated death domain/caspase-8 in Ras-induced apoptosis. **Cell Growth Differ.**, v. 12, p. 297–306, 2001.

CHEN, G. et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 365–398, 2009.

CHIYANZU, I. et al. Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, p. 3527-3530, 2003.

CHO, M.H. et al. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. **Toxicol. in vitro**, v. 22, p. 1099–1106, 2008.

CHOREV, M.; GOODMAN, M. A dozen years of retro-inverso peptidomimetics. **Acc. Chem. Res.**, v. 26, p. 266–273, 1993.

COHEN, F.E. et al. **Thio semicarbazone and semicarbozone inhibitors of cysteine proteases and methods of their use.** US Patent US 7495023 B2. 2002.

COHEN, B.E. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. **J. Membr. Biol.**, v. 238, 1–20, 2010.

COSTA, C.H.N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 386- 392, 2010.

COSTA, J.D. et al. In vitro evidence for metallopeptidase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. **Acta Trop.**, v. 106, p. 175-183. 2008.

COSTA, T.F.R. **Caracterização molecular e bioquímica da cisteínoprotease majoritária do *Trypanosoma brucei brucei*, brucipaina**. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica), Universidade Federal do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

COURRET, N. et al. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 2303-2316, 2002.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Ind. J. Med. Res.**, v. 123, p. 399–410, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILLHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p.151-156, 2006;

DAS, M.; MUKHERJEE, S.B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 2461–2469, 2001.

DAS, P. et al. Protease inhibitors in potential drug development for Leishmaniasis. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 50, p. 363-76, 2013.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação. Indicadores de morbidade e fatores de risco. Disponível em:< <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2015.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, v. 22, p. 491–502, 2009.

DE-AZEVEDO-JR, W.F.; SOARES, M.B. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. **Curr. Drug. Targets**, v. 10, p. 193-201, 2009.

DEBUS, A. et al. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. **Infect. Immun.**, v.71, p. 7215–7218, 2003.

DEBRABANT, A.; NAKHASI, H. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? **Kinetoplastid Biol. and Dis.**, v. 2, p. 7, 2003.

DEBRABANT, A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 257–267, 2003.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DE-MACEDO-SILVA, S.T. et al. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *leishmania amazonensis*. **Mol. Biol. Int.**, v. 2011, p. 876021, 2011.

DEPAQUIT, J. et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Euro. Surveill.**, v.15, p. 19507, 2010.

DE-TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathog.**, v.5, p. e1000494, 2009.

DOBEK, A.S. et al. Inhibition of clinically significant bacterial organisms in vitro by 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 18, p. 27–36, 1980.

DOBSON, D. E. et al. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1001185, 2010.

DOWNING, T. et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance.

Genome Res., v. 21, p. 2143–2156, 2011.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain, **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUARTE, C.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 7, p.1108–1119, 2007.

DUJARDIN, J.C. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? **Infect Genet Evol.**, v. 9, p. 290-297, 2009.

DUSZENKO, M. et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, p. 127–158, 2011.

EICHLER, T. et al. Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway. **Toxicol. Sci.**, v. 90, p. 392–399, 2006.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 193-236, 2002.

EI-KEBIR, D.; FILEP, J. G. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. **Scientific World Journal**, v. 10, p. 1731–1748, 2010.

ESCOBAR, P. et al. Sensitivities *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine). ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.**, v.81, p. 151-157, 2002.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 820–832, 2004.

FIGUEIREDO-SOUZA, L. W.; SOUZA, S.V.T.; BOTELHO, A.C.C. Comparative analysis of the geographic distribution of the histopathological spectrum and Leishmania species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, p. 369-74, 2012.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol. Letters**, v.160, p. 171–177, 2006.

FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Curr. Med. Chem.**, v.13, p. 167-198, 2006.

FREITAS-JUNIOR, L.H.; CHATELAIN, E.; KIM, H.A.; SIQUEIRA-NETO, J.L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.**, v. 2, p. 11-19, 2012.

GALLARDO-SOLER, A. et al. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor- γ/δ -mediated effect that links lipid metabolism and immunity. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n. 6, p. 1394–1402, 2008.

GAMA, M.E. et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 129-136, 2004.

GAMA, M.E.A. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, p. 741-745, 2013.

GENESTRA, M. *et al.* Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide**, v. 8, p. 1–6, 2003.

GONÇALVES, G.S. *et al.* Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Trop.**, v. 93, p. 161–167, 2005.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; PRIANTI, M.G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 51, p. 241–246, 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 26, p. 293–307, 2012.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia*, v. 46, p. 101–103, 2004.

GRECCO, S.S. *et al.* In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Exp. Parasitol.**, v. 130, p. 141–145, 2012.

GREENBAUM, D.C. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 3212–3219, 2004.

GRISCAVAGE, J.M.; WILK, S.; IGNARRO, L.J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- κ B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 3308-3312, 1996.

GUIMARÃES, C.A.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 1638–1650, 2004.

GUIMARÃES, E. T. et al. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 5, p. 1219–1226, 2006.

HALL, B.S.; BOT, C.; WILKINSON, S.R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 13088–13095, 2011.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 332–334, 2002.

HAYDEN, M.S.; WEST, A.P.; GOSH, S. NF-Kb and the immune response. **Oncogene**, v. 25, p. 6758-6780, 2006.

HERNÁNDEZ, P. et al. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 59, p. 64-74,2013

HILLESLAND, H. et al. Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.79, p. 881–886, 2008.

HSIEH, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, v.260, p. 547-549, 1993.

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

IFA, D.R. et al. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. **J. Mol. Struct.**, v.505, p. 11-17, 2000.

IVENS, A.C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436–442, 2005.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Mol. Cell**, v. 11, p. 293–302, 2003.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 104, 2010.

KADIOGLU, A.; ANDREW, P.W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 143–149, 2004.

KANG, J.; PERVAIZ, S. Mitochondria: Redox Metabolism and Dysfunction. **Biochem. Res. Int.**, v. 2012, p. ID 896751, 2012.

KAYE, P. M.; BLACKWELL, J. M. Postgenomic research on leishmaniasis: a critical self-appraisal. **Trends Parasitol.**, v. 24, p. 401–405, 2008.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr. Med. Chem.**, v. 16, n. 5, p. 599–614, 2009.

KLIONSKY, D.J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v. 8, p. 445–544, 2012.

KOVACIC, P. et al. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. **J. Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2601-2623, 2005.

KOVACIC, P.; BECVAR, L.E. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Pharm. Des.**, v. 6, p.143-167, 2000.

KROPF P, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **FASEB J.**, v. 19, p.1000–1002, 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811–27, 2005.

LAM, P.Y.S. et al. Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. **Science**, v. 263, p. 380- 384, 1994.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 26, p. 223-227, 2009.

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

LEE, N. et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 53–64, 2002.

LEPROHON, P. et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 1387-1399, 2009.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2679–2688, 2005.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v.27, p. 6194–6206. 2008.

LI, R. et al. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 4, p.1421–1427, 1996.

LIMA, L.M. **Planejamento e Síntese de Novos Análogos de Arilsulfonamidas, Antagonistas de Bioreceptores de TXA2, a Partir do Safrol**. Dissertação (mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

LIMA-JUNIOR, D.L. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat. Med.**, v. 19, p. 909-915, 2013.

LINDOSO, J.A. et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Br. J. Dermatol.**, v. 160, p. 311–318, 2009.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 2405–2419, 2004.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clin. Immunol.**, v. 114, p.256–265, 2005.

LODGE, R.; DIALLO, T.O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1922–1931, 2006.

LOPEZ-KOSTKA, S. *et al.* IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J. Immunol.**, v.182, p. 3039–3046, 2009.

LY, J.D.; GRUBB, D.R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, p. 115-128, 2003.

MACHADO, MG.M.C.; LEON, L.L.; CASTRO, S.L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 73-77, 2007.

MACKLIS, J.D.; MADISON, R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v.31; p. 43-46, 1990.

MAFFEI, R.S. **Novos complexos de Cu (II) com ligantes fluorados para o tratamento de leishmaniose**. Dissertação (mestrado em Química - Química Inorgânica), Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MAGILL, A.J. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 19, p. 241–266, 2005.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J.H. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. **Exp. Parasitol.**, v. 106, p.158-163, 2004.

MARIATHASAN, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature.**, v. 430, p. 213-218, 2004.

MARINHO, F.A. *et al.* The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87659. doi:10.1371/journal.pone.0087659

MARR, A.K. et al. Leishmania donovani Infection Causes Distinct Epigenetic DNA Methylation Changes in Host Macrophages. **PLoS Pathog.**, v. 10, p. e1004419, 2014.

MARSDEN, P. D.; JONES, T. C. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of leishmaniasis. In: CHANG, K.P.; BRAY, R.S. **Human Parasitic Diseases, Leishmaniasis**. New York: Elsevier Science, 1985. Pág. 183–198.

MARTENS, S.; HOWARD, J. The interferon-inducible GTPases. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 22, p. 559–589, 2006.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol. Cell.**, v.10, p. 417-426, 2002.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 229–265, 2009.

MATLASHEWSKI, G. Leishmania infection and virulence. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, p. 37-42, 2001.

MATHUR, R.K. et al. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. **Nature Medicine**, v. 10, p. 540-544, 2004.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. Leishmania spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 98–111, 1997.

MAURER, M.; DONDJI, B.; VON-STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 198, p. 137–146, 2009.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 188–189, 2000.

MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, p. 639-644, 1999.

MCKERROW, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 833-837, 1999.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p.11798-11813, 2004.

MESLIN, B. et al. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 26, 2011.

MIRANDA, M. S. **Uso de fibroblastos em processo de morte celular programada como doadores de núcleos na técnica de transferência nuclear em bovinos.** Tese (doutorado em Zootecnia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: Past, present and future. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 1153-1169, 2007.

MONTE-NETO, R.L. et al. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 215–221, 2011.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 121, 2012.

MORRISON, R.P. New insights into a persistent problem – chlamydial infections. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1647–1649, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Rev. Immunol.**, v.8, p. 958–969, 2008.

MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 375-381, 2004.

MOTTRAM, J.C. et al. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1925-1832, 1992.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.**, v. 240, p. 286–296, 2011.

MUELAS-SERANO, S. et al. Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 97-101, 2002.

MUKBEL, R.M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.76, p. 669–675, 2007.

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

MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A.S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Mol. Biol.**, v. 6, p. 3, 2005.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

NÄGLER, D. K. et al. Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. **Biochem.**, v. 38, p. 12648–12654, 1999.

NG, L.G. et al. Migratory Dermal Dendritic Cells Act as Rapid Sensors of Protozoan Parasites. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 11, p. e1000222, 2008.

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. **J. Immunol.**, v. 162, p.6132–6140, 1999.

NOVOZHILOVA, N.M.; BOVIN, N.V. Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. cell surface. **Biochem.**, v. 75, p. 686–694, 2010.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, p. 135–146, 2010.

OGHUMU, S. et al. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v.126, p. 389–396, 2010.

OLIVEIRA, L.F. et al. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta Trop.**, v.118, p 87-96, 2011.

OMS. **Control of leishmaniases**. WHO Technical Report Series. Geneve: WHO; 2010. 949. Pág 1–186.

OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2015.

OTERO, L. et al. Insight into the Bioreductive Mode of Action of Antitrypanosomal 5-Nitrofuryl Containing Thiosemicarbazones. **Med. Chem.**, v. 4, p. 11-17, 2008.

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.

PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos dabioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PAPADOPOULOU, M.V. et al. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-based Amides and Sulfonamides as Potential anti-Trypanosomal Agents. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 5554–5565, 2012.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genet.**, v.39, p. 839–847, 2007.

PETERS, N.; SACKS, D. L. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol. Rev.**, v. 213, p. 159–179, 2006.

PETERS, N.C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, p. 970–974, 2008.

PIMENTA, P.F. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359–369, 1997.

PIMENTA, P.F. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, p. 1812–1815, 1992.

PIRES, J.R et al. Investigation of 5-nitrofurán derivatives: synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 3673-3681, 2001.

PITTA, M.G. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 2379–2387, 2009.

PLOCK, A.; SOKOLOWSKA-KÖHLER, W.; PRESBER, W. Application of Flow Cytometry and Microscopical Methods to Characterize the Effect of Herbal Drugs on *Leishmania* spp. **Exp. Parasitol.**, v. 97, p. 141–153, 2001.

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

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitol.**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.

RAFATI, S. et al. Identification of *Leishmania* major cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 113, p. 35-43, 2001.

RAMOS, C.C.F.; DUARTE, M.I.S.; RAMOS, A.M.O. Leishmaniose visceral fatal associada à síndrome de imunodeficiência adquirida: relato de caso com achados necroscópicos e estudo imunohistoquímico. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 245-250, 1994.

RAGHAV, N. et al. *In-vitro* studies of various carbonyl derivatives on liver alkaline phosphatase, **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 4, p. 801-807, 2010.

RANDO, D.G. et al. Chalcones and *N*-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmanial agents. **BJPS**, v.46, p. 311-321, 2010.

RAVICHANDRAN, K. S.; LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature Rev. Immunol.**, 7, 964–974, 2007.

RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentola* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p.1131–1147, 2012.

REAL, F. et al. The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models. **DNA Res.**, v. 20, p. 567–581, 2013.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 581-596, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 21–5, 2007.

RIBEIRO, J.M.; ROSSIGNOL, P.A.; SPIELMAN, A. Blood finding strategy of a capillary - feeding sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 83, p. 683–686, 1986.

RIBEIRO, J.M.C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, v. 4, p. 143–152, 1995.

RIOS, F. J. O. et al. Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and FcgammaRII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 22, n. 5-6, p. 549–556, 2008.

ROGERS, K.A. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 209, p. 1-7, 2002.

ROGERS, M.B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res.**, v. 21, p. 2129–2142, 2011.

ROGERS, M.E.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 495–507, 2002.

ROGERS, M.E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 223, 2012.

ROMEIRO, N.C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p.641–652, 2009.

ROVAI, L. et al. Recurrent polymorphisms in small chromosomes of *Leishmania tarentolae* after nutrient stress or subcloning. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 50, p. 115–125, 1992.

RUSSELL, D.G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2613–2620, 1986.

RUSSO, R. et al. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, p. S99-S105, 2003.

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.

SADLOVA, J. et al. The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cell. Microbiol.**, v.12, p. 1765–1779, 2010.

SALEHEEN, D. et al. Latent Activity Of Curcumin Against Leishmaniasis *In Vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 386—389, 2002.

SALOTRA, P.; SINGH, R. Challenges in the diagnosis of post kalaazar dermal leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 295–310, 2006.

SAMPAIO, M.J.Q. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e877, 2010.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 89, p. 9944-9948, 1992.

SCHRÖDER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of Leishmania mexicana Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, p. e77460, 2013.

SCHURIGT, U. et al. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in Leishmania major associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 5028–5041, 2010.

SCOTT, P. et al. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 318–338, 2004.

SECUNDINO, N.F. et al. Lutzomyia longipalpis peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **J. Med. Entomol.**, v. 42, p. 928–938, 2005.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **Open Med. Chem. J.**, v. 5, P. 31–39, 2011.

SEIFERT, K. et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. 229–235, 2007.

SELZER, P.M et al. Leishmania major: Molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 212–221, 1997.

SELZER, P.M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 28, p. 96, 11015-11022, 1999.

SEN, N. et al. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Cell Death Differ.**, v. 11, p. 924-936, 2004.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of 63. Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056–1069, 2011.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death Differ.**, 2014. doi: 10.1038/cdd.2014.216.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **J. Vector Borne Dis.**, v. 45, p. 255–272, 2008.

SHIO, M.T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 819512, 2012.

SHUKLA, A.K. et al. Rational Approaches for Drug Designing Against Leishmaniasis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, p. 2208–2218, 2010.

SHUKLA, S. et al., Synthesis, Molecular docking and Biological evaluation of 4-Cycloalkylideneamino 1, 2-Naphthoquinone Semicarbazones as Anticancer agents. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. S1040-S1046, 2012.

SILVA-LÓPEZ, R.E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quim. Nova**, v.33, p. 1541-1548, 2010.

SILVEIRA, F.T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, p. 529-535, 2010a.

SILVEIRA, F.T. et al. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 377-386, 2010b.

SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiol. Res.**, v. 167, p. 445-451, 2012.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 18-45, 2014.

SINHA, P.K.; PANDEY, K.; BHATTACHARYA, S.K. Diagnosis & management Of *Leishmania*/HIV co-infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, p. 407–414, 2005.

SMOLEWSKI, P et al. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. **J. Immunol. Meth.**, v. 265, p. 111-121, 2002.

SOUZA, M.A. et al. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. **Scand. J. Immunol.**, v. 76, p.175-180, 2012.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, p. 1–6, 2011.

SRIVASTAVA, P. et al. Identification of TLR inducing Th1 responsive *Leishmania donovani* amastigote specific antigens. **Mol. Cell Biochem.**, v. 359, p. 359–368, 2012.

STEMPIN, C.C. et al. Arginase in Parasitic Infections: Macrophage Activation, Immunosuppression, and Intracellular Signals. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. ID 683485, 2010.

STEVERDING, D. et al. Trypanosoma brucei: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and arelevant drug target. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, p. 481-488, 2012.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R.A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLOS Negl. Trop. Dis.** v. 7, n. 6, p. 1-15, 2013.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1301–1310, 2008.

TEIXEIRA, M.J. **Cepas de Leishmania braziliensis com perfis genômicos diversos induzem processos inflamatórios diferentes em camundongos Balb/C.** Tese (doutorado em Patologia Humana), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

TEIXEIRA, M.J. et al. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 32-40, 2006.

TEMPONE, A.G.; MARTINS-DE-OLIVEIRA, C.; BERLINCK, R.G. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 77, p. 572–585, 2011.

TEMPONE, A.G.; TANIWAKI, N.N.; REIMÃO, J.Q. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of Leishmania (L.) chagasi treated with the calcium channel blocker nimodipine. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 499-505, 2009.

TOLEDO, J.S. et al. In Vitro Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from Tithonia diversifolia against Leishmania braziliensis Promastigotes and Amastigotes. **Molecules**, v. 19, p. 6070-6079, 2014.

TROEBERG, L. et al. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. **Mol. Med.**, v. 6, p. 660-669, 2000.

TROSSINI GHG, et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **J. Enzym. Inhib. Med. Chem.**, v. 25, p. 62-67, 2010.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. **Int. J. Dermatol.**, v. 47, p. 109–124, 2008.

TURCO, S.J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

TURETZ, M,L, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern. **Brazil. J. Infect. Dis.**, v. 186, p.1829–1834, 2002.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.** v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

VAN-ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, p. 337-351, 2011.

VAN-GRIENSVEN, J. Balasegaram M, Meheus F, 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, D.L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Curr. Drug Targets**, v. 10, p. 246–260, 2009.

VAN-ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.103, n. 37, p. 13837–13842, 2006.

VILHARDT, F.; VAN-DEURS, B. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. **EMBO J.**, v. 23, p. 739–748, 2004.

WANDERLEY, J.L.M. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. **J. Immunol.**, v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 2006.

WANG, Q. et al. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2853–2863, 2006.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 433–450, 1996.

WEINGÄRTNER, A. et al. *Leishmania* Promastigotes Lack Phosphatidylserine but Bind Annexin V upon Permeabilization or Miltefosine Treatment. **PLoS ONE**, v. 7, p. e42070, 2012.

WILKINSON, S.R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, p. 2072–2084, 2011.

WILKINS-RODRIGUEZ, A.A. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Exp. Parasitol.**, v. 126, p. 426–434, 2010.

WILLIAMS, R.A.M. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 655–674, 2006.

WINCKER, P. et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 1688–1694, 1996.

WYLLIE, S.; PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A.H. Assessing the Essentiality of *Leishmania* donovani Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 57, p. 901–906, 2013.

WYLLIE, S. et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, p. 119re1, 2012.

XIN, L. et al. Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. **J. Immunol.**, v.184, p. 7047–7056, 2010.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Mol. Immunol.**, v.45, p. 3371–3382, 2008.

ZIJLSTRA, E.E., EL-HASSAN, A.M. Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. S59–S76, 2001.

ZIJLSTRA, E.E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, p. 87–98, 2003.

ANEXOS

Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética da UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ROTEIRO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

O projeto de pesquisa Desenvolvimento de protótipos de fármacos leishmanicidas a partir de produtos naturais, derivados semi-sintéticos e/ou sintéticos (2/2013) coordenado pelo Professora Magna Suzana Alexandre Moreira do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / UFAL

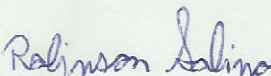
Esse projeto visa determinar o efeito antiparasitário em modelos in vivo (murino), contra *Leishmania amazonensis*. O presente estudo visa à avaliação farmacológica de novos agentes candidatos a protótipos de fármacos imunomoduladores e leishmanicidas, capazes de atuar como estratégias terapêuticas em doenças negligenciáveis, especialmente a leishmaniose.

Não existe método substitutivo para evitar o uso de animais. Esta linhagem de camundongo é utilizada no modelo clássico de indução de leishmaniose, por desenvolver um perfil de resposta imune Th2 com produção de IL-4, suscetível ao desenvolvendo lesões com riqueza parasitária. Será utilizada apenas para a(s) molécula(s) mais ativa para minimizar o número de animais.

Existe planejamento estatístico para determinar o tamanho das amostras. Cada grupo experimental será constituído por cinco animais (n=5 animais). Os 14 grupos presentes no estudo serão: Grupo Controle infectado (Balb/c infectado com tratamento apenas com veículo), Grupo Controle não-infectado (Balb/c não-infectado com tratamento apenas com veículo), Grupo Antimoniato de Meglumina (Balb/c infectado com tratamento utilizando fármaco de referência), Grupo Combretastatina A4 (Balb/c infectado com tratamento utilizando fármaco antitumoral), Grupo LASSBio 1483 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado LASSBio 1483), Grupo LASSBio 1586 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado LASSBio 1586), Grupo JB-42 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado JB-42), Grupo Quercetina-permetilada (Balb/c infectado com tratamento utilizando Quercetina-permetilada), Grupo VR-67 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado VR-67), Grupo L1-SbPh3 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado L1-SbPh3), Grupo HDL-Sb (Balb/c infectado com tratamento utilizando HDL-Sb), Grupo HDL (Balb/c infectado com tratamento utilizando HDL), Grupo espectralina (Balb/c infectado com tratamento utilizando espectralina), Grupo WE-01 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado WE01) e HB-04 (Balb/c infectado com tratamento utilizando derivado HB-04).

Devido à solicitação do CONCEA na Orientação técnica 2.2013 será necessário o envio de: XIII - plantas baixas das áreas e das instalações utilizadas para criação, manutenção, manuseio e manejo de animais para fins de ensino ou pesquisa científica, contendo o detalhamento/dimensionamento das áreas e o registro do Responsável Técnico pela planta (engenheiro ou arquiteto), devidamente assinado.

Situação: Aprovado


Robinson Sabino da Silva
Coordenador CEUA-UFAL

Robinson Sabino da Silva
Coordenador da CEUA-UFAL
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B: Patente derivada da tese

		<p>Reservado para o Organismo receptor</p> <p>PCT</p> <p>REQUERIMENTO</p> <p>31/07/2013 11:09 APR J</p> <p>0000221305465509</p>		<p>DA T/BR 2013 / 000276</p> <p>31 JUL 2013 3 1 0 7 1 3</p> <p>0000221305465509</p>	
<p>O abaixo assinado solicita que o pedido internacional seja processado de acordo com o Tratado de Cooperação em matéria de Patentes</p>					
<p>Nome do Organismo receptor e "Pedido internacional PCT"</p> <p>WIPO/BRAZIL-PCT INTERNATIONAL APPLICATION</p>				<p>Referência do processo do requerente ou do mandatário (facultativa) (72 caracteres no máximo)</p>	
<p>Quadro No. I TÍTULO DA INVENÇÃO</p> <p>COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, USO DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DE HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS OBTIDAS</p>					
<p>Quadro No. II REQUERENTE <input type="checkbox"/> Esta pessoa é também inventor.</p> <p>Nome e endereço: <i>(Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se não for indicado nenhum domicílio abaixo)</i></p> <p>Universidade Federal do Rio de Janeiro Av. Pedro Calmon, 550 - Prédio Reitoria - 2º andar Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP 21941-901</p>					
<p>Autorização relativa ao correio eletrônico: o facto de marcar uma das caixas abaixo autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional, a utilizar o endereço de correio eletrónico indicado neste quadro para enviar, se tal desejarem esses organismos, notificações relativas a este pedido internacional.</p> <p><input type="checkbox"/> como notificações preliminares seguidas por notificações em papel; ou <input type="checkbox"/> exclusivamente em forma eletrónica (não será enviada nenhuma notificação em papel)</p>					
<p>Nacionalidade (siglas do país):</p> <p>BR</p>			<p>Domicílio (siglas do país):</p> <p>BR</p>		
<p>Esta pessoa é requerente para: <input checked="" type="checkbox"/> todos os Estados designados <input type="checkbox"/> todos os Estados designados, excepto os Estados Unidos da América <input checked="" type="checkbox"/> apenas os Estados Unidos da América <input type="checkbox"/> os Estados indicados no quadro suplementar</p>					
<p>Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(ES)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados nestas folhas de continuação.</p>					
<p>Quadro No. IV MANDATÁRIO OU REPRESENTANTE COMUM; OU ENDEREÇO PARA A CORRESPONDÊNCIA</p> <p>A pessoa identificada a seguir é/foi nomeada para actuar em nome do(s) requerente(s) perante as autoridades internacionais competentes, como: <input type="checkbox"/> mandatário <input type="checkbox"/> representante comum.</p> <p>Nome e endereço: <i>(Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir código postal e o nome do país)</i></p> <p>Agência UFRJ de Inovação Av. Pedro Calmon, 550/B10B Prédio da Reitoria CEP 21941-901 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil Att. Ricardo Pereira e/ou Rogério Filgueiras</p>					
<p>Autorização relativa ao correio eletrónico: o facto de marcar uma das caixas abaixo autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional, a utilizar o endereço de correio eletrónico indicado neste quadro para enviar, se tal desejarem esses organismos, notificações relativas a este pedido internacional.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> como notificações preliminares seguidas por notificações em papel; ou <input type="checkbox"/> exclusivamente em forma eletrónica (não será enviada nenhuma notificação em papel)</p> <p>Correio eletrónico: agencia@inovacao@inovacao.ufrj.br</p>					
<p><input checked="" type="checkbox"/> Endereço para a correspondência: marcar esta caixa se não foi/ver sido nomeado nenhum mandatário ou representante comum e o espaço acima for utilizado para indicar um endereço especial para o qual deve ser enviada a correspondência.</p>					
<p>Formulário PCT/RO/101 (primeira folha) (Janeiro de 2010)</p>			<p>Ver as notas sobre o formulário de requerimento</p>		

Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(ES)

Se não for utilizado nenhum dos seguintes sub-quadros, esta folha não deve ser incluída no requerimento.

Nome e endereço: *(Apellido seguido do nome próprio, no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).*Universidade Federal de Alagoas
Avenida Lourival Melo Mota, Cidade Universitária,
Tabuleiro do Martins, Maceió - AL, Brasil
CEP: 57072-970

Esta pessoa é:

- apenas requerente
- requerente e inventor
- apenas inventor *(se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país):*

BR

Domicílio *(siglas do país):*

BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementarNome e endereço: *(Apellido seguido do nome próprio, no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).*Lídia Moreira Lima
Ambatinga, 160/301
CEP 21921-520, Ilha do Governador, Rio de Janeiro, RJ,
Brasil

Esta pessoa é:

- apenas requerente
- requerente e inventor
- apenas inventor *(se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país):*

BR

Domicílio *(siglas do país):*

BR

(ds) Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementarNome e endereço: *(Apellido seguido do nome próprio, no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).*Eli ezer Jesus de Lacerda Barreiro
Rua Haddock Lobo, 35/603
CEP 20260-130, Estácio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Esta pessoa é:

- apenas requerente
- requerente e inventor
- apenas inventor *(se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país):*

BR

Domicílio *(siglas do país):*

BR

(ds) Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementarNome e endereço: *(Apellido seguido do nome próprio, no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).*Marina Amaral Alves
Rua Breno Guimarães 106/102, Ilha do Governador, Rio de Janeiro - RJ, Brasil
CEP: 21931310

Esta pessoa é:

- apenas requerente
- requerente e inventor
- apenas inventor *(se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país):*

BR

Domicílio *(siglas do país):*

BR

(ds) Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados numa folha de continuação.

Quadro suplementar	Se o quadro suplementar não for utilizado, esta folha não deve ser incluída no requerimento.
<p>1. Se, em qualquer dos quadros – exceto os Quadros No. VIII i) a v) para os quais é fornecido um quadro de continuação especial – o espaço for insuficiente para contar todas as informações: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. ...” (indicar o número do quadro) e fornecer as informações de acordo com as instruções dadas no quadro em que o espaço era insuficiente, especialmente:</p> <p>i) se for necessário indicar mais de uma pessoa como requerente e/ou inventor e não se dispuser de uma “folha de continuação”: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. III” e fornecer, para cada pessoa suplementar, o mesmo tipo de informações que as que são requeridas no Quadro No. III. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado do domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo:</p> <p>ii) se, no Quadro No. II ou em qualquer dos sub-quadros do Quadro No. III, a indicação “os Estados indicados no quadro suplementar” for marcada: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. II”, ou “Continuação do Quadro No. III”, ou “Continuação dos Quadros No. II e III” (conforme o caso), indicar o(s) nome(s) do(s) requerente(s) em causa e, junto a (cada) nome, o Estado para o qual, ou os Estados para os quais, a pessoa mencionada tem a qualidade de requerente (e/ou, se for caso disso, a menção “patente da ARIPO”, “patente eurasiática”, “patente europeia” ou “patente da OAPI”);</p> <p>iii) se, no Quadro No. II ou em qualquer dos sub-quadros do Quadro No. III, o inventor ou o inventor/requerente não for considerado inventor por todos os Estados designados ou pelos Estados Unidos da América: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. II”, ou “Continuação do Quadro No. III”, ou “Continuação dos Quadros No. II e III” (conforme o caso), indicar o(s) nome(s) do(s) inventor(es) em causa e, junto a (cada) nome, o Estado para o qual, ou os Estados para os quais, a pessoa mencionada tem a qualidade de inventor (e/ou, se for caso disso, a menção “patente da ARIPO”, “patente eurasiática”, “patente europeia” ou “patente da OAPI”);</p> <p>iv) se, além do(s) mandatário(s) indicadas no Quadro No. IV, houver outros mandatários: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. IV” e fornecer para cada mandatário suplementar os mesmo tipo de informações que as que são requeridas no Quadro No. IV;</p> <p>v) se, no Quadro No. VI, a prioridade de mais de três pedidos anteriores forem reivindicadas: neste caso, escrever “Continuação do Quadro No. VI” e fornecer para cada pedido anterior suplementar os mesmo tipo de informações que as que são requeridas no Quadro No. VI.</p>	<p>“Continuação dos Quadros nº III”</p> <p>Aline Cavalcanti de Queiroz Rua Dr. Pedro Cavalcante, 53, Jardim Petrópolis, Maceió, CEP: 57080-650, AL, Brasil</p> <p>Nacionalidade: BR Domicílio: BR</p> <p>Esta pessoa é apenas inventor</p> <p>Magna Suzana Alexandre Moreira Rua Hélio Pradines, 639, apto 902 Ponta Verde Maceió, CEP: 57035-220, AL, Brasil</p> <p>Esta pessoa é apenas inventor</p> <p>Nacionalidade: BR Domicílio: BR</p>
<p>2. Se o requerente tiver a intenção de indicar que deseja que o pedido internacional seja tratado, em certos Estados designados, como um pedido de patente de adição de certificado de adição de verificado, de autor de invenção, de adição ou de certificado de utilidade de adição: neste caso, escrever o nome ou o código de duas letras de cada Estado designado em causa, assim como “patente de adição”, “certificado de adição”, “certificado de autor de invenção de adição” ou “certificado de utilidade de adição”, o número do pedido original, ou da patente original ou de outro título original, e a data de concessão da patente original ou de outro título original, ou a data de depósito do pedido original (Regras 4.11.a)ii) e 49bis.1.a) ou b)).</p>	
<p>3. Se o requerente tiver a intenção de indicar que deseja que o pedido internacional seja tratado, nos Estados Unidos da América, como um pedido de “continuation” ou de “continuation-in-part” de um pedido anterior: neste caso, escrever “Estados Unidos da América” ou “US” e “continuation” ou “continuation-in-part” e o número e a data de depósito do pedido original (Regras 4.11.a)iii) e 49bis.1.a)).</p>	
<p>4. Se o requerente desejar pedir que o Organismo receptor ou a Secretaria Internacional obtenha um documento de prioridade junto de uma biblioteca digital mas esse documento só for conservado numa biblioteca digital em relação a um outro pedido de patente que também se serviu desse documento de prioridade para apoiar uma reivindicação de prioridade (e a não ser que essa biblioteca digital seja acessível através do serviço de acesso numérico aos documentos de prioridade), nesse caso escrever “Continuação do Quadro No. VI”, e indicar para cada pedido anterior considerado o mesmo tipo de informações exigidas no Quadro VI e indicar o número do qual o pedido é conservado (e, se conhecida, a biblioteca digital em questão) (Instrução 716 a)ii)).</p>	

Quadro No. V DESIGNAÇÕES

O depósito deste requerimento constitui, de acordo com a Regra 4.9.a), a designação de todos os Estados Contratantes vinculados PCT na data do depósito internacional, para os fins da concessão de qualquer tipo de protecção disponível e, se for caso disso, para a concessão tanto de patentes regionais como de patentes nacionais.

Porém,

- DE a Alemanha não é designada para nenhum tipo de protecção nacional
 JP o Japão não é designado para nenhum tipo de protecção nacional
 KR a República da Coreia não é designada para nenhum tipo de protecção nacional

(As casas acima só podem ser utilizadas para excluir (irrevogavelmente) as designações em questão se, no momento do depósito internacionalmente de acordo com a Regra 26bis.1, o pedido internacional reivindicar, no Quadro No. VI, a prioridade de um pedido nacional anterior depositado no Estado em questão, para evitar que esse pedido nacional anterior deixe de produzir efeitos, em virtude da legislação nacional).

Quadro No. VI REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

A prioridade do(s) seguinte(s) pedido(s) anterior(es) é reivindicada:

Data do depósito do pedido anterior (dia/mês/ano)	Número do pedido anterior	No caso de o pedido anterior ser:		
		um pedido nacional: país ou membro da OMC	um pedido regional: Organismo regional	um pedido internacional: Organismo receptor
Ponto 1) 31/07/2012	BR102012019095 8	BR		
Ponto 2)				
Ponto 3)				

Outras reivindicações de prioridade são indicadas no quadro suplementar.

Pede-se que **Secretaria Internacional** obtenha junto a uma biblioteca digital uma cópia certificada do(s) pedido(s) anterior(es) a **Secretaria Internacional** puder obter o ou os pedidos anteriores junto a uma biblioteca digital) identificado(s) acima como:

- todos os pontos ponto 1) ponto 2) ponto 3) outros, ver o quadro suplementar

Pede-se que o **Organismo receptor** prepare e transmita à **Secretaria Internacional** uma cópia certificada do(s) pedido(s) anterior(es) (se o ou os pedidos anteriores tiverem sido depositados junto ao **Organismo** que, para os fins deste pedido internacional, **Organismo receptor**) identificado(s) acima como:*

- todos os pontos ponto 1) ponto 2) ponto 3) outros, ver o quadro suplementar

* Se a cópia certificada do ou dos pedidos anteriores não for conservada numa biblioteca digital sob o número do pedido anterior aqui indicado mas sob o número de um outro pedido que também reivindica a prioridade através dele, indicar esse número no quadro suplementar (ponto 4).

Restaurar o direito de prioridade: pede-se que o **Organismo receptor** restaure o direito de prioridade a respeito do(s) pedido(s) anterior(es) identificado(s) acima ou no quadro suplementar como ponto(s): (_____). (Ver também as notas sobre **Quadro No. VI**; é necessário fornecer mais informações para apoiar um pedido de restauração do direito de prioridade).

Incorporação por referência: se um elemento do pedido internacional mencionado no Artigo 11.1)iii)d) ou e), ou uma parte da descrição das reivindicações ou dos desenhos mencionada na Regra 20.5.a), não estiver de outro modo contido neste pedido internacional mas figurar integralmente num pedido anterior cuja prioridade é reivindicada na data em que um ou mais elementos mencionados no Artigo 11.1)ii) foram recebidos inicialmente pelo **Organismo receptor**, esse elemento ou essa parte é, sob reserva da confirmação prevista na Regra 20 incorporado por referência neste pedido internacional, para os efeitos da Regra 20.6.

Quadro No. VII AUTORIDADE RESPONSÁVEL PELA PESQUISA INTERNACIONAL

Escolha da Autoridade responsável pela pesquisa internacional (ISA) (se duas ou mais Autoridades responsáveis pela pesquisa internacional forem competentes para efectuar a pesquisa internacional, indicar a Autoridade escolhida; o código de duas letras pode ser utilizado):

Continuação do Quadro No. VII UTILIZAÇÃO DE RESULTADOS DE UMA PESQUISA ANTERIOR, REFERÊNCIA A ESSA PESQUISA

Pede-se que a Autoridade responsável pela pesquisa internacional (ISA) indicada no Quadro No. VII tenha em conta os resultados da(s) pesquisa(s) anterior(es) indicada(s) abaixo (ver também as notas sobre o Quadro No. VII: utilização dos resultados de mais de uma pesquisa anterior).

Data de depósito (dia/mês/ano) Número do pedido País (ou Organismo regional)

Declaração (Regra 4.12.i)): o pedido internacional é o mesmo, ou fundamentalmente o mesmo, que o pedido a respeito do qual foi efectuada a pesquisa anterior excepto, se for caso disso, que está depositado numa língua diferente.

Disponibilidade de documentos: os seguintes documentos são obtíveis pela ISA numa forma e maneira aceitável para ela e, por isso, não é necessário que o requerente os forneça a essa autoridade (Regra 12bis.1.f):

- uma cópia dos resultados da pesquisa anterior,*
- uma cópia do pedido anterior,
- uma tradução do pedido anterior numa língua admitida pela ISA,
- uma tradução dos resultados da pesquisa anterior numa língua admitida pela ISA,
- uma cópia de qualquer documento mencionado nos resultados da pesquisa anterior. (Queira indicar a seguir, se os conhecer, os documentos obtíveis pela ISA):

Transmissão de uma cópia dos resultados de uma pesquisa anterior e de outros documentos: (no caso de a pesquisa anterior não ter sido efectuada pela ISA indicada acima, mas pelo mesmo organismo que aquele que actua como Organismo receptor): pede-se que o Organismo receptor prepare e transmita à ISA (Regra 12bis.1.c):

- uma cópia dos resultados da pesquisa anterior,*
- uma cópia do pedido anterior,
- uma cópia de qualquer documento mencionado nos resultados da pesquisa anterior.

* No caso de os resultados da pesquisa anterior não serem, nem obtíveis a partir de uma biblioteca digital, nem transmitidos pelo Organismo receptor, pede-se que o requerente os forneça (Regra 12bis.1.a). (Ver o ponto 11 na lista de controle e também as notas sobre o Quadro No. VII).

Data de depósito (dia/mês/ano) Número do pedido País (ou Organismo regional)

Declaração (Regra 4.12.ii)): o pedido internacional é o mesmo, ou fundamentalmente o mesmo, que o pedido a respeito do qual foi efectuada a pesquisa anterior excepto, se for caso disso, que está depositado numa língua diferente.

Disponibilidade de documentos: os seguintes documentos são obtíveis pela ISA numa forma e maneira aceitável para ela e, por isso, não é necessário que o requerente os forneça a essa autoridade (Regra 12bis.1.f):

- uma cópia dos resultados da pesquisa anterior,*
- uma cópia do pedido anterior,
- uma tradução do pedido anterior numa língua admitida pela ISA,
- uma tradução dos resultados da pesquisa anterior numa língua admitida pela ISA,
- uma cópia de qualquer documento mencionado nos resultados da pesquisa anterior. (Queira indicar a seguir, se os conhecer, os documentos obtíveis pela ISA):

Transmissão de uma cópia dos resultados de uma pesquisa anterior e de outros documentos: (no caso de a pesquisa anterior não ter sido efectuada pela ISA indicada acima, mas pelo mesmo organismo que aquele que actua como Organismo receptor): pede-se que o Organismo receptor prepare e transmita à ISA (Regra 12bis.1.c):

- uma cópia dos resultados da pesquisa anterior,*
- uma cópia do pedido anterior,
- uma cópia de qualquer documento mencionado nos resultados da pesquisa anterior.

* No caso de os resultados da pesquisa anterior não serem, nem obtíveis a partir de uma biblioteca digital, nem transmitidos pelo Organismo receptor, pede-se que o requerente os forneça (Regra 12bis.1.a). (Ver o ponto 11 na lista de controle e também as notas sobre o Quadro No. VII).

Outras pesquisas anteriores não indicadas numa folha de continuação.

Quadro No. VIII DECLARAÇÕES

As seguintes declarações encontram-se no Quadro No. VIII.i) a v) (marcar a seguir as casas aplicáveis e indicar na coluna da direita o número de cada tipo de declaração):

- | | | Número de declarações |
|-------------------------------------|---|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | Quadro No. VIII.i) Declaração relativa à identidade do inventor | |
| <input type="checkbox"/> | Quadro No. VIII.ii) Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de pedir e obter uma patente | |
| <input type="checkbox"/> | Quadro No. VIII.iii) Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de reivindicar a prioridade de um pedido anterior | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Quadro No. VIII.iv) Declaração de autoria da invenção (apenas para os fins da designação dos Estados Unidos da América) | 1 |
| <input type="checkbox"/> | Quadro No. VIII.v) Declaração relativa a divulgações não prejudiciais ou excepções à falta de novidade | |

Quadro No. VIII.iv) DECLARAÇÃO: AUTORIA DA INVENÇÃO (apenas para os fins da designação dos Estados Unidos da América)

A declaração deve conformar-se com o texto normalizado previsto na Instrução 214: ver as notas sobre os Quadros No. VIII, VIII.i) a v) (generalidades) e as notas específicas sobre o Quadro No. VIII.iv). Se este quadro não for utilizado, esta folha não deve ser incluída no requerimento.

Declaração de autoria da invenção (Regras 4.17.iv) e 51.bic.1.2(iv)) para os fins da designação dos Estados Unidos da América

Declaro, por este meio, que penso ser o primeiro, original e único inventor (se um só inventor for mencionado abaixo) ou um dos primeiros co-inventores (se mais de um inventor for mencionado abaixo) do objecto reivindicado para o qual é pedida uma patente.

Esta declaração refere-se ao pedido internacional de que faz parte (se a declaração for apresentada com o pedido).

Esta declaração refere-se ao pedido internacional No. PCT/.....(se a declaração for apresentada de acordo com a Regra 26ter).

Declaro, por este meio, que o meu domicílio, o meu endereço postal, e a minha nacionalidade, são os que estão indicados junto ao meu nome.

Declaro, por este meio, que examinei e compreendi o conteúdo do pedido internacional acima identificado, inclusive as reivindicações do referido pedido. Indiquei no requerimento do referido pedido, de acordo com a Regra 4.10 do PCT, qualquer reivindicação de prioridade de um pedido estrangeiro e identifiquei abaixo, sob o título "Pedidos anteriores", através do número do pedido, do país ou membro da Organização Mundial do Comércio, do dia, do mês e do ano do depósito, qualquer pedido de patente ou de certificado de inventor depositado num país que não seja os Estados Unidos da América, inclusive qualquer pedido internacional segundo o PCT que designa pelo menos um país que não seja os Estados Unidos da América, cuja data de depósito é anterior à data do pedido do qual é reivindicada a prioridade.

Pedidos anteriores:

Reconheço, por este meio, a obrigação de divulgar informações de que tenha conhecimento e que sejam importantes para a patenteabilidade tal como definida no Título 37 § 1.56 do Código Federal das Regulações, inclusive, no que diz respeito a pedidos de continuation-in-part, informações importantes que se tenham tornado acessíveis entre a data do depósito do pedido anterior e a data do depósito internacional PCT do pedido de continuation-in-part.

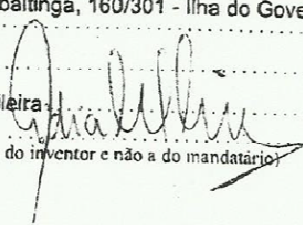
Declaro, por este meio, que todas as declarações feitas por este meio são verdadeiras, que eu saiba, e que creio que são verdadeiras todas as declarações feitas a partir de informações ou de suposições; e também que estas declarações foram feitas com o conhecimento de que declarações falsas intencionais ou desse tipo são puníveis por prisão ou multa, ou ambas as coisas, de acordo com a Secção 101 do Título 18 do Código dos Estados Unidos, e que tais declarações intencionalmente falsas podem comprometer a validade do pedido ou de qualquer patente emitida na base dessas declarações.

Nome: Lidia Moreira Lima

Domicílio: Ambaitinga, 160/301 - Ilha do Governador, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
(cidade e Estado dos Estados Unidos da América, se for caso disso, ou país)

Endereço postal: Ambaitinga, 160/301 - Ilha do Governador, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP 21921-520

Nacionalidade: Brasileira

Assinatura do inventor: 

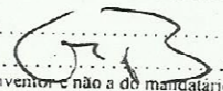
Data: 12/09/2013

Nome: Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro

Domicílio: Rua Haddock Lobo, 35/603 - Estácio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
(cidade e Estado dos Estados Unidos da América, se for caso disso, ou país)

Endereço postal: Rua Haddock Lobo, 35/603 - Estácio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP 20260-130

Nacionalidade: Brasileira

Assinatura do inventor: 

Data: 12/09/2013

Esta declaração continua na folha seguinte, "Continuação do Quadro No. VIII.iv)".

Continuação do Quadro No. VIII.i) e v) **DECLARAÇÃO**

Se, em qualquer dos Quadros No. VIII.i) e v), o espaço for insuficiente para conter todas as informações, inclusive no caso em que se devem nomear mais de dois inventores no Quadro No. VIII.iv), neste caso, escrever "Continuação do Quadro No. VIII..." (completar o número do quadro com o número do ponto em questão) e fornecer as informações do mesmo modo exigido para o quadro em que o espaço era insuficiente. Se mais espaço for necessário em duas ou mais declarações, um quadro de continuação deve ser utilizado para cada uma dessas declarações. Se este quadro não for utilizado, esta folha não deve ser incluída no requerimento.

"Continuação do Quadro nº VIII, iv - Declaração Autoria de Invenção"

Nome: Aline Cavalcanti de Queiroz

Domicílio: Rua Dr. Pedro Cavalcante, 53, Jardim Petrópolis, Maceió,
CEP: 57080-650, AL, Brasil
Endereço Postal: Rua Dr. Pedro Cavalcante, 53, Jardim Petrópolis, Maceió,
CEP: 57080-650, AL, Brasil

Nacionalidade: Brasileira

Assinatura do Inventor: Aline Cavalcanti de Queiroz Data: 11/09/2013

Nome: Magna Suzana Alexandre Moreira
Domicílio: Rua Hélio Pradines, 639, apto 902, Ponta Verde, Maceió, AL, Brasil
CEP: 57035-220
Endereço Postal: Rua Hélio Pradines, 639, apto 902, Ponta Verde, Maceió, AL, Brasil
CEP: 57035-220

Nacionalidade: Brasileira

Assinatura do Inventor: Magna Suzana Alexandre Moreira Data: 28/08/2013

Nome: Marina Amaral Alves
Domicílio: Rua Breno Guimarães 106/102, Ilha do Governador, Rio de Janeiro - RJ, Brasil
CEP: 21931310
Endereço Postal: Rua Breno Guimarães 106/102, Ilha do Governador, Rio de Janeiro - RJ, Brasil - CEP: 21931310

Nacionalidade: Brasileira

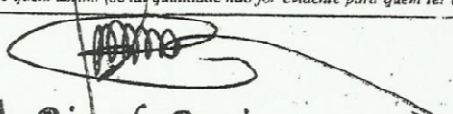
Assinatura do Inventor: Marina Amaral Alves Data: 12/09/2013

Quadro No. IX LISTA DE CONTROLE para depósitos feitos em PAPEL – esta folha só deve ser utilizada quando o depósito de um pedido internacional for feito em PAPEL

Este pedido internacional contém o seguinte:	Número de folhas	Este pedido internacional é acompanhado pelo(s) seguinte(s) documento(s) (marcar as casas apropriadas e indicar na coluna da direita o número de cada documento)	Número de documentos
a) formulário de requerimento PCT/RO/101 (incluindo quaisquer declarações e folhas suplementares)	8	1. <input checked="" type="checkbox"/> folha de cálculo das taxas	1
b) descrição (excluindo qualquer parte da listagem de sequências da descrição, ver f) abaixo)	66	2. <input type="checkbox"/> procuração separada original	
c) reivindicações	15	3. <input type="checkbox"/> procuração geral original	
d) resumo	1	4. <input type="checkbox"/> cópia da procuração geral; número de referência	
e) desenhos (se for caso disso)	5	5. <input type="checkbox"/> declaração explicativa da falta de assinatura	
f) parte da listagem de sequências da descrição (se for caso disso)		6. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridade indicado(s) no Quadro No. VI no(s) ponto(s):	
Número total de folhas : 95		7. <input type="checkbox"/> tradução do pedido internacional em (língua):	
		8. <input type="checkbox"/> indicações separadas relativas a microrganismos depositados ou a outro material biológico	
		9. <input type="checkbox"/> cópia da listagem de sequências em forma eletrônica (ficheiro texto segundo o Anexo C/ST.25) em suporte(s) físico(s) de dados, não fazendo parte do pedido internacional, fornecida apenas para os fins da pesquisa internacional de acordo com a Regra 13ter (tipo e número de suportes físicos de dados)	
		10. <input type="checkbox"/> uma declaração confirmando que "as informações em forma eletrônica submetidas de acordo com a Regra 13ter são idênticas à listagem de sequências contida no pedido internacional" depositado em papel	
		11. <input type="checkbox"/> cópia dos resultados de pesquisa(s) anterior(es) (Regra 12bis.1.a)	
		12. <input checked="" type="checkbox"/> outros documentos (especificar): <u>Protocolo NFRJ e GRO</u>	4

Figura dos desenhos que deve acompanhar o resumo: _____ Língua do depósito do pedido internacional: **PORTUGUÊS**

Quadro No. IX ASSINATURA DO REQUERENTE, DO MANDATÁRIO OU DO REPRESENTANTE COMUM
 Junto a cada assinatura, indicar o nome e a qualidade de quem assina (se tal qualidade não for evidente para quem ler o requerimento).


Ricardo Pereira
 Coordenador

1. Data efectiva de recepção do alegado pedido internacional: 31 JUL 2013 3 1 0 7 1 3	2. Desenhos: <input type="checkbox"/> recebidos: <input type="checkbox"/> não recebidos:
3. Data efectiva de recepção, corrigida devido à recepção ulterior, mas dentro do prazo, de documentos ou desenhos que completam o alegado pedido internacional:	
4. Data da recepção, dentro do prazo, das correcções exigidas de acordo com o Artigo 11.2) do PCT:	
5. Autoridade responsável pela pesquisa internacional (se duas ou mais forem competentes): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmissão da cópia de pesquisa diferida até ao pagamento da taxa de pesquisa.

Reservado para a Secretaria Internacional

Data da recepção da via original pela Secretaria Internacional: _____

Anexo C: Artigos Publicados durante o doutorado

- 1. QUEIROZ, A. C. ; ALVES, H. S. ; CAVALCANTE, L. H. A. ; DIAS, T. L. M. F. ; SANTOS, M. S. ; MELO, G. M. A. ; CAMPESATTO, E. A. ; CHAVES, M. C. O. ; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. .** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Natural Products Research*, v. 2013, p. 1-4, 2014.
- 2. DE QUEIROZ, ALINE CAVALCANTI ; DIAS, THAYS DE LIMA MATOS FREIRE ; DA MATTA, CAROLINA BARBOSA BRITO ; CAVALCANTE SILVA, LUIZ HENRIQUE AGRA ; DE ARAÚJO-JÚNIOR, JOÃO XAVIER ; ARAÚJO, GIVANILDO BERNARDINO DE ; MOURA, FLÁVIA DE BARROS PRADO ; ALEXANDRE-MOREIRA, MAGNA SUZANA .** Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- 3. DE ARAÚJO, MORGANA ; DE SOUZA, PATRICIA ; DE QUEIROZ, ALINE ; DA MATTA, CAROLINA ; LEITE, ANDERSON ; DASILVA, AMANDA ; DE FRANÇA, JOSÉ ; SILVA, TANIA ; CAMARA, CELSO ; ALEXANDRE-MOREIRA, MAGNA .** Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. *Molecules (Basel. Online)*, v. 19, p. 15180-15195, 2014.
- 4. DE ALBUQUERQUE MELO, GABRIELA MUNIZ ; SILVA, MARCELA CAMPELO RODRIGUES ; GUIMARÃES, THAÍS PEREIRA ; PINHEIRO, KÁTIA MANTOVANI ; DA MATTA, CAROLINA BARBOSA BRITO ; DE QUEIROZ, ALINE CAVALCANTI ; PIVATTO, MARCOS ; DA SILVA BOLZANI, VANDERLAN ; ALEXANDRE-MOREIRA, MAGNA SUZANA ; VIEGAS, CLAUDIO .** Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Phytomedicine (Stuttgart)*, v. 21, p. 277-281, 2014.
- 5. BENÍTEZ, JULIO ; CAVALCANTI DE QUEIROZ, ALINE ; CORREIA, ISABEL ; ALVES, MARINA AMARAL ; ALEXANDRE-MOREIRA, MAGNA S. ; BARREIRO, ELIEZER J. ; LIMA, LIDIA MOREIRA ; VARELA, JAVIER ; GONZÁLEZ, MERCEDES ; CERECETTO, HUGO ; MORENO, VIRTUDES ; PESSOA, JOÃO COSTA ; GAMBINO, DINORAH .** New oxidovanadium(IV) *N*-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 20-27, 2013.
- 6. FALCAO, ROSANGELA A. ; DO NASCIMENTO, PATRICIA L. A. ; DE SOUZA, SILVANA A. ; DA SILVA, TELMA M. G. ; DE QUEIROZ, ALINE C. ; DA MATTA, CAROLINA B. B. ; MOREIRA, MAGNA S. A. ; CAMARA, CELSO A. ; SILVA, TANIA M. S. .** Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 2013, p. 1-7, 2013.

7. MATTA, C. B. B. ; SOUZA, E. T. ; **QUEIROZ, A. C.** ; LIRA, D. P. ; ARAÚJO, M. V. ; CAVALCANTE, L. H. A. ; MIRANDA, G. E. C. ; ARAUJO JUNIOR, J. X. ; BARBOSA, J. M. ; SANTOS, B. V. O. ; MOREIRA, M.S.A. . Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. *Marine Drugs*, v. 9, p. 307-318, 2011.