



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FTALIMIDO-TIAZÓIS
SOBRE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

AMANDA SILVA DOS SANTOS ALIANÇA

Recife

2016

AMANDA SILVA DOS SANTOS ALIANÇA



**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FTALIMIDO-TIAZÓIS
SOBRE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)**

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Recife

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A398a Aliança, Amanda Silva dos Santos.
Atividade biológica de compostos ftalimido-tiazóis sobre *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) / Amanda Silva dos Santos Aliança. – 2016.
139 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Leishmaniose visceral. 3. *Leishmania infantum*. 4.
Ftalimida tiazols. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-135)

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2016.

Aos 25 (vinte e cinco) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 9 horas, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FTALIMIDO-TIAZÓIS SOBRE *Leishmania infantum*” da aluna **Amanda Silva dos Santos Aliança**, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos e coorientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Alves. A doutoranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTORA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.003894/2016-87 em 29/01/2016, composta pelos Professores: Ana Catarina de Souza Lopes (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Ana Cristina Lima Leite, do Departamento de Farmácia da UFPE; Ana Paula Sampaio Feitosa, do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ; Anekécia Lauro da Silva, do Departamento de Antibióticos da UFPE; e Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, do Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE). Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção Aprovada da referida Tese. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 25/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Profa. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa

Profa. Dra. Anekécia Lauro da Silva

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Celina Maria Turchi Martelli

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

Dedico,

à minha mãe, Maria Dalva, por toda sua dedicação e amor!

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, por me dá a dádiva da VIDA!
- À mãe, Maria Dalva, que é a razão da minha vida. A força dessa guerreira, que sempre fez o melhor para as suas crias, é a minha inspiração diária. É por ela que consegui chegar até aqui;
- Aos meus dois orientadores, Dr. Fábio André Brayner e Dr. Luiz Carlos Alves por terem me recebido e me dado essa oportunidade de crescer na família LBCM. Sou extremamente grata aos dois!
- Aos meus irmãos, Abidjan, Adailta e Daniel por sempre me apoiarem;
- À minha cunhada, Vilma, e as alegrias de titia, Larissa e Aninha;
- À Mirna, que foi uma grata surpresa que recebi da vida! Obrigada por me aguentar nessa reta final, sei que não foi fácil (hehehe)!
- Aos meus amigos de infância, Andréa, Diego, Danielle, Línthia, Rosemere, Simone e Leandro. E aos de nem tanto tempo assim, mas que são tão importantes quanto, Solange, Paula, Jr, Rinaldo... Irmãos que a vida me presenteou; A Lincoln e Marielly (*in memoriam*), que hoje olham por nós ao lado de Deus;
- Aos amigos biomédicos Isabelle, Jana, Julliana, Luís, Livia, Maria Carolina, Rafael, Renato, Steffany e Veridiana; foi com vocês que a jornada começou de verdade!
- À querida família LBCM (Alberon, Amandinha, Ana Paula, Camila, Carmelzinha, Catarina, Duda, Dyana, Elverson, Fernanda, Grasielle, Gabriel, Nairomberg, Olavio, Rafael, Iany, Jefferson, Heitor e Thiago) que me acolheu maravilhosamente. Sou muito grata a todos que nestes quatro anos estiveram ao meu lado, seja numa discussão científica, seja numa conversa/ desabafo na copa, seja nas nossas festinhas sempre animadas;
- À Ana Paula, que tanto me ajudou, me aconselhou nessa jornada;
- Às minhas companheiras de luta, estudos e sofrimento (faz parte!), Carmelzinha e Duda! Valeu meninas, formamos uma ótima equipe!
- Não podia deixar de agradecer ao maior agregado da família LBCM, o querido Rubens! Obrigada captura das imagens das abençoadas amastigotas! Valeu boy!

- Às companheiras da “sala de et al.”, Jana e Karla! Foram dias (tardes e noites também) de muito trabalho, estresse, choro e risadas, mas tenho certeza que trabalhar juntas foi ótimo para todas nós;
- A meninas do BioCel, Taci, Karla, Larissa e Jana pelos momentos divã, pelo escambo de materiais, pelas festinhas e comilanças, nem tudo é na vida de pós-graduando é trabalho. Como a gente costuma dizer uma vez BioCel, sempre Biocel!
- A Dra. Ana Cristina Lima Leite e toda sua equipe, em especial a Arsênio Rodrigues, pela síntese das moléculas usadas na tese;
- A Dra. Maria Carolina, pelo auxílio na aquisição dos dados da citometria de fluxo;
- À Viviane Carvalho e Cássia Docena pela assistência técnica e o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) / FIOCRUZ pelo uso de suas instalações.
- A todos os funcionários do Departamento de Medicina Tropical – UFPE;
- Aos professores da pós-graduação e aos colegas de turma;
- A CAPES pelo apoio financeiro;
- A todos do CPqAM/FIOCRUZ e LIKA/UFPE, que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

*“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem
de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos. ”*

Paulo Coelho

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa de caráter zoonótico, causada por vários tipos de protozoários do gênero *Leishmania*. Em humanos, a doença apresenta três principais formas clínicas, dependendo das espécies envolvidas de *Leishmania*: a cutânea, mucocutânea e visceral (LV), sendo esta última a forma mais grave que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. O agente etiológico da LV compreende *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum* na China, Ásia central, Europa, África, América do Sul e Central. Calcula-se que a prevalência mundial de leishmaniose esteja em torno de 12 milhões de pessoas, acometendo 80 países e com uma estimativa de 400.000 novos casos da doença por ano. O tratamento atual para a leishmaniose é baseado na utilização de antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®), este apresenta várias dificuldades como toxicidade, via de administração intravenosa e tempo prolongado de tratamento, que levam a sua descontinuação. Diante deste cenário, os compostos sintéticos são de grande importância na terapêutica por representarem 85% dos fármacos disponíveis. As ftalimidas e os tiazóis são importantes classes de compostos sintéticos e apresentam amplo espectro de atividades biológicas, como ansiolítica, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antibacteriana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* frente a *L. infantum* e a células de mamíferos de uma série de 15 derivados ftalimido-tiazóis. Os compostos foram avaliados frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, quanto à citotoxicidade frente a células vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais, a produção de óxido nítrico e alterações sobre alvos intracelulares do parasito. Os resultados mostram que os compostos oriundos da hibridação da ftalimida com 1,3 tiazol apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigota de *L. infantum*, baixa citotoxicidade às células de mamíferos testadas e aumentaram a produção de ON em relação às células controles nos macrófagos não infectados. Os compostos 2j e 2m se mostraram como os mais potentes contra as formas promastigotas da série testada, estes foram testados frente as formas amastigotas, os compostos reduziram a sobrevivência de amastigotas intracelulares e apresentaram baixa citotoxicidade para os macrófagos peritoneais. Formas promastigotas tratadas com esses compostos apresentaram alterações ultraestruturais como: encolhimento do corpo celular, perda da integridade da membrana celular, vacuolização do citoplasma, perfis de membranas circundando organelas e inchaço da mitocôndria. Quando avaliada a marcação pelo iodeto de propídio e pela rodamina 123, formas promastigotas tratadas com os compostos 2j e 2m apresentaram aumento no número de células marcadas com o iodeto de propídio e induziram alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial. Dessa maneira, os compostos ftalimido-tiazóis apresentam atividades leishmanicida e devem formar a base para futuros estudos experimentais.

Palavras-chave: Leishmaniose. Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. Ftalimida. Tiazol.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease, non-contagious with zoonotic characteristic, caused by several types of protozoa of the genus *Leishmania*. In humans, the disease has three main clinical forms, depending on the species of *Leishmania* involved: cutaneous, mucocutaneous and visceral, the latter being the more severe if left untreated can lead to death in more than 90% of cases. The etiologic agent of LV comprises *Leishmania donovani* in India and East Africa; *Leishmania infantum* in China, Central Asia, Europe, Africa, South and Central America. It is estimated that the worldwide prevalence of leishmaniasis is around 12 million people in 80 countries and 400,000 new cases per year. The current treatment for leishmaniasis is based on the use of pentavalent antimonials such as stibogluconate sodium (Pentostan®) and meglumine antimonate (Glucantime®), this presents several problems such as difficulties such as toxicity, intravenous route of administration and prolonged treatment, which leads to its discontinuation of the treatment. The phthalimides and thiazoles are important classes of synthetic compounds and have a broad spectrum of biological activities such as anxiolytic, anti-Parkinsons, anti-Alzheimer, analgesic, antiinflammatory, immunomodulating and antibacterial. This study aimed to evaluate the *in vitro* activity against *L. infantum* and mammalian cells in a series of 15-phthalimido thiazoles derivatives. The present work report the *in vitro* activity of a phthalimido-thiazoles derivatives series. The activities were evaluated against promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum*, front of cytotoxicity to vero cells, J774 macrophages and peritoneal macrophages, the effect on production of nitric oxide (NO) and changes of intracellular targets on the parasite. The results show that the compounds arising from the hybridization of phthalimido 1, 3 thiazole showed leishmanicidal activity against promastigotes forms of *L. infantum*, low cytotoxicity to mammalian cells and increased the NO production compared to control cells in uninfected macrophages. The compounds 2j and 2m are shown as the most potent against promastigotes of the test series, these were tested against amastigote forms, the compounds reduced the survival of intracellular amastigotes and showed low cytotoxicity peritoneal macrophages. The promastigotes treated with these compounds exhibited ultrastructural changes such as cell body shrinkage, loss of cell membrane integrity, vacuolization of the cytoplasm membranes surrounding organelles profiles and swelling of mitochondria. The compounds 2j and 2m were the most potent of the series tested and the parasites treated with these compounds showed ultrastructural changes such as cell body shrinkage, loss of cellular membrane integrity, vacuolization of cytoplasm, membrane profiles surrounding organelles and swelling of mitochondria. When assessed by propidium iodide tag and the rhodamine 123 promastigotes treated with the compounds 2j and 2m showed an increase in the number of cells stained with propidium iodide and induced significant changes in mitochondrial membrane potential. Thus, the phthalimido-thiazoles compounds have leishmanicide activities and should form the basis for future experimental studies.

Keywords: Leishmaniasis. Visceral Leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Phthalimido. Thiazol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral.	20
Figura 2 -	Distribuição espacial dos casos de LV no Brasil	21
Figura 3 -	Figura esquemática apresentando as características estruturais da forma promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp.	23
Figura 4 -	Inseto vetor da Leishmaniose Visceral.	26
Figura 5 -	Cão infectado com leishmaniose canina.	27
Figura 6 -	O ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	28
Figura 7 -	Pacientes com Leishmaniose visceral.	29
Quadro 1 -	Esquema terapêutico para as formas clínicas de Leishmaniose.	33
Figura 8 -	Figura esquemática da estrutura química da Ftalimida.	35
Figura 9 -	Figura esquemática da estrutura química do Tiazol.	36
Esquema 1-	Série de derivados ftalimido-tiazóis	48
Figura 1 -	Eletromicrografia de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratada e tratadas com compostos 2j e 2m.	51
Figura 2 -	Eletromicrografia de <i>L. infantum</i> não tratada e tratada com composto 2j.	52
Figura 3 -	Eletromicrografia de <i>L. infantum</i> não tratada e tratada com composto 2m.	53
Figura 1 -	Índice de sobrevivência de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos após 24 horas de tratamento com os compostos 2j (A) e 2m (B).	68
Figura 2 -	Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de <i>L. infantum</i> e tratados com os compostos 2j e 2m por 24 horas.	69
Figura 3 -	Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os compostos 2j (A) e 2m (B) sobre a integridade da membrana plasmática.	71
Figura 4 -	Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os compostos 2j (A) e 2m (B) sobre a integridade da membrana plasmática.	72
Figura 5 -	Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os compostos 2j (A) e 2m (B) sobre o potencial da membrana	

mitochondrial. 73

Figura 6 - Microscopia confocal de células controles e tratadas com 2j e 2m,
submetidas a marcação com rodamina 123. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ação dos compostos sobre promastigotas de <i>L. infantum</i> , células vero e macrófagos J774.	49
Tabela 1 -	Atividade leishmanicida, efeitos citotóxicos contra macrófagos peritoneais e índice de seletividade dos compostos 2j e 2m.	68
Tabela 2 -	Efeitos dos compostos 2j e 2m sobre a integridade da membrana plasmática	70
Tabela 3 -	Efeito dos compostos 2m e 2j sobre o potencial de membrana mitocondrial.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CC ₅₀	Concentração que causa a perda de viabilidade em 50% das células
CEUA	Comitê de Ética em experimentação Animal
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CO ₂	Dióxido de carbono
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DIC	Contraste Interferencial – <i>Differential Interference Contrast</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> - Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
IDMR	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência Indireta
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
IP	Iodeto de Propídio

IS	Índice de Seletividade
IV	Índice de Variação
kDNA	<i>Kinetoplast Deoxyribonucleic acid</i> /ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
LV	Leishmaniose Visceral
MC	Mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MT	Mediana da fluorescência dos parasitos tratados
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
Rho 123	Rodamina 123
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
Th	T <i>helper</i> /auxiliar
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Leishmaniose visceral	20
2.2	Agente etiológico	21
2.3	Biologia celular da <i>Leishmania</i> sp.	22
2.3.1	Superfície celular	23
2.3.2	Mitocôndria	24
2.3.3	Bolsa flagelar e flagelo	24
2.3.4	Acidocalcissomos	25
2.3.5	Glicossomos	25
2.3.6	Megassomos	25
2.4	Vetor e reservatórios	26
2.5	Ciclo biológico	27
2.5.1	Aspectos clínicos e imunológicos	29
2.6	Diagnóstico	31
2.7	Tratamento	32
2.8	Novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose	34
2.8.1	Ftalimidas	34
2.8.2	Tiazóis	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Compostos utilizados no tratamento in vitro de <i>L. infantum</i>	38
4.2	Cultura de células de mamíferos e obtenção de macrófagos peritoneais	38
4.3	Análise da citotoxicidade dos compostos em células de mamífero	38
4.4	Análise da produção de óxido nítrico por células de mamíferos	39
4.5	Cultivo dos parasitos	40
4.6	Atividade biológica in vitro sobre as formas promastigotas de <i>L.</i>	

	<i>infantum</i>	40
4.7	Atividade biológica <i>in vitro</i> sobre as formas amastigotas intracelulares	41
4.8	Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. infantum</i>	41
4.9	Potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e integridade da membrana	42
4.10	Análises estatísticas	43
4.11	Considerações éticas	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Artigo 1	44
5.2	Artigo 2	63
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE A – Artigo 1 submetido à Revista <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	89
	APÊNDICE B – Artigo 2 submetido à Revista <i>Acta Tropica</i>	113
	ANEXO A – Comprovante de submissão à Revista <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	138
	ANEXO B – Comprovante de submissão à Revista <i>Acta Tropica</i>	139

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (MARÍN et al., 2015). Possuem ampla distribuição mundial e são endêmicas em mais de 90 países atingindo quase todos os continentes (BARBOSA et al., 2015). Em humanos, a doença apresenta três principais formas clínicas, dependendo das espécies envolvidas de *Leishmania*: a cutânea, mucocutânea e visceral, sendo esta última a forma mais grave que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (MARÍN et al., 2015).

Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (BARBOSA et al., 2015). A incidência anual estimada da doença é de cerca de 200.000 a 400.000 novos casos. Infelizmente, esses dados são subestimados, uma vez que a doença não é de notificação compulsória em todos os países em que ocorre, além de muitos países não realizarem vigilância ou outras investigações e não possuírem um sistema de armazenamento de dados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

As drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses foram introduzidas como quimioterápicos na década de 40, sendo utilizadas até os dias atuais apesar de sua elevada toxicidade. Esse tratamento é realizado através de antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) (AMATO et al., 2008). Estas drogas de primeira escolha produzem muitos efeitos colaterais ao paciente, o longo tempo de terapia favorece o abandono do tratamento. Além disso, já é descrito na literatura a presença de cepas resistentes (AMATO et al., 2008).

A descoberta de novos agentes com propriedades leishmanicida que sejam menos tóxicos e que produzam menos efeitos colaterais é necessária. Nesse cenário, compostos heterocíclicos têm uma importância incontestável, particularmente no que se refere ao fato de inúmeros usos como medicamentos. Muitos destes compostos heterocíclicos são fármacos mundialmente utilizados e apresentam atividades farmacológicas diversificadas (MELO et al., 2006).

Neste contexto estão inseridos os compostos derivados das estruturas do Tiazol e da Ftalimida, que apresentam um grande espectro de ação. Os tiazóis são uma classe de

compostos heterocíclicos contendo em sua estrutura química um anel de cinco membros com os símbolos de Enxofre e Nitrogênio como heteroátomos. Formam uma importante classe de compostos cíclicos na química orgânica com amplo espectro de atividades biológicas, tais como atividades anticâncer, antibacteriana, antidepressiva, anti-inflamatória, herbicida dentre outras (FUNAKOSHI et al., 2002; VICINI et al., 2003).

O anel ftalimídico é relatado em uma série de compostos com diferentes atividades farmacológicas, entre elas anticonvulsivante, ansiolítica, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora (LIMA et al., 2002).

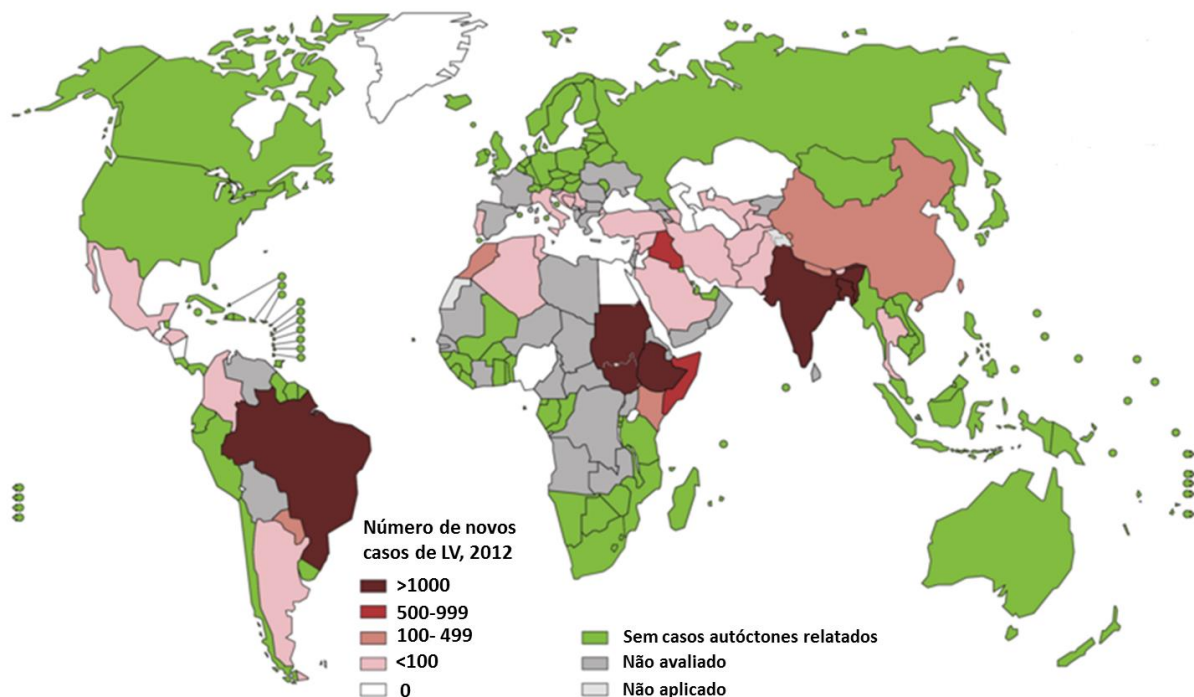
Estudos com os compostos heterocíclicos têm demonstrado a sua extensa atividade biológica, incluindo antiprotzoária (CHAN-BACA; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ; NAVARRETE-VÁZQUEZ, 2009), mas ainda são incipientes os estudos com as classes Tiazol e Ftalimida. Tendo em vista o potencial de compostos ainda poucos explorados e a necessidade de prospecção de novos compostos menos tóxicos e com baixo custo associado para o tratamento da leishmaniose visceral, no presente trabalho investigamos o potencial leishmanicida *in vitro*, a citotoxicidade sobre células de mamíferos, a produção de óxido nítrico e os possíveis alvos de novos compostos heterocíclicos das classes Tiazol e Ftalimida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Leishmaniose Visceral (LV) é uma das sete maiores endemias mundiais e afeta de 200.000 a 400.000 de pessoas a cada ano. Estima-se que cerca de 360 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). A LV é uma doença endêmica em cinco continentes, com casos humanos relatados em cerca de 50 países localizados em regiões tropicais e subtropicais (MARCONDES; ROSSI, 2013) (Fig. 1).

Figura 1 - Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral



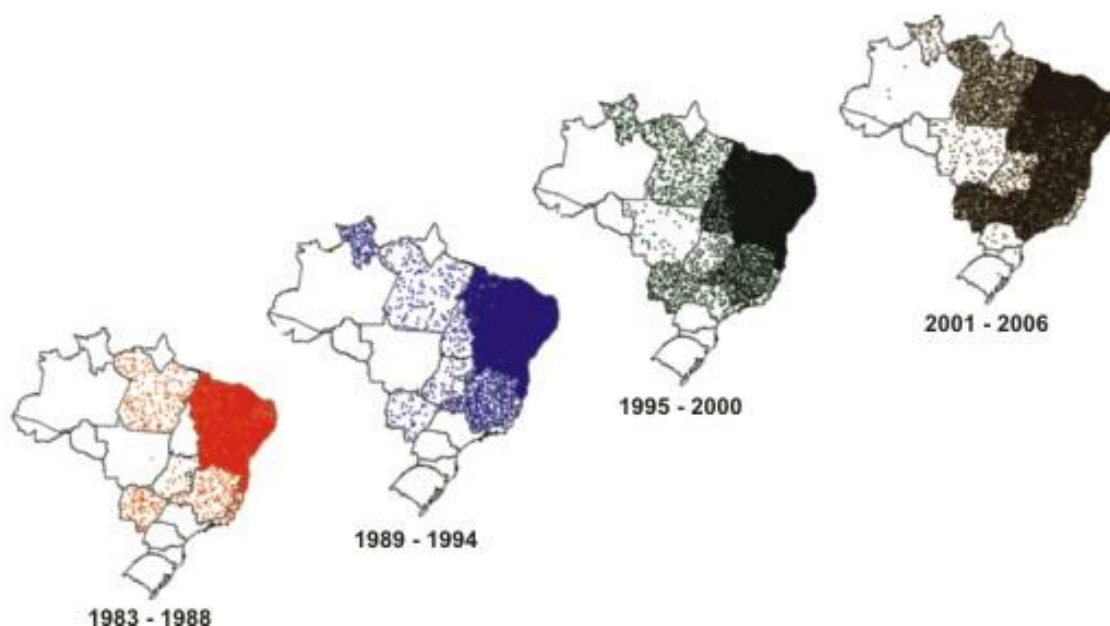
Fonte: Organização Mundial da Saúde (2015).

Mesmo com grande parte dos casos de leishmaniose visceral subnotificados, o Brasil é atualmente, responsável por cerca de 90% dos casos da América Latina. Somente no ano de 2012 foram notificados 3.038 casos da doença em humanos, com uma incidência da ordem de 1,57 casos/100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 7,1%. Crianças com até nove anos

de idade são as mais acometidas, compreendendo 41,9% dos casos humanos de LV no país (BRASIL, 2014).

A LV humana encontra-se em expansão no Brasil (Fig. 2), estando quase ausente na região sul (0,1% dos casos registrados), nos anos de 2006-2010 foram registrados cerca de 19 mil casos (BRASIL, 2014). Vários fatores epidemiológicos são citados para justificar o aumento da incidência da LV no Brasil, podendo-se destacar, aumento da urbanização em regiões do Nordeste e Sudeste, convívio próximo com o cão, constante processo migratório, o desmatamento acentuado e a ocupação das matas residuais e encostas nos centros urbanos e o aumento do número de vetor. Além do êxodo rural e o aumento da população urbana, outros fatores servem de estímulo para domiciliação do vetor como as questões socioeconômicas e as condições higiênico-sanitárias da população (BRASIL, 2014).

Figura 2 – Distribuição espacial dos casos de LV no Brasil



Fonte: Sinan/SVS/MS

2.2 Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*. Atualmente são conhecidas

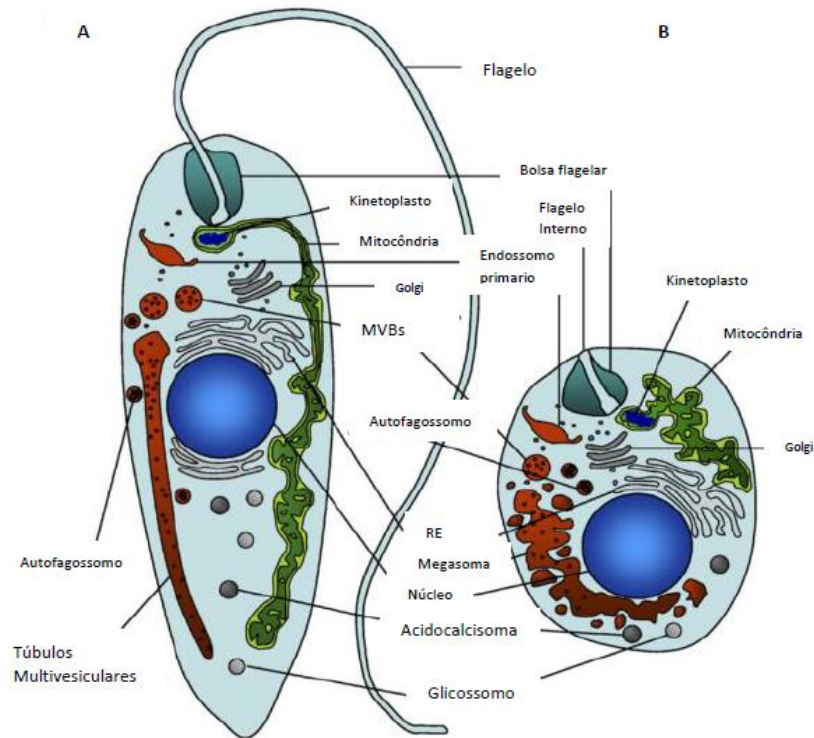
aproximadamente 30 espécies capazes de infectar o homem. As principais espécies do gênero *Leishmania* pertencem a dois subgêneros: *Viannia*, que inclui espécies do complexo *braziliensis*; e *Leishmania*, que inclui espécies do complexo mexicana (LAINSON; SHAW, 1998). O agente etiológico da LV compreende *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum* na China, Ásia central, Europa, África, América do Sul e Central (JAIN; JAIN, 2013).

Leishmania é um parasito digenético, o que significa que seu ciclo de vida se completa em dois diferentes hospedeiros. No caso, um vertebrado e um inseto (SANTOS; YOSHIOKA; MIYAGUI, 2008). Apresenta um estágio flagelado, a promastigota, que prolifera no tubo digestivo do flebotômíneo, essa forma do parasito é fusiforme, mede cerca de 15 µm e possui núcleo, citoplasma, cinetoplasto e um flagelo livre; enquanto que o outro estágio é a forma amastigota, não móvel que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, a forma amastigota é arredondada ou oval, medindo 4 a 6 µm de comprimento por 2 µm de diâmetro, contendo núcleo, cinetoplasto e vacúolo (JAIN; JAIN, 2013; SANTOS, YOSHIOKA, MIYAGUI, 2008) (Fig. 3).

2.3 Biologia celular da *Leishmania* spp

Sob o ponto de vista da biologia celular, os tripanosomatídeos possuem organelas em comum com outras células eucarióticas, como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, mas possuem também estruturas que lhe são próprias, como os glicossomos, microtúbulos subpeliculares e acidocalcisoma. Nessas organelas existem vias metabólicas únicas que podem ser alvos para o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e seletivas (FIDALGO; GILLE, 2011) (Fig. 3).

Figura 3 – Esquema apresentando as características estruturais da forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Besteiro et al. (2007)

2.3.1 Superfície celular

A superfície celular dos tripanosomatídeos é composta basicamente pela membrana plasmática, glicocálice e microtúbulos subpeliculares. A membrana plasmática desempenha função de adesão do parasito às células epiteliais do intestino do inseto vetor e permite sua sobrevivência e diferenciação (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Na parte externa da membrana plasmática encontra-se o glicocálice, estrutura formada por glicoproteínas e glicolipídeos, presente em todos os estágios do ciclo de vida do parasito. Essa parte da membrana plasmática pode ser responsável pela interação entre o parasito e seu hospedeiro (BRENER et al, 2000; (SOUZA, 2008).

Os microtúbulos subpeliculares são feixes de microtúbulos arranjados em paralelo e estão localizados abaixo da membrana plasmática do parasito (HEUSER, 2001). Estas

estruturas estão presentes em todo o ciclo celular e são responsáveis pelas diferentes formas e formatos do parasito durante o ciclo de vida (OKUDA et al., 1999). Além disso, estão associados à membrana, permanecendo unidos após a lise celular (MATOS et al., 2012).

2.3.2 Mitocôndria

Uma característica interessante dos tripanosomatídeos é que eles possuem uma mitocôndria única que é ramificada pelo corpo, diferentemente de outras células eucarióticas que possui centenas a milhares de mitocôndrias (FIDALGO; GILLE, 2011). O bom funcionamento desta estrutura torna-se imprescindível para a sobrevivência dos parasitos (MEHTA; SHAHA, 2004). Geralmente a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática distribuída por todo o corpo do parasito abaixo dos microtúbulos subpeliculares. O DNA mitocondrial (kDNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada cinetoplasto. Esta é uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009).

O kDNA representa 30% do material genético total da célula e é composto de duas classes de moléculas circulares de diferentes tamanhos, os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos são responsáveis por codificar RNAs ribossomais para várias proteínas, muitas delas com funções vitais à célula, como as envolvidas com os mecanismos de transdução de energia (CAVALCANTI et al., 2009; SOUZA, 2008). Os minicírculos correspondem a 90% do cinetoplasto e sua função é codificar pequenos RNAs guia que na edição do RNA mensageiro codificado pelo maxicírculo (SCHNEIDER, 2001).

2.3.3 Bolsa flagelar e flagelo

Os tripanosomatídeos realizam a endocitose em regiões especializadas como o citóstoma e a bolsa flagelar, ao contrário da maioria das células eucarióticas, que obtêm nutrientes através da endocitose na superfície celular. A bolsa flagelar é uma invaginação da membrana plasmática que emerge lateralmente ao flagelo (ROCHA, 2010). Há evidências morfológicas e citoquímicas de que a bolsa flagelar é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (SOUZA, 2002).

Na mesma região onde se localiza a bolsa flagelar emerge o flagelo composto de axonema, uma combinação de nove microtúbulos duplos e com um par central e, ao longo a haste paraflagelar, uma estrutura cristalina que é única dos protistas (ROTUREUA et al.,

2009). Todas as formas evolutivas dos tripanosomatídeos possuem flagelo, incluindo as formas amastigotas (SOUZA, 2008)

2.3.4 Acidocalcissomos

São organelas encontradas em todos os membros da família Trypanosomatidae e também estão presentes em bactérias, fungos e algas (DOCAMPO et al., 2005). Estas estruturas são morfologicamente variáveis de acordo com a espécie, o meio de cultivo, etc. São organelas eletrondensas acídicas, ricas em polifosfato complexado com cálcio e outros cátions. Essa organela está relacionada com a manutenção do equilíbrio de íons, controle do pH e osmoregulação juntamente com o vacúolo contrátil (DO CAMPO et al., 2005).

2.3.5 Glicossomos

Os glicossomos são organelas esféricas que se distribuem aleatoriamente por toda a célula. O número de glicossomos e a área que ocupam no citoplasma dos tripanosomatídeos variam de acordo com a espécie e até mesmo entre os estágios de desenvolvimento dentro de uma mesma espécie. A função dos glicossomos parece residir exclusivamente na glicólise, onde enzimas glicolíticas ocupam 90% do conteúdo proteico dessa organela em *Trypanosoma brucei* (COLASANTE et al., 2013; CULL et al., 2014; MICHELS et al., 2006). Além das funções relacionadas à produção de energia, outras vias bioquímicas estão pelo menos parcialmente associadas aos glicossomos, nos tripanosomatídeos, como a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese de pirimidinas, entre outras (MICHELS et al., 2006).

2.3.6 Megassomos

Primeiramente descritos em formas amastigotas de *Leishmania* pertencentes ao complexo mexicana, os megassomos são estruturas eletrondensas delimitadas por membranas abundantes no citoplasma. Variam de número, tamanho e aparência. Sua matriz é heterogênea, apresentando inclusões densas e vesículas (UEDA-NAKAMURA; ATTÍAS; DE CULL, 2014). Através da citoquímicas, mostrou-se que o megassomo contém fosfatase ácida e cisteína-protease correspondendo a um lisossomo típico. Megassomos não são observados em formas promastigotas, aparecendo apenas durante o processo de transformação destas formas em amastigotas (BOUKAI et al., 2000). Estas organelas e seus constituintes podem

estar diretamente envolvidos na infectividade e virulência da *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS. SOUZA, 2007).

2.4 Vetor e reservatório

O parasito é transmitido para os hospedeiros vertebrados através da picada da fêmea de insetos flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*), sendo os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* amplamente distribuídos no Novo e Velho Mundo, respectivamente (PACE, 2014). Nas Américas é conhecida a existência de pelo menos 400 espécies de flebotomíneos, das quais cerca de 40 são relatadas como possíveis vetores de *Leishmania* spp. (LAINSON; RANGEL, 2003).

São insetos de pequeno porte (1 a 3 milímetros), com dois pares de asas que lhes permitem deslocamento por saltitos (LEWIS, 1974). São frágeis, pilosos, de atividade crepuscular ou noturna (uma exceção ocorre com *Lutzomyia wellcomei*, que permanece ativa durante o período diurno), baixa capacidade de bater asas e naturalmente silvestres (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Nas Américas e no Brasil a principal espécie transmissora é *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 4). No Brasil, a distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em todas as regiões geográficas do Brasil, exceto a região Sul (BRASIL, 2014). Embora outra espécie venha sendo envolvida na transmissão da doença, como nas cidades de Corumbá e Ladário no estado do Mato Grosso do Sul, o vetor da *Leishmania* é o *Lu. cruzi* (SANTOS et al., 2008).

Figura 4 - Inseto vetor da Leishmaniose Visceral.



Fonte: Brasil (2014)

Várias espécies de reservatórios estão presentes em áreas endêmicas para leishmaniose. Os principais reservatórios na área urbana são os cães (*Canis familiaris*), já no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014). No cão, a enfermidade é de gravidade variável e as lesões cutâneas são as observações mais frequentes e aparentes, consistindo em áreas de alopecia, com descamação eczematosa, principalmente ao redor dos olhos, nas articulações e pregas de pele. Algumas vezes, observam-se pequenas ulcerações, que podem ou não estar cobertas por crostas, no nariz, pavilhão auricular e dorso (SANTOS et al., 2008) (Fig. 5).

Figura 5 - Cão infectado com leishmaniose canina.



Fonte: Vilas et al. (2015).

Nota: Os sinais clínicos incluem lesões de pele, inflamação ocular ou danos, perda de peso, letargia, inapetência e linfadenomegalia.

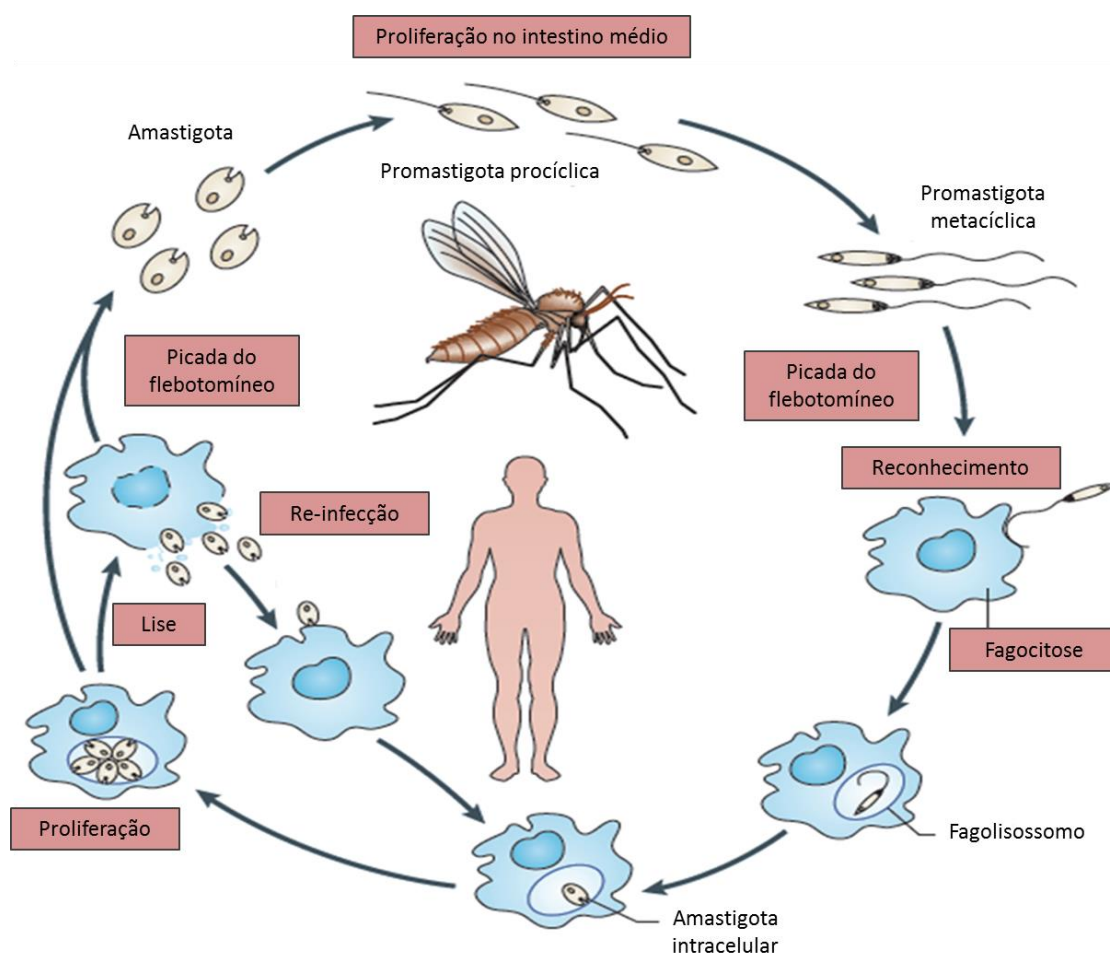
2.5 Ciclo biológico

O ciclo evolutivo da *Leishmania* spp. inicia durante a alimentação de sangue do flebotomíneo, este regurgita as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com imunomoduladores e vários componentes salivares. As promastigotas metacíclicas são então

fagocitadas por células do SFM, principalmente macrófagos. Após a internalização das promastigotas metacíclicas nas células hospedeiras dos vertebrados, estas se transformam em formas amastigotas e se multiplicam, ocorrendo então o rompimento da célula e liberação dos parasitos que vão infectar outros macrófagos (KAYE; SCOTT, 2011) (Fig. 6).

O ciclo de transmissão está completo quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo. Os flebotomíneos são contaminados a partir de animais infectados, que são fundamentais para o estabelecimento da doença humana. O desenvolvimento da leishmaniasis no tubo digestivo do inseto é complexo. As formas promastigotas passam por várias mudanças até se diferenciarem em formas promastigotas metacíclicas, fases infectantes para o hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

Figura 6 - O ciclo biológico da *Leishmania* spp.



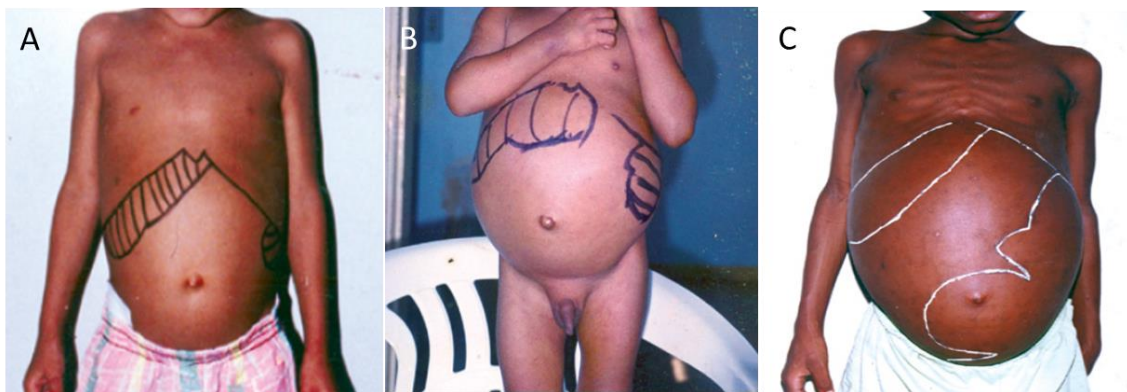
Fonte: Adaptado de Kaye & Scott (2011).

2.5.1 Aspectos clínicos e imunológicos

Nos humanos, a infecção pode ser assintomática ou desenvolver as formas clínicas compreendendo: febre, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia. O aparecimento dos sintomas geralmente é gradual, mas podem se manifestar abruptamente, levando a um desfecho fatal em poucas semanas (VILAS et al., 2015).

Diversos fatores influenciam a resposta imune de resistência ou susceptibilidade a infecção, incluindo a cepa do parasito, a genética do hospedeiro e fatores ambientais (KUMAR; NYLÉN, 2012). A evolução clínica da LV pode ser dividida em três períodos, o período inicial, o período de estado e o período final. O período inicial, também chamado de fase aguda, é onde se inicia o aparecimento da sintomatologia (febre, hepatoesplenomegalia). No período de estado o paciente apresenta febre irregular, emagrecimento progressivo e aumento da hepatoesplenomegalia. Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, onde paciente apresenta febre contínua, instala-se a desnutrição, edema de membros inferiores, hemorragias, icterícia e ascite (BRASIL, 2014) (Fig. 7).

Figura 7 - Pacientes com Leishmaniose visceral.



Fonte: Brasil (2014)

Nota: A- Paciente no período inicial da LV; B- Paciente no período de estado da LV; C- Paciente no período final da LV. É possível notar o aumento do fígado e do baço nos três períodos da LV.

A infecção humana se dá após a inoculação das formas promastigotas através da picada do flebotomíneo. Estas formas são fagocitadas pelos macrófagos e no seu interior se

transformam nas formas amastigotas, a sua sobrevivência dependerá da sua capacidade de resistir aos mecanismos decorrentes da ativação do macrófago (FALEIRO et al., 2014).

Estes mecanismos estão relacionados com a ativação de uma resposta imune mediada principalmente por linfócitos T, que resulta na estimulação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ (T *helper*/auxiliares 1 e T *helper*/auxiliares 2) que produzem citocinas que quando liberadas regulam os mecanismos parasiticidas dos macrófagos (MALLA; MAHAJAN, 2006).

A resposta imune protetora é mediada por células, onde a resposta Th1 está relacionada com a resistência a infecção e a resposta Th2 com a susceptibilidade a infecção. Os macrófagos são ativados a um estado leishmanicida estimulado por uma resposta de células Th1 (STOBIE et al., 2000). Esta resposta envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs), células T CD4⁺ e uma grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (STOBIE et al., 2000). Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos ativados por interferon-gama (IFN- γ) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão relacionados com resistência à infecção (LIEW et al., 1991).

Já a citocina IL-4 direciona o desenvolvimento clonal da subpopulação Th2 que produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, contribuindo para a desativação dos macrófagos e desenvolvimento da resposta humoral que leva à progressão da doença, polo de susceptibilidade (VALE DE GATO, 2009).

A resposta humoral mediada pelos linfócitos B ativa plasmócitos determinando a produção de anticorpos policlonais, resultando em hipergamaglobulinemia. Estes eventos (celular e molecular) definem a patogenia da doença e as alterações morfológicas resultam do acometimento progressivo e proeminente do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), levando à hipertrofia, hiperplasia e intenso parasitismo de macrófagos (PRATA; SILVA, 2005). Ocorre, também, participação reativa do interstício dos diferentes órgãos, com modificação de seus componentes celulares, da matriz extracelular e com o aparecimento do infiltrado mononuclear, que com dilatação e congestão dos seios venosos, determinam o aumento do volume e do peso dos órgãos atingidos (PRATA; SILVA, 2005).

Vários patógenos, incluindo *Leishmania*, desenvolveram mecanismos para subverter o sistema imune do hospedeiro a fim de estabelecer a infecção e melhorar sua sobrevivência (SIBLEY, 2011). Apesar dos macrófagos serem células especializadas na fagocitose e

destruição de agentes patogênicos, a leishmania não só altera a produção de citocinas importantes para uma resposta protetora, mas também é capaz de reduzir a atividade dos macrófagos e assim enganar o sistema imune do hospedeiro (VALE DE GATO, 2009).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da LV é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais. Os dados clínicos se baseiam na pesquisa de sinais e sintomas peculiares, como febre, hepatoesplenomegalia, anemia e manifestações hemorrágicas. Já os dados epidemiológicos advêm das informações sociais, econômicas e ambientais. Enquanto que os dados laboratoriais são baseados na realização de provas sorológicas específicas, exames parasitológicos e moleculares (SANTOS et al., 2008).

O padrão ouro para a confirmação da infecção por *Leishmania* é a visualização dos parasitos por microscopia: em um esfregaço de tecido, tal como um aspirado de baço, medula óssea ou biópsia do fígado (BRASIL, 2014). A precisão da análise microscópica é influenciada pela capacidade do técnico de laboratório e a qualidade dos reagentes utilizados (CHAPPUIS et al., 2007).

Atualmente existem vários métodos disponíveis para o diagnóstico da LV, porém os métodos sorológicos podem apresentar resultados conflitantes devido à presença de imunocomplexos na amostra (CARVALHO, 2010). Os testes sorológicos mais utilizados são o Ensaio imunoenzimático (ELISA), a Imunofluorescência Indireta (IFI), Teste de aglutinação direta (DAT) e a Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM) (NASCIMETO et al., 2005; GOTO, 2009; TAVARES et al., 2005).

Ensaio baseados em biologia molecular para detectar o DNA do parasito (Reação em Cadeia da Polimerase) são mais sensíveis, mas são aplicados em centros particulares e centros de pesquisas (SAVOIA et al., 2015). Diferentes métodos já foram avaliados (LEMRANI et al., 2009; SANTOS et al., 2014).

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível. O diagnóstico e tratamento dos pacientes devem ser realizados precocemente e sempre que possível a confirmação parasitológica da doença deve preceder o tratamento. Em situações onde o diagnóstico sorológico e/ou parasitológico não estiver disponível ou na demora da liberação dos mesmos, o início do tratamento não deve ser postergado (BRASIL, 2014).

2.7 Tratamento

Os fármacos empregados no tratamento da LV apresentam alto custo e efeitos colaterais (SAVOIA et al, 2015). O tratamento é feito através de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®), há mais de 60 anos, sendo utilizados até os dias atuais. Embora sejam fármacos de primeira escolha, os antimoniais, apresentam eficácia limitada e algumas vezes significativa toxicidade e efeitos adversos (FREITAS-JÚNIOR, et al., 2012). Os antimoniais pentavalentes são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas da leishmaniose. Eles interferem na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania* spp., inibindo tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, causando a redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2014).

No Brasil, o medicamento antimonial de escolha é o antimoniato de meglumina. Administrado de forma contínua e posologicamente adequada sendo eficaz ao tratamento das formas visceral, cutânea e mucocutânea de leishmaniose. Por sua vez, baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes do parasito (RATH et al, 2003). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb^{+5} /kg/dia (BRASIL, 2014). Podem ocorrer um ou mais efeitos adversos, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém, na dose de 20mg Sb^{+5} /kg/dia, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento (BRASIL, 2014). Recomenda-se o tratamento da LV com a dose de 20mg Sb^{+5} /kg/dia, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias, por via endovenosa ou intramuscular (BRASIL, 2014) (Quadro 1).

Quadro 1- Esquema terapêutico para as formas clínicas de Leishmaniose.

Forma Clínica	Dose	Tempo de duração mínimo
Leishmaniose Cutânea	10-20mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Difusa	20mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Visceral	20mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias

Fonte: Modificado de Brasil (2007)

Como tratamentos alternativos para o tratamento tem-se o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato), os imunomoduladores (interferon gama e fator estimulante de crescimento de granulócito e macrófago). Com exceção das duas primeiras drogas, as demais se encontram ainda em fase de investigação. Todas elas só devem ser administradas em hospitais de referência (BRASIL, 2014).

A pentamidina é o fármaco mais comumente recomendado, embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira administração parenteral (GIL et al., 2007). A anfotericina, um antibiótico macrolítico, é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais. Apesar de sua elevada toxicidade e de também requerer administração parenteral, tem sido proposta como agente terapêutico de escolha para LV e para infecção sistêmica por fungos (CROFT; COOMBS, 2003). No caso do tratamento de pacientes gestantes com leishmaniose tegumentar (LT) e pacientes com coinfeção *Leishmania*/HIV este fármaco passa ser a primeira escolha (BRASIL, 2009). A anfotericina lipossomal é uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada a lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. No Brasil, esta droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no tratamento da LV (BRASIL, 2009). Tanto a anfotericina quanto a pentamidina possuem limitações e efeitos colaterais frequentes e graves, como alterações renais, cardíacas e hepáticas (BRASIL, 2014) além de alto custo de tratamento e necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração.

A paromicina é o único aminoglicosídeo com atividade leishmanicida importante clinicamente. Ambas as formas de leishmanioses (LT e LV) podem ser tratadas com esse antibiótico, mas por ter baixa absorção oral, formulações parenterais e tópicas têm sido desenvolvidas para a forma visceral e tegumentar, respectivamente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Além da ação dos fármacos sobre os parasitos o sucesso do tratamento da leishmaniose está sujeito a imunidade celular, independentemente da droga utilizada. Assim, em pacientes com coinfeção *Leishmania*/HIV o tratamento tende mais ainda ao insucesso, entre 40% e 65% (CHRISTOPHER et al., 2007).

Ao longo das últimas décadas, poucos medicamentos alternativos ou novas formulações tornaram-se disponíveis, mas, até o momento, nenhum deles são ideais para o tratamento devido a alta toxicidade, as questões de resistência, os preços elevados, a longa duração do tratamento. Devido a toda essa problemática se faz necessária a descoberta de novos compostos menos tóxicos e com ação leishmanicida mais efetiva.

2.8 Novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose

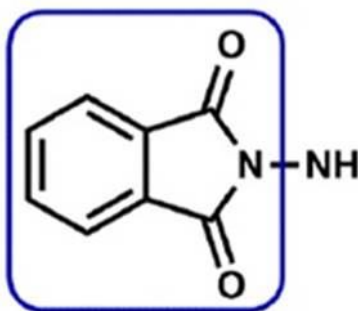
2.8.1 Ftalimidas

Para o desenvolvimento de novos fármacos os pesquisadores investigam diferentes classes de compostos interessados em suas possíveis atividades biológicas, além de desenvolverem novas rotas sintéticas para compostos já existentes na literatura. Devido à intensa pesquisa na terapêutica moderna cerca de 85% dos fármacos disponíveis são de origem sintética (LIMA et al., 2002).

A talidomida (N-fatalimidoglutarimida) está dentre os compostos mais conhecidos que contém a estrutura ftalimida. A talidomida foi introduzida no mercado farmacêutico em 1956, como sedativo e hipnótico, tornando-se bastante popular para o tratamento da insônia. Mas devido a seu perfil teratogênico, foi retirada do mercado em novembro de 1961 (HASHIMOTO, 2002; VARGESSON, 2013). Objetivando aprimorar as propriedades farmacológicas da talidomida e reduzir seus efeitos teratogênicos, inúmeros esforços de pesquisa têm sido feitos na busca de análogos otimizados, com melhor perfil farmacoterapêutico, partindo-se da premissa de que poderiam identificar e excluir os grupamentos toxicofóricos presentes na talidomida (MATTHEWS; MACCOY, 2003.)

A ftalimida constitui uma importante classe de compostos heteroaromáticos uma estrutura promissora para uso na síntese de novos fármacos (DESHAYES et al., 1999) (Fig. 8). O anel ftalimídico é relatado em uma série de compostos com diferentes atividades farmacológicas, entre elas anticonvulsivante, ansiolítica, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora (LIMA, 2001; LIMA et al., 2002).

Figura 8 – Figura esquemática da estrutura química da Ftalimida.

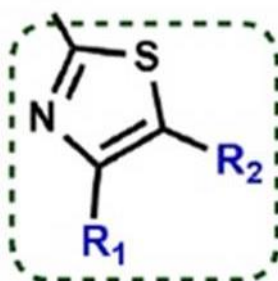


Fonte: Adaptado de Gomes et al. (2016).

2.8.1 Tiazóis

Outra classe de compostos heterocíclicos bastante estudada na atualidade são os tiazóis. Este núcleo contém em sua estrutura química um anel de cinco membros com os símbolos de enxofre e nitrogênio como heteroátomos (Fig. 9). Forma uma importante classe de compostos cíclicos na química orgânica com amplo espectro de atividades biológicas, tais como atividades anticâncer, antibacteriana, antidepressiva, anti-inflamatória, herbicida dentre outras (FUNAKOSHI et al., 2002; LABER et al., 1999; VICINI et al., 2003; HARMET et al., 2004).

Figura 9 - Figura esquemática da estrutura química do Tiazol.



Fonte: Adaptado de Gomes et al. (2016).

Estudos com os compostos contendo as classes ftalimida e tiazol têm demonstrado as suas extensas atividades biológicas, incluindo antitumoral, antifúngica, antimalárica, anti-helmíntica e antiprotozoária (ALANAZI et al., 2015; GOMES et al., 2016; PONTES ESPÍNDOLA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2014; TURAN-ZITOUNI et al., 2016). No entanto, são incipientes os estudos com as classes ftalimida e tiazol contra *Leishmania infantum*. Tendo em vista o manancial de compostos ainda poucos explorados e a necessidade de prospecção de novas drogas menos tóxicas e com baixo custo associado para o tratamento da leishmaniose visceral, no presente trabalho investigamos o potencial leishmanicida *in vitro* dos compostos ftalimido-tiazol, bem como sua citotoxicidade sobre células de mamíferos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* dos compostos Ftalimido-Tiazóis sobre as formas evolutivas de *Leishmania infantum* e sobre as células de mamíferos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade dos compostos sobre as células de mamíferos (Células vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais);
- Analisar o efeito dos compostos sobre a produção de Óxido Nítrico por células de mamíferos (Células vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais);
- Avaliar o efeito dos compostos sobre o crescimento de promastigotas de *L. infantum*, através da determinação da IC₅₀;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre o índice de sobrevivência das formas amastigotas de *L. infantum*, através da determinação da IC₅₀;
- Estimar o Índice de Seletividade dos compostos para formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*;
- Descrever as alterações ultraestruturais e morfológicas em promastigotas *L. infantum* tratadas com os compostos;
- Analisar possíveis alterações no potencial da membrana mitocondrial e na integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos ftalimido-tiazóis;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos utilizados no tratamento *in vitro* de *L. infantum*

Os 15 compostos ftalimido-tiazóis foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisas da Dra. Ana Cristina Lima Leite, no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal/LpQM da Universidade Federal de Pernambuco.

Para a realização dos testes, os compostos ftalimido-tiazóis (1, 2a-2n) foram solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução foi então dissolvida em meio de cultura adequado para cada ensaio (RPMI para ensaios com macrófagos/amastigotas e Schneider's para ensaios com promastigotas), para a obtenção das diferentes concentrações testadas nos experimentos. O preparo das soluções de uso foi feito sempre no momento da realização do experimento para garantir a estabilidade dos compostos.

Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente.

4.2 Cultura de células de mamíferos e obtenção de macrófagos peritoneais

As células vero e os macrófagos J774 foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Adaptado de MELLO et al., 2014).

A coleta de macrófagos peritoneais foi realizada em camundongos BALB/c machos. Os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO₂ e foi realizada assepsia dos mesmos com álcool 70%. Dentro da cabine de fluxo laminar, cada animal foi fixado à prancha de dissecação pelas patas com auxílio de agulha. Foi realizada a exposição do peritônio e a injeção de 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), seguida de coleta desse meio. Foi realizado pool de células de pelo menos oito animais. O lavado foi acondicionado em frasco de vidro estéril a 4°C. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída em azul de tripan e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea®).

4.3 Análise da citotoxicidade dos compostos em células de mamífero

Para a análise da citotoxicidade foi realizado o teste 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) que se baseia na redução dos sais amarelos de tetrazólio

por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

As células vero e os macrófagos J774 foram tripsinizados e contados em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea®). Todos os três tipos celulares (células vero, macrófagos J744 e macrófagos peritoneais) foram semeados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença das concentrações testes (6.25 a 100 µg/mL) dos compostos ftalimido-tiazóis por 48 horas. Após este período, o meio foi novamente retirado e adicionado o MTT diluído em meio RPMI sem vermelho de fenol, a uma concentração de 5mg/mL. As células foram incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições de cultivo. Após incubação, a solução do MTT foi retirada cuidadosamente e adicionado 100 µL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 5 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 595nm (ALIANÇA et al., 2014). A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

4.4 Análise da produção de óxido nítrico por células de mamíferos

A fim de analisar os efeitos dos diferentes compostos na produção de óxido nítrico pelas células de mamíferos anteriormente mencionadas, o sobrenadante das culturas controles (não tratadas) e tratadas nas concentrações teste (6.25 a 100 µg/mL) dos compostos ftalimido-tiazóis foram analisados através do método reagente de Griess. Através deste método, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com a *N*-(1-naftil)-etileno diamina dihidroclorato (NED) formando um complexo de coloração rósea. Cerca de 100 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos tratados ou não com os compostos, por 48 horas, foram incubados com 100 µL do reagente Griess (1% sulfanilamida e 0.1% NED/H₃PO₄ á 2.5%) à temperatura

ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida com um filtro de 540 nm no leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA) (ALIANÇA et al., 2014). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio.

4.5 Cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/BH46), gentilmente cedidas pelo Dr. Rodrigo Soares (CPqRR/MG) foram mantidas a 26°C em meio de cultura Schneider suplementado (10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina-estreptomicina), pH 7.2. As formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas infectivas em culturas de macrófagos peritoneais e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos conforme é descrito abaixo. Parasitos na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos com repiques a cada três dias.

4.6 Atividade biológica *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. infantum*

Visando um *screening* inicial dos compostos com atividade leishmanicida, formas promastigotas de *L. infantum* foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas nas concentrações teste (6.25 a 100 µg/mL) dos compostos Ftalimido-Tiazóis, por 72 horas. Células incubadas apenas com o meio de Schneider foram utilizadas como controle.

O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01®, Cheonan-Si, Korea). O crescimento dos parasitos tratados foi comparado ao crescimento do controle e ao final do tempo de incubação foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento. A partir destes valores de inibição, para cada uma das concentrações testadas, foi realizada a determinação da IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicata técnica. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀ para cada composto.

A partir do *screening* inicial foram selecionados os compostos que apresentaram os melhores IS para os experimentos 4.6 ao 4.9.

4.7 Atividade biológica *in vitro* sobre as formas amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais foram semeados em placas de cultivo de 24 poços, a uma concentração de 3×10^5 células/mL, contendo uma lamínula de vidro, e mantidas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com meio RPMI-1640 (Sigma) e infectadas, por três horas com formas promastigotas, na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago. Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem em meio RPMI e incubadas em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos. Após 24 horas de tratamento as lamínulas foram retiradas e foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 horas de cultivo por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A Anfotericina B foi utilizada como controle. A IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos) foi determinada através da contagem direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares em microscópio óptico convencional. O índice de sobrevivência (SI) foi obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas pelo número de amastigotas/ macrófago.

4.8 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum*

Formas promastigotas *L. infantum* controles e tratadas nas concentrações de 3.64 µg/mL e 7.28 µg/mL (2j) e 5.41 µg/mL e 10.82 µg/mL (2m) dos compostos Ftalimido-Tiazóis com melhor IS, foram lavadas em tampão fosfato-salina e fixadas *overnight* em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e processadas para Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

Para MEV, promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 minutos as lamínulas foram lavadas no mesmo tampão para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em tampão cacodilato de sódio. Em seguida as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan),

cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol,Tokyo, Japan) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan)

Para MET, os parasitos fixados foram lavados e pós-fixados por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl_2 em tampão cacodilato de sódio. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de espessura, obtidos em ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Germany), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

4.9 Análise do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e avaliação da integridade da membrana celular

Para análise do possível efeito dos compostos Ftalimido-Tiazóis sobre a membrana plasmática e a mitocôndria dos protozoários foram utilizados os seguintes marcadores: (a) iodeto de propídio, para monitorar possível permeabilização de membrana plasmática e (b) rodamina 123, para análise do potencial de membrana mitocondrial.

Formas promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 células/mL) foram tratadas 3.64 $\mu\text{g/mL}$ e 7.28 $\mu\text{g/mL}$ (2j), e com 5.41 $\mu\text{g/mL}$ e 10.82 $\mu\text{g/mL}$ (2m), e por 72 horas. Após o tratamento os parasitos tratados e controles foram incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de rodamina 123 por 15 minutos. Como controles para o iodeto, as células foram incubadas com peróxido de hidrogênio e para a rodamina 123 com metanol P.A por 20 minutos. Células não tratadas também foram avaliadas. Ao final do tempo de incubação com os marcadores, as amostras foram colocadas em tubos apropriados para as análises no citômetro de fluxo. A obtenção e análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipado com o software Cell Quest, utilizando o canal FL2-H para o iodeto e o canal FL1-H para a rodamina 123. Análises posteriores foram realizadas também no software WinMDI2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, EUA). Foram analisados 20.000 eventos por amostra. Os resultados da marcação com iodeto de propídio foram expressos como porcentagem de células marcadas em cada situação testada. Alterações na polarização da membrana mitocondrial foram medidas através do Índice de Variação (IV) obtido pela equação $(\text{MT-MC})/\text{MC}$, onde

MC é a mediana de intensidade de fluorescência do controle e MT a mediana de fluorescência das células tratadas. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (ALIANÇA et al., 2014).

Amostras obtidas como descrito acima foram também analisadas por microscopia confocal a laser (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, ALE). Ao final do tempo de incubação, as amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., USA) no momento da visualização das células ao microscópio. As imagens foram adquiridas usando os lasers 488 nm (iodeto de propídio) e 543 nm (rodamina 123).

4.10 Análises estatísticas

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. Para as análises de significância foi realizada ANOVA e o pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$.

4.11 Considerações éticas

Todos os procedimentos envolvendo animais experimentais foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ) sob o número 30/2011.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida *in vitro* de derivados ftalimido-tiazóis

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma parasitose causada pelo agente etiológico *Leishmania infantum* no continente Americano, na Europa e em certas partes da África. Esta doença acomete indivíduos de todas as faixas etárias e podem levar a óbito quando não tratada (1).

O tratamento da LV tem sido baseado nos antimoniais pentavalentes, utilizados como medicamentos de escolha (2). Os medicamentos de segunda escolha incluem Anfotericina B, Pentamidina e Mitelfocina (3–6). A maioria das terapias utilizadas mostra-se inadequada, devido a vários fatores, tais como os índices terapêuticos baixos levando a altas toxicidades e efeitos colaterais, surgimento de parasitos resistentes, altos custos que são inacessíveis para os países afetados, entre outros. Estas desvantagens da terapia corrente, juntamente com a falta de uma vacina, mostra a necessidade da busca de novos fármacos (4, 5).

Na busca de moléculas bioativas, é sabido que os derivados do grupo heterocíclico tiazol são promissores para a geração de novos agentes com atividade anti-leishmanicida. Esforços para o desenvolvimento de novos fármacos para o combate das doenças negligenciadas desenvolveu uma variedade de tiossemicarbazonas e seus bioisómeros 1,3-tiazóis como agentes antiparasitários (7–12).

Outra família de compostos que mostram um amplo espectro de propriedades farmacológicas são os derivados da ftalimida. São atribuídas a tais biomoléculas atividades como: analgésica (13), anticonvulsivante (14), antituberculose (15, 16), hipolipidêmica (16), ansiolítica (13), anti-inflamatória (13), antimicrobiana (15, 17) e antipsicótica (18).

No tocante a obtenção de derivados ftalimido-tiazóis identificados como potentes agentes antiparasitários foram descritos em vários estudos. Santiago et al. (2014) mostraram biomoléculas com potente atividade esquistossomicida, sendo o composto LpQM-45 o mais promissor, causando significativa alteração ultraestrutural, incluindo a destruição do tegumento em ambos os vermes machos e fêmeas (24). Gomes et al. (2016) (26) descreveram

uma série de compostos mostrou potência antichagásica e diversas alterações celulares do parasito.

No entanto estudos sobre os efeitos dos compostos das classes tiazóis e ftalimidas sobre *Leishmania* spp. ainda são incipientes. No presente trabalho foi avaliada a ação de uma das séries descrita por de Gomes et al. (2016) (26) híbridos das ftalimidas e dos tiazóis sobre formas promastigotas de *L. infantum* e células de mamíferos.

Materiais e Métodos

Compostos Avaliados. Os compostos ftalimido-tiazóis foram obtidos e purificados assim como descrito por Gomes et al. (2016) (26) sendo que todos foram caracterizados quimicamente por ressonância magnética nuclear, infravermelho, espectroscopia de massas e análise elementar e apresentaram pureza >95%.

Preparação das amostras testadas. Para a realização dos testes, 15 compostos ftalimido-tiazóis (1 a 2n) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Esta solução foi então dissolvida em meio de cultura adequado para cada ensaio (RPMI para ensaios com macrófagos/amastigotas e meio Schneider para ensaios com promastigotas), para a obtenção das diferentes concentrações testadas nos experimentos. O preparo das soluções de uso foi feito sempre no momento da realização do experimento para garantir a estabilidade dos compostos.

Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0.01 a 1%) presente na diluição dos compostos.

Cultivo dos parasitos. Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/BH 46), cedidas pelo Dr. Rodrigo Soares (CPqRR/MG) foram mantidas a 26°C em meio de cultura Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de Penicilina-Estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Parasitos na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

Atividade biológica sobre promastigotas de *Leishmania infantum*. Para realizar o *screening* inicial dos compostos com atividade leishmanicida, formas promastigotas de *L. infantum* foram coletadas, contadas e diluídas em meio de Schneider suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença das concentrações teste (6.25; 12.5; 25; 50 e 100 µg/mL) dos derivados ftalimido-tiazóis, por 72 horas. Células incubadas apenas com o meio Schneider foram utilizadas como controle. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea). A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

Cultura de células de mamíferos. Células Vero e Macrófagos J774 foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. Ambas as células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de SFB, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

Ensaio de citotoxicidade. A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através do teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) de acordo com Aliança et al. (2014). Resumidamente, células vero e macrófagos J774 foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6×10^4 células/poço e incubados em uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas nas concentrações 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL dos compostos por 48 horas. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 490nm. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC_{50}) das células foi determinada por análise de regressão linear. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} para cada composto. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

Produção de óxido nítrico (ON). Para dosagem do ON produzido pelas células de mamífero (Células Vero e Macrófagos J774), tratadas nas concentrações teste (6.25 a 100 µg/mL) dos

compostos ftalimido-tiazóis e não tratadas foi utilizado o reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% *N*-(1-naftil)-etileno diamina dihidroclorato /2.5% H_3PO_4) (Promega, Madison, USA) de acordo com o fabricante. Ao sobrenadante das culturas incubadas por 48 horas, foi adicionado 100 μL do reagente Griess à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida com um filtro de 540nm no leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio.

Análise Ultraestrutural. Para análise ultraestrutural foram selecionados os compostos com melhor índice de seletividade. Promastigotas de *L. infantum* controles e tratadas nas concentrações 13.87 μM e 27.94 μM (2m), e 9.81 μM e 19.62 μM (2j) dos compostos ftalimido-tiazóis, foram lavadas e fixadas *overnight* em uma solução contendo 2.5% de glutaraldeído (Sigma) e 4% de formaldeído (Sigma) em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0.1M, pH 7.2 e processadas para Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

Para MEV, promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 minutos as lamínulas foram lavadas no mesmo tampão para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato de sódio. Em seguida as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan), cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tokyo, Japan) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan)

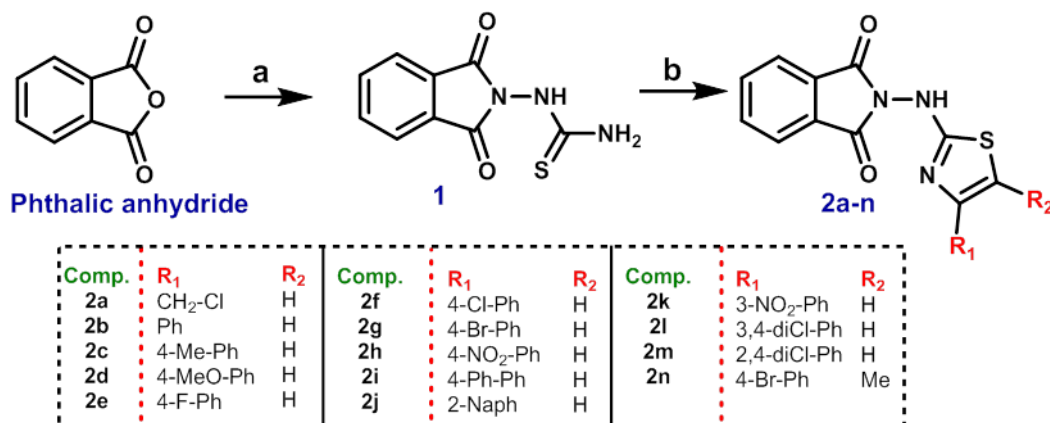
Para MET, os parasitos fixados foram lavados e pós-fixados por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0.8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl_2 em tampão cacodilato de sódio. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70nm de espessura, obtidos em ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Germany), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

Análise estatística. As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

Resultados

Atividade biológica sobre promastigotas de *L. infantum*. Foram testados 15 compostos derivados de ftalimidas, sendo que 14 destes apresentando o núcleo tiazol (2a-n) e o compostos precursor destes (1) na rota sintética, assim como está representada no esquema 1.

Esquema 1. Série de derivados ftalimido-tiazóis



Os resultados demonstram que todos os compostos ftalimido-tiazóis foram capazes de inibir o crescimento das promastigotas de *L. infantum*, apresentando valores de IC₅₀/72h variando entre 9.81 e 263.78μM (Tabela 1).

Tabela 1. Ação dos compostos sobre promastigotas de *L. infantum*, células vero e macrófagos J774.

Compostos	μM		IS _{vero}	μM		IS _{J774}	NO _v	NO _J
	IC ₅₀	CC ₅₀ (Vero)		CC ₅₀ (J774)				
1	236.38 ±9.6	883.76 ±86.3	3.7	393.30 ±7.3	1.7	N	N	
2a	263.78 ±17.3	380,41 ±6.5	1.4	1582.96 ±36.8	6.0	S*	N	
2b	54.02 ±1.6	229.84 ±16.7	4.2	241.68 ±2.9	4.5	N	N	
2c	41.97 ±0.3	159.43 ±1.9	3.7	277.16 ±5.3	6.5	N	S*	
2d	43.48 ±1.0	185.78 ±11.8	4.3	419.20 ±5.6	9.7	S*	S*	
2e	57.11 ±4.9	244.13 ±9.1	4.3	206.49 ±9.6	3.6	S*	S*	
2f	31.79 ±1.4	192.07 ±5.3	6.0	216.96 ±3.9	6.8	S*	S*	
2g	61.98 ±1.5	161.65 ±16.3	2.6	201.90 ±3.1	3.3	N	N	
2h	54.45 ±5.5	412.79 ±28.2	7.6	278.42 ±0.3	5.1	S*	S*	
2i	27.76 ±1.6	48.82 ±0.4	1.8	112.95 ±2.8	4.1	S*	S*	
2j	9.81 ±0.1	122.32 ±2.3	12	173.32 ±1.2	17.7	N	N	
2k	57.21 ±2.2	181.83 ±9.1	3.2	323.72 ±13.0	5.7	S*	S*	
2l	28.77 ±2.7	153.69 ±6.8	5.3	157.90 ±7.9	5.5	N	S*	
2m	13.87 ±0.8	88.95 ±12.9	6.4	176.05 ±15.8	12.7	N	S*	
2n	23.41 ±0.7	99.37 ±1.0	4.2	125.58 ±0.5	5.4	N	S*	
AmB	0.047 ±0.03	105.66 ±2.1	2270	37.61 ±1.4	808	S*	S*	

- IC_{50} : Concentração que inibi em 50% o crescimento das promastigotas de *L. infantum*

- CC_{50} : Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% das células de mamífero

- IS (Índice de seletividade): CC_{50} das células de mamíferos / IC_{50} *L. infantum*

- AmB: Anfotericina B; NO- Dosagem de Óxido Nítrico.

*: correspondem à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. S: produção significativa; N: produção não significativa.

Os compostos que apresentaram uma maior inibição do crescimento, com menor valor de IC_{50} foram o 2j (9.81 μM), 2m (13.87 μM), 2n (23.41 μM), além de 2i (27.76 μM), 2l (28.77 μM). Oito compostos (2b, 2f, 2g, 2c, 2d, 2k, 2h e 2e) apresentaram atividade intermediária com valores variando entre 31.79 e 61.98 μM . Enquanto os compostos 1 (236.38 μM) e 2b (263.78 μM) se mostraram menos efetivos. Avaliando a atividade dos

compostos sobre promastigotas do parasito foi possível observar os baixos valores de IC_{50} , onde apenas o 2a e o composto 1, que deu origem aos outros da série, apresentaram valor de IC_{50} mais elevados em comparação aos demais compostos. A anfotericina B, inibiu 100% do crescimento de *L. infantum* nas concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 μ M.

Ensaio de Citotoxicidade. Alguns compostos nas concentrações analisadas apresentaram citotoxicidade sobre células vero e macrófagos J774 (Tabela 1). Os valores de CC_{50} para as células vero variaram de 48.82 a 883.76 μ M e para os macrófagos J774 de 112.95 a 419.20 μ M (Tabela 1). Quando analisamos o índice de seletividade ($IS = CC_{50} / IC_{50}$), que informa quanto o composto é seletivo para o parasito em relação às células de mamíferos, foi demonstrado que todos os compostos avaliados foram mais seletivos para o parasito do que para as células de mamíferos.

O composto que teve maior inibição do crescimento sobre promastigotas de *L. infantum* (2j) foi também o que apresentou maior índice de seletividade com 12.5 para as células vero e 17.7 para macrófagos J774 (Tabela 1). O 2m também se mostrou efetivo em inibir o crescimento das promastigotas, e apresentou índice de seletividade de 6.4 para as células vero e 12.7 para macrófagos J774.

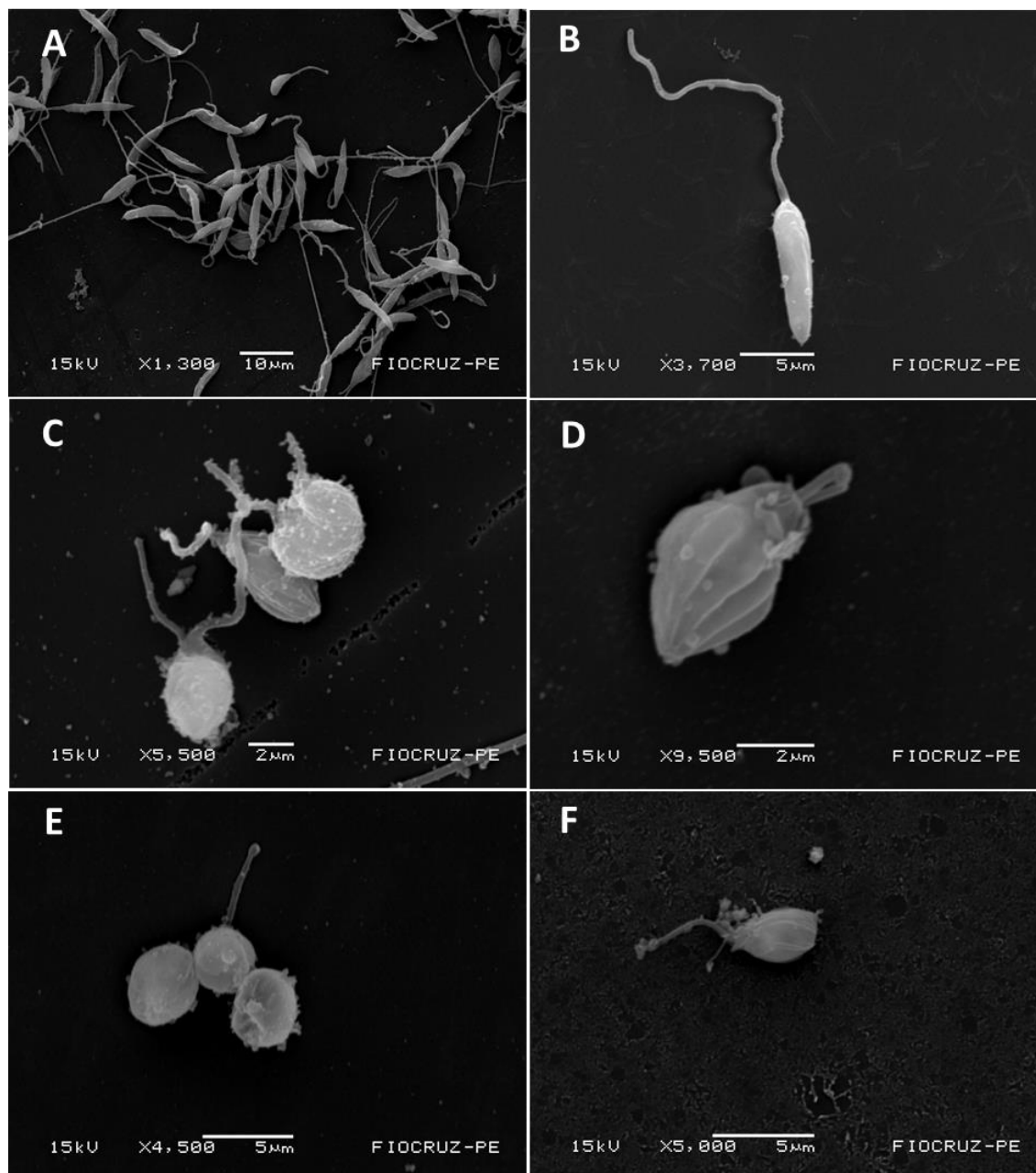
Análise da produção de óxido nítrico (ON). Analisando a produção de ON pelas células vero e macrófagos J774, foi observado que alguns compostos (2d, 2e, 2f, 2i, 2k e 2h), foram capazes de aumentar a produção de ON nos dois tipos celulares, sendo estas diferenças consideradas significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) (Tabela 1). Dentre estes compostos o 2h foi o que induziu o maior aumento na concentração de ON pelos 2 tipos celulares.

Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum*. Promastigotas de *L. infantum* tratadas e não tratadas com os derivados ftalimido-tiazóis 2j e 2m foram analisadas por microscopia eletrônica para identificar alterações ultraestruturais.

Nas análises por MEV, as promastigotas do grupo não tratadas exibiram morfologia do corpo fusiforme com topologia das superfícies normais e flagelo longo preservado (Figura 1A-B). Os parasitos tratados com ambos os compostos e nas duas concentrações testadas apresentaram alterações na forma da célula, apresentando-se mais arredondadas, inchadas

com redução flagelar (Figura 1C-F). Em adição, alterações da topologia como presença de ondulações na membrana celular foram observadas (Figura 1D).

Figura 1. Eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratada e tratadas com compostos 2j e 2m.



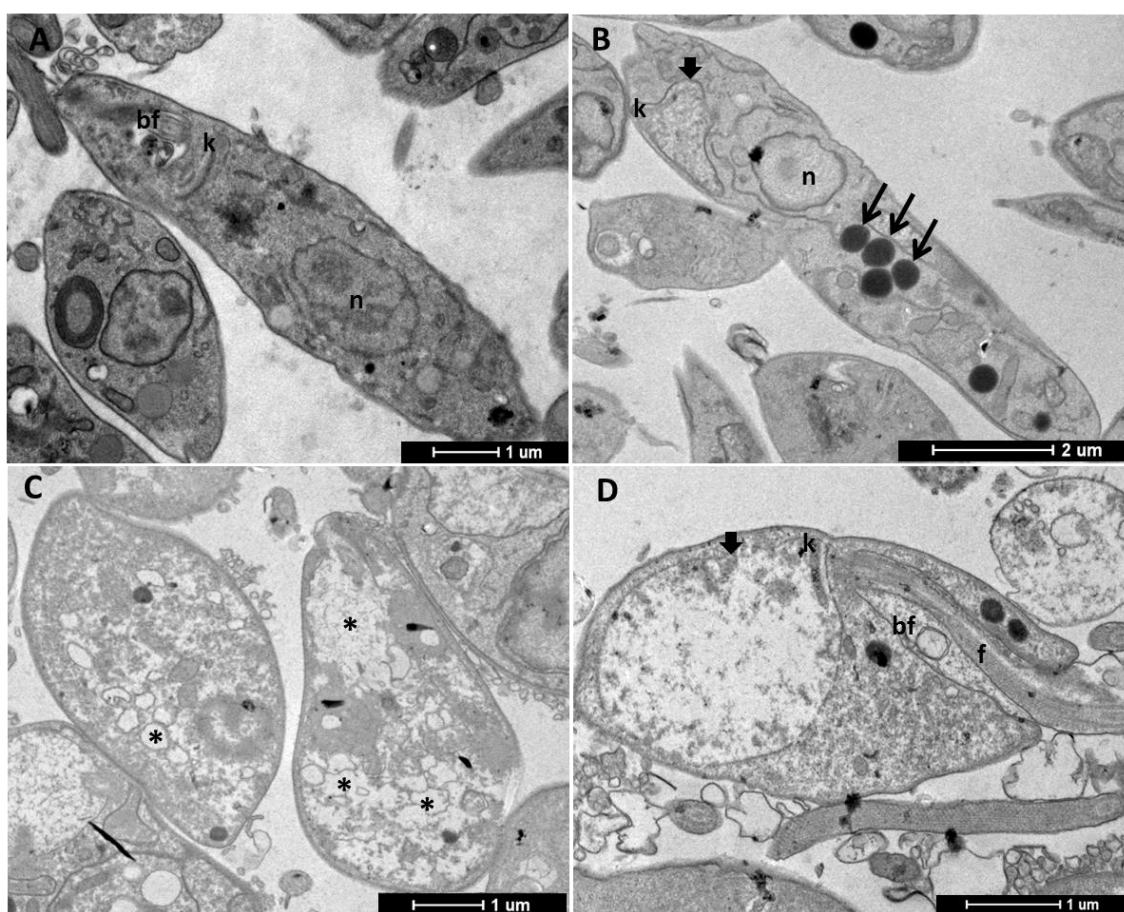
(A-B) promastigotas controle apresentando forma fusiforme e comprimento do flagelo normal. (C) Promastigotas tratadas com 9.81 μM do composto 2j e (D) promastigotas tratadas com 19.62 μM do composto 2j mostrando alterações na topologia da célula. (E) Promastigotas

tratadas com $13.87\mu\text{M}$ do composto 2m e (F) promastigotas tratadas com $27.74\mu\text{M}$ do composto 2m mostrando o encolhimento da célula.

Através da MET pudemos observar que no grupo não tratado, as promastigotas de *L. infantum* apresentam núcleo e organelas com forma e morfologia celular bem preservada (Figura 2A). Os grupos expostos aos compostos 2j e 2m apresentaram alterações ultraestruturais em comparação com as formas promastigotas não tratadas.

No tratamento com o composto 2j na concentração de $9.81\mu\text{M}$ (IC_{50}) também foram observados inchaço mitocondrial e presença de grande quantidade de inclusões eletrondensas no citoplasma (Figura 2B). Já na concentração de $19.81\mu\text{M}$ ($2\times \text{IC}_{50}$) do composto 2j observaram-se intensa vacuolização do citoplasma, além de inchaço da mitocôndria ocupando quase a totalidade da célula (Figura 2C-D).

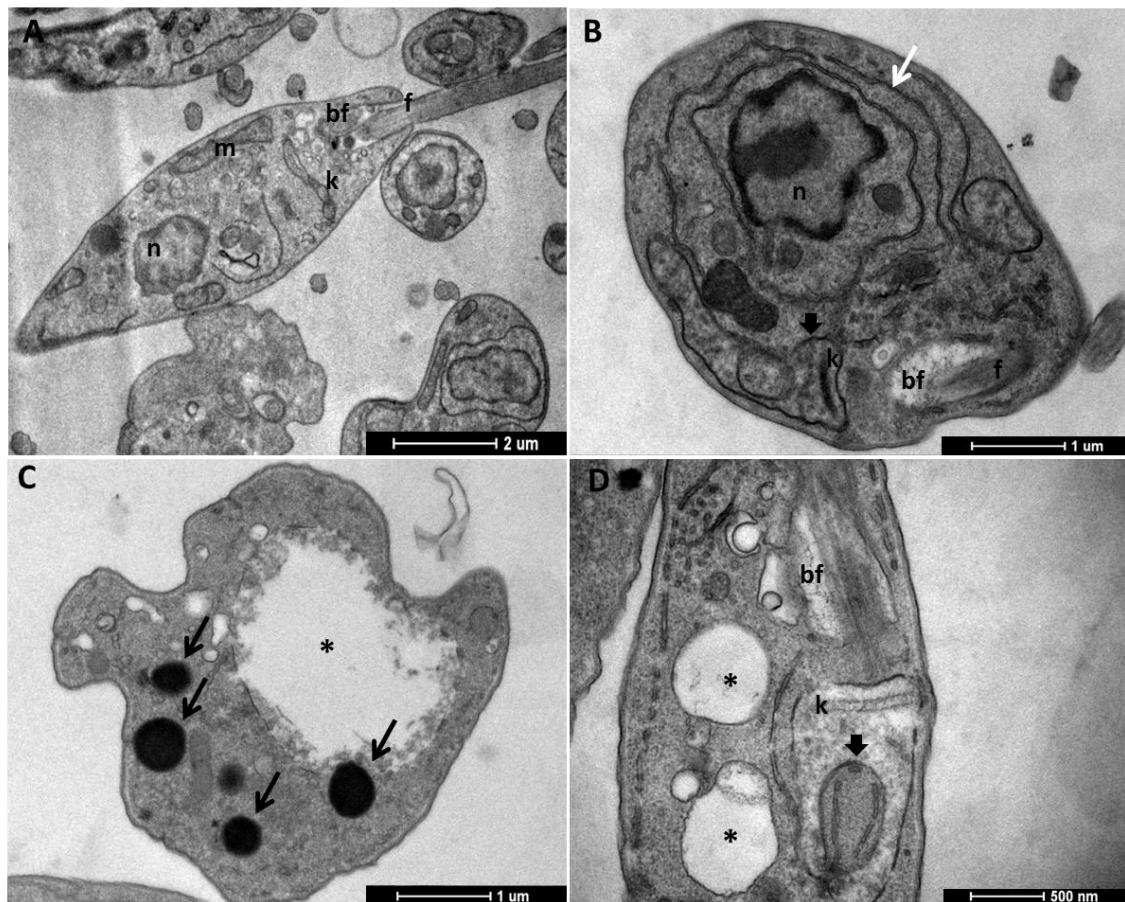
Figura 2. Eletromicrografia de *L. infantum* não tratada e tratada com composto 2j.



(A) Promastigota não tratada, apresentando estrutura normal das organelas como núcleo (n), cinetoplasto (k) e bolsa flagelar (bf). (B) Promastigota tratada com $9.81\mu\text{M}$ do composto 2j é possível notar a presença de grânulos eletrondensos, além do inchaço da mitocôndria. (C-D) Parasitos tratados com $19.62\mu\text{M}$ do composto, em (C) parasitos apresentando intensa vacuolização do citoplasma (*) e (D) a seta mostra a intenso inchaço da mitocôndria (seta larga).

Promastigotas tratadas com $13.87\mu\text{M}$ (IC_{50}) do composto 2m apresentaram perfis de retículo circundando o núcleo e inchaço das mitocôndrias (Figura 3B). Na concentração de $27.74\mu\text{M}$ ($2\times \text{IC}_{50}$) foi observado além da morfologia celular irregular, grande quantidade de inclusões eletrondensas distribuídas no citoplasma e presença de espaços eletrnluscentes (Figura 3C). Espaços eletrnluscentes e alterações na mitocôndria como inchaço e presença de vesícula no seu interior (Figura 3D).

Figura 3. Eletromicrografia de *L. infantum* não tratada e tratada com composto 2m.



(A) Promastigota não tratada, apresentando estrutura normal do núcleo (n) e organelas como cinetoplasto (k), mitocôndria (m), bolsa flagelar (bf), flagelo (f). (B) Promastigota tratada com 13.87 μ M do composto mostrando perfis de retículo (seta) ao redor do núcleo. Também é possível notar o inchaço na mitocôndria (seta larga). (C-D) Promastigotas tratadas com 27.74 μ M. (C) Presença de um grande espaço eletrnluscente (*) e a presença de corpos eletrondensos (seta). (D) Detalhe do promastigota apresentando espaço eletrnluscente e inchaço da mitocôndria com presença de vesícula no seu interior (seta larga).

Discussão

No *screening* realizado com os 15 compostos sintéticos (1 e 2a-n) sobre promastigotas de *L. infantum* foi observado que a maioria dos compostos apresentou atividade leishmanicida e as melhores atividades foram observadas nos compostos que possuem o radical fenil (Ph) na porção C4 do anel tiazol. Já os compostos que não possuem este radical (1 e 2a) apresentaram menor ação leishmanicida. Esse resultado sugere que a ciclização e a presença de grupamentos volumosos substituindo o anel tiazol está envolvido na atividade leishmanicida. Pinto et al. (2014) estudando o potencial de Naftoquinonas contra *L. infantum* verificaram que os compostos mais promissores apresentaram dois grupos fenil como radical. A presença deste radical torna o composto mais hidrofóbico e isto facilita a penetração do composto na membrana do parasito (28).

A série 2a-n aqui em estudo apresenta variações na substituição da posição C4 do tiazol e estas provocaram diferenças na atividade leishmanicida. De acordo com Hernandez et al. (2010), a utilização de substituintes halogenados contribui para a estabilidade da ligação fármaco-receptor. Este fato pode justificar a diferença na atividade leishmanicida dos compostos testados (29). Como por exemplo, as substituições duplas feitas com cloro (2l e 2m) parecem influenciar nos resultados (Tabela 2). O composto 3,4-dicloro (2l) se mostrou menos ativo, enquanto o composto 2,4-dicloro (2m) apresentou maior atividade leishmanicida. Resultado similar ao estudo de Gomes et al. (2016), onde foi avaliada esta mesma série de compostos ftalimido-tiazol sobre *Trypanosoma cruzi*. Os autores observam que a orientação do substituinte influenciou na atividade contra o parasito, sugerindo que a orientação do substituinte seja importante para a atividade (26).

O composto 2j apresentou a maior ação leishmanicida, na estrutura química deste composto está presente um substituinte volumoso, o 2-naftil. Esses dados também corroboram o trabalho de Gomes et al. (2016), visto que o composto 2j também foi o mais ativo contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (26). Manda et al. (2014), testando Alcalóides β - carbonila contra *Leishmania donovani*, demonstraram que um dos compostos mais promissores da sua série possuía um radical naftil em sua estrutura. Diante da maior atividade de compostos que possuíam o substituinte naftil, sugerimos que este possa estar envolvido com a ação contra os tripanosomatídeos testados (30).

Para escolha de composto com potencial quimioterápico deve-se levar em consideração sua ação frente ao microrganismo, assim como, a sua citotoxicidade. Em nossos

estudos a baixa toxicidade dos compostos em relação às células de mamíferos teve um reflexo direto nos valores do índice de seletividade (IS), todos os derivados testados foram mais seletivos para *L. infantum* quando comparadas as células vero e macrófagos J774. Santiago et al. (2014) testando uma série de ftalimido-tiazóis em esplenócitos de camundongos BALB/c também observaram baixo efeito citotóxico mostrando que mesmo em diferentes tipos celulares os compostos apresentaram baixa citotoxicidade (24). Os autores também observaram as alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitos devido a ação direta dos compostos.

No presente estudo, foram selecionados compostos 2j e 2m por terem sido os que apresentaram maior atividade leishmanicida com baixa citotoxicidade às células de mamíferos para investigar os seus efeitos morfológicos e ultraestruturais.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que os parasitos tratados com os compostos 2j e 2m apresentaram alterações como parasitos com encolhimento do corpo celular e encurtamento do flagelo. Achados similares aos trabalhos de Aliança et al., (2014), Gomes et al. (2016), Oliveira et al. (2009) demonstraram que seus compostos também causavam essas alterações na morfologia do parasito (27, 26, 31). Muitas das alterações morfológicas que os parasitos apresentaram estão relacionadas com perda da viabilidade e morte celular dos mesmos (32).

A ação dos compostos ftalimido-tiazóis 2j e 2m sobre a ultraestrutura das promastigotas foram semelhantes, apresentando de um modo geral vacuolização do citoplasma, grande quantidade de inclusões eletrondensas, perfis de membranas (semelhantes ao retículo endoplasmático) circundando organelas e inchaço da mitocôndria. Kaczanowski et al. (2011) descreveram alterações da morfologia celular e vacuolizações do citoplasma como características de morte celular por apoptose, em organismos eucariotos, semelhante ao que foi encontrado em nosso estudo. Porém, em nosso estudo, não podemos confirmar a morte celular programada, uma vez que não utilizamos marcadores específicos para apoptose.

A literatura mostra que alguns fármacos, além de terem atividade diretamente contra o parasito, também induzem a resposta imune do hospedeiro. Um dos principais mecanismos de defesa imune celular contra os tripanossomatídeos é o aumento da produção de óxido nítrico pelas células do sistema monocítico fagocitário (33). Os nossos resultados mostraram que a maioria dos compostos testados causou alterações significativas no aumento da produção de Oxido Nítrico (ON) pelos macrófagos J774 e células vero tratadas com os compostos

ftalimido-tiazóis quando comparados com o controle sem tratamento. Ghosh et al. (2013) mostraram que a produção de ON a partir de macrófagos tratados com os fármacos Miltefosina, Anfotericina B e Paromicina, utilizados no tratamento das leishmanioses, é necessária para sua atividade leishmanicida, uma vez que este é um dos mecanismos utilizados pelas células fagocíticas no combate ao parasito (34). Possivelmente, os compostos ftalimido-tiazóis por induzirem um aumento na produção de ON, favorecendo uma melhor resposta dos macrófagos contra a *L. infantum*.

Em suma, nossos resultados indicam que os ftalimido-tiazóis, especialmente aqueles que contêm substituintes aromáticos, são agentes antiparasitários e foram mais potentes do que os análogos não tiazólico (1) e não aril-substituído (2a). Estes compostos mostraram substanciais propriedades leishmanicida contra *L. infantum*, com alterações celulares constatadas microscopicamente, baixa toxicidade frente a células vero e macrófagos J774, e indutores da produção de óxido nítrico.

O presente estudo revelou 2j e 2m como os compostos mais promissores para a atividade em estudo, o que sugere a utilização destes como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas. Os presentes resultados fornecem uma base sólida para mais estudos aprofundados das propriedades anti-*Leishmania* de ftalimidas e tiazóis, particularmente derivados híbridos destes núcleos heterocíclicos. É também importante que, em vista dos resultados obtidos, outros testes biológicos sejam desenvolvidos para lançar luz sobre o mecanismo de ação leishmanicida.

Referências

1. **Cavalcanti da Silva E, Dias Rayol C, Lys Medeiros P, Figueiredo RCBQ, Piuvezan MR, Brabosa-Filho JM, Fernandes Marinho A, Silva TG, Militão GCG, Pimentel Cassilhas AP, Paes de Andrade P.** 2012. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Sci World J* **2012**:1–5.
2. **Marín C, Ramírez-Macías I, Rosales MJ, Muro B, Reviriego F, Navarro P, Arán VJ, Sánchez-Moreno M.** 2015. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. *Acta Trop* **148**:170–178.
3. **Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB,**

- Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC.** 2008. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitol Res* **103**:1–10.
4. **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.
 5. **Espuelas S, Plano D, Nguewa P, Font M, Palop J a., Irache JM, Sanmartin C.** 2012. Innovative Lead Compounds and Formulation Strategies As Newer Kinetoplastid Therapies. *Curr Med Chem* **19**:4259–4288.
 6. **Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P.** 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* **110**:1065–78.
 7. **Cardoso MVDO, Siqueira LRP De, Silva EB Da, Costa LB, Hernandez MZ, Rabello MM, Ferreira RS, Cruz LF da, Moreira DRM, Pereira VRA, Castro MCAB de, Bernhardt P V, Leite ACL.** 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. *Eur J Med Chem* **86**:48–59.
 8. **Hernandes MZ, Rabello MM, Leite ACL, Cardoso MVO, Moreira DRM, Brondani DJ, Simone CA, Reis LC, Souza MA, Pereira VRA, Ferreira RS, McKerrow JH.** 2010. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. *Bioorg Med Chem* **18**:7826–7835.
 9. **Leite ACL, de Lima RS, Moreira DR de M, Cardoso MV de O, Gouveia de Brito AC, Farias dos Santos LM, Hernandez MZ, Kiperstok AC, de Lima RS, Soares MBP.** 2006. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi. *Bioorganic Med Chem* **14**:3749–3757.
 10. **Leite ACL, de M. Moreira DR, de O. Cardoso MV, Hernandez MZ, Alves Pereira VR, Silva RO, Kiperstok AC, da S. Lima M, Soares MBP.** 2007. Synthesis, Cruzain Docking, and in vitro Studies of Aryl-4-Oxothiazolylhydrazones Against Trypanosoma cruzi. *ChemMedChem* **2**:1339–1345.

11. **Pontes Espíndola JW, de Oliveira Cardoso MV, de Oliveira Filho GB, Oliveira e Silva DA, Magalhaes Moreira DR, Bastos TM, de Simone CA, Soares MBP, Villela FS, Ferreira RS, de Castro MCAB, Pereira VRA, Murta SMF, Sales Junior PA, Romanha AJ, Leite ACL.** 2015. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of a New Series of Antiparasitic Aryloxyl Thiosemicarbazones Inhibiting *T. cruzi* cruzain. *Eur J Med Chem* **101**:818–835.
12. **de Oliveira Filho GB, de Oliveira Cardoso MV, Espíndola JWP, Ferreira LFGR, de Simone CA, Ferreira RS, Coelho PL, Meira CS, Moreira DRM, Soares MBP, Leite ACL.** 2015. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* **23**:–.
13. **Alanazi AM, El-azab AS, Al-suwaidan IA, Eldin K, Eltahir H, Asiri YA, Abdel-aziz NI, Abdel-aziz AA.** 2015. European Journal of Medicinal Chemistry Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors : Anti-in fl ammatory and analgesic activities **92**:115–123.
14. **Kaminski K, Obniska J, Wiklik B, Atamanyuk D.** 2011. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. *Eur J Med Chem* **46**:4634–4641.
15. **Akgun H, Karamelekoglu I, Berk B, Kurnaz I, Saribiyik G, Oktem S, Kocagoz T.** 2012. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. *Bioorganic Med Chem* **20**:4149–4154.
16. **Abdel-Aziz AAM, El-Azab AS, Attia SM, Al-Obaid AM, Al-Omar MA, El-Subbagh HI.** 2011. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. *Eur J Med Chem* **46**:4324–4329.
17. **Singh AK, Rajendran V, Pant A, Ghosh PC, Singh N, Latha N, Garg S, Pandey KC, Singh BK, Rathi B.** 2015. Design, synthesis and biological evaluation of functionalized phthalimides: A new class of antimalarials and inhibitors of falcipain-2, a major hemoglobinase of malaria parasite. *Bioorganic Med Chem* **23**:1817–1827.
18. **Williams R, Manka JT, Rodriguez AL, Vinson PN, Niswender CM, Weaver CD, Jones CK, Conn PJ, Lindsley CW, Stauffer SR.** 2011. Synthesis and SAR of centrally active mGlu5 positive allosteric modulators based on an aryl acetylenic

bicyclic lactam scaffold. *Bioorganic Med Chem Lett* **21**:1350–1353.

19. **Leite ACL, Barbosa FF, Cardoso MV de O, Moreira DRM, Coelho LCD, da Silva EB, Filho GB de O, de Souza VMO, Pereira VRA, de C. Reis L, Ferreira PMP, Pessoa C, Wanderley AG, Mota FVB, da Silva TG.** 2013. Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes. *Med Chem Res* 1–8.
20. **De Oliveira Cardoso MV, Magalhães Moreira DR, Oliveira Filho GB, Tiburcio Cavalcanti SM, Duarte Coelho LC, Pontes Espíndola JW, Rubio Gonzalez L, Montenegro Rabello M, Zaldini Hernandez M, Pinheiro Ferreira PM, Pessoa C, De Simone CA, Teixeira Guimarães E, Pereira Soares MB, Lima Leite AC.** 2015. Design, synthesis and structure - Activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. *Eur J Med Chem* **96**:491–503.
21. **Coêlho LCD, Cardoso MVDO, Moreira DRM, Gomes PATDM, Cavalcanti SMT, Oliveira AR, Filho GBDO, Siqueira LRP De, Barbosa MDO, Borba EFDO, Silva TG Da, Kaskow B, Karimi M, Abraham LJ, Leite ACL.** 2014. Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties. *Medchemcomm* **5**:758.
22. **Pessoa C, Ferreira PMP, Lotufo LVC, DeMoraes MO, Cavalcanti SMT, Coêlho LCD, Hernandez MZ, Leite ACL, DeSimone CA, Costa VMA, Souza VMO.** 2010. Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes. *ChemMedChem* **5**:523–528.
23. **Da Costa PM, Da Costa MP, Carvalho AA, Cavalcanti SMT, De Oliveira Cardoso MV, De Oliveira Filho GB, De Araujo Viana D, Fachine-Jamacaru FV, Leite ACL, De Moraes MO, Pessoa C, Ferreira PMP.** 2015. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chem Biol Interact* **239**:174–183.
24. **Santiago EDF, Oliveira A De, Oliveira B De, Magalhaes R.** 2014. Evaluation of the Anti- *Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. *J Antimicrob Agents Chemother* **58**:352–363.
25. **Cardosoa M, Hernandez M, Moreira D, Pontes F, Simone C, Leite A.** 2015. Structural Insights Into Bioactive Thiazolidin-4-one: Experimental and Theoretical

- Data. *Lett Org Chem* **12**:262–270.
26. **Gomes PAT de M, Oliveira AR, de Oliveira Cardoso MV, de Farias Santiago E, de Oliveira Barbosa M, de Siqueira LRP, Moreira DRM, Bastos TM, Brayner FA, Soares MBP, de Oliveira Mendes AP, de Castro MCAB, Alves Pereira VR, Leite ACL.** 2016. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 1–12.
 27. **Aliança A, Anjos K, de Vasconcelos Reis T, Higino T, Brelaz-de-Castro M, Bianco É, de Figueiredo R.** 2014. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* **19**:14052–14065.
 28. **Pinto EG, Santos IO, Schmidt TJ, Borborema SET, Ferreira VF, Rocha DR, Tempone AG.** 2014. Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships. *PLoS One* **9**:e105127.
 29. **Hernandes MZ, Cavalcanti SMT, Moreira DRM, de Azevedo Junior WF, Leite ACL.** 2010. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr Drug Targets* **11**:303–314.
 30. **Manda S, Khan SI, Jain SK, Mohammed S, Tekwani BL, Khan I a., Vishwakarma R a., Bharate SB.** 2014. Synthesis, antileishmanial and antitrypanosomal activities of N-substituted tetrahydro- β -carboline. *Bioorganic Med Chem Lett* **24**:3247–3250.
 31. **Oliveira VCS, Moura DMS, Lopes JAD, De Andrade PP, Da Silva NH, Figueiredo RCBQ.** 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol Res* **104**:1053–1059.
 32. **Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, de Castro SL.** 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* **40**:157–68.
 33. **Carneiro P, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho E, Bacellar O.** 2016.

- The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One* **11**:1–2.
34. **Ghosh M, Roy K, Roy S.** 2013. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *J Antimicrob Chemother* **68**:2834–2838.

5.2 Potencial *in vitro* de 2-(4-(naftalen-2-il)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona e 2-(4-(2,4-diclorofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona frente a *Leishmania infantum*

1. Introdução

A relevância epidemiológica da leishmaniose visceral (LV), causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, como doença negligenciada aumentou significativamente na América Latina e especialmente no Brasil, onde ocorrem 90% dos casos (Barros et al., 2015).

Os principais fármacos (Estibogluconato de Sódio e Antimoniato de Meglumina) utilizados no tratamento da LV têm sido usadas como drogas de escolha há décadas apesar dos seus severos efeitos colaterais (Sundar, 2015). Outros fármacos como miltefosina e anfotericina B têm mostrado resultados promissores, mas elas também podem causar efeitos secundários que limitam sua utilização (Da Luz et al., 2015). Neste cenário, é urgente a necessidade de descoberta de novos agentes leishmanicidas com eficácia maior e menos efeitos colaterais.

Diante disso, as classes Ftalimida e Tiazol, que são núcleos farmacofóricos importantes na química medicinal, possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas como atividade antitumoral (Turan-Zitouni et al., 2016), antioxidante e anti-inflamatório (Lamie et al., 2015), antifúngica (De Monte et al., 2016), antimicrobiana (Van Der Westhuyzen et al., 2015), antiviral (Stachulski et al., 2011) e antiprotozoário (Cardoso et al., 2014; Gomes et al., 2016).

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo demonstraram a atividade tripanocida e leishmanicida de uma nova série sintetizada de compostos ftalimido-thiazol (Gomes et al., 2016). Desta série, os derivados testados frente a promastigotas de *Leishmania infantum*, os compostos 2-(4-(naftalen-2-il)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2j) e 2-(4-(2,4-diclorofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2m) foram identificados como os mais promissores da série, por apresentarem as melhores atividades leishmanicidas e por não serem tóxicos às células de mamíferos. Sabendo que um fármaco com potencial leishmanicida deve apresentar ação contra a forma amastigota, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação desses dois compostos sobre a forma amastigota intracelular, determinar a produção de

óxido nítrico por macrófagos infectados com *L. infantum*, além de avaliar o potencial da membrana mitocondrial e a integridade da membrana plasmática em promastigota, tratados com os compostos.

2. Materiais e métodos

2.1. Derivados ftalimido-tiazóis

Os compostos 2j e 2m foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para obter uma solução estoque a 5mg/mL e esta solução foi dissolvida em meio de cultura (RPMI-1640 ou Schneider) adequado para cada ensaio, obtendo uma solução final com uma concentração de DMSO não tóxica ao parasito e nem as células de mamíferos. O preparo da solução final foi realizado sempre no momento da montagem do experimento para garantir a estabilidade dos compostos.

2.2. Cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/BH46) foram mantidas a 26°C em meio de cultura Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). As formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas infectivas em culturas de macrófagos peritoneais e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos conforme é descrito abaixo.

2.3. Ensaio de Citotoxicidade

Macrófagos peritoneais foram obtidos após injeção de 5mL de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) na cavidade peritoneal de fêmeas de camundongos BALB/c. Para determinar a citotoxicidade dos compostos, os macrófagos peritoneais foram semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubados a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 3 horas. Os macrófagos foram tratados com concentrações crescentes (de 17-270µM para o composto 2j e de 16-260µM para o composto 2m) dos compostos. A viabilidade foi determinada utilizando o método do MTT (Aliança et al., 2014). A concentração capaz de causar a perda de

viabilidade em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão linear. O Índice de Seletividade (IS) foi determinado considerando a seguinte equação: CC₅₀ macrófagos peritoneais/IC₅₀ parasitos.

2.4. Atividade biológica *in vitro* sobre as formas amastigotas intracelulares

Para avaliar os efeitos dos compostos sobre formas amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais, em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), foram distribuídos em placas de cultura com lamínulas redondas na parte inferior a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas por 3 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* por 3 horas, numa proporção de 10:1. Após o tempo de infecção as células foram lavadas para remover os parasitos não internalizados. As amastigotas intracelulares foram tratadas com o derivado 2j nas concentrações de 4.90 a 19.62 µM e o derivado 2m nas concentrações 6.94 a 27.74 µM e incubados por 24 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 horas de cultivo por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A Anfotericina B foi utilizada como controle.

2.5. Determinação da produção de Óxido Nítrico (ON)

A produção de ON foi mensurada no sobrenadante dos experimentos relacionados ao efeito citotóxico dos compostos 2j e 2m apenas em macrófagos e sobre macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com os compostos. A avaliação foi realizada após o tempo de incubação adequado a cada experimento utilizando o método de Griess. O sobrenadante das culturas de células (100 µL) foi incubado com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% *N*-(1-naftil)-etileno diamina dihidroclorato/2.5% H₃PO₄) por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida com um filtro de 540nm no leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, PA, USA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (Aliança et al., 2014).

2.6. Avaliação da Integridade da Membrana

Parasitas tratados com os compostos 2j e 2m e controles foram incubados com 30 µg/mL Iodeto de Propídio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) por 15 minutos. Como controle positivo as células foram incubadas com peróxido de Hidrogênio (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) por 20 minutos. Células não tratadas também foram avaliadas. Ao final do tempo de incubação com o marcador, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Os dados foram obtidos, utilizando o canal FL2-H. Foram analisados 20.000 eventos por amostra. Os resultados da marcação com IP foram expressos como porcentagem de células marcadas em cada situação testada.

Amostras obtidas como descrito acima foram também analisadas por microscopia confocal a laser (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, GER). Ao final do tempo de incubação, as amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., USA) no momento da visualização das células ao microscópio. As imagens foram adquiridas usando o laser 488nm.

2.7. Análise do Potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para determinar o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi_m$, promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com o derivado 2j nas concentrações de 9.81 e 19.62µM e o derivado 2m nas concentrações 13.87 e 27.74µM por 72 horas. Após o tratamento os parasitos tratados e controles foram incubados com 10µg/mL rodamina 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) por 15 minutos. Como controle negativo, as células foram tratadas com metanol P.A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) por 20 minutos. Células não tratadas também foram avaliadas. Ao final do tempo de incubação as amostras foram colocadas em tubos apropriados para as análises no citômetro de fluxo. A obtenção e análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipado com o software Cell Quest, utilizando canal FL1-H. Foram analisados 20.000 eventos por amostra. Alterações na polarização da membrana mitocôndria foram medidas através do índice de variação (IV) obtido pela equação $(MT-MC) / MC$, onde MC é a mediana de intensidade de fluorescência do controle e MT a mediana de fluorescência das células tratadas. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (Aliança et al., 2014).

Amostras obtidas como descrito acima foram também analisadas por microscopia confocal a laser (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, GER). Ao final do tempo de incubação, as

amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., USA) no momento da visualização das células ao microscópio. As imagens foram adquiridas usando o laser 543nm.

2.8. Análises estatísticas

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

2.9. Considerações éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/Pernambuco sob o número de protocolo 30/2011.

3. Resultados

3.1. Efeito dos derivados ftalimido-tiazol sobre a citotoxicidade

A partir da análise de citotoxicidade em macrófagos peritoneais tratados com os compostos 2j e 2m através da técnica do MTT observou-se que as concentrações que foram citotóxicas a 50% dos macrófagos (CC_{50}) variaram entre $362.7 \pm 18 \mu M$ para o composto 2j e $263.6 \pm 19 \mu M$ para o composto 2m. A anfotericina B mostrou-se mais tóxica aos macrófagos, apresentando valor de $CC_{50} 74.9 \pm 9.5 \mu M$. A toxicidade dos compostos foi comparada com a atividade frente a formas amastigotas para determinar o Índice de Seletividade (IS). Nossos resultados demonstram que o composto 2j foi 24 vezes mais tóxico para as amastigotas do que para as células de mamíferos ($IS=23.8$). Já o composto 2m se mostrou 12 vezes mais tóxico para as amastigotas ($IS=11.8$) (Tabela 1).

Tabela 1

Atividade leishmanicida, efeitos citotóxicos contra macrófagos peritoneais e Índice de seletividade dos compostos 2j e 2m.

Compostos	Macrófagos	Amastigotas intracelulares	
	CC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IS
2j	362.66 $\pm$ 18	15.20 $\pm$ 0.7	23.8
2m	263.64 $\pm$ 19	22.33 $\pm$ 0.3	11.8
AmB	74.86 $\pm$ 9.5	2.1 $\pm$ 0.1	35.6

IS (Índice de seletividade) = CC₅₀/IC₅₀.

3.2. Ação dos compostos sobre as formas amastigotas intracelulares

Nossos dados demonstram que os compostos inibiram significativamente ($p < 0.05$) a sobrevivência das formas amastigotas dentro dos macrófagos peritoneais, apresentando redução significativa, para o composto 2j, nas concentrações de 9.81 e 19.62 μ M (Fig. 1A). Já para o composto 2m, as três (6.9, 13.9 e 27.7 μ M) concentrações testadas apresentaram redução significativa da sobrevivência das amastigotas (Fig. 1B). A concentração necessária para reduzir em 50% a porcentagem de macrófagos infectados foi de 15.20 μ M para o composto 2j e 22.33 μ M para o 2m (Tabela 1).

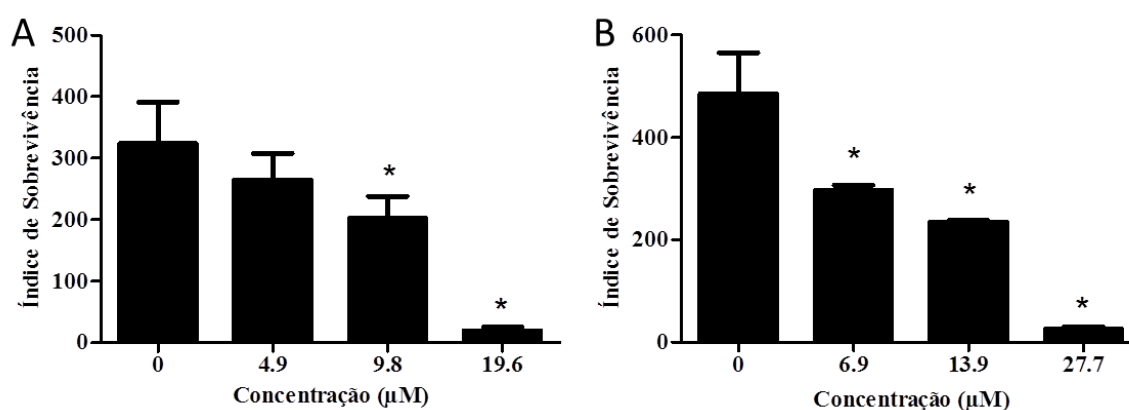


Fig. 1. Índice de sobrevivência de *Leishmania infantum* em macrófagos após 24 horas de tratamento com os compostos 2j (A) e 2m (B). Os valores representam a média de dois

experimentos em duplicata biológica e quadruplicata técnica $\pm$ desvio padrão. * Corresponde a valores significativos $p < 0.05$.

Comparando os grupos tratados e não tratado, o número médio de parasitos por macrófagos, diminuiu no tratamento com ambos os compostos (2j e 2m). Esta redução foi significativa para a concentração de $19.6\mu\text{M}$ do composto 2j. O composto 2m foi capaz de reduzir significativamente o número médio de parasitos internalizados nas três concentrações testadas (6.9 , 13.9 e $27.7\mu\text{M}$) (Fig. 2).

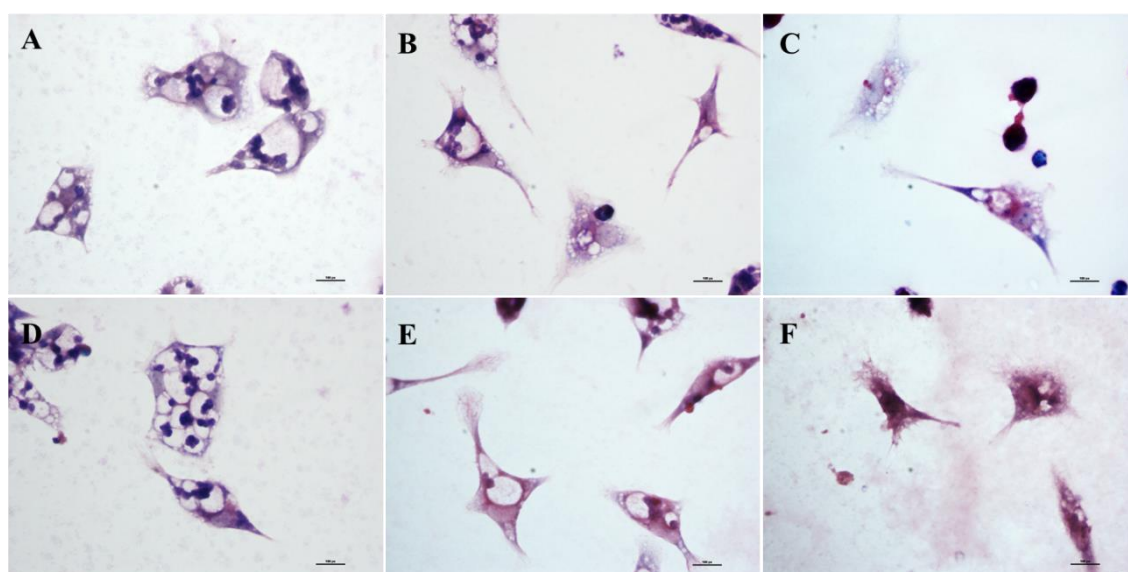


Fig. 2. Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. infantum* e tratados com os compostos 2j e 2m por 24 horas. (A e D) Células não tratadas. (B) células tratadas com $4.90\mu\text{M}$ do composto 2j. (C) células tratadas com $19.62\mu\text{M}$ do composto 2j. (E) Promastigotas tratadas $6.94\mu\text{M}$ do composto 2m. (F) Promastigotas tratadas $27.74\mu\text{M}$ do composto 2m.

3.3. Efeito dos compostos ftalimido-tiazol sobre a produção de Óxido Nítrico (ON)

Quando comparados os grupos de macrófagos tratados e não tratados, diferenças significativas nos níveis de ON foram observadas nas duas maiores concentrações testadas do composto 2j (270 e $135\mu\text{M}$) e nas três maiores do composto 2m (260 , 130 e $65\mu\text{M}$). O tratamento com a Anfotericina B não induziu produção significativa de ON pelos macrófagos peritoneais.

No sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *L. infantum*, a produção de ON não foi estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados com os compostos 2j e 2m, além da Anfotericina B, em todas as concentrações testadas.

3.4. Efeito dos compostos sobre a Integridade da Membrana Plasmática

Para avaliar o efeito dos compostos 2m e 2j na integridade da membrana plasmática foi utilizada a marcação com o Iodeto de Propídio (IP) analisadas através da citometria de fluxo e microscopia confocal. Na citometria de fluxo observou-se que as formas promastigotas não tratadas mostraram pouca marcação (0.6%), indicando a viabilidade dessas células com membrana plasmática íntegra, enquanto as células tratadas com o metanol apresentaram 37.03% de células marcadas com IP. Nas células tratadas com os compostos 2j e 2m é possível notar um aumento na porcentagem de células marcadas com o IP, este aumento se mostrou dose-dependente como é possível verificar na tabela 2. O tratamento com 27.74µM do composto 2j, marcou com o IP, aproximadamente 60% das células (Tabela 2 e Fig. 3).

Tabela 2

Efeitos dos compostos 2j e 2m sobre a integridade da membrana plasmática.

Tratamento	IP+ (%)
Controle	0.60
Metanol	37.03
2j (9.8µM)	41.04
2j (19.62µM)	58.11
2m (13.87µM)	20.64
2m (27.74µM)	32.77

IP+: porcentagem de células positivas para o iodeto de propídio.

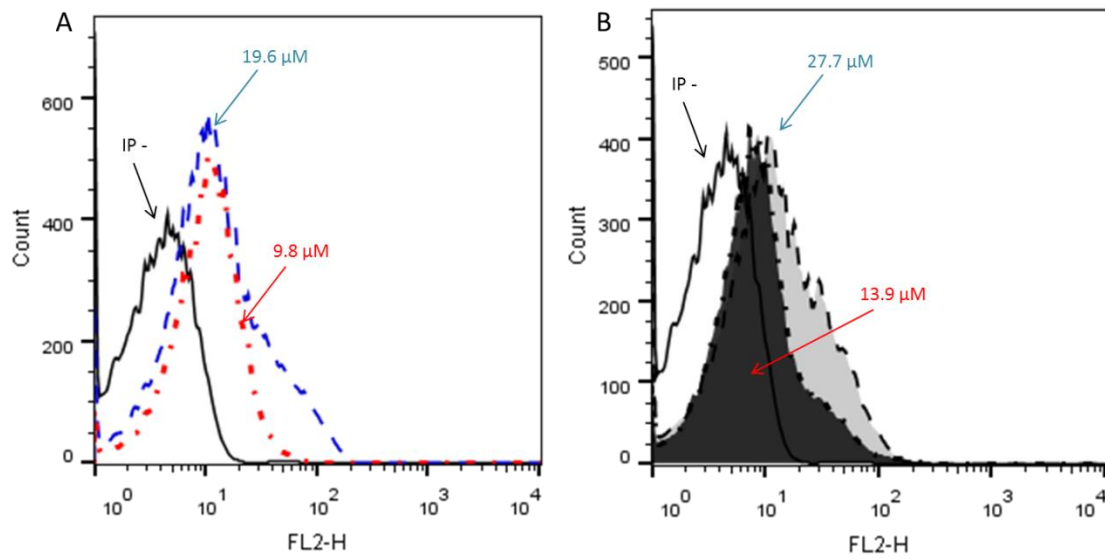


Fig. 3. Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os compostos 2j (A) e 2m (B) sobre a integridade da membrana plasmática.

Os resultados obtidos através da microscopia confocal corroboraram os dados da citometria de fluxo, onde foi possível observar alterações morfológicas das formas promastigotas, tais como, encurtamento do flagelo e arredondamento da célula (Fig. 4).

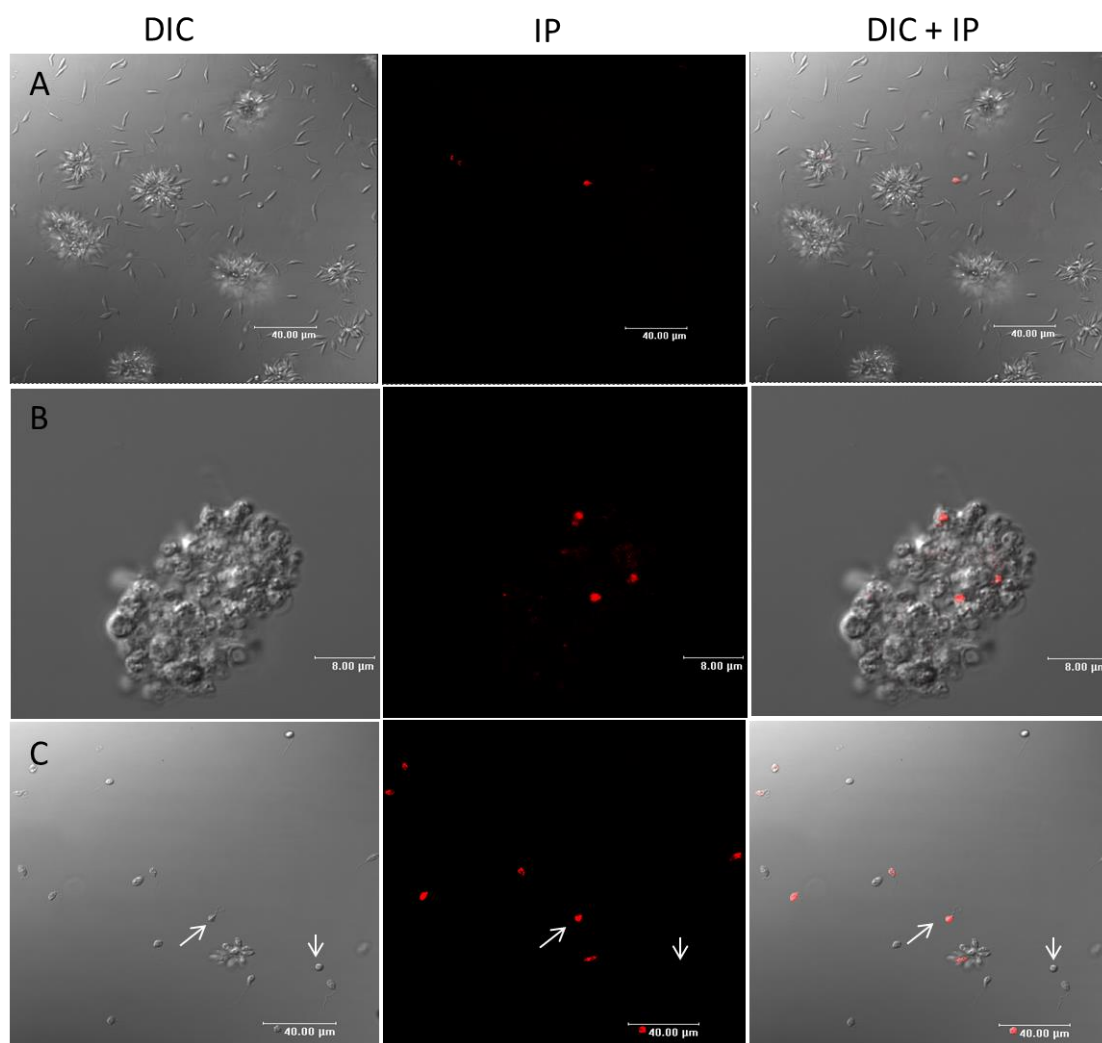


Fig. 4. Microscopia confocal de células controles e tratadas com 2j e 2m, submetidas a marcação com iodeto de propídio. (A) Células não tratadas. (B) células tratadas com 19.62µM do composto 2j. (C) Promastigotas tratadas 27.74µM do composto 2m. Note nas células tratadas a presença de alterações morfológicas (setas) e com fraca ou nenhuma marcação com IP. DIC=Contraste de interferência diferencial (do inglês Differential Interference Contrast); IP=Marcação com iodeto de propídio e DIC + IP=Sobreposição das duas imagens.

3.5. Efeito dos compostos sobre o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

As alterações induzidas pelo composto 2j e 2m no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) estão representadas na tabela 3 e figura 5. É possível observar que promastigotas de *L. infantum* tratadas com concentrações (9.81 e 19.62µM do composto 2j e 13.87 e 27.74µM do composto 2m) dos compostos por 72 horas, diminuiu a intensidade da fluorescência da rodamina 123, observando uma redução do $\Delta\Psi_m$ nas células tratadas com os

compostos (Fig. 5). A redução $\Delta\Psi_m$ também foi quantificada por valores de Índice de Variação (IV). O valor do IV das células tratadas com o 2j causou despolarização, porém não houve alteração dose dependente (-0,62 na concentração de 9.81 μ M e -0,59 na concentração de 19.62 μ M). Células tratadas com o 2m mostraram um valor de IV de -0,36 (na concentração de 13.87 μ M) e -0,50 (na concentração de 27.74 μ M) (Tabela 3). Valores negativos do IV representam diminuição do potencial de membrana.

Tabela 3

Efeito dos compostos 2m e 2j sobre o potencial de membrana.

Tratamento	Rho 123*	IV
Controle	588.21	0
Metanol	98.22	-0.83
2j (9.8 μ M)	220.67	-0.62
2j (19.62 μ M)	239.28	-0.59
2m (13.87 μ M)	378.55	-0.36
2m (27.74 μ M)	294.27	-0.50

IV- Índice de Variação= $MT-MC/MC$, onde MT é a intensidade média de fluorescência das células tratadas; MC é a média de fluorescência das células não tratadas. Nota: * Mediana da intensidade de fluorescência para rodamina 123 (Rho 123).

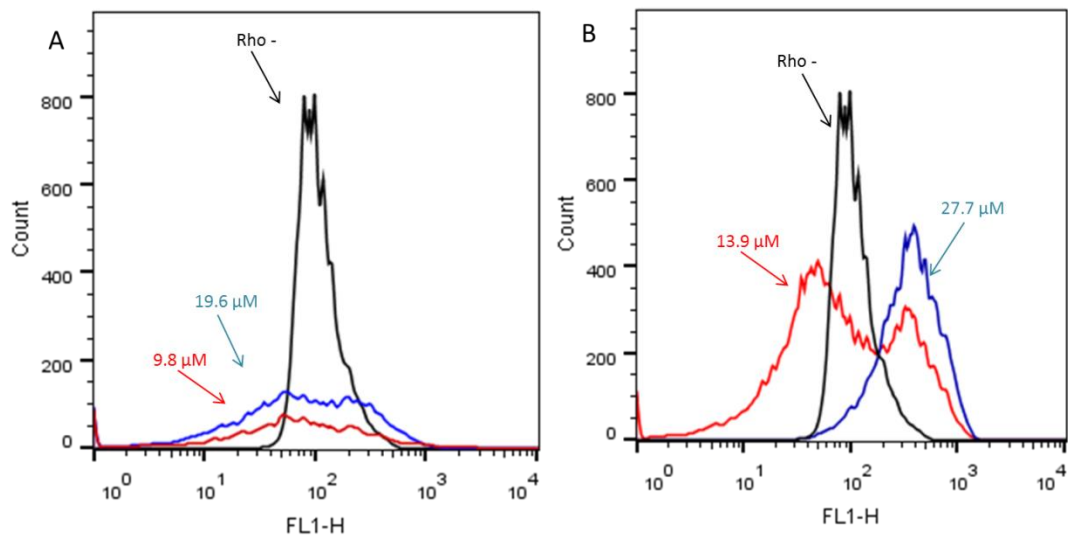


Fig. 5. Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os compostos 2j (A) e 2m (B) sobre o potencial da membrana mitocondrial. Nota: Rho⁻ (Rodamina negativa)

A alteração do $\Delta\Psi_m$ também foi visualizada por microscopia confocal. As imagens dos parasitos tratados e controles corroboram os dados da citometria de fluxo, evidenciando a perda da intensidade da marcação da rodamina 123 nas células morfológicamente alteradas (Fig. 6).

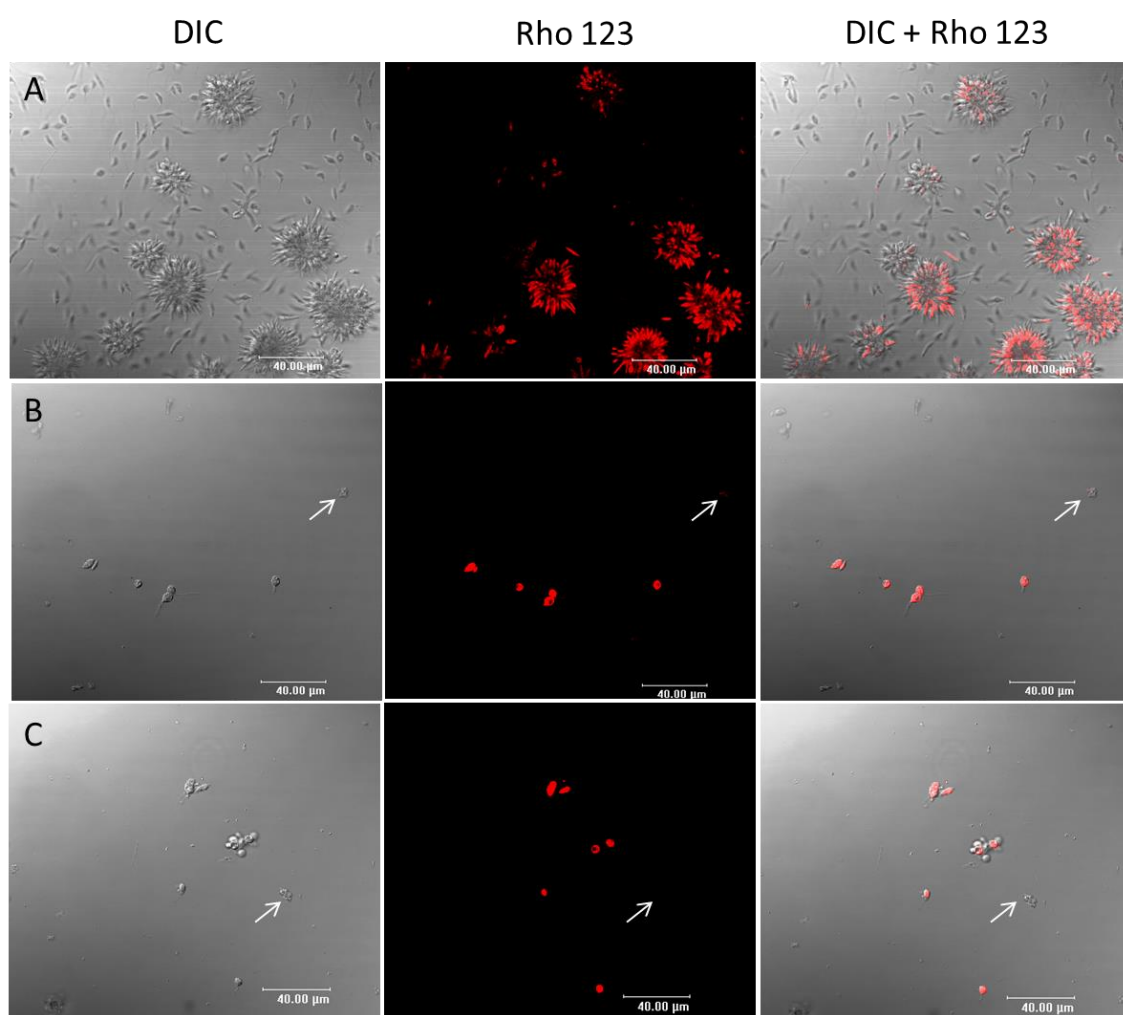


Fig. 6. Microscopia confocal de células controles e tratadas com 2j e 2m, submetidas a marcação com Rho 123. (A) Células controles apresentaram morfologia e intensidade de marcação com Rho 123 preservadas. (B) Células tratadas com 19.62 μ M do composto 2j. (C) Promastigotas tratadas 27.74 μ M do composto 2m. Note nas células tratadas a presença de alterações morfológicas (setas) e com fraca ou nenhuma marcação com Rho 123. DIC=Contraste de interferência diferencial (do inglês Differential Interference Contrast); Rho 123=Marcação com rodamina 123 e DIC + Rho=Sobreposição das duas imagens.

4. Discussão e conclusão

Um importante critério na pesquisa de novos fármacos com atividade leishmanicida é a baixa citotoxicidade às células de mamíferos (Bhargava; Singh, 2012). A respeito disso, em nosso estudo, foi avaliado o potencial citotóxico dos compostos 2j e 2m sobre macrófagos

peritoneais e observou-se que os dois compostos apresentaram baixa toxicidade (CC_{50} 2j= 362.7 μ M; CC_{50} 2m= 263.6 μ M). Quando comparados com a droga de referência, Anfotericina B (CC_{50} AmB= 74.9 μ M), os compostos testados, apresentaram menor toxicidade para macrófagos.

Os dados concordam em parte com os achados de Gomes et al. (2016), que trabalhando com a série a qual pertencem os compostos 2j e 2m, avaliaram a citotoxicidade em esplenócitos de camundongos BALB/c e observaram que o composto 2j apresentou baixa toxicidade (CC_{50} = 269.2 μ M). No entanto, o 2m mostrou-se citotóxico aos esplenócitos (CC_{50} = 12.8 μ M). Em outro trabalho do grupo (dados não publicados), a mesma série foi testada frente a outros tipos de células de mamíferos e os compostos 2j e 2m também apresentaram baixa toxicidade. Esses dados demonstram que existe diferença no nível de toxicidade dos compostos quando testados frente a tipos celulares distintos, mesmo com essa diferença o composto 2j mostrou ser menos tóxico as diferentes células de mamíferos testadas, fazendo com que este composto possa ser um bom candidato a fármaco com atividade leishmanicida.

Nas pesquisas de novos medicamentos com atividade leishmanicida, além de avaliar a citotoxicidade sobre células de mamíferos é importante os estudos com as amastigotas intracelulares, uma vez que essa forma parasitária é responsável pelas manifestações clínicas da leishmaniose (Kima, 2007). Nossos resultados demonstraram que os compostos 2j e 2m diminuíram significativamente o índice de sobrevivência das formas amastigotas intracelulares, com valores de IC_{50} após 24 horas de tratamento de 15.20 μ M para o composto 2j e 22.33 μ M para o composto 2m. Rottini et al. (2015), avaliaram o efeito do composto (-) α -bisabolol sobre as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, eles observaram que o composto foi capaz de reduzir o índice de sobrevivência das amastigotas intracelulares. Marín et al. (2015) estudaram derivados Nitroindazoles sobre *L. infantum* e *L. braziliensis* e observaram que o derivado tem efeito sobre as formas amastigotas intracelulares. Assim como nos trabalhos de Rottini et al. (2015) e Marín et al. (2015), os compostos 2j e 2m também reduziram a sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos. Demonstrando que os nossos compostos são efetivos contra esta forma do parasito.

Macrófagos infectados com *Leishmania* spp. usam o Óxido Nítrico (ON) como mecanismo de defesa. O ON é produzido pela indução da óxido nítrico sintase e é essencial para a destruição intracelular de *Leishmania* em macrófagos (Mello et al., 2014). Além disso,

mesmo não infectados, os macrófagos são capazes de aumentar a produção de ON quando submetidos a ação substâncias indutoras. A análise da produção de ON por macrófagos não infectados, tratados com os compostos, 2j e 2m, em concentrações acima de 65 μ M, mostrou aumento na produção de ON, enquanto a Anfotericina B, não induziu a produção do ON pelos macrófagos. Nos macrófagos infectados com *L. infantum* e submetidos ao tratamento com os compostos, 2j e 2m em concentrações de 28 a 1.4 μ M, não houve aumento significativo na produção de ON. Porém, foram observados índices reduzidos da infecção, sugerindo que neste caso, os compostos podem agir na eliminação dos parasitos intracelulares através de outro mecanismo de ação. Pois, de acordo com Singh et al. (2012), a produção de ON não é a única via que os macrófagos possuem para destruição celular, outros recursos, como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, produção de várias citocinas Th1, lisozimas e outras moléculas microbidas são utilizadas para destruição do parasito no seu interior.

Tendo em vista que os compostos se mostraram promissores como drogas leishmanicidas, foram realizadas análises para detectar possíveis alvos dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. infantum*. Para avaliar a extensão dos danos causados a membrana plasmática na população de parasitos tratados com os compostos 2j e 2m utilizou-se a marcação com o iodeto de propídio (IP), o qual é um corante com afinidade por ácidos nucleicos, impermeável às células íntegras. Foi observado um aumento considerável do número de células marcadas com o IP através da citometria e também da microscopia confocal. Através da microscopia confocal foi possível observar algumas células com morfologias alteradas e com pouca ou nenhuma marcação com o IP, porém não foram observadas células com características de extravasamento do material citoplasmático. É possível que os compostos estejam atuando sobre propriedades físico-químicas da membrana interferindo na sua permeabilidade e permitindo a marcação sem ruptura da mesma. Resultados similares foram obtidos por Oliveira et al. (2009) testando óleos essenciais de plantas usadas na medicina popular frente a *L. infantum*, onde também foi observado aumento do número de células marcadas com IP, e através da microscopia eletrônica de transmissão não foram observadas alterações na membrana da *L. infantum*.

Outro alvo investigado no estudo foi a mitocôndria, pois de acordo com Salomão et al. (2013), as alterações na permeabilidade, particularmente na membrana mitocondrial, podem levar o parasito à uma morte celular programada. O potencial da membrana mitocondrial está ligado à função da mitocôndria e a sua manutenção adequada é essencial para a sobrevivência

das células (Fidalgo; Gille, 2011). Além disso, tripanosomatídeos possuem apenas uma mitocôndria, o que faz dela um alvo potencial para medicamentos (Ribeiro et al., 2013). O dano mitocondrial foi confirmado por uma diminuição da fluorescência de rodamina 123 e, por conseguinte, uma alteração do $\Delta\Psi_m$. Portanto, sugerimos que os compostos exerçam o seu efeito leishmanicida em promastigotas de *L. infantum* por afetar a função mitocondrial do parasito. Compostos como Itraconazol, Paraconazol e Óleo essencial de *Artemisia annua* tem sido reportados com atividade leishmanicida e esta atividade está associada com a perda do potencial de membrana mitocondrial (Macedo-Silva et al., 2013; Islamuddin et al., 2014). No presente estudo, os compostos 2m e 2j também causaram despolarização da membrana mitocondrial.

No presente estudo foi avaliada a ação de dois compostos ftalimido-tiazol, 2j e 2m, frente a *Leishmania infantum*. Foi possível observar que os dois compostos mostraram baixa toxicidade aos macrófagos peritoneais, apresentaram atividade contra as formas amastigotas intracelulares, que estimularam a produção de óxido nítrico por macrófagos não infectados, além de interferir na permeabilidade da membrana plasmática e alterar o potencial da membrana mitocondrial de promastigotas de *L. infantum*. A atividade seletiva dos compostos 2j e 2m sugere que seus potenciais sejam utilizados no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da leishmaniose visceral.

Referências

- Aliança, A., Anjos, K., de Vasconcelos Reis, T., Higino, T., Brelaz-de-Castro, M., Bianco, É., de Figueiredo, R., 2014. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* 19, 14052–14065. doi:10.3390/molecules190914052
- Barros, G.A.C., Pereira, A. V, Barros, L.C., Jr, A.L., Calvi, S.A., Santos, L.D., Barraviera, B., Ferreira, R.S., 2015. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania* (*L.*) *infantum* chagasi. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 48. doi:10.1186/s40409-015-0049-0
- Bhargava, P., Singh, R., 2012. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012. doi:10.1155/2012/626838

- Cardoso, M.V.D.O., Siqueira, L.R.P. De, Silva, E.B. Da, Costa, L.B., Hernandes, M.Z., Rabello, M.M., Ferreira, R.S., Cruz, L.F. da, Moreira, D.R.M., Pereira, V.R.A., Castro, M.C.A.B. de, Bernhardt, P. V, Leite, A.C.L., 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 86, 48–59. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.012
- Da Luz, J.S.B., De Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H. Da, Alves, L.C., Dos Santos, F.A.B., Da Silva, L.L.S., Silva, E.C., De Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural analysis of *leishmania infantum* chagasi promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. *Sci. World J.* 2015. doi:10.1155/2015/617401
- de Macedo-Silva, S.T., Urbina, J. a, de Souza, W., Rodrigues, J.C.F., 2013. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 8, e83247. doi:10.1371/journal.pone.0083247
- de Mello, T.F.P., Bitencourt, H.R., Pedroso, R.B., Aristides, S.M.A., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., 2014. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Exp. Parasitol.* 136, 27–34. doi:10.1016/j.exppara.2013.11.003
- De Monte, C., Carradori, S., Bizzarri, B., Bolasco, A., Caprara, F., Mollica, A., Rivanera, D., Mari, E., Zicari, A., Akdemir, A., Secci, D., 2016. Anti-*Candida* activity and cytotoxicity of a large library of new N-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 107, 82–96. doi:10.1016/j.ejmech.2015.10.048
- Fidalgo, L.M., Gille, L., 2011. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. *Pharm. Res.* 28, 2758–2770. doi:10.1007/s11095-011-0586-3
- Gomes, P.A.T. de M., Oliveira, A.R., de Oliveira Cardoso, M.V., de Farias Santiago, E., de Oliveira Barbosa, M., de Siqueira, L.R.P., Moreira, D.R.M., Bastos, T.M., Brayner, F.A., Soares, M.B.P., de Oliveira Mendes, A.P., de Castro, M.C.A.B., Alves Pereira, V.R., Leite, A.C.L., 2016. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* 1–12. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.010
- Islamuddin, M., Chouhan, G., Tyagi, M., Abdin, M.Z., Sahal, D., Afrin, F., 2014. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. *Front. Microbiol.* 5, 626. doi:10.3389/fmicb.2014.00626
- Kima, P.E., 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* 37, 1087–96.

doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.007

Lamie, P., Phillopes, J., El-Gendy, A., Rarova, L., Gruz, J., 2015. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* 20, 16620–16642.

doi:10.3390/molecules200916620

Marín, C., Ramírez-Macías, I., Rosales, M.J., Muro, B., Reviriego, F., Navarro, P., Arán, V.J., Sánchez-Moreno, M., 2015. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. *Acta Trop.* 148, 170–178. doi:10.1016/j.actatropica.2015.04.028

Oliveira, V.C.S., Moura, D.M.S., Lopes, J.A.D., De Andrade, P.P., Da Silva, N.H., Figueiredo, R.C.B.Q., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol. Res.* 104, 1053–1059.

doi:10.1007/s00436-008-1288-6

Ribeiro, G.A., Cunha-Júnior, E.F., Pinheiro, R.O., da-Silva, S.A.G., Canto-Cavalheiro, M.M., da Silva, A.J.M., Costa, P.R.R., Netto, C.D., Melo, R.C.N., Almeida-Amaral, E.E., Torres-Santos, E.C., 2013. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 789–799. doi:10.1093/jac/dks498

Rottini, M.M., Amaral, A.C.F., Ferreira, J.L.P., Silva, J.R. de A., Taniwaki, N.N., Souza, C. da S.F. de, d'Escoffier, L.N., Almeida-Souza, F., Hardoim, D. de J., Gonçalves da Costa, S.C., Calabrese, K. da S., 2015. In vitro evaluation of (-)-bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* 148, 66–72.

doi:10.1016/j.exppara.2014.10.001

Stachulski, A. V., Pidathala, C., Row, E.C., Sharma, R., Berry, N.G., Iqbal, M., Bentley, J., Allman, S. a, Edwards, G., Helm, A., Hellier, J., Korba, B.E., Semple, J.E., Rossignol, J.-F., 2011. Thiazolides as novel antiviral agents: I. inhibition of hepatitis B virus replication. *J. Med. Chem.* 54, 4119–4132. doi:10.1021/jm200153p.

Sundar, S., n.d. 2015_sundar_Visceral leishmaniasis.

Turan-Zitouni, G., Altintop, D.M., Ozdemir, A., Kaplancikli, A.Z., 2016. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and biological evaluation of thiazoline derivatives as new antimicrobial and anticancer agents 107, 288–294.

6 CONCLUSÕES

- a) A baixa citotoxicidade dos compostos ftalimido-tiazóis sobre as células de mamíferos, somados aos altos índices de seletividade, apontam seu uso para a realização de possíveis ensaios *in vivo*;
- b) Os compostos foram capazes de aumentar a produção de NO, sugerindo que os compostos podem ter um papel imunomodulatório;
- c) Todos os compostos testados foram capazes de inibir o crescimento dos parasitos, embora de maneira distintas;
- d) Os compostos 2j e 2m se mostraram os mais promissores da série ftalimido-tiazol contra *Leishmania infantum*, por apresentar alta atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas e baixa citotoxicidade para as células de mamíferos;
- e) As análises ultraestruturais mostraram que os compostos 2j e 2m causaram alterações semelhantes, demonstrando efeitos indicativos da perda da viabilidade e morte celular;
- f) As análises de microscopia confocal e citometria de fluxo mostraram que os compostos 2j e 2m causam despolarização da membrana mitocondrial dos parasitos tratados;
- g) As alterações ultraestruturais sugerem que a ação dos compostos envolva a mitocôndria do parasito como alvo principal;
- h) Apesar de estudos futuros ainda sejam necessários para melhor elucidação do mecanismo de ação dos compostos ftalimido-tiazóis, resultados apontam para o uso dos compostos 2j e 2m em análises *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALANAZI, A. M. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors : Anti-inflammatory and analgesic activities. v. 92, p. 115–123, 2015.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, jan. 2008.

BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. **Metabolic & Immune Drug Discovery**, p. 90–102, 2015.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l.: s.n.].

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília **Ministério da Sade**. Brasília, 2009.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogar, p. 431. 2000.

BOUKAI, L. K. et al. Trafficking of cysteine proteinase to Leishmania lysosomes: lack of involvement of glycosylation. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.107, n. 2, p. 321-325, 2000.

CAVALCANTI, D. P. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiology**, v.

12, p. 1–12, 2009.

CHAN-BACAB, MANUEL JESUS; HERNANDEZ-NUNEZ, EMANUEL; NAVARRETE-VAZQUEZ, GABRIEL. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. doi:10.1093/jac/dkp117. 2009.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–82, nov. 2007.

CHRISTOPHER, L. K.; AUWAERTER, P. G.; MAYER K. H. Coinfection with HIV and Tropical Infectious Diseases: Protozoal Pathogens. **Clinical Infectious Disease**, Arlington, v.45, n.9, p.1208-1213, 2007.

COLASANTE, C. et al. Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* [v1 ; ref status : indexed ,. **F1000 Research**, v. 2, p. 2–27, 2013.

CULL, B. et al. Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy
Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. November 2015, p. 2143–2157, 2014.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

DESHAYES S. et al. Microwave activation in phase transfer catalysis. **Tetrahedron**. V. 55, 1999.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251–261, 2005.

FALEIRO, R.J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n. 7, e2914, 2014.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2758–2770, 2011.

FUNAKOSHI, T. et al. In vitro and in vivo pharmacological profile of (NRA0562), a novel and putative atypical antipsychotic. v. 71, p. 1371–1384, 2002.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**, Trindade, v. 1, n . 01, 2007.

GOMES, P. A. T. DE M. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. January, p. 1–12, 2016.

HARMET, J. J. et al. Phenolic thiazoles as novel orally-active neuroprotective agents. **Bioorq Med. Chem.** V. 14, 2004.

HEUSER, J. E. A critical comparison between the two current methods of viewing frozen, live cells in the electron microscope: cryoelectron microscopic tomography versus “deepetch” electron microscopy. **Biomedical Reviews**, Warsaw, n.12, p.11-29, 2001.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23-24, p. 1272–1281, 2013.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–10, 2012.

LABER, B. et al. Inhibition of *Narcissus pseudonarcissus* Phytoene Desaturase by Herbicidal 3-Trifluoromethyl-1,1'-biphenyl Derivatives. v. 184, p. 173–184, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. Ecologia das Leishmanioses. In EF Rangel, R Lainson, **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-309, 2003.

LIEW, F.Y. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**. V. 21, p. 3009-3014, 1991.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 9, p. 3067–73, out. 2002.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **Indian J Med Res**. V. 3, p. 267-274, 2006.

MARÍN, C. et al. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. **Acta tropica**, v. 148, p. 170–178, 2015.

MATTOS, E. C. et al. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. **PloS one**, v. 7, n. 10, 2012.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry, Baltimore**, v.279, n. 12, p.798-813, 2004.

MELO, J. O. F. et al. Heterocíclicos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação,

aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569–579, 2006.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1463–1477, 2006.

OKUDA, Barbosa JF, de Figueiredo SM1, Monteiro F, Rocha-Silva F, Gaciele-Melo C, Coelho SS, Lyon S, Caligiorne RB. Recent Pat Endocr. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review on Recent Patents. **Metab Immune Drug Discov**. 2015.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of infection**, p. 10–18, 2014.

PRATA, A.; SILVA, L.A. Calazar. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 2005. P. 713- 732.

PONTES ESPÍNDOLA, J. W. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of a New Series of Antiparasitic Aryloxyl Thiosemicarbazones Inhibiting *T. cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818–835, 2015.

RATH, S. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, Vol. 26, p. 550-555, 2003.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogenactivated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 710-718, mai. 2009.

SANTIAGO, E. D. F. et al. Evaluation of the Anti- *Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

SANTOS, T.A.B., YOSHIOKA, M.K., MIYAGUI, M. L.; AL., E. Leishmaniose visceral. **PubVet**, 2008.

SAÚDE, O. M. DA. **Leishmaniasis**, 2015.

SIBLEY, D. L. Invasion and intracellular Survival by Protozoan Parasites. **Immunol Rev**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2011.

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 13, p. 1403-15, 2001.

SOUZA, W. DE. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, p. 1013–1025, 2002.

SOUZA, W. DE. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. June, p. 313–325, 2008.

SOUZA, W. DE; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 41, p. 2069–2080, 2009.

STOBIE, L. et al. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8427–32, 18 jul. 2000.

TURAN-ZITOUNI, G. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and biological evaluation of thiazoline derivatives as new antimicrobial and anticancer agents. v. 107, p. 288–294, 2016.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. **Research in Microbiology**, Paris, v.158, p.456-462, 2007.

VALE DE GATO, M. I. C. Análise da resposta imunitária celular à *Leishmania* sp. em murganhos tratados e vacinados. Dissertação de Mestrado. Lisboa. 2009.

VICINI, P. et al. Synthesis and biological evaluation of benzo[d]isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4785–4789, nov. 2003.

VILAS, V. et al. Visceral leishmaniasis : a One Health approach. **Veterinary R**, p. 42–45, 2015.

APÊNDICE A – Artigo 1 submetido à Revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of Phthalimido-thiazoles derivatives

Amanda Silva dos Santos Aliança^{a,c#} & Arsênio Rodrigues Oliveira^b, Marcius Vinicius de Oliveira Silva^b, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^b, Ana Paula Sampaio Feitosa^a, Karla Raíza Cardoso Ribeiro^a, Ana Cristina Lima Leite^b, Luiz Carlos Alves^a e Fábio André Brayner^{a,c}

^a Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA/UFPE and Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, , CEP, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brasil

^c Post Graduate Program in Tropical Medicine (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil - CEP: 50670-901.

#Address correspondence to Amanda Silva dos Santos Aliança, amanda_alianca@yahoo.com.br

Abstract

Leishmaniasis is an infectious disease, non-contagious with zoonotic characteristic, caused by several types of protozoa of the genus *Leishmania*, and may have the infection in the living organism in different ways, of which the most known are cutaneous and visceral forms. It is

estimated that the worldwide prevalence of leishmaniasis is around 12 million people in 80 countries and 400,000 new cases per year. The present work report the *in vitro* activity of a phthalimido-thiazoles derivatives series. The cytotoxicity against a strain of *L. infantum*, Vero cells and J774 macrophages were evaluated, as well as the Nitric Oxide production and microscopy changes caused on the parasite. The results show that the compounds arising from the hybridization of phthalimido 1, 3 thiazole showed promising for leishmanicidal activity. The compounds 2j and 2m were the most potent of the series tested and the parasites treated with these compounds showed ultrastructural changes such as cell body shrinkage, loss of cellular membrane integrity, vacuolization of cytoplasm, membrane profiles surrounding organelles and swelling of mitochondria. According to this study, the phthalimido-thiazoles compounds have leishmanicidal activity and should form the foundation for further experimental and clinical studies.

Keywords: Leishmaniasis, Visceral Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Thiazoles; Phthalimido.

Introduction

Leishmania infantum is the etiological agent of Visceral Leishmaniasis in the Americas, in Europe and parts of Africa. This disease affects individuals in all age groups and can lead to death when not treated (1).

The treatment of leishmaniasis have been based on pentavalent antimonials, which are used as first choice therapy (2). The second choice drugs include Amphotericin B, Pentamidine and Miltefosine (3–6). Most used therapies are inadequate due to several factors such as low therapeutic index leading to high toxicity and side effects, emergence of resistant parasites, high cost associate that are inaccessible to the affected countries, among others. These

disadvantages of the current therapy, together with the lack of an effective vaccine shows the need to search for new drugs (4, 5).

Our efforts to develop new drugs to combat neglected diseases have been made since 2006 and have led us to develop a variety of thiosemicarbazone and their bioisosters 1,3-thiazoles as antiparasitic agents (7–12). In continuation of our search for bioactive molecules, we expect that the derivatives of thiazole heterocyclic group are promising for the generation of novel agents with anti-leishmanicidal activity.

Another family of compounds, which show a wide spectrum of pharmacological properties, are derived from phthalimido. They are assigned to such biomolecules activities such as analgesic (13), anticonvulsant (14), antituberculosis (15, 16), hypolipidaemic (16), anxiolytic (13), anti-inflammatory (13), antimicrobial (15, 17) and antipsychotic (18).

For this reason, our research group is intended to explore pharmacological properties of phthalimide derivatives. As a result, bioactive prototypes were identified with potent anti-inflammatory action (19), anti-proliferative (20), immunomodulatory (19, 21, 22), anticancer (20), antiangiogenic (23) and antiparasitic (24, 25).

As regards to obtaining phthalimido-triazole derivatives identified as potent antiparasitic agents are described by various studies. Santiago et al. (2014) showed biomolecules with powerful schistosomicide activity, of which LpQM-45 was the most promising, causing significant ultrastructural changes, including the destruction of the integument in both male and female worms (24). Gomes et al. (2016) (26) described a number of compounds that showed potency antichagasic presenting diverse cellular changes of the parasites (25).

However, studies on the effects of the thiazoles phthalimides compounds derivatives and *Leishmania* spp. are still incipient. In the present study, we evaluated the action of the series

described by de Gomes et al. (2016) (26) hybrids of phthalimido and thiazoles on *L. (L.) infantum* promastigotes and mammalian cells.

Material and Methods

Compounds. The compounds were obtained e purified as describe by Gomes et al. (26), all of which were chemically characterized by nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, mass spectroscopy and elemental analysis and showed >95% purity.

Preparation of test samples. For the tests, 15 phthalimido-triazole compounds (1 to 2n) were solubilize in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). This solution was then dissolved in a suitable culture medium for each assays (RPMI for macrophages/amastigotes and Schneider's medium for promastigotes), in order to obtain different test concentrations in the experiments. The preparation of the used solutions has always been made at the time of the experiments to ensure the stability of the compounds.

Parasites incubated only with culture medium or B Amphotericin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were used as negative and positive controls respectively. It was also performed incubation with the same DMSO concentration range (0.01 a 1%) present in the dilution of compounds.

Parasites. *Leishmania infantum* (strain MHOM/BR/BH 46) promastigotes kindly provided by Dr. Rodrigo Soares (CPqRR/MG) were maintained at 26°C in Schneider's medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of Penicillin – Streptomycin solution (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Parasites at exponential growth phase were used in all experiments.

Biological activity on *Leishmania infantum* promastigotes. To perform the initial screening of the compounds with leishmanicidal activity, *L. infantum* promastigotes forms were collected, counted and diluted in Schneider's medium supplemented 10% FBS at a concentration of 1×10^6 parasites/mL. After dilution, the cells were incubated in the presence of test concentrations (6.25; 12.5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) of phthalimido – thiazoles for 72 hours. Cells incubated only with Schneider's medium were used as control. Cell culture growth was accompanied by daily counts in Neubauer chamber (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea). The IC_{50} (concentration that inhibit 50% of parasite growth) value was determined after 72 hours of culture by linear regression analysis. Each experiment was performed in biological duplicate and technical quadruplicate.

Mammalian cell culture. Vero cells and Macrophages J774 were used in cytotoxicity assay. Both cells were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) supplemented with 10% FBS and maintained at 37 °C in 5% CO_2 .

Cytotoxicity assay. The cytotoxicity in mammalian cells were evaluated by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, as describe by Aliança et al. (27). Briefly, Vero cells and J774 macrophages were counted in Neubauer chamber, seeded in 96 wells plate at the concentration 6×10^4 cells/well, and incubated at an atmosphere of 5% CO_2 and 37°C. After 24 hours, the medium was removed and cells were incubated at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of the compounds for 48 hours. The reading of absorbance of the soluble formazan crystals were performed using ELISA reader Benchmark Plus (Bio-Rad, California, EUA) with wavelength of 490nm. The concentration able to cause 50% loss of cellular viability were determined by linear regression analysis. The

Selectivity Index (SI) was calculated as the ratio between the CC_{50} and IC_{50} for each compound. Each experiment were performed in biological duplicate and technical quadruplicate.

Nitric Oxide Production. For dosage of nitric oxide (NO) produced by mammalian cells (Vero cells and J774 macrophages), treated with the test concentrations (6.25 to 100 $\mu\text{g/mL}$) of the phthalimido - thiazoles compounds and untreated cells was used Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1 % N-1-napthylethylenediamine/ 2.5% H_3PO_4 (Promega, Madison, USA) as recommended by the manufacturer's instructions. To the culture supernatant incubated for 48 hours was added 100 μL of Griess reagent at room temperature for 10 minutes. The absorbance was measured with a 540 nm filter on Benchmark Plus ELISA reader (Bio-Rad, California, USA). The concentration of nitrite was determined using a standard curve of sodium nitrite.

Ultrastructural Analysis. For ultrastructural analysis, we selected the compounds that showed better selectivity index. *L. infantum* promastigotes controls and treated at concentrations 13.87 μM and 27.94 μM (2m), and 9.81 μM and 19.62 μM (2j) of phthalimido – thiazoles compounds were washed and fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and processed for scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

For SEM, fixed promastigotes were placed to adhere on glass coverslips previously coated with poly - L - lysine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). After 20 minutes, the coverslips were washed at the same buffer for remove of non-adherent cells, and post-fixed for 1 hour in

solution containing 1% osmium tetroxide (OsO_4) in sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Then the cells were dehydrated in graded ethanol series and subjected to critical point drying using Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan), coated with 20 nm of gold in the JFC-1100 sputter and examined under a JEOL T-200 scanning electron microscopy.

For TEM, fixed parasites were washed and post – fixed for 1 hour in a solution containing 1% osmium tetroxide (OsO_4) in sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After this step, the samples were dehydrated in graded acetone series, infiltrated and embedded in EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Ultrathin sections approximately 70 nm thick, obtained by ultramicrotome Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Germany), were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by transmission electron microscopy TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

Statistical Analysis. The Linear regression analysis were performed using SPSS 8.0 software (IBM Co., New York, USA) for Windows. The significance analysis, considered significant $p < 0.05$, were performed using ANOVA followed by the Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5.0 software (Graphpad, California, USA) for Windows.

Results

Biological activity on *L. infantum* promastigotes. Fifteen compounds derived of phthalimides were tested, of which fourteen of these presenting thiazoles nucleus (**2n**) and their precursor compound (1) in the synthetic route as represented in scheme 1.

The results demonstrated that all phthalimido-thiazoles compounds were able to inhibit the growth of *L. infantum* promastigotes, showing IC_{50} /72h value ranging from 9.81 to 263.78 μM (Table 1).

The compounds that showed higher inhibition of growth were 2j (9.81 μM), 2m (13.87 μM), 2n (23.41 μM) (**Fig. 1**), 2i (27.76 μM) and 2l (28.77 μM). Eight compounds (2b, 2f, 2g, 2c, 2d, 2k, 2h and 2e) had intermediate activity with IC_{50} values ranging between 31.79 and 61.89 μM . While compounds 1 (236.38 μM) and 2b (263.78 μM) were less effective. Evaluating the activity of the compounds on parasites promastigotes was observed low IC_{50} values only for 2a and 1, which gave rise to the others in the series that showed IC_{50} values higher in compared to others compounds. Amphotericin B inhibit by 100% growth of *L. infantum* at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 μM .

Cytotoxicity assay. Some compounds showed cytotoxicity at the concentrations tested on Vero cells and J774 macrophages (Table 1). The CC_{50} values for Vero cells ranged from 48.82 to 883.76 μM and for J774 macrophages from 112.95 to 419.20 μM (Table 1). When analyzed the Selectivity Index ($\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$), which tells how much the compounds is selective to the parasite compared to mammalian cells, it was demonstrated that all compounds evaluated were more selective to the parasite than to mammalian cells.

The compound that had greater growth inhibition of *L. infantum* promastigotes (2j) also presented highest SI with 12.5 for the Vero cells and 17.7 for J774 macrophages (Table 1). The 2m also was effective in inhibiting the growth of promastigotes, and showed SI of 6.4 for Vero cells and 12.7 for J774 macrophages.

Nitric Oxide production analysis. Analyzing the production of NO by Vero cells and J774 macrophages, it was observed that some compounds (2d, 2e, 2f, 2i, 2k e 2h) were able to increase the NO production by the two cells type, and these differences are considered

significant compared to control ($p < 0.05$) (Table 1). Among these compounds was 2h that induced the highest increase in NO concentration by the two cells types.

Ultrastructural analysis of *L. infantum* promastigote. *L. infantum* promastigotes treated and untreated with the phthalimido – thiazoles derivatives 2j and 2m were analyzed by electron microscopy in order to identify the ultrastructural changes.

In the analysis by SEM, untreated promastigotes exhibit morphology of fusiform body with surface topology normal and long flagellum preserved (Figure 1A-B). Parasites treated with 2j and 2m at the two concentration tested showed alteration on cell shape, which presented more rounded, swollen and with flagellar reduction (Figure. 2C-F). In addition, changes of topology with the presence of undulations on cellular membrane were observed (Figure 1F).

Trough TEM we could observe that on the untreated group, *L. infantum* promastigotes showed nucleus and organelles with shape and cellular morphology well preserved (Fig. 3A). The groups exposed to compounds 2j and 2m showed ultrastructural changes compared to untreated promastigotes. In the treatment with compound 2j at the concentration of 9.81 μM (IC_{50}) also were observed swelling in mitochondria and the presence of a high amount of electron dense inclusions in the cytoplasm (Figure 2B). At the concentration of 19.81 μM ($2 \times \text{IC}_{50}$) of the compound 2j it is observed an intense vacuolization of the cytoplasm, and mitochondrial swelling occupying almost the entire cell (Figure 2C-D).

Promastigotes treated with 13.87 μM (IC_{50}) of compound 2m showed reticulum profile surrounding nucleus and swelling of mitochondria (Figure 3B). At a concentration of 27.74 μM ($2 \times \text{IC}_{50}$) was observed in addition to the irregular cellular morphology, high amounts of electron dense inclusions distributed in the cytoplasm and the presence of electronluculent

spaces (Figure 3C). Electronluscant spaces and changes in the mitochondria as swelling and presence of vesicles inside was also observed (Figure 3D).

Discussion

In the screening performed with the 15 synthetics compounds on *L. infantum* promastigotes it was observed that most compounds showed antileishmanial activity, and the best activities were exhibited by compounds that have the phenyl radical (Ph) in its structure. Already, compounds that do not have this radial (1 and 2a) had lower leishmanicidal action, this result suggests that this radical is involved in leishmanicidal activity. Pinto et al. (28) studying the potential of Naphthoquinones against *L. infantum* found that the compounds with more promising leishmanicidal activity showed two phenyl groups as radicals. The authors observed that the presence of this radical provides a hydrophobic feature to the compound, thus facilitating its penetration through the parasite membrane.

In the present study were performed alterations of the substituents (Cl, Br and F) in the phenyl radical and these substitutions caused differences in the leishmanicidal activity. According to Hernandez et al. (29), the use of halogenates substitutes contributes to the stabilization of drug– receptor binding. This fact may explain the difference in the leishmanicidal activity of the compounds tested. As an example, the double substitutions made with the chlorine (2l and 2m) seems to influence the results (Table 1). The compound 3, 4 – dichloro (2l) were less active, while the 2, 4 – dichloro (2m) compound showed higher leishmanicidal activity. This result is similar to the study of Gomes et al. (26), which was evaluated this same series of phthalimido – thiazole on *Trypanosoma cruzi*. The authors observed that the orientation of the substituent influenced the activity against the parasite, suggesting that an orientation of the substituent is important for the activity.

The compound 2j showed higher leishmanicidal activity, in the chemical structure of this compound is present a bulky substituent, 2- naphthyl. These data also corroborate to the work of Gomes et al. (26), whereas the compound 2j was also the most active against *T. cruzi* trypomastigotes. Manda et al. (30), by testing alkaloids β – carbonyl against *Leishmania donovani* demonstrated that one of the most promising compound from its series had a naphthyl radical in its structure. Faced with the higher activity of compounds that have the naphthyl substituent, we suggest that it may be involved in the action against the tested trypanosomatids.

In order to choose the compound with chemotherapeutic potential it must take in to account its action against microorganisms, as well as its cytotoxicity. In our study, the low cytotoxicity of the compounds towards the mammalian cells had a direct influence on the Selectivity Index values (SI). All drugs tested were more selective to *L. infantum* when compared to Vero cells and J774 macrophages. Santiago et al. (24) by testing a phthalimido – thiazoles series in splenocytes from BALB/c mice also observed low cytotoxic effect showing that even in different cells types the compounds have low cytotoxicity. The authors also note morphological and ultrastructural changes in the parasites due the direct action of the compounds.

In the present study, compounds 2j and 2m were selected for further investigations on their morphological and ultrastructural effects, since they showed higher leishmanicidal activity with low cytotoxicity to mammalian cells

The scanning electron microscopy (SEM) revealed that the parasites treated with the compounds 2j and 2m showed changes as cell body shrinkage and shortening of the flagellum. Aliança et al. (27), Gomes et al. (26) and Oliveira et al. (31) demonstrated that their

compounds caused similar alterations in the parasite morphology. Many of the morphological changes that the parasite exhibited are related to loss of cell viability and cellular death (32).

The action of the phthalimido-thiazoles compounds 2j and 2m on the ultrastructure of promastigotes were similar, showing a generally vacuolization of cytoplasm, large amount of electron – dense inclusions, membrane profiles (similar to endoplasmic reticulum) surrounding organelles and swelling of mitochondria. Kaczanowski et al. (33) described changes of the cellular morphology and cytoplasmic vacuolization as characteristics of cell death by apoptosis in eukaryotic organisms, similar to what was found in our study. However, in our study we could not confirm the programmed cell death, since we did not used specific markers for apoptosis.

The literature shows that some drugs, in addition to have activity directed against the parasite, also induce the immune response of the host. One of the main mechanism of cellular immune defense against trypanosomatids is the increased production of nitric oxide by cells of the monocyte phagocytic system (34). Our results showed that the most of the compounds tested caused significant changes in increase the production of Nitric Oxide (NO) by J744 macrophages and Vero cells treated when compared to untreated control. Ghosh et al. (35) have shown demonstrated that the production of NO by macrophages treated with the drugs Miltefosine, Amphotericin B and Paromycin, used in the treatment of leishmaniasis, is required for its leishmanicidal activity, since this is one of the mechanism used by phagocytic cells in the combat to parasite. Probably, the phthalimido-thiazoles compounds by inducing an increase in NO production favoring a better response from the macrophages against *L. infantum*

In conclusion, our results indicate that the phthalimido-thiazoles, especially those containing aromatic substituents, are antiparasitic agents and were more potent than those

analogous non-thiazole (1) and non-aryl substituted (2a). These compounds showed substantial leishmanicidal properties against *L. infantum*, with cellular damages observed microscopically, low toxicity against Vero cells and J774 macrophages, and inducing the production of nitric oxide. This work revealed 2j and 2m as the most promising compounds for activity in study, suggesting the use of these compounds as a prototype for the development of new antileishmania compounds. The present results provide a solid foundation for further studies of anti-leishmania property of phthalimides and thiazoles, particularly hybrids derivatives from these heterocyclic rings. It is also important that, in view of the results obtained, other biological tests have to be designed to shed light on the mechanism of leishmanicidal action.

References

1. **Cavalcanti da Silva E, Dias Rayol C, Lys Medeiros P, Figueiredo RCBQ, Piuvezan MR, Brabosa-Filho JM, Fernandes Marinho A, Silva TG, Militão GCG, Pimentel Cassilhas AP, Paes de Andrade P.** 2012. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Sci World J* **2012**:1–5.
2. **Marín C, Ramírez-Macías I, Rosales MJ, Muro B, Reviriego F, Navarro P, Arán VJ, Sánchez-Moreno M.** 2015. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. *Acta Trop* **148**:170–178.
3. **Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC.** 2008. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitol Res* **103**:1–10.

4. **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.
5. **Espuelas S, Plano D, Nguewa P, Font M, Palop J a., Irache JM, Sanmartin C.** 2012. Innovative Lead Compounds and Formulation Strategies As Newer Kinetoplastid Therapies. *Curr Med Chem* **19**:4259–4288.
6. **Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P.** 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* **110**:1065–78.
7. **Cardoso MVDO, Siqueira LRP De, Silva EB Da, Costa LB, Hernandes MZ, Rabello MM, Ferreira RS, Cruz LF da, Moreira DRM, Pereira VRA, Castro MCAB de, Bernhardt P V, Leite ACL.** 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. *Eur J Med Chem* **86**:48–59.
8. **Hernandes MZ, Rabello MM, Leite ACL, Cardoso MVO, Moreira DRM, Brondani DJ, Simone CA, Reis LC, Souza MA, Pereira VRA, Ferreira RS, McKerrow JH.** 2010. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. *Bioorg Med Chem* **18**:7826–7835.
9. **Leite ACL, de Lima RS, Moreira DR de M, Cardoso MV de O, Gouveia de Brito AC, Farias dos Santos LM, Hernandes MZ, Kiperstok AC, de Lima RS, Soares MBP.** 2006. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi. *Bioorganic Med Chem* **14**:3749–3757.

10. **Leite ACL, de M. Moreira DR, de O. Cardoso MV, Hernandes MZ, Alves Pereira VR, Silva RO, Kiperstok AC, da S. Lima M, Soares MBP.** 2007. Synthesis, Cruzain Docking, and in vitro Studies of Aryl-4-Oxothiazolylhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem* **2**:1339–1345.
11. **Pontes Espíndola JW, de Oliveira Cardoso MV, de Oliveira Filho GB, Oliveira e Silva DA, Magalhaes Moreira DR, Bastos TM, de Simone CA, Soares MBP, Villela FS, Ferreira RS, de Castro MCAB, Pereira VRA, Murta SMF, Sales Junior PA, Romanha AJ, Leite ACL.** 2015. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of a New Series of Antiparasitic Aryloxyl Thiosemicarbazones Inhibiting *T. cruzi* cruzain. *Eur J Med Chem* **101**:818–835.
12. **de Oliveira Filho GB, de Oliveira Cardoso MV, Espíndola JWP, Ferreira LFGR, de Simone CA, Ferreira RS, Coelho PL, Meira CS, Moreira DRM, Soares MBP, Leite ACL.** 2015. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* **23**:-.
13. **Alanazi AM, El-azab AS, Al-suwaidan IA, Eldin K, Eltahir H, Asiri YA, Abdel-aziz NI, Abdel-aziz AA.** 2015. European Journal of Medicinal Chemistry Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors : Anti-in fl ammatory and analgesic activities **92**:115–123.
14. **Kaminski K, Obniska J, Wiklik B, Atamanyuk D.** 2011. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. *Eur J Med Chem* **46**:4634–4641.
15. **Akgun H, Karamelekoglu I, Berk B, Kurnaz I, Saribiyik G, Oktem S, Kocagoz T.** 2012. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives.

- Bioorganic Med Chem **20**:4149–4154.
16. **Abdel-Aziz AAM, El-Azab AS, Attia SM, Al-Obaid AM, Al-Omar MA, El-Subbagh HI.** 2011. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. *Eur J Med Chem* **46**:4324–4329.
 17. **Singh AK, Rajendran V, Pant A, Ghosh PC, Singh N, Latha N, Garg S, Pandey KC, Singh BK, Rathi B.** 2015. Design, synthesis and biological evaluation of functionalized phthalimides: A new class of antimalarials and inhibitors of falcipain-2, a major hemoglobinase of malaria parasite. *Bioorganic Med Chem* **23**:1817–1827.
 18. **Williams R, Manka JT, Rodriguez AL, Vinson PN, Niswender CM, Weaver CD, Jones CK, Conn PJ, Lindsley CW, Stauffer SR.** 2011. Synthesis and SAR of centrally active mGlu5 positive allosteric modulators based on an aryl acetylenic bicyclic lactam scaffold. *Bioorganic Med Chem Lett* **21**:1350–1353.
 19. **Leite ACL, Barbosa FF, Cardoso MV de O, Moreira DRM, Coelho LCD, da Silva EB, Filho GB de O, de Souza VMO, Pereira VRA, de C. Reis L, Ferreira PMP, Pessoa C, Wanderley AG, Mota FVB, da Silva TG.** 2013. Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes. *Med Chem Res* 1–8.
 20. **De Oliveira Cardoso MV, Magalhães Moreira DR, Oliveira Filho GB, Tiburcio Cavalcanti SM, Duarte Coelho LC, Pontes Espíndola JW, Rubio Gonzalez L, Montenegro Rabello M, Zaldini Hernandez M, Pinheiro Ferreira PM, Pessoa C, De Simone CA, Teixeira Guimarães E, Pereira Soares MB, Lima Leite AC.** 2015. Design, synthesis and structure - Activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. *Eur J Med Chem* **96**:491–503.
 21. **Coêlho LCD, Cardoso MVDO, Moreira DRM, Gomes PATDM, Cavalcanti SMT,**

- Oliveira AR, Filho GBDO, Siqueira LRP De, Barbosa MDO, Borba EFDO, Silva TG Da, Kaskow B, Karimi M, Abraham LJ, Leite ACL.** 2014. Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties. *Medchemcomm* 5:758.
22. **Pessoa C, Ferreira PMP, Lotufo LVC, DeMoraes MO, Cavalcanti SMT, Coêlho LCD, Hernandes MZ, Leite ACL, DeSimone CA, Costa VMA, Souza VMO.** 2010. Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes. *ChemMedChem* 5:523–528.
23. **Da Costa PM, Da Costa MP, Carvalho AA, Cavalcanti SMT, De Oliveira Cardoso MV, De Oliveira Filho GB, De Araujo Viana D, Fachine-Jamacaru FV, Leite ACL, De Moraes MO, Pessoa C, Ferreira PMP.** 2015. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chem Biol Interact* 239:174–183.
24. **Santiago EDF, Oliveira A De, Oliveira B De, Magalhaes R.** 2014. Evaluation of the Anti- *Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. *J Antimicrob Agents Chemother* 58:352–363.
25. **Cardoso M, Hernandes M, Moreira D, Pontes F, Simone C, Leite A.** 2015. Structural Insights Into Bioactive Thiazolidin-4-one: Experimental and Theoretical Data. *Lett Org Chem* 12:262–270.
26. **Gomes PAT de M, Oliveira AR, de Oliveira Cardoso MV, de Farias Santiago E, de Oliveira Barbosa M, de Siqueira LRP, Moreira DRM, Bastos TM, Brayner FA, Soares MBP, de Oliveira Mendes AP, de Castro MCAB, Alves Pereira VR, Leite ACL.** 2016. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth

- and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 1–12.
27. **Aliança A, Anjos K, de Vasconcelos Reis T, Higino T, Brelaz-de-Castro M, Bianco É, de Figueiredo R.** 2014. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* **19**:14052–14065.
 28. **Pinto EG, Santos IO, Schmidt TJ, Borborema SET, Ferreira VF, Rocha DR, Tempone AG.** 2014. Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships. *PLoS One* **9**:e105127.
 29. **Hernandes MZ, Cavalcanti SMT, Moreira DRM, de Azevedo Junior WF, Leite ACL.** 2010. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr Drug Targets* **11**:303–314.
 30. **Manda S, Khan SI, Jain SK, Mohammed S, Tekwani BL, Khan I a., Vishwakarma R a., Bharate SB.** 2014. Synthesis, antileishmanial and antitrypanosomal activities of N-substituted tetrahydro- β -carbolines. *Bioorganic Med Chem Lett* **24**:3247–3250.
 31. **Oliveira VCS, Moura DMS, Lopes JAD, De Andrade PP, Da Silva NH, Figueiredo RCBQ.** 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol Res* **104**:1053–1059.
 32. **Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, de Castro SL.** 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* **40**:157–68.

33. **Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE.** 2011. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors* **4**:44.
34. **Carneiro P, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho E, Bacellar O.** 2016. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous PubMed Commons. *PLoS One* **11**:1–2.
35. **Ghosh M, Roy K, Roy S.** 2013. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *J Antimicrob Chemother* **68**:2834–2838.

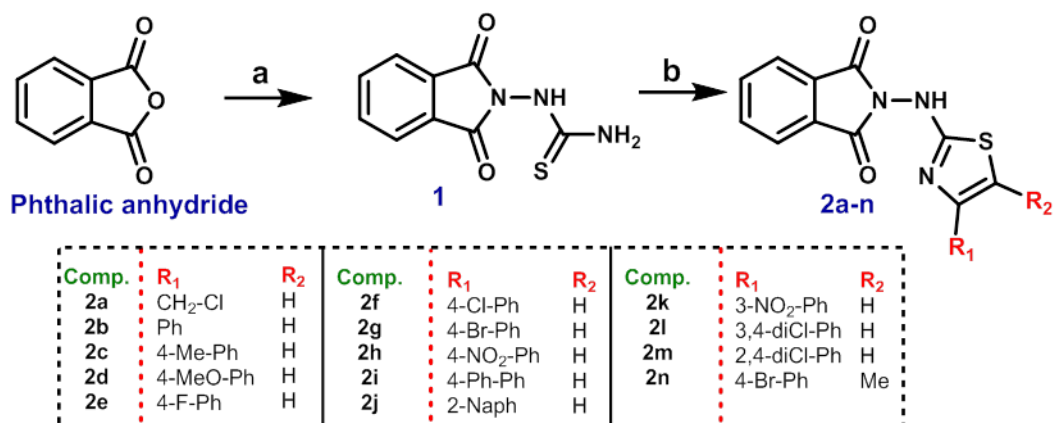
Scheme 1. Phthalimido-thiazoles derivative series

Table 1. Activity of compounds on *L. infantum* promastigotes, Vero cells and J774 macrophages

Compound	μM		IS_{ver} o	μM		IS_{J77} 4	NO (Vero)	NO (J774)
	IC_{50}	CC_{50} (Vero)		CC_{50} (J774)				
1	236.38 $\pm$ 9.6	883.76 $\pm$ 86.3	3.7	393.30 $\pm$ 7.3	1.7	N	N	
2a	263.78 $\pm$ 17.3	380,41 $\pm$ 6.5	1.4	1582.96 $\pm$ 36.8	6.0	S*	N	
2b	54.02 $\pm$ 1.6	229.84 $\pm$ 16.7	4.2	241.68 $\pm$ 2.9	4.5	N	N	
2c	41.97 $\pm$ 0.3	159.43 $\pm$ 1.9	3.7	277.16 $\pm$ 5.3	6.5	N	S*	
2d	43.48 $\pm$ 1.0	185.78 $\pm$ 11.8	4.3	419.20 $\pm$ 5.6	9.7	S*	S*	
2e	57.11 $\pm$ 4.9	244.13 $\pm$ 9.1	4.3	206.49 $\pm$ 9.6	3.6	S*	S*	
2f	31.79 $\pm$ 1.4	192.07 $\pm$ 5.3	6.0	216.96 $\pm$ 3.9	6.8	S*	S*	
2g	61.98 $\pm$ 1.5	161.65 $\pm$ 16.3	2.6	201.90 $\pm$ 3.1	3.3	N	N	
2h	54.45 $\pm$ 5.5	412.79 $\pm$ 28.2	7.6	278.42 $\pm$ 0.3	5.1	S*	S*	
2i	27.76 $\pm$ 1.6	48.82 $\pm$ 0.4	1.8	112.95 $\pm$ 2.8	4.1	S*	S*	
2j	9.81 $\pm$ 0.1	122.32 $\pm$ 2.3	12.5	173.32 $\pm$ 1.2	17.7	N	N	
2k	57.21 $\pm$ 2.2	181.83 $\pm$ 9.1	3.2	323.72 $\pm$ 13.0	5.7	S*	S*	
2l	28.77 $\pm$ 2.7	153.69 $\pm$ 6.8	5.3	157.90 $\pm$ 7.9	5.5	N	S*	
2m	13.87 $\pm$ 0.8	88.95 $\pm$ 12.9	6.4	176.05 $\pm$ 15.8	12.7	N	S*	
2n	23.41 $\pm$ 0.7	99.37 $\pm$ 1.0	4.2	125.58 $\pm$ 0.5	5.4	N	S*	
AmB	0.047 $\pm$ 0.03	105.66 $\pm$ 2.1	2270	37.61 $\pm$ 1.4	808	S*	S*	

- IC_{50} : Concentration that inhibit by 50% the growth of *L. infantum* promastigotes

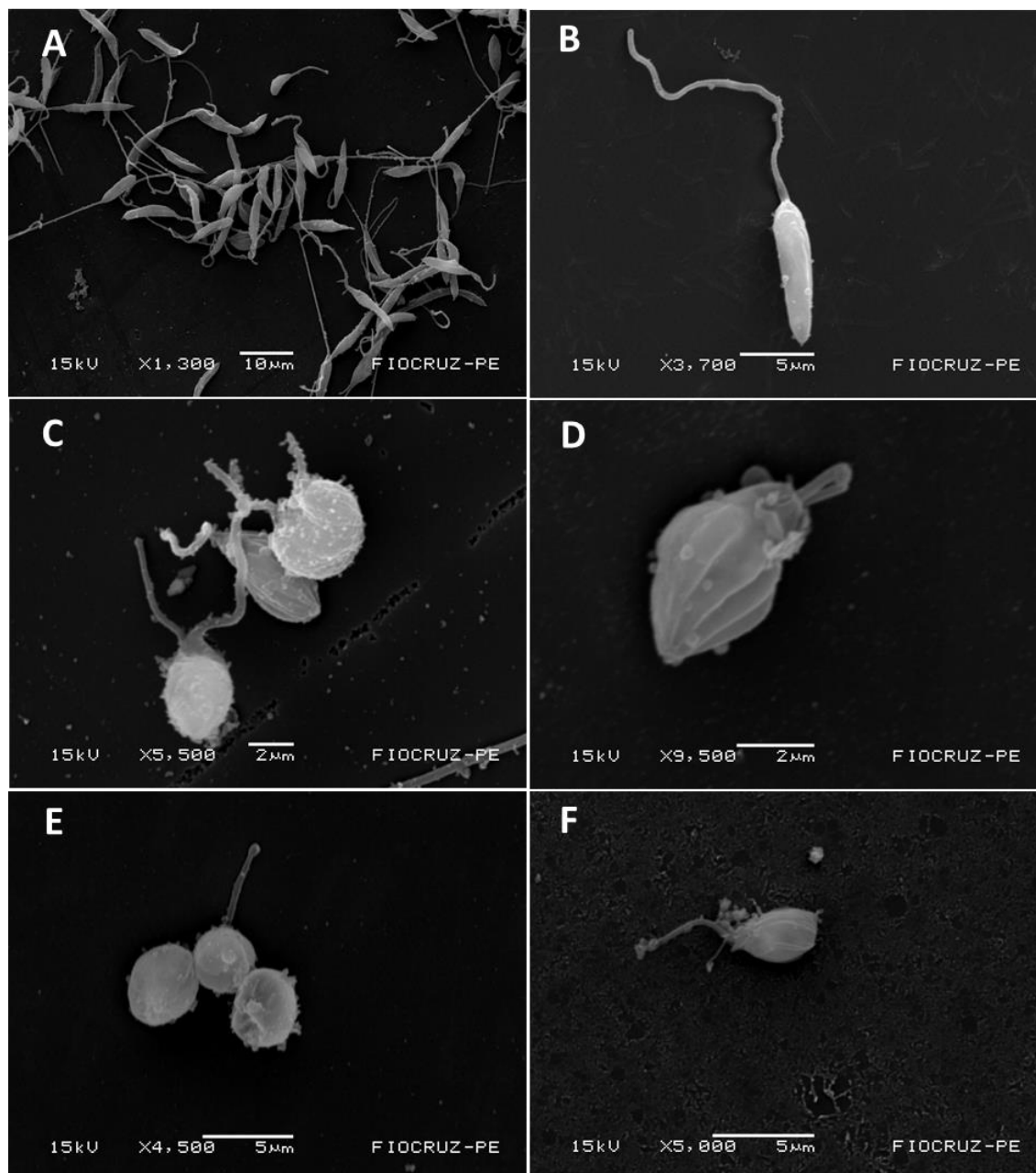
- CC_{50} : Concentration capable of causing cytotoxic effect on 50% of mammalian cells

- IS (Selectivity Index): CC_{50} of mammalian cells / IC_{50} *L. infantum*

- AmB: Amphotericin B; NO- Nitric Oxide dosage.

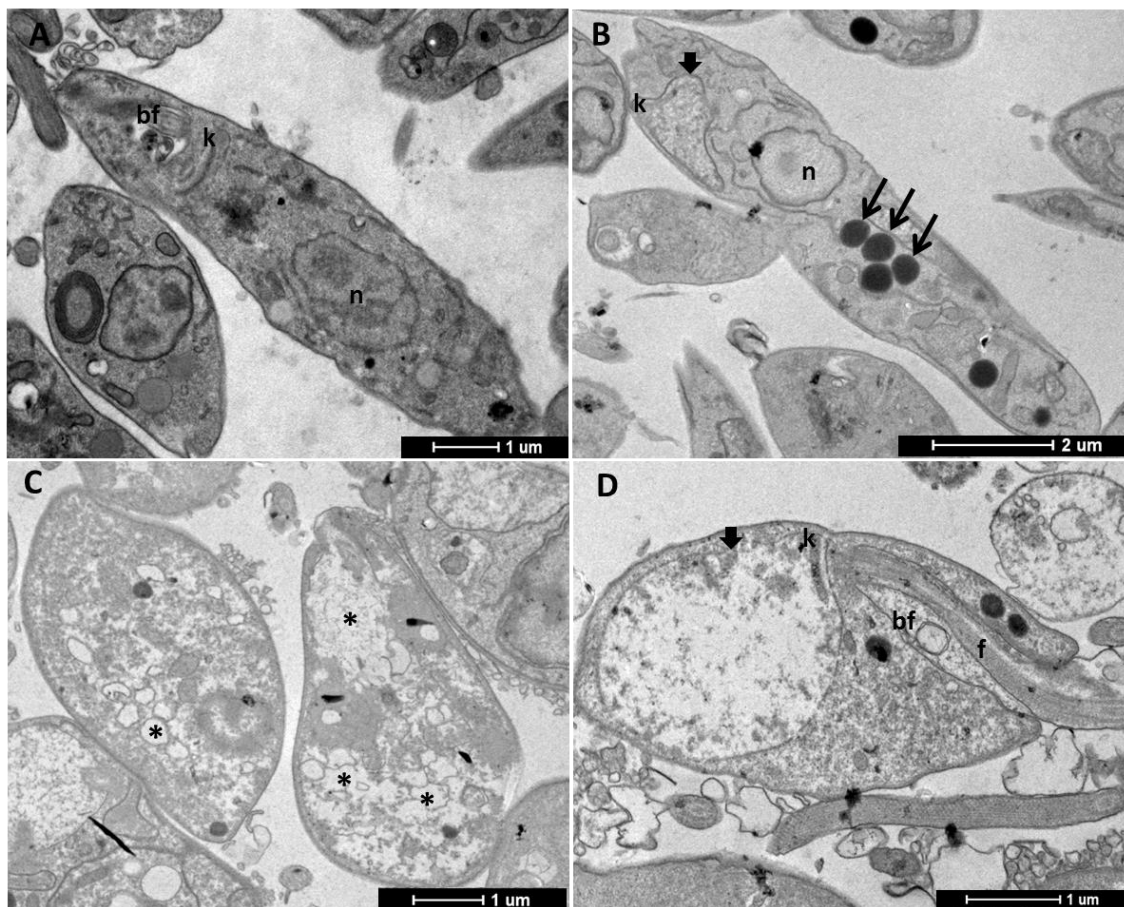
*: correspond to significant difference compared to control ($p < 0.05$), ANOVA and Dunnett's post-test. S: significant production; N: no significant production.

Figure 1. Eletromicrography of *L.infantum* promastigotes untreated and treated with compounds 2j and 2m.



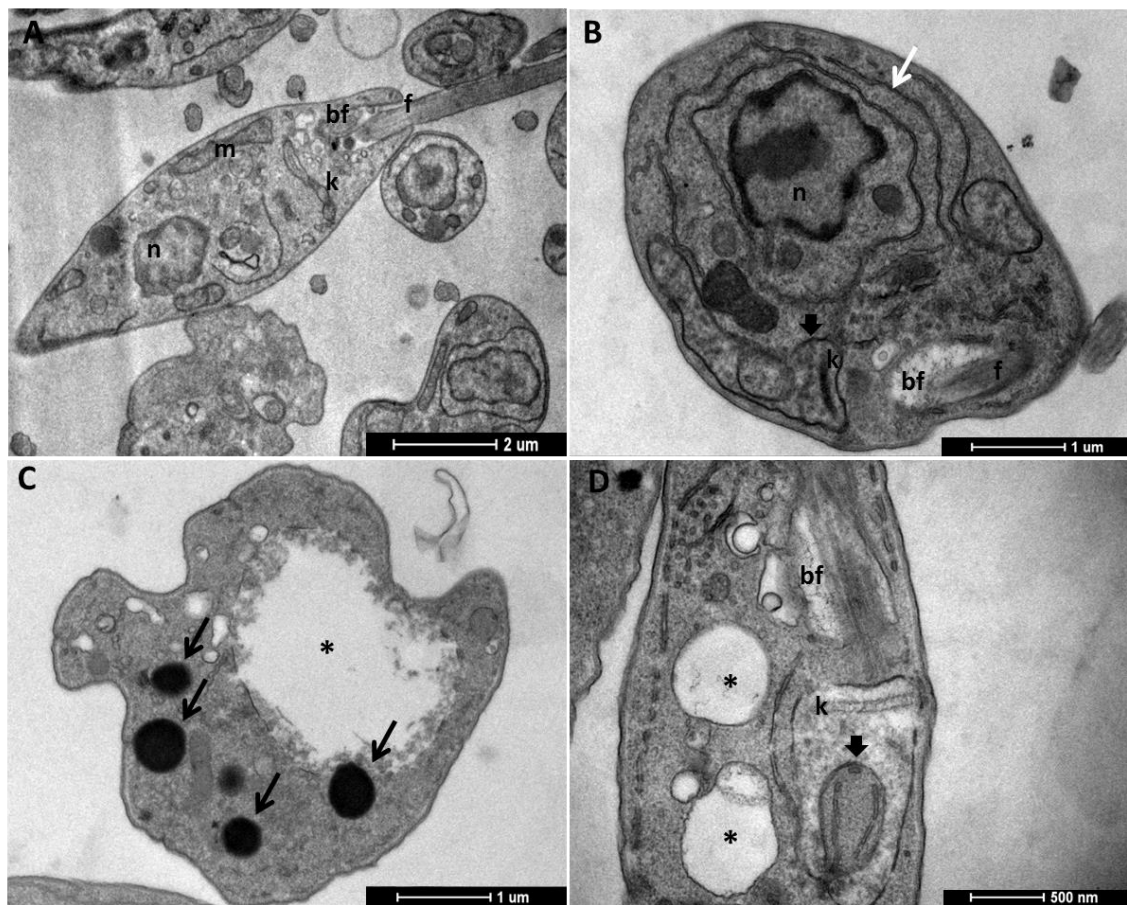
(A-B) Promastigotes control showing fusiform shape and flagellum length normal. (B) Promastigotes treated with 9.81 μ M and (C) 19.62 μ M of compound 2j showing cell topology changes. (D) Promastigotes treated with 13.87 μ M and (E) 27.74 μ M of compound 2m showing shrinkage of the cell.

Figure 2. Eletromicrography of *L. infantum* treated and untreated with 2j compound.



(A) Promastigote untreated, showing normal structure of organelles such as nucleus (n), kinetoplast (k) and flagellar pocket (fp). (B) Promastigote treated with 9.81 μ M of the compound 2j is possible to note the presence of electron-dense granules, and mitochondrial swelling. (C-D) Parasites treated with 19.81 μ M of the compound, in (C) parasites showing intense vacuolization of the cytoplasm (*) and (D) the arrow points the intense swelling of the mitochondria (large arrow).

Figure 3. Eletromicrography of *L. infantum* treated and untreated with 2m compound.



(A) Promastigote untreated showed nucleus with normal structure (n) and organelles such as kinetoplast (k), mitochondria (m), flagellar pocket (fp) preserved. (B) Promastigote treated with 13.87 μM of the compound showing reticulum profiles (arrow) surrounding the nucleus. Also is possible note the swelling of mitochondria (large arrow). (C-D) Promastigotes treated with 27.74 μM . (C) Presence of a large electron-lucent space (*) and the presence of electron-dense bodies (arrow). (D) Detail of the promastigote treated showing electron-lucent spaces and swelling of mitochondria with the presence of vesicles in its inside (large arrow).

APENDICE B – Artigo 2 submetido à revista *Acta Tropica*

Potential of 2-[4-(naphthalen-2-yl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione and 2-[4-(2,4-dichlorophenyl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione against *Leishmania infantum*

Amanda Silva dos Santos Aliança^{a, b, *} & Arsênio Rodrigues Oliveira^c, Marcius Vinicius de Oliveira Silva^c, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^c, Ana Paula Sampaio Feitosa^a, Karla Raíza Cardoso Ribeiro^a, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^d, Luiz Carlos Alves^a, Ana Cristina Lima Leite^c e Fábio André Brayner^{a, b}

^a Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA/UFPE and Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, , CEP, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

^b Post Graduate Program in Tropical Medicine (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil - CEP: 50670-901.

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brasil.

^d Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ – CpqAM, Fundação Oswaldo Cruz, CEP, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

*Address correspondence to Amanda Silva dos Santos Aliança, amanda_alianca@msn.com

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is caused by the protozoan parasite *L. infantum*, and 90% of the cases in Latin America is from Brazil. The current treatment for leishmaniasis present several difficulties such as toxicity, intravenous route of administration and prolonged treatment, which leads to discontinuation of the treatment. The aim of this study was investigate news alternatives of treatment for visceral leishmaniasis. Two phthalimido-thiazole compounds (2j and 2m) were evaluated for their action on peritoneal macrophage cytotoxicity, the activity against amastigotes forms of *L. infantum*, the effect on Nitric Oxide production and on intracellular targets of parasite. The data showed that the compounds reduced the survivor of intracellular amastigotes and presented low toxicity to mammalian cells. The compounds increased the NO production when compared to untreated cells in non-infected macrophages. Treated promastigotes forms showed increase in the number of cell stained with propidium iodide. The compounds induced significant changes on the mitochondrial membrane potential. The low toxicity to mammalian cells and the leishmanicidal activity presented suggest the use of the derivatives 2j and 2m as promising agents for the treatment of visceral leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Visceral Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Thiazoles; Phthalimido.

1. Introduction

The epidemiologic relevance of visceral leishmaniasis (VL), caused by the protozoan parasite *L. infantum*, as a neglected disease increased significantly in Latin America and especially in Brazil, where 90% of the cases occur (Barros et al., 2015).

The main drugs (sodium stibugluconate and meglumine antimoniate) used in treatment of VL have been the first choice drugs for decades, despite their severe side effects (Sundar, 2015). Others drugs as Miltefosine and Amphotericin B have shown promising results, but they also can cause secondary effects that limits their use (Da Luz et al., 2015). In this context, there is an urgent need to find new leishmanicidal agents with improved efficacy and fewer side effects.

Therefore, the Phthalimido and Thiazole classes, which are important pharmacophore in medicinal chemistry, have a broad spectrum of pharmacological activities such as antitumor activity (Turan-Zitouni et al., 2016), antioxidant and anti-inflammatory (Lamie et al., 2015), antifungal (De Monte et al., 2016), antimicrobial (Van Der Westhuyzen et al., 2015), antiviral (Stachulski et al., 2011) and protozoal (Cardoso et al., 2014; Gomes et al., 2016).

Recent studies by our group have shown the trypanocidal and leishmanicidal activity of a new series synthesized from phthalimido-thiazoles compounds (Gomes et al., 2016). From these series, the derivatives tested against promastigotes of *Leishmania infantum*, the compounds 2-[4-(naphthalen-2-yl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione and 2-[4-(2,4-dichlorophenyl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione were identified as the most promising, since they presented the best leishmanicidal activity and no toxicity to mammalian cells.

Knowing that a drug with leishmanicidal potential must present activity against amastigotes forms, the present work had the aim to evaluate the action of these two compounds on intracellular amastigotes, determinate the NO production by macrophages infected with *L. infantum*, and evaluate the mitochondrial membrane potential and the plasma membrane integrity on promastigotes treated with the compounds.

2. Material and Methods

2.1. Phthalimido-Thiazoles derivatives

The compounds 2j and 2m were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) to obtain a stock solution of 5mg/mL, this solution was diluted in culture medium (RPMI – 1640 or Schneider's) suitable for each assay. The final solution had a final concentration of DMSO not toxic to the parasite neither to mammalian cells. The final solution was prepared at the time of the experiment assembly to ensure the stability of the compounds.

2.2. Parasites culture

Leishmania infantum promastigotes (strain MHOM/BR/BH46) were maintained at 26 °C in Schneider's medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) containing 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and 1% of Penicillin – Streptomycin solution (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The intracellular amastigotes forms were obtained from inoculation of infective promastigotes in culture of peritoneal macrophages and used in the biological activity assays of compounds as described bellow

2.3. Cytotoxicity assay

Peritoneal macrophages were obtained after injection of 5mL RPMI -1640 medium containing 20% of FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in the peritoneal cavity of female BALB/c mice. To determinate the cytotoxicity of the compounds, peritoneal macrophages were seeded in 96 well plate at a concentration of 1×10^6 cells/mL and incubated at 37°C and an atmosphere with 5% CO₂ for 3 horas. The macrophages were treated with increasing

concentrations (17-270 μM for 2j and 16-260 μM for 2m) of the compounds. The viability was determinate using MTT assay (Aliança et al., 2014). The concentration capable of causing the loss of viability by 50% (CC_{50}) of the cells was determinate by linear regression analyses. The selectivity index (SI) were determinate considering the following equation: $\text{CC}_{50} \text{ peritoneal macrophages} / \text{IC}_{50} \text{ parasites}$.

2.4. *In vitro* biological activity on intracellular amastigote forms

To evaluate the effect of the compounds on intracellular amastigotes forms, peritoneal macrophages, in RPMI-1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) containing 10% of FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), were distributed in culture plates with round coverslips at a concentration of 1×10^6 cells/ml and incubated for 3 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . The macrophages were infected with *L. infantum* promastigotes for 3 hours, at a multiplicity of infection of 10:1. After this period of infection, the cells were treated with 4.90 to 19.62 μM of 2j and 6.94 to 27.74 μM of 2m, and incubated for 24 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . Then, the cells were washed with PBS, fixed with methanol and Giemsa stained. The percentage of infected macrophages were determinate by counting 100 cell in triplicate. The IC_{50} (concentration that inhibit 50% of parasite growth) were determinate after 24 hours of culture by linear regression analysis. The survivor index were determined multiplying the percentage of infected macrophages by the number of parasites per infected cells. The amphotericin B were used as control.

2.5. Determination of Nitric Oxide production

The NO production was quantified on the supernatant of the experiment regards the cytotoxic effect of the compounds 2j and 2m only in macrophages, macrophages infected with

L. infantum treated with the compounds and untreated. The evaluation was performed after the suitable period of incubation to each experiment using the Griess assay. The supernatant of the cell culture (100 μ L) were incubated with equal volume of the Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1 % N-1-naphthylethylenediamine/ 2.5% H_3PO_4) for 10 minutes at room temperature. The absorbance were measured with a filter at 540 nm on ELISA Benchmark Plus reader (Bio-Rad Laboratories, PA, USA). The concentration of nitrite were determined using a standard curve of sodium nitrite (Aliança et al., 2014).

2.6. Evaluation of Plasma Membrane Integrity

Parasites treated with the compounds and control were incubated with 30 μ g/mL of propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 15 minutes. Cells in the presence of hydrogen peroxide for 20 minutes (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were used as positive control. Untreated cells were also evaluated. At the end of incubation with the probe, the samples were analyzed by flow cytometer. The data were obtained using the FL2-H channel. It was analyzed 20.000 events per samples. The results were expressed as percentage of marked cells in each condition tested.

The samples obtained as described above were also analyzed by confocal laser microscopy (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, GER). At the end of incubation, the samples were harvested and placed in micro plates (Mattek Co., USA) at the moment of viewing the cells under microscopy. The images were acquired using 488nm laser.

2.7. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

To determinate the effect of the compound on $\Delta\Psi_m$, *L. infantum* promastigotes were treated with 9.81 and 19.62 μ M of 2j and 13.87 and 27.74 μ M of 2m for 72 hours. After

treatment, the parasites treated and control were incubated with 10 µg/mL of rhodamine 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 15 minutes. Cells in the presence of methanol for 20 minutes were used as negative control. Untreated cells were also evaluated. At the end of incubation the samples were placed in tubes suitable for flow cytometer analysis. The collection and analysis of the results were performed in the flow cytometer FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipped with the software Cell Quest, using FL1-H channel. It was analyzed 20.000 events per sample. Changes on mitochondrial membrane polarization were measured through the Variation Index (VI) obtained by the equation $(MT - MC)/MC$, where MC is the median fluorescence intensity of the control and MT is the median fluorescence intensity of the treated cells. Negative values of VI correspond to a depolarization of mitochondrial membrane (Aliança et al., 2014).

Samples obtained as describe above were also analyzed by confocal laser microscopy (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, GER). At the of incubation, the samples were placed in micro – plates (Mattek Co., USA) at the moment of viewing the cell under microscopy. The images were acquired using 543nm laser.

2.8. Statistical Analysis

The linear regression analyzes were performed using SPSS 8.0 software (IBM Co., New York, USA) for Windows. The significance analysis, considered significant p-values <0.05 were performed by ANOVA and Dunnett's post-test in the GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, California, USA) for Windows. All experiments were performed in duplicate biological and technical quadruplicate.

2.9. Ethical Considerations

This work was approved by the Ethics Committee for the use of Animals (CEUA) of Aggeu Magalhães Research Center - Fiocruz / Pernambuco under protocol number 30/2011.

3. Results

3.1. Effect of phthamilido-thiazoles derivatives on cytotoxicity

From the cytotoxicity analysis of peritoneal macrophages treated with the compounds 2j and 2m using the MTT technique it was noted that the concentrations that were cytotoxic to 50% of macrophages (CC_{50}) ranged from $362.7 \pm 18 \mu\text{M}$ for compound 2j and $263.6 \pm 19 \mu\text{M}$ for compound 2m. Amphotericin B showed be more toxic to macrophages, presenting CC_{50} value $74.9 \pm 9.5 \mu\text{M}$. The toxicity of the compounds were compared to the activity against amastigotes forms in order to determinate the selectivity index (SI). Our results demonstrate that compound 2j was 24 times more toxic to amastigotes than to mammalian cells ($SI = 23.8$). While the compound 2m showed be 12 times more toxic to amastigotes ($SI = 11.8$) (Table 1).

3.2. Action of compounds on intracellular amastigotes forms

Our data demonstate that the compounds inhibited significantly ($p < 0.05$) the survival of amastigotes forms within peritoneal macrophages, presenting significant decreased for the compound 2j at concentrations of 9.81 and 19.62 μM (Fig. 1A). As for the compound 2m the three concentrations tested (6.9, 13.9 e 27.7 μM) showed significant decrease in survival of amastigotes (Fig. 1B). The concentration required to reduce by 50% the percentage of infected macrophages were 15.20 μM for 2j and 22.33 μM for 2m (Table 1).

When comparing the treated and untreated group, the mean number of parasites per macrophage decreased in the treatment with both compounds (2j and 2m). This reduction was significant at a concentration of 19.6 μM for compound 2j. The compound 2m was able to significantly reduce the average number of internalized parasites in the three concentrations tested (6.9, 13.9 e 27.7 μM) (Fig. 2).

3.3. Effect of phthalimido-thiazole compounds on Nitric Oxide production (NO)

When comparing macrophages treated and not-treated groups significant differences in the level of NO were observed at the two highest concentrations tested of 2j (270 and 135 μM) and at the three highest concentrations of 2m compound (260, 130 and 65 μM). The treatment with Amphotericin B does not induced a significant production of NO by peritoneal macrophages.

In the supernatant of macrophage culture infected with *L. infantum*, NO production was not statistically significant between untreated group and treated group with 2j and 2m, besides Amphotericin B, in all concentrations tested.

3.4. Effect of the compounds on plasma membrane integrity

To evaluate the effect of compounds 2j and 2m in plasma membrane integrity was used propidium iodide (PI) stain, then the cells were analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. In the flow cytometer, it was observed that the untreated promastigotes showed few cells marked (0.6%), indicating the viability of these cells with intact plasma membrane, while the cells treated with methanol showed 37.03% of cells marked with PI. In cells treated with the compounds 2j and 2m is possible to notice an increase in the percentage of cells marked with the PI, this increase showed be dose-dependent as can be seen in Table 2.

Treatment with 27.74 μM of compound 2j marked with PI approximately 60% of the cells (Table 2 and Fig. 3).

The results obtained through confocal microscopy corroborated with the data from flow cytometer, where was possible to observe morphological changes of promastigotes forms, such as, shortening of the flagellum and rounding of the cell (Fig. 4C).

3.5. Effect of the compounds on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The changes induced by the compounds 2j and 2m in the mitochondrial membrane potential are represented in table 3 and figure 5. It can be observe that *L. infantum* promastigotes treated with concentrations (9.81 and 19.62 μM of 2j and 13.87 and 27.74 μM of 2m) of compounds for 72 hours decreased fluorescence intensity of rhodamine 123, thus showing the reduction of $\Delta\Psi_m$ in treated cells.

This reduction was also quantified by calculating the Variation Index (VI). The VI value of cells treated with 2j showed depolarization, but not in a dose-dependent manner (-0.62 treated with 9.81 μM and -0.59 treated with 19.62 μM). Cells treated with 2m showed VI value of -0.36 (13.87 μM) and -0.50 (27.74 μM) (Table 3). Negative values represents decrease in the membrane potential.

The changes on $\Delta\Psi_m$ were also analyzed by confocal microscopy. The images of parasites treated and control supports the data of flow cytometry, which indicate the loss of rhodamine 123 labeling intensity in cell morphologically altered (Fig. 6).

4. Discussion and conclusion

An important criterion in the search for new drugs with leishmanicidal activity is low cytotoxicity to mammalian cells (Bhargava; Singh, 2012). In this regard, in our study we

evaluated the cytotoxic potential of compounds 2j and 2m on peritoneal macrophages, and it was noted that the two compounds showed low toxicity (CC_{50} 2j = 362.7 μ M; CC_{50} 2m = 263.6 mM). When compared to the reference drug, Amphotericin B (CC_{50} AmB= 74.9 μ M), the compounds tested showed lower toxicity to mammalian cells. Our data agrees in part with the findings of Gomes et al. (2016), which worked with the series to which belong the compounds 2j and 2m. They evaluated the cytotoxicity on splenocytes from BALB/c and found that 2j showed low toxicity (CC_{50} = 269.2 mM), whereas 2m were toxic to splenocytes (CC_{50} = 12.8 mM). In other works of our group (data not shown), the same series were tested in other mammalian cells types and the compounds 2j and 2m also showed low toxicity. These data demonstrate that a significant difference in the toxicity level of the compounds, when tested against different cells types. Even with this difference, the compound 2j shown to be less toxic to different mammalian cells tested, thus making this compound a promising candidate for drug with leishmanicidal activity.

In research for new drugs with leishmanicidal activity, in addition to evaluate cytotoxicity to mammalian cells, it is important studies on intracellular amastigotes, since this parasitic form is responsible for the clinical manifestations of leishmaniasis (Kima, 2007). Our results showed that the compounds 2j and 2m significantly decreased the survival of intracellular amastigotes, with IC_{50} values after 24 hours treatment of 15.20 and 22.33 μ M for 2j and 2m compounds, respectively. Rottini et al. (2015) evaluated the effect of the compound (-) α -bisabolol on amastigotes of *Leishmania amazonensis*, they found that the compound was able to reduce the survival of intracellular amastigote. Marin et al. (2015) studied Nitroindazoles derivatives on *L. infantum* and *L. braziliensis*, and found that the derivative had an effect on intracellular amastigotes. As well as the work of Rottini et al. (2015), and

Marin et al. (2015), the compounds 2j and 2m also reduced the survival of amastigotes inside macrophages. Showing that our compounds are effective against this form of the parasite.

Macrophages infected with *Leishmania* spp. use Nitric Oxide (NO) as a defense mechanism. NO is produced by nitric oxide synthase induction and is essential for the intracellular killing of *Leishmania* within macrophages (Mello et al., 2014). Moreover, even uninfected macrophages are capable of increasing NO production when induced by some substances. The analysis of NO production by uninfected macrophages treated with the compounds 2j and 2m at a concentration over 65 μ M showed increased production of NO, while the Amphotericin B did not induce the production of NO. Macrophages infected with *L. infantum* and subjected to treatment with the compounds 2j and 2m in concentrations from 28 to 1.4 μ M, showed no significant increase in NO production. However, reduced infection rates were observed, suggesting that in this case the compounds may act in the elimination of intracellular parasites via another mechanism of action. According to Singh et al. (2012), the production of NO is not the only way that macrophages have to eliminate parasites, other mechanism such as reactive species of nitrogen and oxygen, production of various Th1 cytokines, lysozyme and other microbicides molecules are used for parasite killing.

Considering that the compounds have shown promising as leishmanicidal drugs, analysis were performed to detect possible targets of the compounds on promastigotes of *L. infantum*. To evaluate the extent of damage to the plasma membrane in the population of parasites treated with the compounds 2j and 2m we utilize staining with propidium iodide (PI), which is a dye that have affinity for nucleic acids and is impermeable to intact cells. It was observed considerable increase in the number of cells labeled with PI through cytometry analysis, as well as by confocal microscopy. By confocal microscopy we observed few cells with altered morphology and low or no staining with PI, cells with leakage of cytoplasmic

material were not observed. It is possible that the compounds are acting on physicochemical properties of the membrane interfering in its permeability and allowing marking without membrane disruption. Similar results were obtained by Oliveira et al. (2009) testing essential oils from plants used in folk medicine against *L. infantum*, which was also observed an increase in the number of cells labeled with PI, and changes in the membrane of *L. infantum* were observed by transmission electron microscopy analysis.

Another target investigated in our study was the mitochondria. According to Salomão et al. (2013) changes in permeability, particularly in the mitochondrial membrane of the parasite, can lead to programmed cell death. The mitochondrial membrane potential is connected to the function of mitochondria and its proper maintenance is essential for the survival of the cells (Fidalgo; Gille, 2011). Furthermore, trypanosomatids have only one mitochondria, making this organelle a potential target for drugs (Ribeiro et al., 2013). Mitochondrial damage was confirmed by a decrease in fluorescence of Rhodamine 123 and consequently a modification of $\Delta\Psi_m$. Therefore, we suggest that the compounds exert their leishmanicidal effect on promastigotes of *L. infantum* by affecting mitochondrial function of the parasite. Compounds such as Itraconazole, Paraconazole and essential oil of *Artemisia annua* have been reported with leishmanicidal activity, and this activity is associated with the loss of mitochondrial membrane potential (Macedo-Silva et al, 2013;. Islamuddin et al, 2014.). In our study, the compounds 2m and 2j also caused depolarization of the mitochondrial membrane.

In the present study was conducted the evaluation the leishmanicidal activity of two phthalimido-thiazole compounds, 2j and 2m, against *Leishmania infantum*. It was observed that the two compounds showed low toxicity to peritoneal macrophages, showed activity against intracellular amastigotes, which stimulated the production of nitric oxide by

macrophages not infected. Also, the compounds interfere with the plasma membrane permeability and changed the potential of the mitochondrial membrane promastigotes of *L. infantum*. The selective activity of the compounds 2j and 2m suggests its potential to be used in the development of new drugs for the treatment of visceral leishmaniasis.

References

- Aliança, A., Anjos, K., de Vasconcelos Reis, T., Higino, T., Brelaz-de-Castro, M., Bianco, É., de Figueiredo, R., 2014. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* 19, 14052–14065. doi:10.3390/molecules190914052
- Barros, G.A.C., Pereira, A. V, Barros, L.C., Jr, A.L., Calvi, S.A., Santos, L.D., Barraviera, B., Ferreira, R.S., 2015. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 48. doi:10.1186/s40409-015-0049-0
- Cardoso, M.V.D.O., Siqueira, L.R.P. De, Silva, E.B. Da, Costa, L.B., Hernandez, M.Z., Rabello, M.M., Ferreira, R.S., Cruz, L.F. da, Moreira, D.R.M., Pereira, V.R.A., Castro, M.C.A.B. de, Bernhardt, P. V, Leite, A.C.L., 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 86, 48–59. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.012
- Da Luz, J.S.B., De Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H. Da, Alves, L.C., Dos Santos, F.A.B., Da Silva, L.L.S., Silva, E.C., De Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural analysis of *leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. *Sci. World J.* 2015. doi:10.1155/2015/617401

- De Monte, C., Carradori, S., Bizzarri, B., Bolasco, A., Caprara, F., Mollica, A., Rivanera, D., Mari, E., Zicari, A., Akdemir, A., Secci, D., 2016. Anti-Candida activity and cytotoxicity of a large library of new N-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 107, 82–96. doi:10.1016/j.ejmech.2015.10.048
- Gomes, P.A.T. de M., Oliveira, A.R., de Oliveira Cardoso, M.V., de Farias Santiago, E., de Oliveira Barbosa, M., de Siqueira, L.R.P., Moreira, D.R.M., Bastos, T.M., Brayner, F.A., Soares, M.B.P., de Oliveira Mendes, A.P., de Castro, M.C.A.B., Alves Pereira, V.R., Leite, A.C.L., 2016. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* 1–12. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.010
- Lamie, P., Phillopes, J., El-Gendy, A., Rarova, L., Gruz, J., 2015. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* 20, 16620–16642. doi:10.3390/molecules200916620
- Stachulski, A. V., Pidathala, C., Row, E.C., Sharma, R., Berry, N.G., Iqbal, M., Bentley, J., Allman, S. a, Edwards, G., Helm, A., Hellier, J., Korba, B.E., Semple, J.E., Rossignol, J.-F., 2011. Thiazolides as novel antiviral agents: I. inhibition of hepatitis B virus replication. *J. Med. Chem.* 54, 4119–4132. doi:10.1021/jm200153p.Thiazolides
- Sundar, S., 2015. Visceral leishmaniasis. *Trop. Parasitol.* 5, 83–85.
- Turan-Zitouni, G., Altintop, D.M., Ozdemir, A., Kaplancikli, A.Z., 2016. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and biological evaluation of thiazoline derivatives as new antimicrobial and anticancer agents 107, 288–294.
- Van Der Westhuyzen, R., Winks, S., Wilson, C.R., Boyle, G.A., Gessner, R.K., Soares De Melo, C., Taylor, D., De Kock, C., Njoroge, M., Brunschwig, C., Lawrence, N., Rao,

S.P.S., Sirgel, F., Van Helden, P., Seldon, R., Moosa, A., Warner, D.F., Arista, L., Manjunatha, U.H., Smith, P.W., Street, L.J., Chibale, K., 2015. Pyrrolo[3,4-c]pyridine-1,3(2H)-diones: A novel antimycobacterial class targeting mycobacterial respiration. *J. Med. Chem.* 58, 9371–9381. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01542

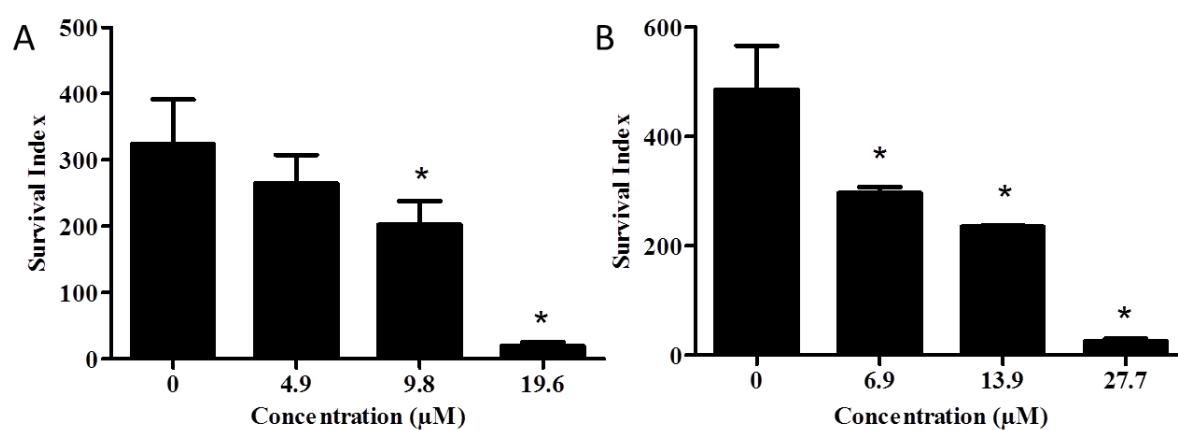


Fig. 1. Survival index of *Leishmania infantum* - infected macrophages after 24 hours of treatment with compounds 2j (A) and 2m (B). The values represent the media of two experiments in biological duplicate and technical quadruplicate $\pm$ standard deviation. * Correspond to significant values $p < 0.05$.

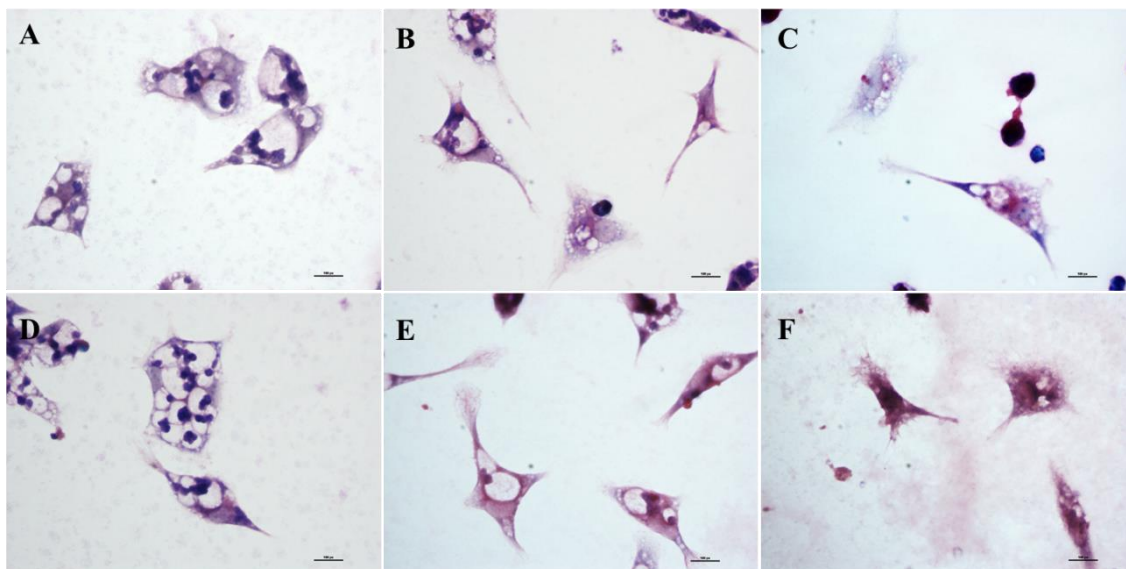


Fig. 2. Peritoneal macrophages infected with *L. infantum* promastigotes and treated with the compounds 2j and 2m for 24 hours. (A and D) Cells not treated. (B) Cells treated with 4.90 μM of compound 2j. (C) Cells treated with 19.62 μM of compound 2j. (E) Cells treated with 6.94 μM of compound 2m. (F) Cells treated with 27.74 μM of compound 2m.

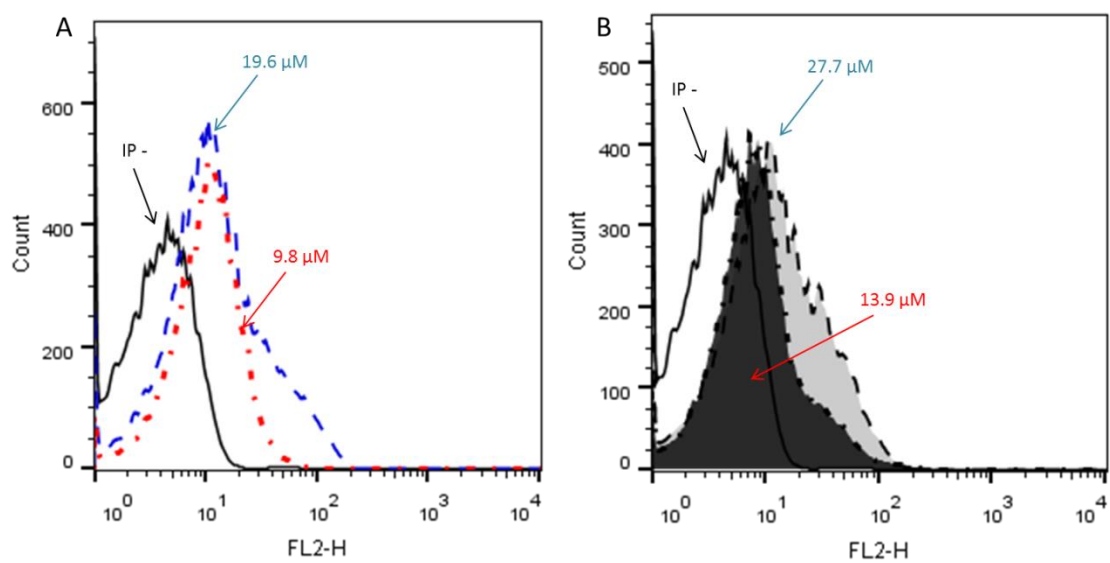


Fig. 3. Histograms representing the effect of treatment with the compounds 2j (A) and 2m (B) on the integrity of promastigotes plasma membrane.

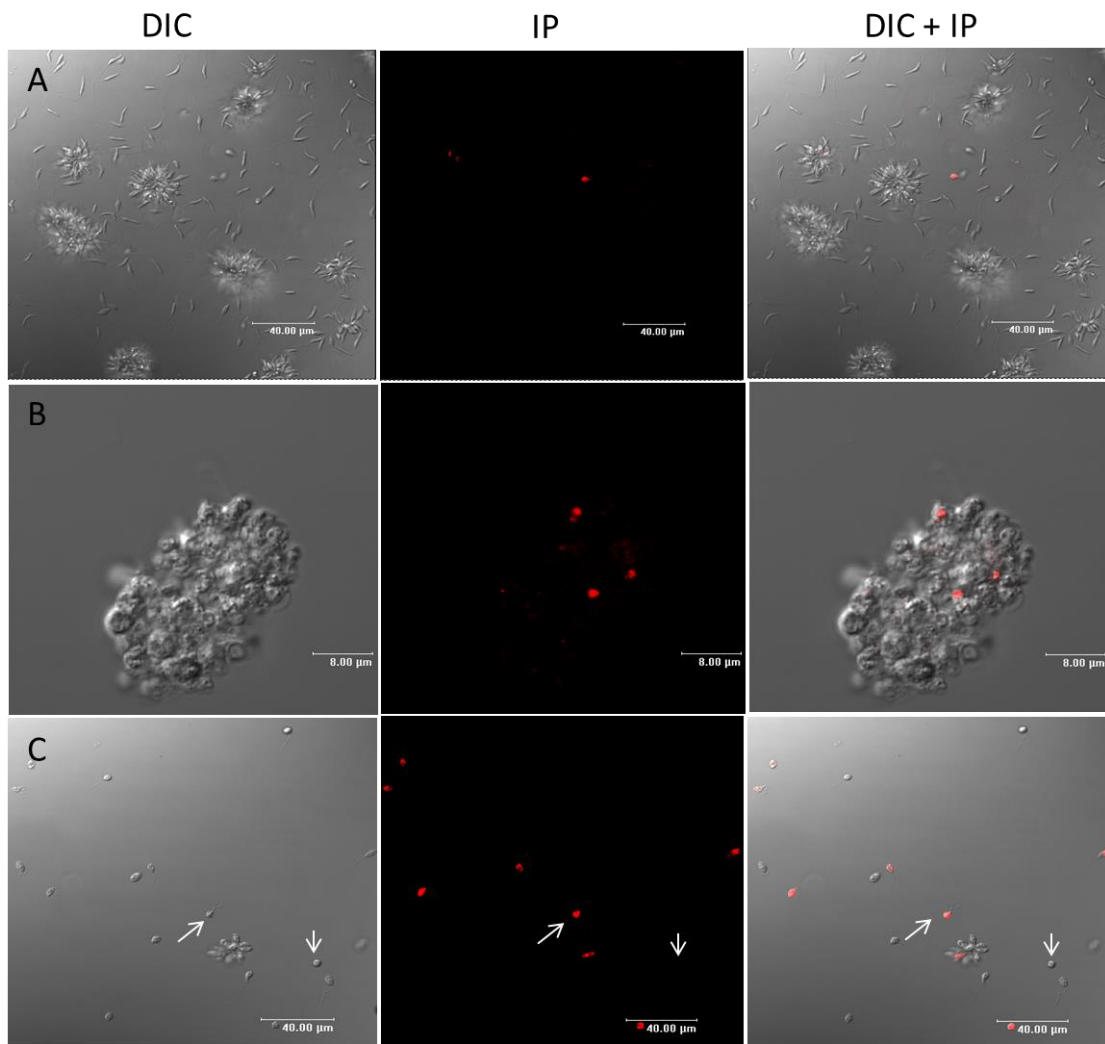


Fig. 4. Confocal microscopy of cells untreated and treated with 2j and 2m, subject to staining with propidium iodide. (A) Cells untreated. (B) Cells treated with 19.62 μM of 2j. (C) Promastigotes treated with 27.74 μM of 2m. Note in cells treated the presence of morphological changes (arrow) with low or none fluorescence intensity of PI. DIC = Differential Interference Contrast; PI = Propidium iodide stain and DIC+ PI = Overlay of the two images

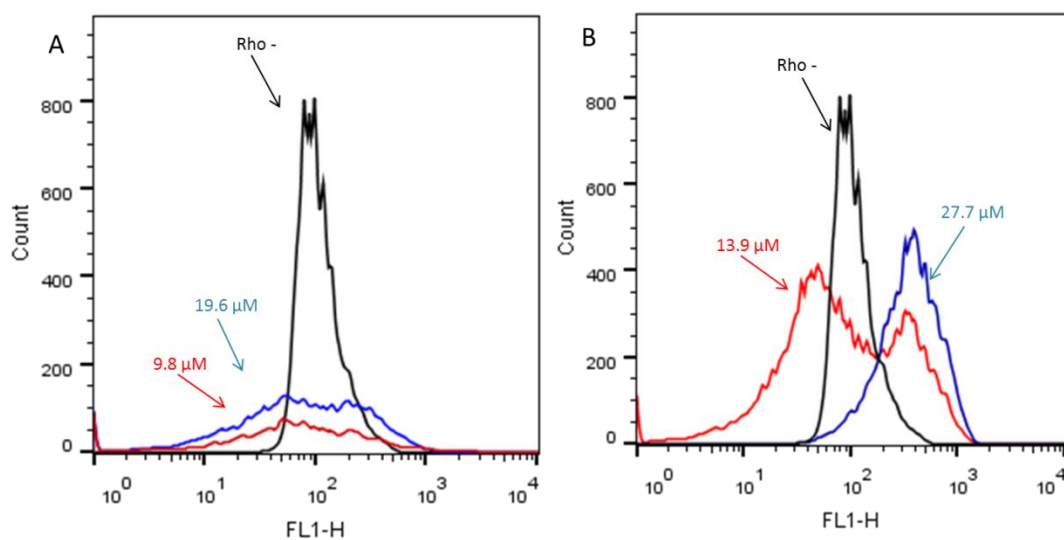


Fig. 5. Histograms representing the effect the compounds 2j (A) and 2m (B) on mitochondrial membrane potential of promastigotes.

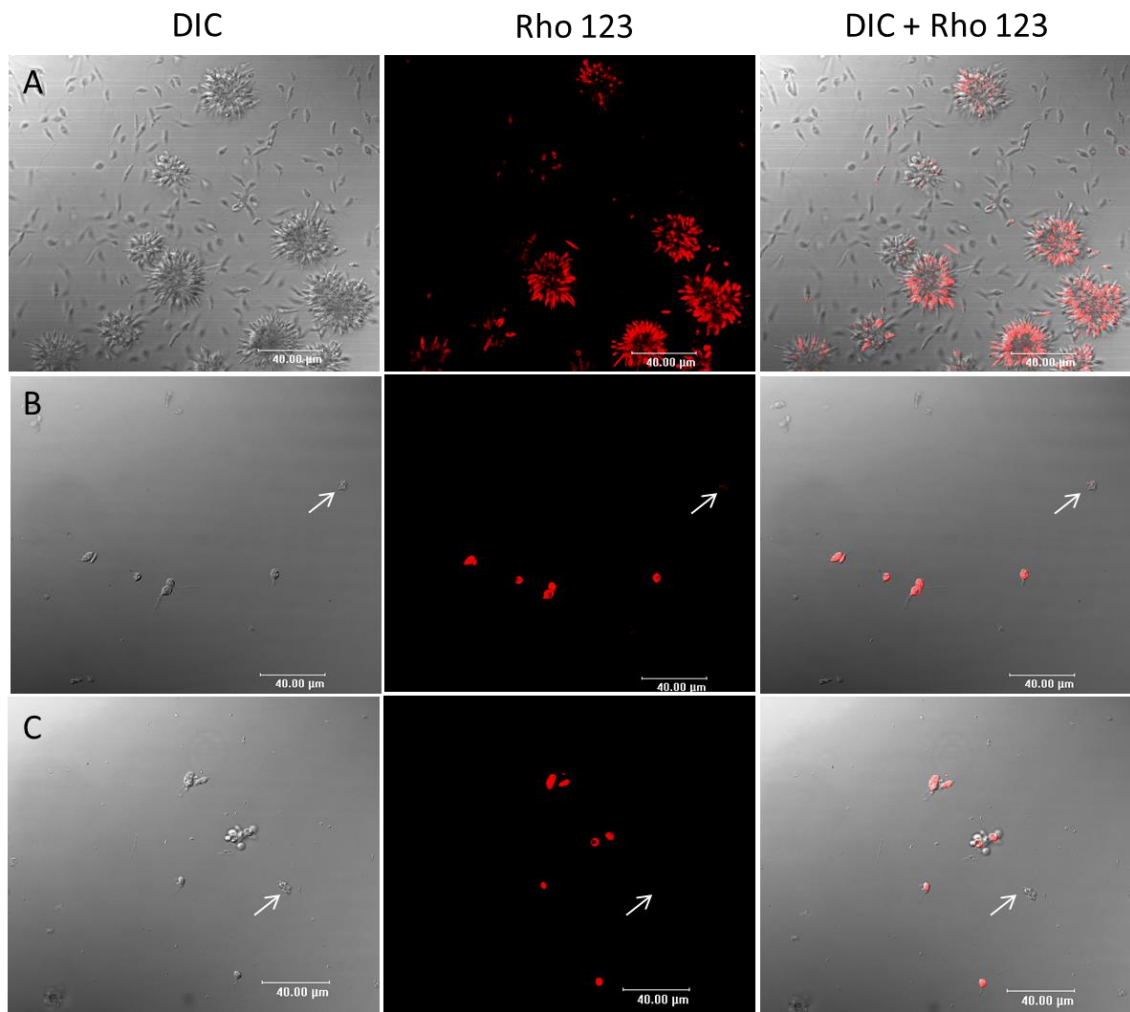


Fig. 6. Confocal microscopy of cells control and treated with 2j and 2m, subject to labeling with Rho 123. (A) Cells control showed morphology and intensity staining with Rho123 preserved. (B) Cells treated with 19.62 μM of 2j. (C) Promastigotes treated with 27.74 μM of 2m. Note in the cells treated the presence of morphological changes (arrows) with low or none labeling with Rho123. DIC = Differential Interference Contrast; Rho123 = Rhodamine 123 stain and DIC+ Rho123 = Overlay of the two images.

Table 1

Leishmanicidal activity, cytotoxic effect against peritoneal macrophage and Selectivity Index of the compounds 2j and 2m.

Compound	Macrophages	Intracellular amastigotes	
	CC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IS
2j	362.66 $\pm$ 18	15.20 $\pm$ 0.7	23.8
2m	263.64 $\pm$ 19	22.33 $\pm$ 0.3	11.8
AmB	74.86 $\pm$ 9.5	2.1 $\pm$ 0.1	35.6

SI (Selectivity index) = CC₅₀/IC₅₀.

Table 2

Effect of the compounds 2j and 2m on the plasma membrane integrity.

Treatment	PI+ (%)
Control	0.6
Methanol	37.03
2j (9.8 μ M)	41.04
2j (19.62 μ M)	58.11
2m (13.87 μ M)	20.64
2m (27.74 μ M)	32.77

PI+: percentage of positive cells for Propidium Iodide

Table 3

Effect of the compounds 2m and 2j on mitochondrial membrane potential.

Treatment	Rho 123**	VI
Control	588.21	0
Methanol	98.22	-0.83
2j (9.8 μ M)	220.67	-0.62
2j (19.62 μ M)	239.28	-0.59
2m (13.87 μ M)	378.55	-0.36
2m (27.74 μ M)	294,27	-0,50

VI- Variation Index = $MT-MC/MC$, where MT is the mean of fluorescence intensity in treated cells; MC is the mean of fluorescence intensity in untreated cells. Note: ** Median fluorescence intensity of Rhodamine 123 (Rho123)

ANEXO A- Comprovante de submissão à Revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*




 Arquivo
  Mover ▾
  Apagar
  Spam
 

 Mais ▾

● AAC00354-16: Manuscript Received 

● **asm@msubmit.net**

Fev 12 em 6:35 PM 

Para amanda_alianca@yahoo.com.br

CC amandaalianca2@gmail.com

Dear Dr. Aliança,

On February 12, 2016, we received the manuscript "In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of Phthalimido-thiazoles derivatives" by Amanda Aliança, Arsênio Oliveira, Marcio Vinicius Silva, Marcos Verissimo Oliveira Cardoso, Ana Paula Feitosa, Karla Raíza Ribeiro, Ana Leite, Luiz Carlos Alves, and Fábio Brayner. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) Full-Length Text intended for publication in the section Experimental Therapeutics.

The manuscript has been assigned the control number AAC00354-16. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

Thank you for submitting your work to *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Regards,
AAC staff

 Responder
  Responder a todos
  Encaminhar
  Mais

ANEXO B- Comprovante de submissão à Revista *Acta Tropica*

De: **Acta Tropica** (actrop@elsevier.com)
Enviada: sábado, 13 de fevereiro de 2016 00:40:55
Para: amanda_alianca@msn.com

Dear Dr. Amanda Aliança,

Your submission entitled "Potential of 2-[4-(naphthalen-2-yl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione and 2-[4-(2,4-dichlorophenyl) thiazol-2-ylamino] isoindoline-1,3-dione against *Leishmania infantum*" has been received by Acta Tropica

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/actrop/>.

Your username is: amanda_alianca@msn.com

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Acta Tropica