



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FERNANDA SILVA ALMEIDA

**ESTUDO *IN SILICO* COM POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS E *IN VITRO* ANTI-
LEISHMANIA DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**

**CAMPINA GRANDE
2018**

FERNANDA SILVA ALMEIDA

**ESTUDO *IN SILICO* COM POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS E *IN VITRO* ANTI-
LEISHMANIA DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura.

Coorientadora: Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A447e Almeida, Fernanda Silva.
Estudo *in silico* com possíveis alvos terapêuticos e *in vitro* anti-leishmania de derivados espiro-acridínicos [manuscrito] : /
Fernanda Silva Almeida. - 2018.
117 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura,
Departamento de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Profa. Dra. Tatjana Keesen Lima de Souza
Clemente, UFPB - Universidade Federal da Paraíba"

1. Acridina. 2. Anti-amastigota. 3. Anti-promastigota. 4.
Atividade leishmanicida.

21. ed. CDD 615.1

FERNANDA SILVA ALMEIDA

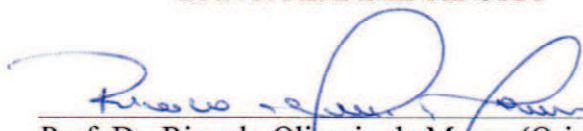
**ESTUDO *IN SILICO* COM POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS E *IN VITRO* ANTI-
LEISHMANIA DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

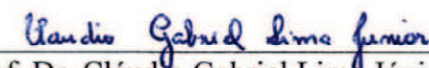
Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico

Aprovada em: 12 / 03 / 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)


Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

DEDICATÓRIA

A Deus que me permitiu chegar até aqui. A minha família pelo apoio e por acreditar no meu esforço e dedicação. A Wesley, que sempre esteve comigo durante todo esse período me apoiando e dando forças.

Aos meus amigos e a todos que torceram por mim e por este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para esta pesquisa.

Primeiramente ao meu orientador e pessoa amiga que é o Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, por ter me aceitado como sua orientanda, por acreditar em mim e por me ter lançado este desafio que é a vida acadêmica.

Agradeço também a minha co-orientadora Prof. Dr. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente por ter aberto as portas do seu laboratório, no qual contribuiu crucialmente para este projeto, por ter confiado em mim e pelo seu carinho e atenção.

Agradeço imensamente aos meus queridos amigos de pesquisa do LABIDIC, no qual me receberam de braços abertos e que me ajudaram bastante, estendendo uma mão amiga em vários momentos, principalmente nos experimentos! Em especial a Juliana que me ensinou toda a prática de cultivo e experimentos da Leishmania. Muito obrigada!

As minhas colegas de mestrado Laisla, Camila, Vandiará, Fernanda e Luana, pela força e por todos os momentos que vivemos juntas.

A Fred pela parceria no estudo de docking, no qual me ajudou imensamente e contribuiu de grande valia a minha pesquisa.

Ao professor Elquio, que me aconselhou tantas vezes, pela sua compreensão e ajuda.

A Vanessa que me auxiliou diversas vezes e a todos os demais que contribuíram para esta pesquisa.

“I am half agony, half hope...”

Jane Austen - Persuasion

RESUMO

A leishmaniose é considerada como doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde, onde o Brasil está nas estatísticas mundiais de países com maior prevalência dessa patologia. Essa doença engloba diversas manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas ulcerosas simples a formas mucocutâneas desfigurantes, e a forma visceral da doença, que pode ser fatal quando não tratada. O tratamento das leishmanioses é feito através da administração de antimoniais pentavalentes, que apresentam diversas limitações, como a dolorosa administração por via parenteral e a elevada toxicidade, sendo pouco satisfatórios, assim destaca-se a importância no desenvolvimento de novos medicamentos que sejam capazes de diminuir esses efeitos. Diante disso, este trabalho propõe um estudo *in silico* com possíveis alvos terapêuticos e a avaliação da atividade anti-*Leishmania* *in vitro* de compostos espiro-acridínicos frente as formas promastigota e amastigota da *Leishmania infantum*. Neste estudo foram analisados 10 compostos espiro-acridínicos da série AMTAC. No estudo *in silico*, foram analisados *docking* molecular com as enzimas Esterol 14-alfa dimetilase, Tripanotona redutase e Topoisomerase I, utilizando o *software* Hyper Chem v. 8.0. As estruturas tridimensionais das enzimas usadas no *docking* molecular, foram obtidas diretamente do Protein Data Bank (PDB). Todos os compostos apresentaram interação com os alvos estudados, do tipo pontes de hidrogênio e/ou hidrofóbicas, que foram significativas. Quanto a avaliação da atividade *in vitro* anti-*Leishmania*, avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio, foram observados valores de IC₅₀ de 1,109 a 6,058 µg/mL, com exceção do AMTAC 09 (IC₅₀ > 400 µg/ml). Os resultados dos compostos estudados foram melhores do que o antimonial de meglumina (IC₅₀= 25610 ±1,46µg/ml). Nesta série foi possível observar através da relação estrutura-atividade que o AMTAC 01 (IC 50= 2,039 ± 0,06 µg/ml), tido como estrutura base para o desenvolvimento dos variados spiro-acridínicos aqui estudados, e o AMTAC 11 (IC₅₀= 1,109µg/mL), radical dimetilamino substituinte, parece favorecer a atividade farmacológica, provavelmente devido aos efeitos eletrônicos doadores e lipofílicos positivos. Quanto a atividade na forma amastigota da *Leishmania. infantum* dos compostos mais ativos, destaca-se expressiva atividade do AMTAC 11 (EC₅₀= 0,974 ± 0,2 µg/mL), sendo maior que seus controles positivos, antimonial de meglumina (EC₅₀= 112.800 ±12µg/Ml) e anfotericina B (1,597±0,26 µg/ml). No estudo de *docking* molecular, os derivados espiro-acridínicos que apresentaram melhor perfil de interação com os alvos estudados foram os AMTAC 13 (R₁= NO₂) e AMTAC14 (R₃= NO₂) e que também apresentaram uma atividade anti-*Leishmania* expressiva. Nenhum dos derivados apresentou citotoxicidade para hemácias de origem humana (HC₅₀= > 400 µg/ml). Dessa forma, podemos concluir que os compostos espiro-acridínicos apresentam potencial efeito contra a *Leishmania*, porém são necessários estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão do seu possível mecanismo de ação.

Palavras-Chave: Acridina; *Docking* molecular; Anti-amastigota; Anti-promastigota.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered as a neglected disease by the World Health Organization, where Brazil is in the world statistics of countries with a higher prevalence of this pathology. This disease encompasses several clinical manifestations ranging from simple ulcerous cutaneous lesions to disfiguring mucocutaneous forms, and the visceral form of the disease, which can be fatal when left untreated. The treatment of leishmaniasis is done through the administration of pentavalent antimonials, which present several limitations, such as painful parenteral administration and high toxicity, being unsatisfactory, highlighting the importance in the development of new drugs that are able to decrease these effects. Therefore, this work proposes an *in silico* study with possible therapeutic targets and the evaluation of the anti-Leishmania activity *in vitro* of spiro-acridine compounds against the promastigote and amastigote forms of *Leishmania infantum*. In this study 10 spiro-acridine compounds of the AMTAC series were analyzed. In the *in silico* study, molecular *docking* with the enzymes Esterol 14- α dimethylase, Tripanotiona retutase and Topoisomerase I, using Hyper Chem v. 8.0 *software*. The three-dimensional structures of the enzymes used in molecular *docking* were obtained directly from the Protein Data Bank (PDB). All of the compounds showed interaction with the hydrogenated and / or hydrophobic bridges studied, which were significant. Regarding the evaluation of *in vitro* anti-Leishmania activity, evaluated using the colorimetric test of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, IC₅₀ values of IC₅₀ of 1.109 to 6.058 $\mu\text{g} / \text{mL}$ were observed), except AMTAC 09 (IC₅₀ > 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$). The results of the compounds studied were better than the meglumine antimonial (IC₅₀ = $25610 \pm 1.46\mu\text{g} / \text{ml}$). In this series, it was possible to observe the structure – activity relation of AMTAC 01 (IC₅₀ = $2.039 \pm 0.06 \mu\text{g} / \text{ml}$), used as the base structure for the development of the various spiro-acridines studied, and AMTAC 11 (IC₅₀ = $1.109\mu\text{g} / \text{mL}$), dimethylamino radical, seems to favor pharmacological activity, probably due to positive electron donors and lipophilic effects. As for the activity in the amastigote form of *Leishmania infantum* of the most active compounds, there is a significant activity of AMTAC 11 (EC₅₀ = $0.974 \pm 0.2 \mu\text{g} / \text{mL}$), being greater than its positive controls, meglumine antimoniate (EC₅₀ = $112,800 \pm 12\mu\text{g} / \text{ml}$) and amphotericin B ($1.597 \pm 0.26 \mu\text{g} / \text{ml}$). In the molecular *docking* study, the spiro-acridine derivatives that presented the best interaction profile with the target were AMTAC 13 (R₁ = NO₂) and AMTAC14 (R₃ = NO₂) and also showed significant anti-*Leishmania* activity. None of the derivatives showed cytotoxicity to erythrocytes of human origin (HC₅₀ => 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Thus, we can conclude that spiro-acridine compounds have a potential effect against Leishmania, but more studies are needed to better understand of its possible mechanism of action.

Keywords: Acridine; Molecular *docking*; Anti-amastigote; Anti-promastigote.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana e visceral....	23
Figura 2	Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015.....	24
Figura 3.	Taxonomia de <i>Leishmania</i> sp.....	25
Figura 4.	Hospedeiro invertebrado de <i>Leishmania</i> sp.	26
Figura 5.	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp	27
Figura 6.	Estrutura do antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B), respectivamente.....	29
Figura 7.	Dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose.....	30
Figura 8.	Estrutura da Anfotericina B (AmB).....	31
Figura 9.	Estrutura molecular da Pentamidina.....	32
Figura 10.	Estrutura da Miltefosina.....	33
Figura 11.	Estruturas do Cetoconazol (A), Fluconazol (B) e Itraconazol (C).....	34
Figura 12.	Estrutura do Sitamaquine.....	37
Figura 13.	Estrutura da Paronomicina.....	37
Figura 14.	Estrutura química da acridina e suas atividades biológicas.....	39
Figura 15.	Estrutura da Amsacrina (<i>m</i> -AMSA).....	39
Figura 16.	Representação dos modos de interação com o DNA: intercalação, ligação ao sulco e intercalação "threading".....	40
Figura 17.	Derivados acridínicos com potenciais atividade anti-parasitária.....	42
Figura 18.	Estrutura química dos esteróis.....	46
Figura 19.	Estrutura química dos derivados espiro-acridínicos e as respectivas substituições no anel aromático.....	50
Figura 20.	Compostos posicionados no alvo CYP51 (A) e as interações eletrostáticas da AMTAC 08 com a CYP51 (B).....	62
Figura 21.	Complexo formado pelo docking molecular dos compostos (ligantes) com a topoisomerase I (alvo), seguido da interação dos compostos AMTAC 13 e AMTAC 01 com o alvo.....	64

Figura 22.	Composto 13 e 14 com suas respectivas interações com o alvo Topoisomerase I.....	65
Figura 23.	Derivados tiazolidínicos e suas interações com a Topoisomerase I de <i>L. major</i>	66
Figura 24.	Complexo formado pelo docking molecular dos compostos (ligantes) com a tripanotiona redutase (alvo).....	66
Figura 25.	Interações entre AMTAC13 e tripanotiona redutase.....	67
Figura 26.	Interações entre AMTAC14 e tripanotiona redutase.....	68
Figura 27.	Estrutura química da Mepacrina.....	68
Figura 28.	Estrutura química dos AMTAC 01 e AMTAC 11.....	70
Figura 29.	Diagrama de Craig para os descritores estruturais π e σ	72
Figura 30.	Estrutura química das AMTAC 06, AMTAC 08 e AMTAC 10, respectivamente.....	74
Figura 31.	Estrutura química do composto 3- <i>aril</i> -2-fenilimidazo[1,2- <i>a</i>]pirazino [3,5-(Cl ₂)C ₆ H ₃].....	75
Figura 32.	Estrutura química dos compostos 4- (3-benzilidina substituída) -2-substituído-3, 4, 5, 6-tetrahidrobenzo [h] quinazolina.....	76
Figura 33.	Estrutura química dos AMTAC 13 e AMTAC 14.....	77
Figura 34.	Estrutura química da AMTAC 09.....	78
Figura 35.	Formas promastigota (A) e amastigota (B) de <i>L. infantum</i> em microscopia óptica	83
Figura 36.	Estrutura química do composto QuinDer1	86
Figura 37.	Estrutura química dos compostos IF-2 e IFO-2.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas especificações.....	48
Tabela 2.	Parâmetros de configuração dos grids para cada macromolécula.....	50
Tabela 3.	Condições de cultivo	54
Tabela 4.	Valores de energia ($\Delta G = \text{Kcal/mol}$) dos derivados espiro-acridínicos da série AMTAC com os respectivos alvos de ligação	59
Tabela 5.	Resíduos que formaram ligações de hidrogênio com os ligantes para CYP5.	62
Tabela 6.	Resíduos que formaram ligações de hidrogênio com os ligantes para TOP1.....	64
Tabela 7.	Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de promastigotas de <i>L. infantum</i> de derivados espiro-acridínicos	69
Tabela 8.	Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações dos fármacos de referência: Glucantime e Anfotericina B.....	80
Tabela 9.	Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de promastigotas de <i>L. infantum</i> , concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC_{50}) e índice de seletividade ($IS = HC_{50}/IC_{50}$) de derivados espiro-acridínicos	82
Tabela 10.	Concentração Dose efetiva 50% (EC_{50}) de amastigotas de <i>L. infantum</i> dos compostos AMTAC 01 e AMTAC 11 e os fármacos de referência: Glucantime e Anfotericina B.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro-acridínicos AMTAC 01 e AMTAC 11.....	71
Gráfico 2.	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro- acridínicos AMTAC 06, AMTAC 08 e AMTAC 10.....	74
Gráfico 3.	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro-acridínicos AMTAC 13 e AMTAC 14.....	77
Gráfico 4.	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações da droga de referência: Anfotericina B.....	79
Gráfico 5.	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações da droga de referência: Glucantime [®]	79
Gráfico 6.	Viabilidade das formas amastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro-acridínicos AMTAC 01 e AMTAC 11.....	85
Gráfico 7.	Viabilidade celular das formas amastigotas de <i>L. infantum</i> na presença de diferentes concentrações das drogas de referência: Anfotericina B e Glucantime.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BOD	Estufa de demanda biológica de oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (desoxiribonucleic acid)
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EC50	Concentração efetiva capaz de diminuir em 50% a viabilidade celular
HC50	Concentração capaz de causar de 50% de hemólise
IC50	Concentração capaz de inibir de 50% de crescimento
IS	Índice de Seletividade
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2 <i>H</i> -brometo de tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (phosphate buffered saline)
SBF	Soro Bovino Fetal
SbIII	Antimonial trivalente
SbV	Antimonial pentavalente
TR	Tripanotona redutase
Top1	Topoisomerase de DNA do tipo I
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Doenças tropicais negligenciadas: Leishmaniose.....	21
3.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	24
3.3 Terapêutica da Leishmaniose	27
3.4 Resistência ao tratamento farmacológico atual	33
3.5 Novos arsenais terapêuticos para o tratamento da leishmaniose.....	35
3.6 Acridina e seus derivados.....	37
3.7. Possíveis alvos de interação dos derivados acridínicos e sua correlação com atividade leishmanicida.	41
4 METODOLOGIA.....	48
4.1 Obtenção dos compostos	48
4.2 Estudo de <i>docking</i> molecular: Preparo das moléculas e macromoléculas	49
4.3 Preparo das soluções dos derivados acridínicos avaliados	50
4.4 Parasitos e sua manutenção <i>in vitro</i>	50
4.5 Fármacos de referência	51
4.6 Avaliação da atividade antipromastigota de <i>Leishmania infantum</i> e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC ₅₀).....	52
4.7 Avaliação da atividade hemolítica.....	52
4.8 Determinação do índice de seletividade.....	53
4.9 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos AMTAC01 e AMTAC11 sobre formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i>	53
5.0 Análise estatística.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Estudo de <i>docking</i> molecular	57
5.2.1 Alvo biológico: 14-Alfa- Esterol-Dimetilase (CYP51)	60
5.2.2. Alvo biológico: Topoisomerase 1 (TOP1).....	62
5.2.3 Alvo biológico: Tripanotiona redutase (TryR)	65
5.3 Avaliação da atividade antipromastigota de novos derivados spiro-acridínicos	68
5.4 Avaliação da citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos para células de mamíferos: investigação da atividade hemolítica sobre hemácias de origem humana e Índice de seletividade.....	80

5.5 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos AMTAC 01 e AMTAC11 sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	82
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diverso de patologias transmissíveis que prevalecem em regiões tropicais e subtropicais, principalmente atingindo populações que vivem sem saneamento adequado e em estreito contato com vetores infecciosos, animais domésticos e da pecuária (WHO, 2017). Dentre as doenças negligenciadas, destacamos a leishmaniose, que se enquadra como uma doença infecto-parasitária cujos agentes etiológicos são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* que integram o conjunto das seis doenças tropicais mais preocupantes na África, Ásia e América Latina, no qual está associada à desnutrição, moradia precária, ausência de respostas imunológicas adequadas, e a falta de recursos da população para o acesso ao tratamento (SOARES-BEZERRA et al., 2004; SILVA, 2008; WHO, 2015).

Os principais vetores da leishmaniose são os mosquitos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (BASANO; CAMARGO, 2004; SILVA, 2004). Esta patologia apresenta diversas manifestações clínicas que podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar americana (LTA), doença infecciosa caracterizada por lesões ulcerosas cutâneas e/ou muco-cutâneas, e leishmaniose visceral (LV), onde a infecção acomete as vísceras do indivíduo, podendo levar o paciente a óbito em quase 100% dos casos se o tratamento for tardio (DAVID; CRAFT, 2009; MURRAY et al., 2005; WHO, 2010).

O Brasil está dentro das estatísticas mundiais como um dos países com maior prevalência dessa patologia, sendo relatado 3200 casos para a LV e 12590 para LTA no ano de 2016, segundo o ministério da saúde. A doença é geralmente caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas (BRASIL, 2016 a; BRASIL, 2016 b).

Apesar da leishmaniose estar inserida no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas, o arsenal quimioterápico utilizado no seu tratamento é bastante limitado. Os antimonial pentavalentes são os principais medicamentos utilizados há mais de sete décadas no tratamento dos diferentes tipos de leishmanioses, apesar da dolorosa via de administração parental, dos sérios efeitos colaterais e do surgimento de cepas resistentes (FEASEY et al., 2010; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Devido à sua replicação rápida, protozoários da família a qual pertence a *Leishmania* sp (Tripanosomatidae) demonstraram muitas semelhanças com as células tumorais e várias das moléculas que apresentam atividade anti-tumoral tem sido testadas com sucesso para

atividade leishmanicida (DELMAS et al., 2004; DI GIORGIO et al., 2007; JULIEN et al., 2005; PRAJAPATI et al., 2012).

A acridina, que anteriormente era utilizada como corante, demonstrou ao longo dos anos de pesquisa uma promissora arma terapêutica no uso clínico, quando em 1913 foi utilizada na clínica médica com ação bactericida, por meio da ação da proflavina e acriflavina descoberta por Browning (ALBERT, 1966); e a partir de 1940, a mepacrina vem sendo utilizada como composto antimalárico e no tratamento do câncer (GREENWOOD, 1995). Assim, desde a década de 1990, vários derivados de acridina, que tem revelado uma forte atividade anti-proliferativa em células humanas transformadas, têm sido considerados promissores como agentes antitumoral e para a terapia antiparasitária (DELMAS et al., 2004; DI GIORGIO et al., 2007).

A forte atividade dos derivados acridínicos se dá devido à capacidade de intercalar os pares de bases de DNA, levando a apoptose no ciclo celular (SONDHI et al., 2010). Dessa forma, inspirado pela ampla gama de atividades biológicas úteis apresentada por estes derivados e na continuação de nossos esforços em busca de potenciais agentes leishmanicida, este trabalho propõe um estudo *in silico* com proposta de caracterizar possíveis mecanismos de ação e avaliação da atividade anti-*Leishmania* *in vitro* de compostos espiro-acridínicos, como candidatos a fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar um possível candidato a fármaco através de estudos *in silico* e *in vitro* de derivados espiro-acridínicos com potencial atividade anti-Leishmania.

2.2 Específicos

- Realizar estudos de *Docking* molecular com os derivados espiro-acridínicos seus respectivos possíveis alvos;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania in vitro* dos derivados espiro-acridínicos sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Realizar um estudo de Relação Estrutura-atividade (SAR);
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos derivados espiro-acridínicos mais promissres sobre formas amastigotas de *Leishmania infantum*;
- Verificar a citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos através da atividade hemolítica;
- Avaliar o índice de seletividade dos compostos em relação ao parasito e à atividade hemolítica;

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doenças tropicais negligenciadas: Leishmaniose

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são compostas por infecções parasitárias e bacterianas, dentre as quais está a Leishmaniose. Em todo o mundo, cerca de 2 bilhões de pessoas estão acometidas ao risco de contraírem as DTN's e mais de 1 bilhão de pessoas são afetadas por essas doenças, levando a morte de até meio milhão de pessoas anualmente. A leishmaniose visceral está entre as três DTN com maiores taxas de óbito (HOTEZ et al., 2007; MARTINS-MELO et al., 2016).

Estas doenças predominam em regiões de clima tropical e subtropical, sendo disseminadas em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, custando a economia desses países cerca de bilhões de dólares a cada ano, sendo de comum ocorrência, principalmente em áreas rurais e em alguns ambientes urbanos de países de baixa renda da África Subsaariana, Ásia e América Latina (WHO, 2016).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo protozoário *Leishmania*. Mais de 20 espécies de *Leishmania* conhecidas por serem infecciosas para humanos são transmitidas pela picada de mosquitos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* infectados. Existem dois tipos principais de leishmaniose, que podem ser agrupadas em: leishmaniose cutânea ou tegumentar americana (LTA), a mais comum, doença infecciosa caracterizada por lesões ulcerosas cutâneas e/ou muco-cutâneas, e leishmaniose visceral (LV), onde a infecção acomete as vísceras do indivíduo, e é muitas vezes conhecida como calazar (do indu *kala-azar*: *kala* = negra, *azar* = febre; termo empregado em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele durante a doença em alguns pacientes), sendo a manifestação mais grave da doença podendo levar o paciente a óbito em quase 100% dos casos se o tratamento for tardio (Figura 1) (DAVID; CRAFT, 2009; MURRAY et al., 2005; WHO, 2016).

Figura 1. Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana e visceral.



Fonte: BRASIL, 2006; GOTO; LINDOSO, 2012. (A) LCL, caracterizada por lesão única de borda elevada e fundo granulomatoso na região maleolar externa; (B) LR, apresentando pápulas e vesículas ao redor da lesão curada da leishmaniose cutânea na perna; (C) LD, apresentando múltiplas lesões pequenas e ulceradas nas costas; (D) LCD apresentando lesões tumorais e nódulos associados com crostas e várias cicatrizes de lesões anteriores na coxa esquerda. (E) LMC, apresentando destruição parcial da região nasolabial; (F) leishmaniose cutânea atípica em um paciente infectado com o vírus da imunodeficiência humana apresentando múltiplas máculas no tórax e abdômen. (Inserção em F) úlcera no pênis de um paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida. (G) LV na fase inicial; (H) LV no período final, caracterizada pela intensa desnutrição e hepatoesplenomegalia.

As estratégias para restringir esta doença pode ser pelo controle vetorial, diagnóstico precoce e tratamento. Porém, torna-se um desafio seguir esses critérios, devido à falta de

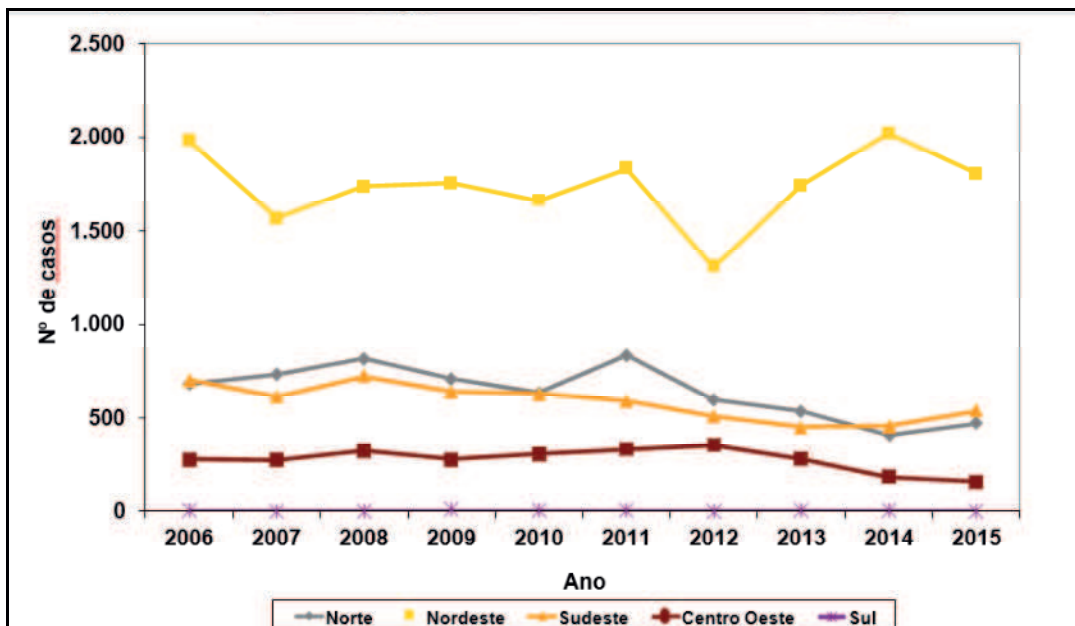
ferramentas de diagnóstico adequado e de tratamento seguro (HOTEZ et al., 2007; MARTINS-MELO et al, 2016; WHO, 2016).

A LV era primariamente uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Porém, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2014).

Esta patologia apresenta um alto índice de mortalidade no Brasil, estando na terceira posição logo após a doença de Chagas e esquistossomose, correspondendo a 90% dos casos na América Latina. Em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 6,7% em 2012 (BRASIL, 2014; MARTINS-MELO et al, 2016)

A LV é relatada em 21 estados do Brasil, com maior incidência na região Nordeste (Figura 2). Essa forma da doença é potencialmente fatal se não diagnosticada e tratada prontamente e é responsável pela maioria dos óbitos por leishmanioses (MARTINS-MELO et al., 2016).

Figura 2. Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015

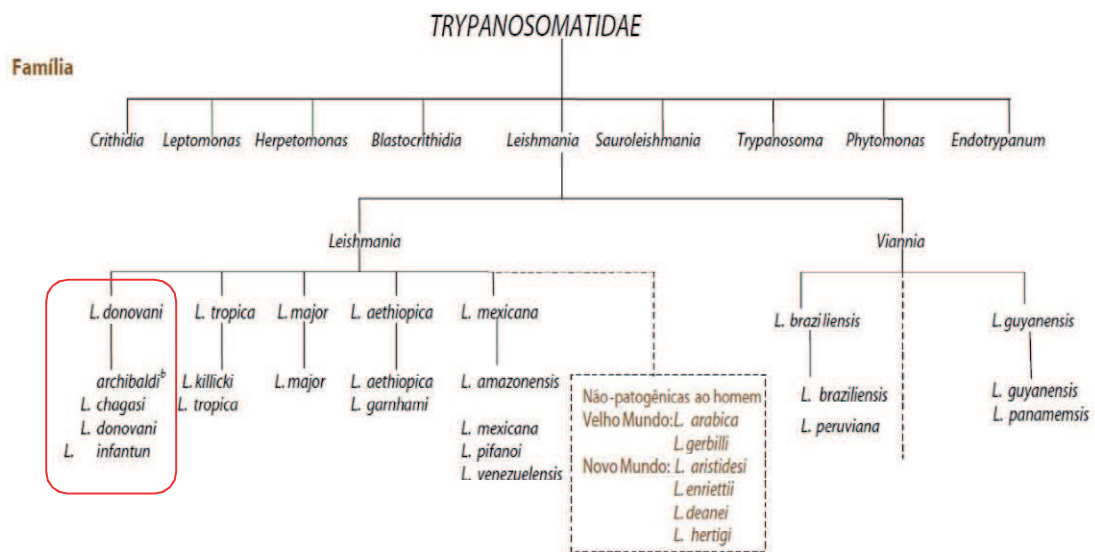


Fonte: BRASIL, 2016.

3.2 Ciclo de vida de *Leishmania* sp

A descoberta dos agentes etiológicos da leishmaniose ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham, em 1885 na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de Calazar. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde como *Leishmania donovani* (figura 3) (RATH et al., 2003). No ciclo de vida da *Leishmania infantum* (chagasi), agente etiológico da leishmaniose visceral no Novo Mundo, a transmissão ocorre, principalmente, através da picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Esta espécie tem demonstrado uma grande capacidade de se adaptar em vários ambientes, aumentando muito a densidade destes insetos dentro e ao redor de habitações humanas facilitando a transmissão da doença (BARATA, 2005).

Figura 3. Taxonomia de *Leishmania* sp.

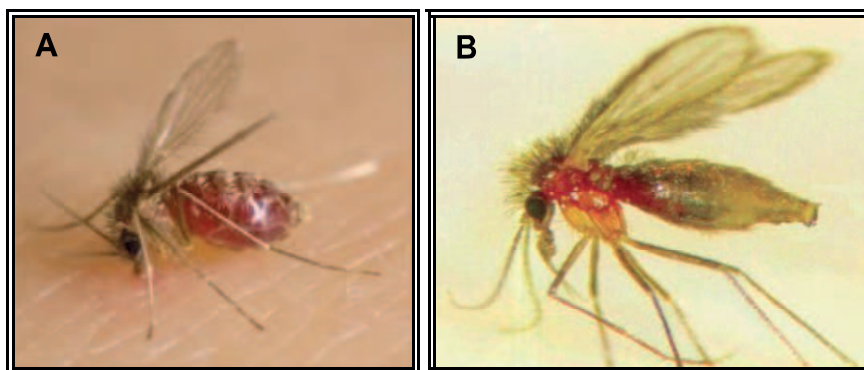


Fonte: WHO, 2010.

O parasita tem um ciclo de vida digenético alternando entre o hospedeiro mamífero e o vetor que, por sua vez, são mosquitos flebotomíneos (Ordem *Díptera*; Família *Psychodidae*; Sub-Família *Phlebotominae*). Estes são insetos pequenos (geralmente 1.5 - 2 mm) e são encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BASANO; CAMARGO, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SILVA, 2008;).

Os flebótomos diferenciam-se entre os gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo nos quais transmitem espécies de *Leishmania* patogênicas para seres humanos (Figura 4). O parasita alterna seu ciclo de vida entre o trato digestivo do vetor e o fagolisossoma dos macrófagos hospedeiros vertebrados (ADAUI et al., 2011; CONCEIÇÃO, 2015; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Figura 4. Hospedeiro invertebrado de *Leishmania* sp.



Fonte: BRASIL, 2006. (A) *Phlebotomus papatasi*; (B) *Lutzomyia longipalpis*;

Os parasitas causadores da leishmaniose se apresentam na forma amastigota e promastigota. A forma amastigota possui uma estrutura arredondada ou ovalada sem flagelos, que se alojam nos fagossomos dos monócitos/ macrófagos dos hospedeiros vertebrados, enquanto que a promastigota é alongada, e flagelada, que ficam livres na corrente sanguínea (BASANO; CAMARGO, 2004; BATES; ROGERS, 2004; GOMES; OLIVEIRA, 2012; SILVA, 2008).

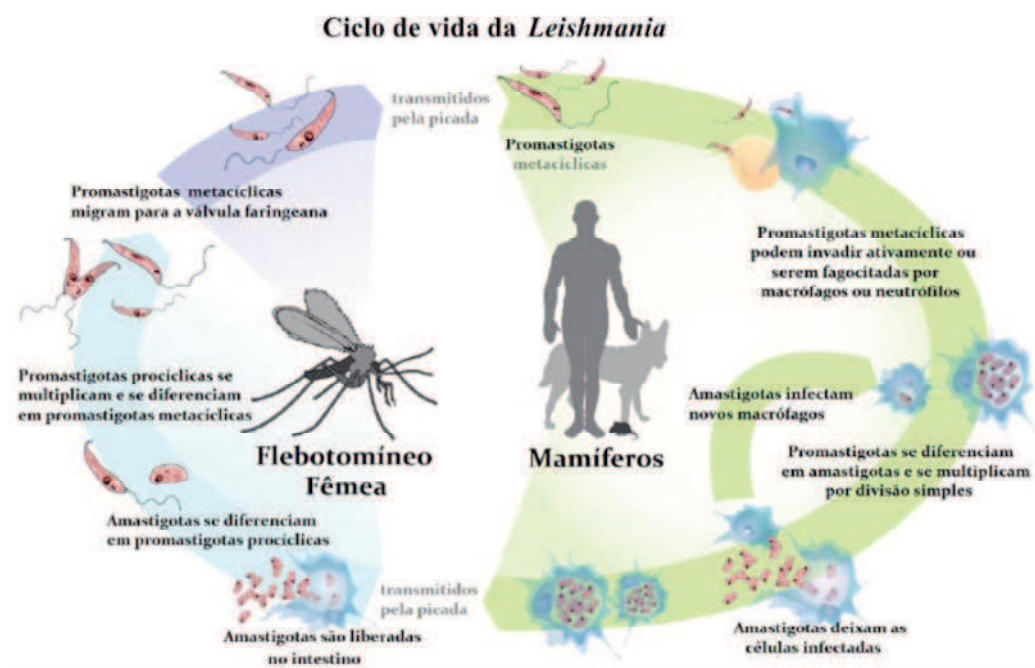
O desenvolvimento da *Leishmania* sp. no vetor é iniciado quando este ingere o sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas no hospedeiro vertebrado. A alteração das condições no processo de deslocamento do hospedeiro mamífero para o intestino médio do mosquito (tal como diminuição da temperatura e aumento do pH) desencadeia na transformação morfológica e no desenvolvimento do parasita (BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

No trato digestivo do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, forma avirulenta, fracamente móvel com um flagelo curto e que se replicam intensamente. Posteriormente os parasitas começam a retardar a sua replicação e passam a se diferenciar em nectomonada, de forte motilidade. Eles se movem em direção ao intestino médio anterior e depois se desenvolvem em leptomonadas, as quais se multiplicam intensamente resultando em um aumento da infecção no intestino anterior do inseto.

Finalmente, a *Leishmania* se transforma no estado metacíclico infeccioso (BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Ao realizarem o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas depositam no hospedeiro vertebrado a forma promastigota metacíclica que é capturada pelas células fagocíticas do hospedeiro, diferenciando-se em amastigotas no interior destas (Figura 5) (ADAUI et al, 2011; CONCEIÇÃO, 2015; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Figura 5. Ciclo de vida da *Leishmania* sp



Fonte: Nursing, 2017.

Por fim, as amastigotas, quando sobrevivem aos mecanismos microbicidas das células fagocíticas, replicam-se até provocar o rompimento celular sendo liberadas para o meio extracelular e podendo infectar mais células fagocíticas, dando continuidade ao ciclo de transmissão (CONCEIÇÃO, 2015; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Cada forma das leishmanioses apresenta um perfil epidemiológico distinto, nas quais suas manifestações clínicas variam. Diversos fatores irão influenciar no tipo de manifestação clínica a ser desenvolvida, dentre eles podemos destacar a espécie de *Leishmania* sp. presente na infecção (infectividade, patogenicidade e virulência), fatores ambientais, além da capacidade imunológica e constituição genética do hospedeiro vertebrado infectado (BOGDAN et al., 1996; BRASIL, 2007; MURRAY et al., 2005; WHO, 2010).

As manifestações clínicas da Leishmaniose apresentam-se de duas formas distintas, de forma geral, a depender dos fatores citados anteriormente. A LTA possui o sítio de infecção na derme. A apresenta como característica principal lesão típica, úlcera indolor, de bordo elevado e fundo granuloso. Podem haver recidiva a partir da lesão ativa (ou próxima) a borda da lesão curada ou uma cicatriz, que se desenvolve com ou sem tratamento após um período variável.

Ainda existe a Leishmaniose Difusa (LD), que se apresenta como úlceras múltiplas e pequenas (10-300 lesões) em diversas áreas do corpo, resultantes da disseminação hematogênica ou linfática, geralmente encontrada em pacientes imunodeprimidos. Essas formas são causadas principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012).

A LV, também conhecida como calazar (do indu *kala-azar*: *kala* = negra, *azar* = febre; termo empregado em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele durante a doença em alguns pacientes), é uma doença sistêmica, que é caracterizada por febre de longa duração, astenia, adinamia e anemia, substancial perda de peso, pancitopenia, acometimento das vísceras do hospedeiro pelo parasito, apresentando organomegalia especialmente no fígado e baço (CHAPPUIS et al., 2007). No Brasil, ela é causada principalmente pela espécie *L. (L.) chagasi*, sinônimo de *L. (L.) infantum* (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014) e quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2014; MURRAY et al., 2005).

3.3 Terapêutica da Leishmaniose

O tratamento medicamentoso para a leishmaniose está disponível desde o início do século XX, mas apenas alguns medicamentos foram desenvolvidos para uso. No início, o Tartarato de potássio e de antimônio (SbIII) foi a única alternativa terapêutica para a leishmaniose. No Brasil foi utilizado pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Na leishmaniose visceral o fármaco só foi utilizado dois anos após, na Itália e, devido à sua toxicidade, dificuldades de administração e eficácia insatisfatória, foram finalmente substituídos por fármacos antimoniais pentavalentes (SbV) (BRASIL, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; MAYRINK et al., 2006).

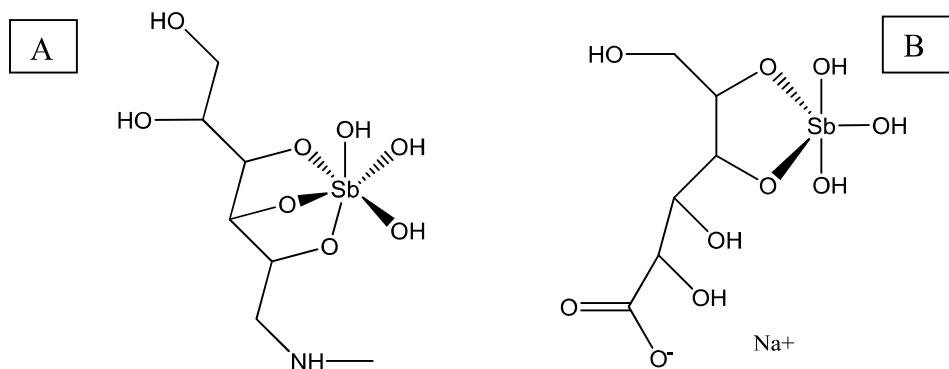
Os derivados SbV, só foram introduzidos no Brasil a partir da década de 40 e, desde então, os mesmos têm sido considerados como drogas de primeira escolha para o tratamento

(BRASIL, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010). Apesar das suas contra-indicações para doentes idosos e outras condições, como cardiopatia, nefropatia e gravidez, os antimoniais ainda representam a terapia padrão para a leishmaniose (MAYRINK et al., 2006).

Embora se observe diferenças entre espécies de *Leishmania*, suscetibilidade a fármacos e distintas manifestações entre a leishmaniose do Velho Mundo e do Novo Mundo, os mesmos fármacos são utilizados para tratamento (GOTO; LINDOSO, 2010).

Existem no mercado atualmente dois fármacos de SbV disponíveis: o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) (Figura 6), não parecendo existir diferenças quanto à eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato de meglumina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas, porém estas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz, para evitar problemas na estabilidade do medicamento (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2006; RATH et al., 2003; SANTOS et al., 2012; SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Figura 6. Estrutura do antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B), respectivamente



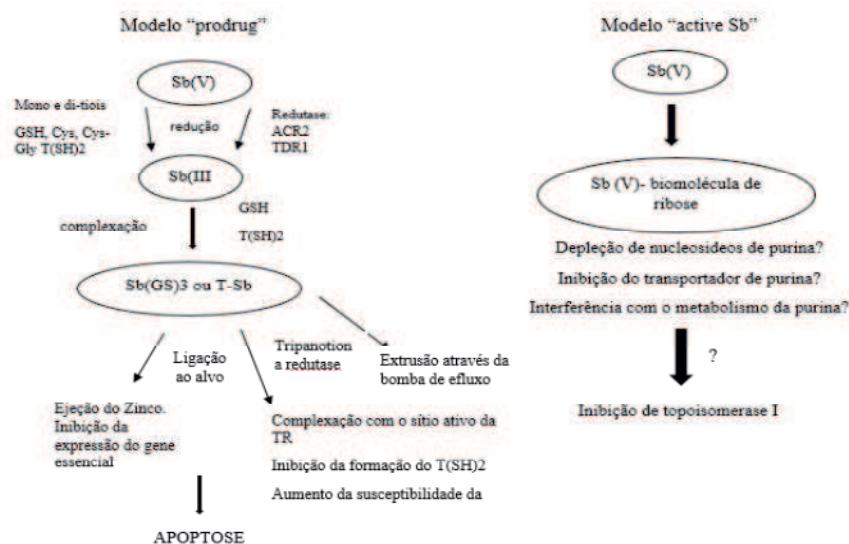
Fonte: FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi claramente elucidado, porém dois modelos de mecanismo de ação são propostos para a atividade dos antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose: De acordo com o modelo *Prodrug*, os dados sugerem que possivelmente os SbV, dentro das células hospedeiras, cruzam a membrana fagolisossomal e são convertidos em antimônio trivalente (SbIII). Em seguida, o SbIII atua contra amastigotas ao comprometer o potencial redox, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e, consequentemente, inibindo a tripanotiona redutase (TR). A redução de SbV pode ser não

enzimática, devido a condição ácida no interior dos macrófagos (Figura 8) (FREITAS-JUNIOR et al, 2012; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009).

Já de acordo com o modelo *Active SbV*, este exibe atividade anti-*Leishmania* intrínseca, e podem atuar inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos na forma amastigota. O SbV também pode eliminar os parasitas por mecanismos indiretos, como o aumento dos níveis de citocinas, e também atuam no DNA, induzindo danos ao mesmo *in vivo* (Sb (III) em baixas concentrações induzem a fragmentação do DNA, sugerindo a aparição de eventos tardios de morte celular programada) e inibindo DNA topoisomerase I (BRASIL, 2006; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; FRÉZARD, DEMICHELI RIBEIRO, 2009).

Figura 7. Dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose.



Fonte: FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009 (ADAPTADO).

Apesar de décadas de seu uso, esses medicamentos apresentam diversas limitações, como a dolorosa administração por via parenteral, com tratamento de aplicação diária durante pelo menos três semanas (geralmente 20mg/Kg/dia por 20-30 dias), e a elevada toxicidade, exigindo, assim, a internação do paciente para um tratamento mais seguro (FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO, 2009).

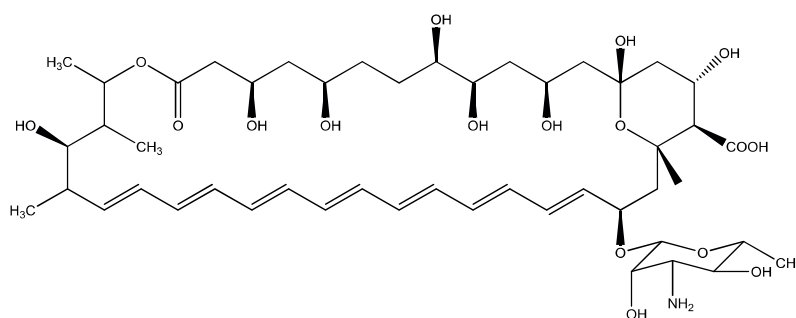
Os efeitos adversos dos antimoniais são bem conhecidos: toxicidade pancreática, artralgia, mialgias, dores abdominais, diarreia, e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária, erupções na pele, hepatotoxicidade (pode ocorrer em até

50% dos pacientes tratados) e distúrbios cardíológicos (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; BRASIL, 2006; FRÉZARD, DEMICHELII& RIBEIRO, 2009; NEVES et al, 2011).

A cardiotoxicidade dos antimoniais traduz-se, principalmente, por distúrbios da repolarização ventricular. Por serem drogas potencialmente arritmogênicas, os antimoniais pentavalentes estão contraindicados em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores (principalmente Sotalol e Propranolol) ou antiarrítmicos, como a amiodarona e quinidina, e em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres da gestação (BRASIL, 2006; NEVES et al, 2011).

As reações adversas, reversíveis após o tratamento, são secundários à competição da droga com o hormônio antidiurético nos tubos coletores renais. Face à excreção renal dos antimoniais e à inexistência de tabela de ajuste de doses na insuficiência renal, contraindica-se o seu uso em pacientes com qualquer grau de insuficiência renal. Nestes casos, a droga de escolha é o desoxicolato de anfotericina B ou sua fórmula lipossomal. Diante da ausência de estudos conclusivos sobre a teratogenicidade dos antimoniais no período gestacional, a anfotericina B (Figura 8) também é a droga de escolha para tratamento da leishmaniose cutânea durante a gravidez. (NEVES et al, 2011; WHO, 2010).

Figura 8. Estrutura da Anfotericina B (AmB).



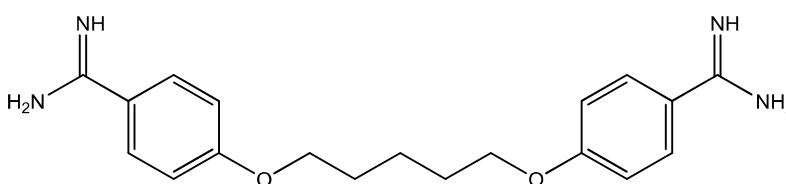
Fonte: CROFT et al., 2006.

A Organização Mundial da Saúde recomendou o uso de formulações de Anfotericina B lipossomal, onde este fármaco encontra-se encapsulado em lipossomas, com base em sua maior eficácia e segurança (menor toxicidade), entretanto, o principal fator limitante foi o custo elevado. Mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas é possível (BASANO; CAMARGO, 2004; RATH et al., 2003; SANTOS et al., 2012; SOARES-BEZERRA et al., 2004; WHO, 2010).

A anfotericina B tem sido utilizada para o tratamento da leishmaniose e é o fármaco de escolha em algumas partes do mundo. Descoberta em 1956, é um antibiótico macrolídeo poliênico, que atua a partir da interação com o ergosterol presente na membrana de *Leishmania*, modificando a permeabilidade da membrana celular, que conseqüentemente promove um influxo de íons no parasita, tanto promastigotas quanto amastigotas, levando a morte celular. É altamente tóxico, exigindo administração intravenosa, e é contraindicada em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas. Os efeitos adversos mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (BHATTACHARYA et al, 2004; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; GOTO; LINDOSO, 2010; NEVES et al., 2011; SUNDAR et al, 2006).

Outro fármaco utilizado na clínica é o Isotionato de pentamidina (Figura 9), que tem sido utilizado com sucesso no tratamento da 3, ou na impossibilidade de seu uso. Este medicamento é administrado por via intramuscular ou, de preferência, por infusão intravenosa. Seu mecanismo de ação se ocorre pela inibição da síntese de DNA do parasita, modificando a morfologia do cinetoplasto, que promove a fragmentação do sistema mitocondrial, eliminando-o. Hipoglicemia e hiperglicemia são os principais efeitos adversos da pentamidina, no qual limitam o seu uso (GOTO; LINDOSO, 2010; NEVES et al., 2011; WHO, 2011; BHATTACHARYA et al, 2004; SUNDAR et al, 2006).

Figura 9. Estrutura molecular da Pentamidina.



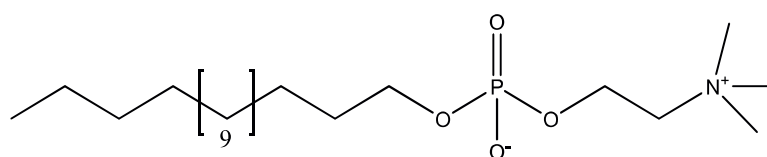
Fonte: CROFT et al., 2006.

Além disso, este fármaco foi utilizado como alternativa de segunda linha em tratamento LV resistente. A alta toxicidade combinada com a diminuição da eficácia no tratamento de pacientes que sugerem resistência, levou a um completo abandono desse fármaco para esse tratamento na Índia. No entanto, a Pentamidina ainda é valiosa para terapias combinadas (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Outra droga alternativa utilizada nas formas resistentes ao tratamento convencional, é a Miltefosina. Ela foi originalmente estudada como agente antitumoral, mas não apresentou

relevante atividade para essa indicação (Figura 10). Após descobrirem que a miltefosina era ativa contra *Leishmania in vitro* e, após utilização oral, em animais, a droga foi desenvolvida em uma parceria público-privada para o tratamento de LV. Ensaios na Índia indicam que a miltefosina é eficaz e bem tolerada tanto em adultos como em crianças, no qual pode ser recomendado como a primeira escolha para o tratamento da LV na infância (BHATTACHARYA et al., 2004; SUNDAR et al., 2006; WHO, 2010).

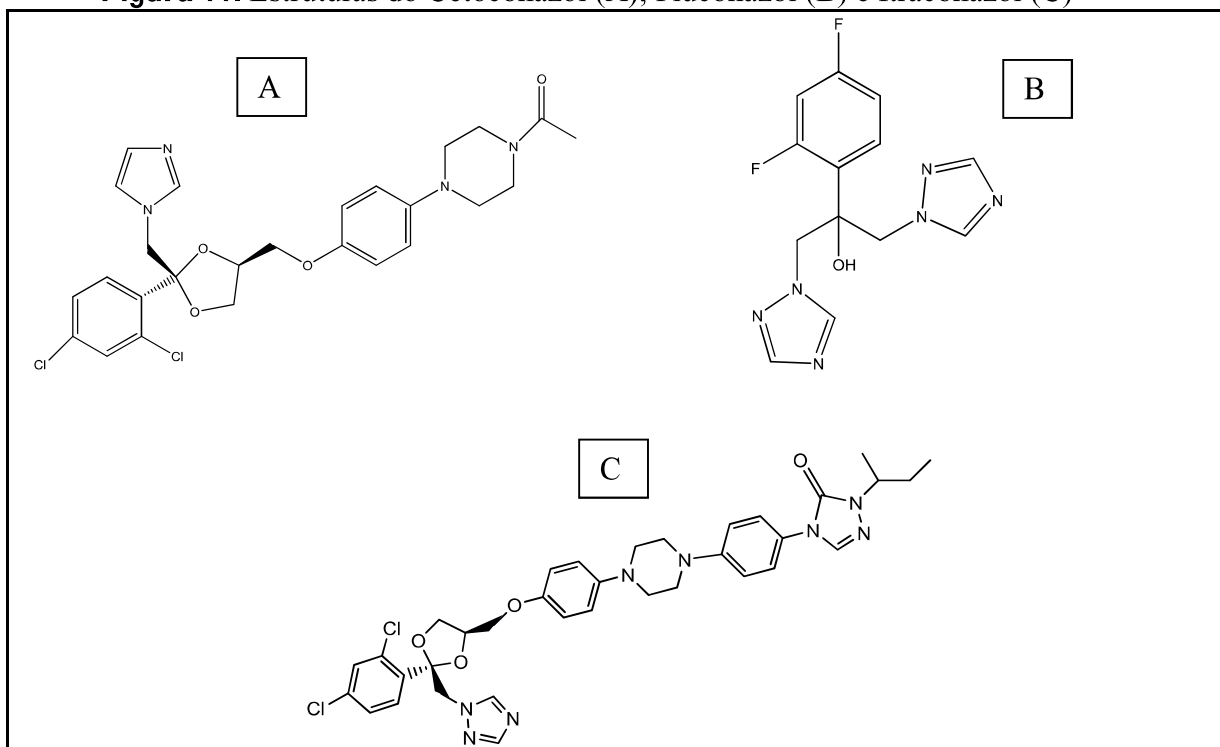
Figura 10. Estrutura da Miltefosina.



Fonte: NAGLE et al., 2014.

Contudo, o seu uso tem sido associado à teratogenicidade, comprovado em estudos com animais, e, portanto, não devem ser prescritos para mulheres grávidas (BHATTACHARYA et al., 2004).

Alguns relatórios demonstram a eficácia do fluconazol, cetoconazol e itraconazol (Figura 11) para o tratamento desta patologia. Estes fármacos inibem a 14-alfa-desmetilação de lanosterol ao ergosterol na síntese da parede celular e promove permeabilidade a membrana do parasita (ANSARI et al., 2017; NAGLE et al., 2014).

Figura 11. Estruturas do Cetoconazol (A), Fluconazol (B) e Itraconazol (C)

Fonte: NAGLE et al., 2014.

Conforme indicado, todos os principais medicamentos utilizados individualmente para o tratamento da leishmaniose apresentam inconvenientes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) encoraja os países a adotarem políticas baseadas em terapias combinadas quando disponíveis. No entanto, a falta de adequação para a administração no campo, toxicidade e principalmente problemas de resistência as terapias atuais, destacam a necessidade de novos medicamentos para pacientes acometidos por esta patologia (WHO, 2010).

3.4 Resistência ao tratamento farmacológico atual

Um dos grandes problemas associados a terapêutica da leishmaniose é o seu pequeno arsenal de drogas disponíveis que, além de apresentar toxicidade, apresenta crescente resistência, ocasionando falha no tratamento. A resistência multidrogas é um fenômeno complexo, que depende de fatores genéticos, dos parasitas e do hospedeiro, além de condições ambientais (HEFNAWY et al., 2016; MESSARITAKIS et al., 2013).

O uso dos medicamentos antimoniais pentavalentes convencionais para o tratamento da Leishmaniose visceral está ameaçado pelo desenvolvimento da resistência (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Em geral, a resistência é definida como um declínio na eficácia a uma droga contra uma população de microrganismos previamente susceptíveis a

esse composto. Esta definição pressupõe que a susceptibilidade original da população é conhecida, o que nem sempre é o caso da *Leishmania*. De fato, a resistência contra um determinado medicamento pode ser natural ou pode ser adquirido quando os microrganismos são expostos a doses insuficiente de drogas (PONTE-SUCRE; 2003).

O tratamento medicamentoso pode ser complicado pela variação na sensibilidade das espécies de *Leishmania* às drogas, variação na farmacocinética dos medicamentos e variação na interação imune-resposta do fármaco no hospedeiro. O estado imunológico dos pacientes com leishmaniose há muito tempo é conhecido por afetar a eficácia da droga. Isto provou ser de particular importância em relação ao tratamento antimonial, onde há ausência de uma resposta imune mediada por células T e mútua exacerbação da infecção (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Na Europa e no Brasil, pacientes imuno-comprometidos infectados com *Leishmania infantum* atualmente apresentam resistência a essas drogas ou recaídas frequentes. Entretanto, mesmo em hospedeiros imuno-competentes, já há relatos da falta de resposta primária ao Glucantime®, e assim se observa que a eficácia clínica dos antimonials parece diminuir durante as recorrências (LOISEAU; BORIES, 2006).

As propriedades farmacocinéticas de um fármaco também podem determinar a sua eficácia, pois os locais de infecção na leishmaniose englobam os órgãos viscerais (medula óssea, fígado e baço), a pele ou a mucosa nasal. Existem poucos estudos estabelecidos sobre o metabolismo dessas drogas. Estudos experimentais sugerem que a própria infecção visceral pode alterar o metabolismo do fármaco ao diminuir os níveis de citocromo P450 no tecido hepático (COOMBS et al., 1990; SAMANTA et al., 2003).

Entretanto, dados da literatura relatam que o gene PGPA (Phosphatidyl glycerophosphatase A) codificador do transportador ABC, é responsável pelo mecanismo de resistência a partir do efluxo de fármacos, e é frequentemente amplificado em *Leishmania* contribuindo para este mecanismo contra os antiparasitários com base em antimônio e arsênico (LAGE, 2003).

Diante desta realidade, o desenvolvimento de um maior arsenal quimioterapêutico é necessário, que também superem as limitações acima mencionadas. Existe uma necessidade urgente de compreensão das relações estrutura-atividade dessas bombas de efluxo que estão subjacentes ao seu mecanismo de transporte e seletividade de drogas. Este conhecimento pode permitir o desenho racional de novos medicamentos que podem inibir ou contornar a atividade desses transportes MDR (Multiple drug resistance- Resistência a múltiplas drogas).

3.5 Novos arsenais terapêuticos para o tratamento da leishmaniose

Em detrimento da resistência aos antimoniais e o fato de que não existem vacinas para a prevenção da leishmaniose, há uma busca pelo avanço do desenvolvimento de novos fármacos para esta doença.

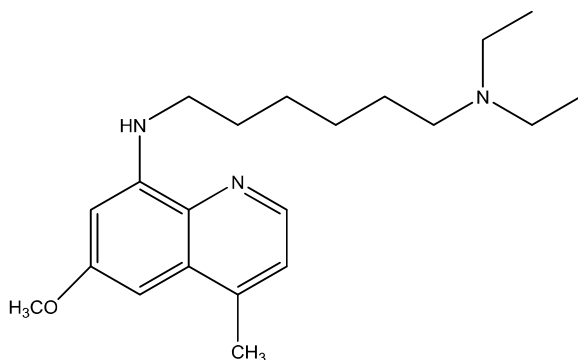
Segundo Freitas et al (2012), tem sido realizada a busca por novos tratamentos para doenças tropicais através do reposicionamento de drogas já existentes. Um senso de urgência para tratar essas doenças levou a abordagens pragmáticas com objetivos de curto e médio prazo, favorecendo a avaliação da terapia combinada e a reutilização de drogas conhecidas.

Esta estratégia reduz consideravelmente o tempo e o custo para ter um tratamento aprovado após a confirmação da eficácia, com a maioria dos dados toxicológicos e testes clínicos já disponíveis. Dadas as necessidades de desenvolvimento de medicamentos para a leishmaniose mais eficazes e melhores, esta estratégia é aceitável a curto prazo, mas para uma solução a médio ou longo prazo, uma abordagem diferente deve ser considerada para encontrar novos fármacos melhores e específicos.

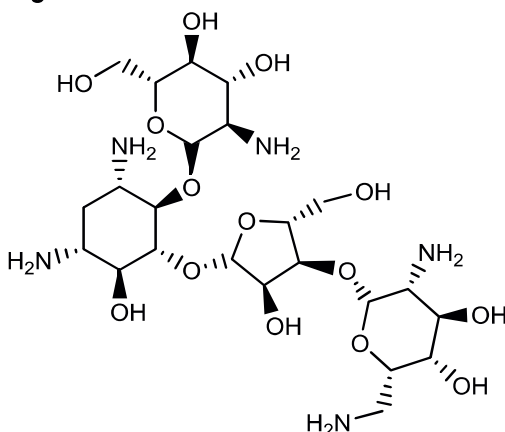
A anfotericina B lipossomal é um exemplo disso. O efeito tóxico é muito menor para infecções fúngicas e foi explorado para o tratamento da leishmaniose. No entanto, o alto custo destas preparações exclui o seu uso nos países subdesenvolvidos. Novas formulações envolvendo microcápsulas feitas de albumina, no qual é um sistema transportador mais barato e efetivo, foram testadas em *Leishmania infantum*. A forma encapsulada testada obteve maior eficácia para a forma amastigota intracelular e não apresentou citotoxicidade para células de camundongos (CROFT et al., 2006; TIUMAN et al., 2011).

A Miltefosina foi registrada na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral em 2002, porém tem exibido potencial teratogênico e, portanto, não deve ser administrado a mulheres grávidas. Seus análogos, edelfosina, ilmofosina e perifosina, provaram possuir potente atividade *in vitro* antiparasitária (CABRERA-SERRA et al., 2007; CROFT et al., 2006; HOTEZ et al, 2012; SANTA-RITA et al., 2004).

O Sitamaquine (Figura 12) é uma opção terapêutica oral promissora para o tratamento da leishmaniose visceral na África, e em um período de 28 dias de tratamento foi eficaz e bem tolerado em 61 pacientes quenianos infectados por *L. donovani*, com a dose testada de 2,0 mg / kg / dia. Contudo, são necessários mais estudos para definir a sua dose ideal. Alguns efeitos adversos incluíram dor abdominal, dor de cabeça e intoxicação renal (CROFT et al., 2006; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; HOTEZ et al., 2012; TIUMAN et al., 2011).

Figura 12. Estrutura do Sitamaquine.**Fonte:** CROFT et al., 2006.

A paromomicina (Figura 13) é um aminoglicosídeo usado para o tratamento de doenças bacterianas. No entanto, ela também mostrou ter ampla atividade antiparasitária não compartilhada pelos outros aminoglicosídeos. Tanto a forma visceral quanto cutânea pode ser tratada com este antibiótico, mas uma fraca absorção oral levou ao desenvolvimento de formulações parentéricas para as formas visceral (CROFT et al., 2006; HOTEZ et al., 2012; SINGH & SIVAKUMAR, 2004; TIUMAN et al., 2011).

Figura 13. Estrutura da Paronomicina.**Fonte:** NAGLE et al., 2014.

Ao longo das últimas décadas, poucas drogas alternativas ou novas formulações referentes aos antigos fármacos estão disponíveis, mas, até o momento, nenhuma delas é ideal para o tratamento, devido à alta toxicidade, problemas de resistência, ou via inadequada de administração. Além disso, muitos pacientes são incapazes de completar o tratamento

completo, aumentando o risco de desenvolvimento da resistência aos medicamentos (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Para identificar os pontos de partida para a descoberta de medicamentos para a leishmaniose, podem ser realizadas duas abordagens, a abordagem do alvo molecular (geralmente referida como baseada no alvo) e a abordagem fenotípica (GILBERT et al., 2011).

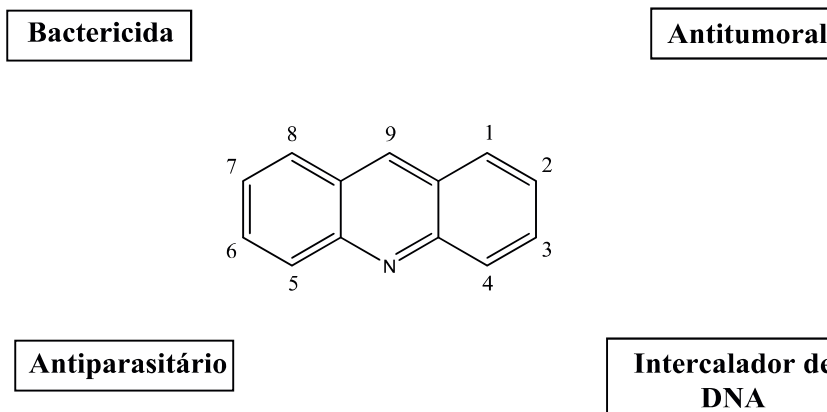
A maior parte dos compostos orgânicos sintetizados para avaliação de atividade antiparasitária, em especial, frente a espécies de *Leishmania* são de cadeia heterocíclica, sendo bons candidatos a fármacos (AGARWAL et al., 2005; BELLO et al., 2011; FERREIRA et al., 2007; MARCHAND et al., 2015; SUNDURU et al., 2006). Destaca-se os compostos que possuem uma fração nitro-heterocíclica, e sua capacidade de induzir o parasito ao estresse oxidativo (SILVA et al., 2016).

3.6 Acridina e seus derivados

A acridina é um tipo de composto aromático policíclico com estrutura π -conjugada. Tais derivados possuem estrutura planar como núcleo principal da molécula, sendo três anéis aromáticos com um deles heteroaromático (figura 14), e também podem ser chamados de dibenzo[*b,e*]piridina, benzo[*b*] quinolina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaaantraceno (GAO et al., 2015; SÁNCHEZ, 2006; SCHMIDT; LIU, 2015; ZHANG et al., 2014).

A acridina e seus derivados foram utilizados primeiramente como corante até o final do século XIX, porém foi a partir da Primeira Guerra Mundial, que suas propriedades farmacológicas foram avaliadas. Atualmente, mais e mais derivados de acridina vem sendo desenvolvidos como drogas quimioterapêuticas, especialmente como agentes antitumorais devido à sua capacidade de intercalar o DNA, e induzir à inibição de enzimas nucleares como as topoisomerases (CHARMANTRAY et al., 2001; GAO et al., 2015).

Figura 14. Estrutura química da acridina e suas atividades biológicas.

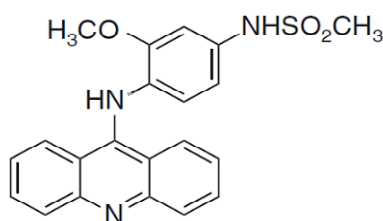


Fonte: SCHMIDT; LIU, 2015.

Exemplos de análogos naturais de acridina são alcaloides de ácidos acrílicos isolados de plantas e alcaloides de piridoacridina extraídos de vários organismos marinhos. Os fármacos sintéticos ou naturais de acridina mostraram a capacidade de intercalar a cadeia dupla de DNA e inibir as enzimas topoisomerase ou telomerase, sendo um dos principais mecanismos que tem caracterizado a atividade biológica destes compostos. Numerosas análises sobre a utilidade desses análogos já foram publicadas (CHOLEWIŃSKI et al., 2011; GAO et al., 2010; JANOVEC et al., 2011; LAFAYETTE et al., 2013; LIU et al., 2010).

A Amsacrina (m-AMSA) (Figura 15) foi a primeira droga sintética com mecanismo de intercalação de DNA a mostrar eficiência clínica (DENNY, 2002), é um derivado 9-anilinoacridínico utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, e foi uma das pioneiras no tratamento contra leucemia promielocítica, sendo o primeiro fármaco no qual o seu modo de ação foi previsto como uma interação com o complexo DNA-Topoisomerase II (BARROS et al., 2012; CHILIN et al., 2009).

Figura 15. Estrutura da Amsacrina (m-AMSA)



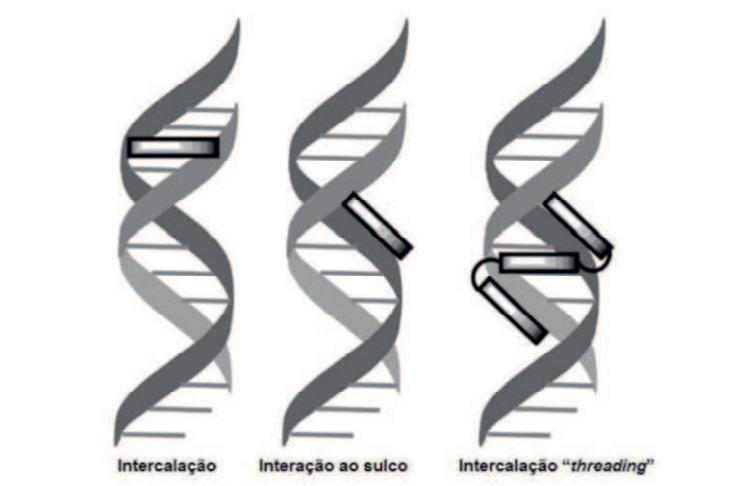
Fonte: ZHANG et al., 2014.

Os compostos acridínicos compartilham a propriedade comum da intercalação de DNA. Isto ocorre devido à presença do grupo cromóforo que dá a estas moléculas uma estrutura planar que lhes permite ligarem-se ao DNA por empilhamento entre pares de bases. Esta capacidade de intercalação confere às moléculas uma alta afinidade ao DNA, que geralmente é considerado como o alvo biológico para agentes anticâncer. A capacidade de causar um grande número de rupturas no DNA estimula processos metabólicos como recombinação e mutação, que desencadeia a morte celular (Apoptose) (CHARMANTRAY et al., 2001; LANG et al., 2013; OLSZEWSKA et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

A atividade destes compostos ocorre devido a interação com o DNA, ligando-se de forma não covalente através de três modos: intercalação, ligação ao sulco e intercalação "threading" (figura 16) (LAFAYETTE et al., 2013; ZHAO et al., 2013). Onde, a estrutura plana heterocíclica e poliaromática da acridina se encaixa de forma eficaz na distância entre duas cadeias de polinucleótidos e a intercalação da fração de acridina perturba seu papel crucial na divisão celular (CHARMANTRAY et al., 2001; CHOLEWIŃSKI et al., 2011).

Os análogos da acridina representam uma classe muito interessante, exibindo outras formas de bioatividade, como, por exemplo, antimicrobiana (PATEL, et al., 2006), anti-inflamatória (SONDHI et al., 2010), antimalárica (TOMAR et al., 2010), anti-alzheimer (FANG et al., 2008) e antitripanossomal (GAMAGE et al., 1997).

Figura 16. Representação dos modos de interação com o DNA: intercalação, ligação ao sulco e intercalação "threading"



Fonte: RESCIFINA et al., 2014.

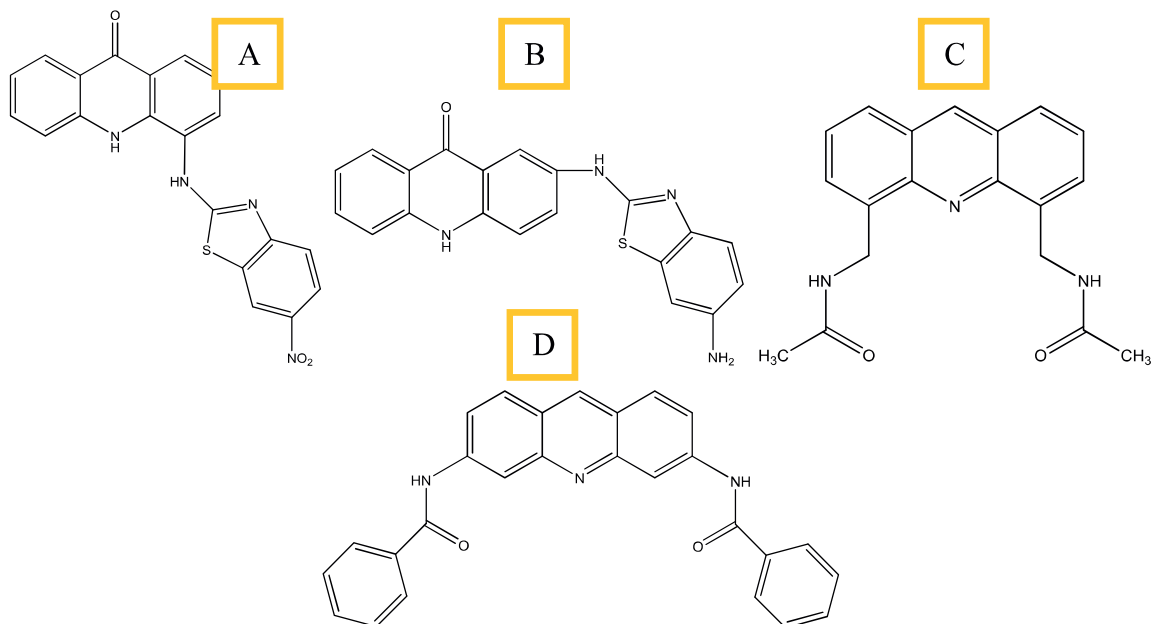
A modificação química das acridinas, tais como a introdução de substituintes ou anéis heterocíclicos confere aos derivados acridínicos sintetizados a capacidade de intercalar o

DNA, e além de interferir em vários processos metabólicos em procariotas e eucariotas, podendo exercer uma poderosa toxicidade a parasitas como *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, também proporcionando uma melhor relação estrutura-atividade com o receptor molecular desejado (ALMEIDA et al, 2015; BARROS et al., 2012; CHAUHAN et al., 2013; GAO et al, 2015; PATEL et al., 2010).

Devido à sua replicação rápida, protozoários da família a qual pertence a *Leishmania* sp (Trypanosomatidae) demonstraram muitas semelhanças com as células tumorais e várias dessas moléculas têm sido testadas com sucesso para a sua atividade leishmanicida. Desde a década de 1990, vários derivados de acridina tem revelado uma forte atividade anti-proliferativa em células humanas cancerígenas, e têm sido considerados promissores como agentes anti-tumoral e terapia antiparasitária (DELMAS et al, 2004; DI GIORGIO et al, 2007; GIRAULT et al., 2000; JULIEN et al, 2005; PRAJAPATI et al, 2012; WERBOVETZ et al., 1992).

Delmas *et al* (2004), por exemplo sintetizaram uma série de derivados acridínicos, dentre os quais os compostos 4-(6-nitro-benzotiazol-2-il-amino)-10*H*-acridin-9-ona (Figura 17-A) e 1-(6-amino-benzotiazol-2-il-amino)-10*H*-acridin-9-ona (Figura 17-B) foram potencialmente mais ativos e seletivos a *L. infantum*, onde se pode observar os efeitos da adição de grupos substituintes e sua respectiva posição. Neste caso, os grupamentos amino e nitro contribuíram para reduzir a citotoxicidade em relação às células humanas e potencializar sua atividade antiparasitária seletiva.

Figura 17. Derivados acridínicos com potencial atividade anti-parasitária



Fonte: DELMAS et al, 2004 (A e B); DI GIORGIO et al., 2007 (C e D).

Di Giorgio e colaboradores (2007) sintetizaram uma série de *N*-(6-amino-3-acridinil) acetamida substituídas. Nesta série, os compostos que apresentaram grupos 3,6-acetilamino ($IC_{50}=4,5\mu M$) Figura 17-C) e 3, 6-benzoilamino ($IC_{50}=1,1\mu M$) (Figura 17-D) frente a forma amastigota de *L. infantum*, indicaram que uma conformação simétrica com acetilamino ou os substituintes de benzoil-amino foram essenciais para tal atividade específica.

Nas doenças negligenciadas onde o tratamento é precário ou desatualizado e de difícil recuperação retoma-se, portanto, a importância das modificações e substituições nos núcleos acridínicos e seus análogos, ampliando a sua atividade farmacológica, possibilitando o surgimento de novos fármacos para a terapêutica das leishmanioses.

Além disso, um dos principais objetivos no desenvolvimento de novos fármacos tem sido a descoberta de ligantes seletivos para sítios de ligação em alvos moleculares específicos. Assim, a medida que a seletividade dos ligantes para o alvo desejado forem aumentadas, há uma diminuição correspondente no lado indesejável dos efeitos que possam surgir da ligação a alvos secundários (ANSARI et al., 2017).

3.7. Possíveis alvos de interação dos derivados acridínicos e sua correlação com atividade leishmanicida.

A integração de métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas, além de sua importância na identificação de novos moduladores, isto é, ligantes de receptores ou moléculas pequenas com atividade biológica. Nesse sentido, destacam-se os métodos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR, do inglês, *quantitative structure-activity relationships*) que têm como objetivos relacionar a informação em conjuntos de dados (estrutura química e atividade biológica) e criar modelos estatísticos com capacidade preditiva externa (GUIDO et al.; 2010).

Os estudos quantitativos de estrutura-atividade (QSAR) e as técnicas de modelagem / acoplamento molecular são ferramentas valiosas em química computacional e podem fornecer informações inestimáveis em estágios iniciais do processo de *design* de novos possíveis medicamentos (TAHGHI et al., 2016).

O estudo de *docking* é uma das técnicas da modelagem molecular mais importantes no desenvolvimento de fármacos. Trata-se de um estudo de interação energética entre o ligante e o receptor utilizando campo de força. Na interação do fármaco ao receptor há o reconhecimento de determinados grupos do ligante, assim como distâncias interatômicas e forma molecular. Este tipo de interação é determinado por meio do ajuste do ligante no sítio do receptor a partir da sua conformação de menor energia (MCCONKEY et al., 2002).

Atualmente, a pesquisa visando a descoberta de alvos para leishmaniose é orientada para desenvolvimento racional de fármacos, onde o design de inibidores específicos é direcionado para atividades metabólicas específicas como um possível meio de controle do parasita sem atingir danosamente o hospedeiro. Entre os alvos leishmanicidas mais importantes, podemos destacar a Tripanotona Redutase (TryR), as topoisomerasas de DNA e enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol, como a 14-Alfa-Esterol-Dimetilase (CYP51).

As topoisomerasas são uma classe de enzimas envolvidas na regulação do super-enrolamento de DNA, introduzindo uma ruptura transitória em sua cadeia dupla em uma reação que envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e a cadeia quebrada (CHOLEWIŃSKI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2007; MAJUMDER, 2013). As topoisomerasas de DNA de *Leishmania* vem sendo apresentada como potencial como alvo

terapêutico no desenvolvimento de agentes anti-*Leishmania*. Portanto, sua inibição tem efeito prejudicial sobre o crescimento do organismo (TAHGHIGHI et al, 2016).

Essa enzima apresenta-se, de forma geral, nos sub-tipos I e II que podem indicar papéis opostos na regulação do superenrolamento de DNA. Ambas as atividades são necessárias durante a transcrição do DNA, a replicação e recombinação, manutenção da estrutura do cromossomo, condensação / descondensação e segregação (CHOLEWIŃSKI et al., 2011; MAJUMDER, 2013).

A Top1 de tripanossomas e leishmania apresentam diferenças substanciais encontradas em relação as outras espécies. Ao contrário dos demais seres eucariotas que são monoméricas, as Top1 desses microrganismos são proteínas heterodiméricas. Essas distintas diferenças estruturais entre as Top1 humana e de leishmania faz da enzima um alvo atraente para quimioterapêuticos (GONZÁLEZ et al., 2007).

Já as topoisomerases do tipo II (TopII) são úteis para separar as duas fitas replicadas de moléculas de DNA circulares. Algumas delas precisam de energia de ATP extra para relaxar as moléculas. Dentro de células eucarióticas, as enzimas tipo II são encontradas principalmente durante períodos de replicação do DNA (CHOLEWIŃSKI et al., 2011; FRANCO, 2013; MAJUMDER, 2013).

Em condições normais, a clivagem e religação do DNA mediado por topoisomerases criam quebras temporárias em um nível tolerável de estado estacionário. (MAJUMDER, 2013). Derivados de acridina são capazes de suprimir a atividade das enzimas topoisomerases I e II, além de controlar a proliferação de células, a sobrevivência e a apoptose (LI et al., 2014; OLSZEWSKA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2015).

A enzima esterol 14 α -demetilase (CYP51) é também um alvo a fármaco validado e atrativo que está presente em parasitas protozoários. A inativação farmacológica desta enzima provou ser muito eficaz contra infecções fúngicas, e é um alvo que está sendo explorado para a nova quimioterapia anti-Chagásica e anti-*Leishmania* (DE VITA et al, 2016; WARFIELD et al., 2014). Estudos demonstraram os efeitos anti-*Leishmania* de derivados de antifúngicos como o Cetoconazol (MARRAPU *et al*, 2011; TAHGHIGHI *et al*, 2012). Ação desses antifúngicos se dá pela inibição da CYP51, levando ao bloqueio da biossíntese de ergosterol, afetado a estabilidade da membrana destes microorganismos.

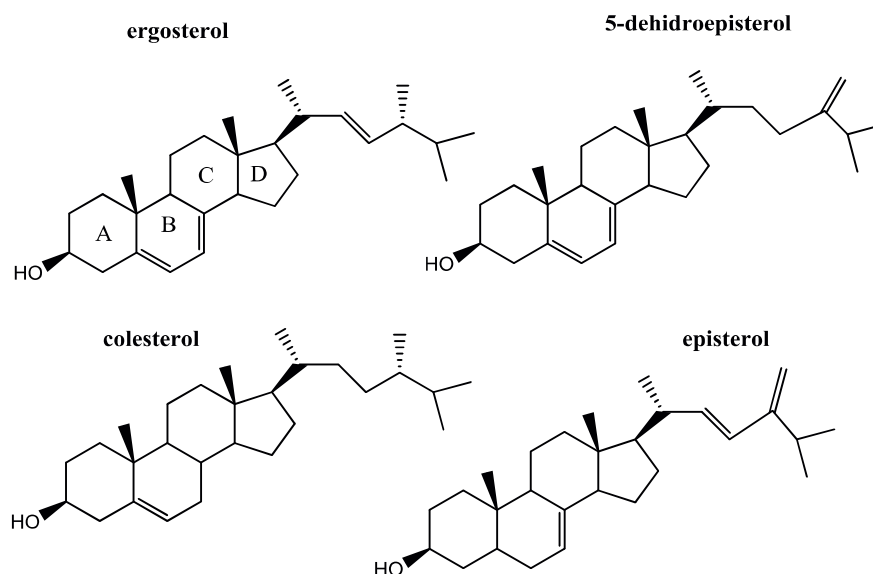
A CYP51 é uma oxidase de função mista, está envolvida na biossíntese de numerosos esteróis estruturalmente semelhantes em animais, fungos, plantas e protozoários. Vários

destes esteróis servem como componente importante das membranas celulares e são vitais para a manutenção da integridade estrutural celular nesses organismos. Alguns derivados de esteróis vegetais também funcionam como moléculas de sinalização e como agentes antifúngicos (WARFIELD et al., 2014).

Entre as diversas vias biossintéticas, a via do esterol foi identificada como um dos alvos para fármacos mais adequados em *Leishmania*, porque ergosterol é crucial para viabilidade e crescimento do parasita, formação da membrana celular, além de estar ausente em mamíferos. Os esteróis atuam como componentes das membranas celulares em eucariotas. Em células de mamíferos, o colesterol é um esterol vital encontrado nas membranas celulares. Já em microrganismos eucarióticos, como fungos e protozoários, uma classe especial de esteróis conhecidos como ergosterol e outros esteróis são predominantes (EMAMI et al., 2017).

O ergosterol e colesterol apresentam algumas pequenas diferenças em suas estruturas como mostrado na Figura 18. O colesterol tem apenas uma dupla ligação no anel B e uma cadeia lateral totalmente saturada sem um grupo metil no carbono 24. No entanto, existem duas duplas ligações no anel B do ergosterol, com uma cadeia lateral não saturada em C-24. Essas características estruturais são essenciais para o crescimento de fungos e tripanosomatídeos. Na *Leishmania*, o principal esterol que foi encontrado foi o 5-desidroepisterol, enquanto ergosterol e episterol (os principais esteróis fúngicos) estão presentes em quantidades menores (EMAMI et al., 2017).

Figura 18. Estrutura química dos esteróis de membrana



Fonte:EMAMI et al., 2017

Assim, a interrupção da biossíntese de ergosterol afeta a citocinese, interrompe o crescimento celular e pode levar ao colapso da membrana celular, tornando a esterol 14 α -demetilase um alvo atraente para doenças parasitárias (WARFIELD et al., 2014; VERMELHO et al., 2017).

Quanto à Tripanotiona redutase (TryR), ela é uma enzima crucial como alvo de fármacos, pois desempenha um papel central no metabolismo do tiol da Leishmania. É uma flavoproteína oxido-redutase dependente de NADPH, que mantém o equilíbrio redox intracelular do parasita, por catalisar a redução do dissulfeto de tripanotionona, onde inibição desta enzima levará à eliminação do parasita (PANDEY et al., 2016; ROMERO & LÓPEZ, 2017).

O sistema de defesa as espécies reativas de oxigênio em mamíferos, baseado em glutathione redutase, é substituído em Trypanosomatídeos então pela TryR. Uma vez que a TryR está ausente em seres humanos e é essencial para a sobrevivência dos protozoários parasitas como Leishmania, a singularidade do metabolismo do tiol do parasita torna a Tripanothione Redutase como um alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários (PANDEY et al., 2016; RODRIGUES et al., 2012; MASOOD et al., 2017; VENKATESAN et al., 2010).

Apesar do acervo limitado na literatura em relação à estudos visando estes alvos, esta pesquisa buscou um possível perfil *mult-target* (múltiplos alvos terapêuticos) *in silico* com o grupo de moléculas estudado, partindo do pressuposto de que essas vias são essenciais para a

sobrevida do parasita e o potencial perfil de atividade dos derivados acridínicos tornara-os possíveis candidatos a fármacos para a Leishmaniose.



METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

A seguir serão descritos os materiais empregados na síntese dos potenciais derivados espiro-acridínicos.

4.1 Obtenção dos compostos

Com o intuito de desenvolver novos fármacos para serem utilizados na terapêutica das leishmanioses, foram utilizados uma série de derivados espiro-acridínicos previamente sintetizados (GOLVEIA, 2016), fazendo parte do acervo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, no Campus V, de João Pessoa, sob coordenação do prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, investigando seu potencial anti-*Leishmania*. Suas características físico-químicas e estrutura molecular se encontram dispostas na tabela 1 e figura 19, respectivamente.

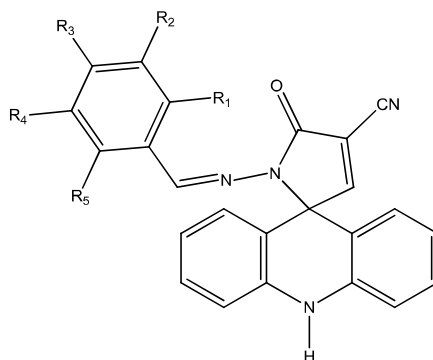
Tabela 1. Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas especificações

Composto	PM	FM	LogP
*AMTAC 01	376,3950	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O	5,11
AMTAC 06	410,8551	C ₂₄ H ₁₅ ClN ₄ O	5,18
AMTAC 07	394,4005	C ₂₄ H ₁₅ FN ₄ O	4,78
AMTAC 08	445,3002	C ₂₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O	5,73
AMTAC 09	485,3321	C ₂₅ H ₁₇ BrN ₄ O ₂	5,32
AMTAC 10	445,3002	C ₂₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O	5,73
AMTAC 11	419,4778	C ₂₆ H ₂₁ N ₅ O	4,9
AMTAC 13	421,4076	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃	4,34
AMTAC 14	421,4076	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃	4,34
AMTAC 16	436,4620	C ₂₆ H ₂₀ N ₄ O ₃	4,44

Fonte: (GOLVEIA, 2016). (ALMEIDA, 2016)*

Legenda: , PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, LogP – Coeficiente de partição

Figura 19. Estrutura química dos derivados espiro-acridínicos e as respectivas substituições no anel aromático.



Quadro 1. Substituições no anel aromático.

Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
AMTAC 01	-H	-H	-H	-H	-H
AMTAC 06	-H	-H	-Cl	-H	-H
AMTAC 07	-H	-H	-F	-H	-H
AMTAC 08	-Cl	-H	-Cl	-H	-H
AMTAC 09	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H
AMTAC 10	-Cl	-H	-H	-H	-Cl
AMTAC 11	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	-H
AMTAC 13	-NO ₂	-H	-H	-H	-H
AMTAC 14	-H	-H	-NO ₂	-H	-H
AMTAC 16	-H	-OCH ₂ CH ₃	-OH	-H	-H

4.2 Estudo de *docking* molecular: Preparo das moléculas e macromoléculas

Utilizando o *software* Hyper Chem v. 8.0, os ligantes foram desenhados e suas estruturas tridimensionais determinadas. Posteriormente, suas energias foram minimizadas através do método de mecânica molecular, MM+, e o método semi-empírico, AM1 tendo as estruturas salvas no formato.mol.

As estruturas tridimensionais das enzimas usadas no *docking* molecular, foram obtidas diretamente do Protein Data Bank (PDB), sendo elas: Esterol 14-alfa dimetilase (PDB = 3L4D), Tripanotona retutase (PDB = 5EBK) e Topoisomerase I (PDB = 2B9S).

O *software* Pymol v 1.7.4 para linux foi utilizado para realizar o pré-tratamento das macromoléculas, isolando as cadeias da macromolécula, removendo moléculas de água, átomos não ligados e moléculas complexadas.

Para determinar os parâmetros do *grid* de cada macromolécula, foi utilizado o softwares Auto Dock Tools v. 1.5.6. Os valores desses parâmetros estão expostos na Tabela 2. O *docking* molecular foi realizado com os softwares AutoDock 4 e AutoGrid 4, onde todo o processo foi automatizado via terminal linux.

Tabela 2. Parâmetros de configuração dos grids para cada macromolécula.

	Esterol 14-alfa dimetilase	Tripanotona retutase	Topoisomerase 1
Número de pontos em x	55	64	40
Número de pontos em y	60	94	60
Número de pontos em z	55	66	60
Espaçamento	0.375	0.375	0.375
Centro do grid box em x	30.089	-7.227	35.616
Centro do grid box em y	-26.744	24.873	48.634
Centro do grid box em z	-4.216	-11.188	10.171

4.3 Preparo das soluções dos derivados acridínicos avaliados

Para os testes *in vitro*, as amostras foram pesadas (20mg) e diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido [DMSO (CH_3)₂SO – Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA] sob agitação em Vortex, obtendo-se uma solução estoque de 20mg/mL. As soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO, no qual não apresenta citotoxicidade para as células utilizadas (MONTE-NETO, 2004).

4.4 Parasitos e sua manutenção *in vitro*

A cepa *Leishmania infantum* (isolado clínico de paciente com leishmaniose visceral de Natal - RN) foi gentilmente cedida pela professora Dra. Selma Maria Bezerra Jeronimo do Laboratório de Imunogenética do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

As formas promastigotas dessas espécies de *Leishmania* foram mantidas *in vitro* em meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL - Gibco, BR) e 1% de urina masculina humana, denominado neste trabalho de meio Schneider suplementado. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 26 ± 1 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) e repicadas semanalmente, não ultrapassando vinte repiques, para manutenção da viabilidade celular.

As culturas de formas promastigotas em início de fase estacionária, de 5 dias foram criopreservadas em 12% de glicerol estéril (Amresco, Ohio, EUA) sob agitação constante por 15 minutos e então armazenadas em freezer a -80 °C para futuras utilizações. Com a mesma finalidade, as formas promastigotas foram criopreservadas em 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA) e 70% do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (Cultilab, São Paulo, Brazil), sendo armazenadas em freezer a -80 °C. De acordo com a necessidade, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 500 µL foram colocadas em 5 mL de meio Schneider suplementado e mantidas em estufa de DBO à 26 ± 1 °C.

4.5 Fármacos de referência

Os fármacos utilizados nos protocolos de atividade anti-*Leishmania* foram o antimoníato de meglumina (Glucantime® – Sanofi-Aventis Farmacêutica, São Paulo, BRA) e a anfotericina B (Anforicin B® – Cristália, São Paulo, Brazil), os quais são utilizados no tratamento de diferentes formas clínicas das leishmanioses, como medicamentos de primeira e segunda escolha respectivamente. O antimoníato de meglumina é apresentado em uma solução aquosa de 300 mg/mL, o qual foi diluído diretamente nos meios de cultura apropriados para cada teste. A anfotericina B, apresentada na forma de pó liofilizado, foi solubilizada previamente em DMSO e assim produzido uma solução-estoque de 10 mg/mL. Posteriormente, essa solução foi diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas de cada teste, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

4.6 Avaliação da atividade antipromastigota de *Leishmania infantum* e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀).

4.6.1 Ensaio com MTT

Foi avaliado a atividade anti-*Leishmania* dos compostos analisados utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Esse método é baseado na atividade de enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais, que são capazes de reduzir o MTT (coloração amarela) e formar um produto de coloração azul, insolúvel em água, o sal formazan. Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio Schneider suplementado e cerca de 1×10^6 promastigotas por poço. Posteriormente, foram adicionados os derivados acridínicos substituídos em triplicata, previamente diluídas em meio Schneider suplementado para um volume final de 100 µL para cada poço nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL; e de 10 a 0,078 µg para a Anfotericina B e de 1,171 a 150 mg/mL do antimoníato de meglumina como controle positivo.

Em seguida, incubadas por 72 h em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26°C. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em tampão fosfato-salino a uma concentração final de 5 mg/mL. Sendo incubados por mais 4 h em estufa de demanda biológica de oxigênio a 26°C, e em seguida adicionado 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. A placa permaneceu em *overnight* para dissolução do formazan e por último, foi realizada leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800).

Os resultados foram expressos em valores de concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (IC₅₀), sendo o controle negativo realizado em meio Schneider suplementado a 0,5% de DMSO e considerado como 0% de inibição do crescimento dos parasitos.

4.7 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada como já descrito anteriormente por Rodrigues e colaboradores (2015). Resumidamente: após a coleta de sangue periférico humano, os eritrócitos foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias em um volume de 80 µL. Em seguida foram adicionadas as soluções-estoque dos derivados e dos fármacos de referência, diluídas em concentrações seriadas num volume de 20 µL de PBS (800, 400, 200, 100, 50,

25, 12,5 µg/mL). Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37°C em estufa DBO e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante então foi submetido à espectrofotometria utilizando espectrofotômetro (modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm para quantificar a atividade hemolítica.

A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (HC₅₀) considerando o controle positivo como 100% de hemólise.

Os experimentos foram realizados em duplicata e foram repetidos pelo menos três vezes. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, com protocolo número 0511/15, CAAE: 49005615.7.0000.5188.

4.8 Determinação do índice de seletividade

Partindo dos dados de atividade antipromastigota e do ensaio de citotoxicidade frente a eritrócitos humanos, estimou-se, respectivamente, o IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) e o HC₅₀ (concentração capaz de causar 50% de hemólise) de todos os derivados testados.

Assim, a partir destas estimativas, determinou-se o índice de seletividade (IS). O IS é um indicativo *in vitro* se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito (*Leishmania*) do que para a célula de mamífero, nesse caso as hemácias, sendo determinado pela razão entre os valores de HC₅₀ e IC₅₀.

4.9 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos AMTAC01 e AMTAC11 sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*

Devido as dificuldades na obtenção de um ensaio para a atividade amastigota partindo de macrófagos, neste trabalho, buscou-se um método simples e rápido de obter grande quantidade de amastigotas axênicos de cultura a partir de um isolado clínico humano,

fornecendo grandes quantidades de parasitas puros e viáveis. Este método evita a necessidade de utilizar animais de laboratório experimentais para obter a forma amastigota e os procedimentos laboriosos para a purificação do parasita intracelular. Assim, foram testados dos compostos espiro-acridínicos mais promissores partindo do seu perfil de atividade para a forma amastigota.

Na Tabela 3 estão descritas as variações dos parâmetros para a obtenção da forma amastigota da *L. infantum*. Após as diversas tentativas, por fim chegamos ao método onde as culturas, após serem cultivadas com 5 dias no seu período estacionário de crescimento, foram reproduzidas no meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cutilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL, BR) e 1% de urina masculina humana, em pH 7,0, sob estufa com demanda de CO₂ (37°C, 5%).

Tabela 3. Condições de cultivo

Meio	pH	Temperatura	Demanda de CO ₂	Período de incubação
Schneider	5,5	32°C	5%	24h
Schneider	5,5	32°C	5%	48h
Schneider	7,0	39°C	5%	24h
Schneider	7,0	37°C	5%	48h
RPMI	5,5	39°C	5%	24h
Schneider	7,0	37°C	5%	24h

A atividade anti-*Leishmania* sob formas amastigotas axênicas de *L. infantum* foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA). Em placas de 96 poços, foram adicionadas as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* obtidas conforme item 4.6, ajustadas na quantidade de 1×10^6 Leishmanias/poço, contendo 100 µL de meio Schneider pH 7,0 suplementado a 5% de SFB e diferentes concentrações seriadas de 0,78 a 100 µg para as acridinas; de 10 a 0,078 µg para a Anfotericina B e de 1,171 a 150 mg/mL do antimoniato de meglumina. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h.

Após a incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 h e em seguida, foram

adicionados 50 µL de uma solução de SDS a 10%. A placa ficou overnight para dissolução completa do formazan e então foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). O controle negativo foi realizado com meio Schneider Ph próximo a 7,0 e 5% de SFB a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em valores de concentração efetiva sobre 50% de amastigotas (EC_{50}).

5.0 Análise estatística

Para análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPadPrism 6.0. Os dados obtidos em cada experimento foram comparados utilizando a Análise de Variância (*ANOVA*) acompanhado do teste de Tukey para análise da significância entre as concentrações testadas e o seu controle. Apenas os valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo de *docking* molecular

A compreensão das interações fármaco-receptor de uma forma tridimensional pode ser feita através da Relação Estrutura-atividade (SAR) e estudos de acoplamento molecular. As vias bioquímicas presentes em tripanosomatídeos e ausentes nos seus hospedeiros devem fornecer excelentes alvos para o desenho racional de candidatos a fármacos para a leishmaniose, onde as enzimas intrínsecas a estes microorganismos, se tornam alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos (GUIDO et al.; 2010, KAUR et al.; 2010).

Sendo assim, este trabalho trouxe a análise do estudo de *docking* molecular com os respectivos alvos: Tripanotona Redutase (TryR) e 14-Alfa-Esterol-Dimetilase (CYP51) de *L. infantum*, além da Topoisomerase 1 (TOP1) de *L. donovani*, visto que não havia disponível a macromolécula desta enzima no PDB da *Leishmania infantum*; em busca de sugerir mecanismos de ação para a atividade dos derivados espiro-acridínicos descritas anteriormente como uma proposta de multi-alvos. A tabela 4 apresenta os resultados de valores de energia de ligação da série dos compostos espiro-acridínicos de acordo com seus respectivos radicais substituintes.

Tabela 4. Valores de energia ($\Delta G = \text{Kcal/mol}$) dos derivados espiro-acridínicos da série AMTAC com os respectivos alvos de ligação.

Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	CYP51	TOP1	TryR
01	-H	-H	-H	-H	-H	-11.3400	-6.8500	-8.8500
06	-H	-H	-Cl	-H	-H	-11.6700	-7.1100	-9.2400
07	-H	-H	-F	-H	-H	-11.3200	-6.8100	-8.8700
08	-Cl	-H	-Cl	-H	-H	-10.0600	-6.8900	-9.5000
09	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H	-12.2500	-7.1500	-8.7000
10	-Cl	-H	-H	-H	-Cl	-11.8600	-7.2100	-8.7100

11	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	-H	-11.4300	-6.4700	-9.1100
13	-NO ₂	-H	-H	-H	-H	-12.1200	-11.0500	-9.7500
14	-H	-H	-NO ₂	-H	-H	-11.2100	-8.3100	-9.6700
16	-H	OCH ₂ CH ₃	-OH	-H	-H	-11.8800	-6.6800	-9.1100

Legenda: Tripanotiona Redutase (TryR), 14-Alfa-Esterol-Dimetilase (CYP51) de *L. infantum* e Topoisomerase 1 (TOP1)

Diante destes dados, podemos observar que o alvo CYP51 apresentou menores valores de *score* de energia (de -10.0600 a -12.2500), quando comparados com a TOP1 (de -11.0500 a -6,4700) e TryR (-9.7500 a -8.7000). Isto implica em interações mais espontâneas entre o alvo e os compostos estudados. Não podemos tirar uma análise conclusiva de que este seria o principal mecanismo de ação, pois apesar do estudo de *docking* trazer valores que parecem favorecer a ação principal nesta enzima, e ao compreendermos a importância na observação dela como um alvo, existem outros mecanismos que possam ser mais definitivos para a manutenção da vida deste microrganismo, como por exemplo a Topoisomerase, ou uma ação direta na intercalação do seu DNA.

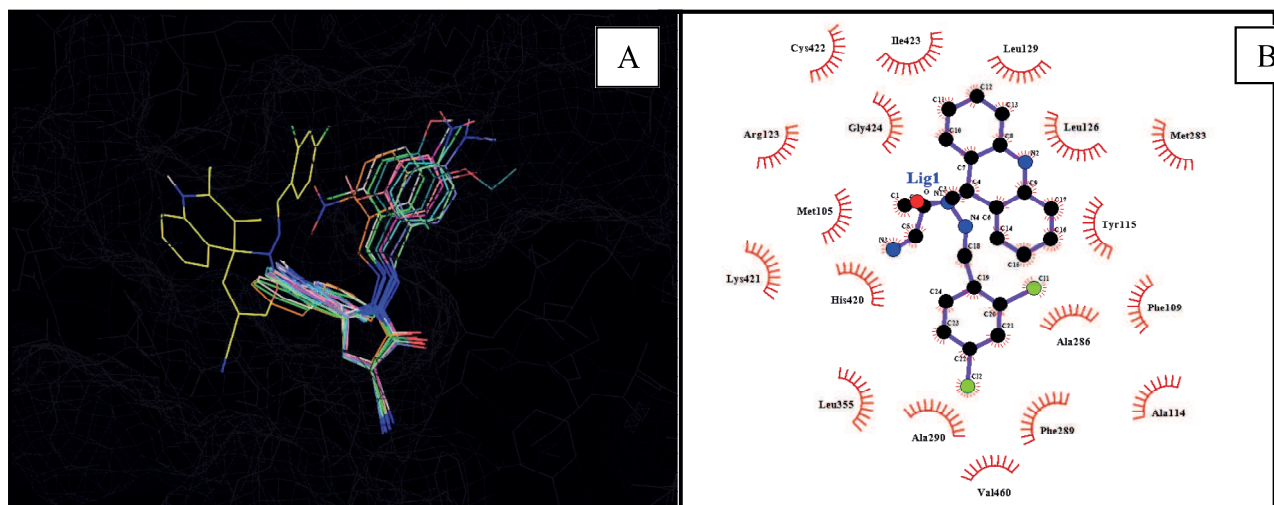
A seguir temos a análise mais detalhada das interações dos compostos espiro-acridínicos com os alvos em estudo.

5.2.1 Alvo biológico: 14-Alfa- Esterol-Dimetilase (CYP51)

Analisando os valores de energia de *docking* na enzima CYP51, temos que os compostos AMTAC 09, AMTAC 16 e AMTAC 13 apresentaram melhores resultados com os valores de -12,2500, -12.1200 e -11.8800 (tabela 4), respectivamente. Vale salientar que, quanto menor o valor energético, mais estável é a interação entre ligante e o alvo biológico.

Quando avaliado as posições dos ligantes, observa-se que todos os compostos estão posicionados de forma similar, sendo a única exceção o composto AMTAC08 (composto amarelo) (Figura 20-A), o que pode justificar nessa análise, o seu pior score comparado aos demais ligantes, além disso, podemos observar que o referido composto não foi capaz de formar nenhuma interação eletrostática do tipo pontes de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da sua vizinhança (figura 20-B).

Figura 20. Compostos posicionados no alvo CYP51 (A) e as interações eletrostáticas da AMTAC 08 com a CYP51 (B).



Quando avaliamos as interações formadas pelas demais moléculas, observamos que todas apresentaram, principalmente, ligações de hidrogênio com o resíduo Arginina 360 e tirosina 102, além de interações hidrofóbicas (ver em apêndice), como pode ser observado na Tabela 5. Também observamos que o grupo carbonílico foi o principal ponto de interação, atuando como aceptor de ligação de hidrogênio.

Tabela 5. Resíduos que formaram ligações de hidrogênio com os ligantes para CYP51.

Compostos	Arginina 360	Tirosina 102
AMTAC01	X	
AMTAC06	X	X
AMTAC07	X	X
AMTAC08		
AMTAC09	X	X
AMTAC10	X	
AMTAC11	X	X
AMTAC13	X	
AMTAC14	X	
AMTAC16	X	X

5.2.2. Alvo biológico: Topoisomerase 1 (TOP1)

As topoisomerasas foram reconhecidas como potenciais alvos quimioterapêuticos para atividade antitumoral e antiparasitária por desempenhar papéis fundamentais na modulação da topologia de DNA durante a replicação, transcrição, recombinação e reparo. Estudos mostram que as topoisomerasas de parasitas são suficientemente distintas comparado a humanas, de modo a permitir diferenças na segmentação química e, portanto, tornando-se bons alvos celulares (CORTÁZAR et al., 2007; DASBRATA et al., 2006; WALKER & SARAIVA, 2004).

Como exemplo disto, De Sousa (2003) em seu estudo de caracterização da topoisomerase de *L. chagasi*, estudo da homologia da enzima em relação as diferentes espécies de *Leishmania* e a topoisomerase humana, apresentou em torno de 98% de homologia com as demais espécies de *Leishmania* estudadas, todavia destacando-se a fraca homologia entre a enzima de *L. chagasi* e a humana, que foi de apenas 26,4% (topoisomerase II beta) e 26,3% (topoisomerase II alfa), tornando a topoisomerase de *Leishmania* um alvo seletivo para possíveis inibidores da mesma.

A capacidade de certos inibidores de Topoisomerase para induzir a morte celular em tripanossomatídeos (incluindo *Leishmania* spp.), aumentou o interesse na geração de derivados específicos do parasita (WALKER & SARAIVA, 2004).

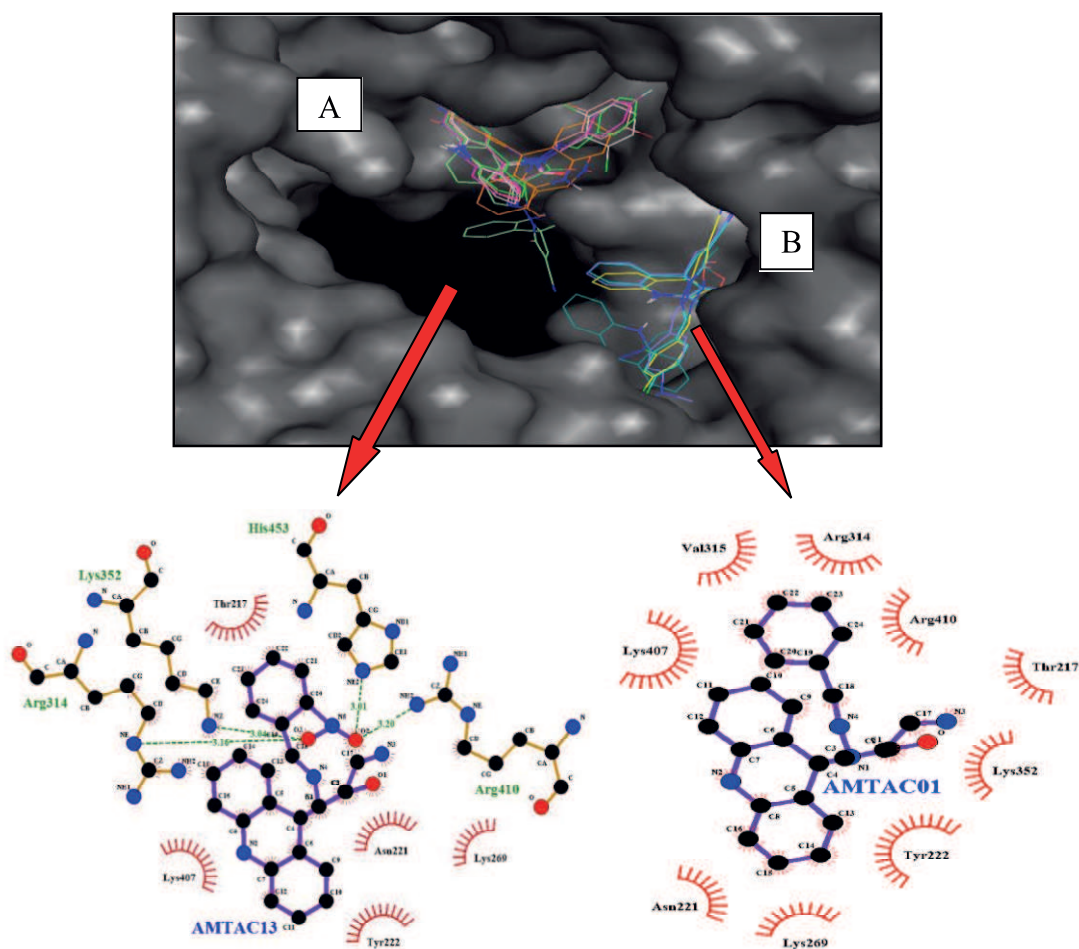
De acordo com os valores de energia de interação vistos na tabela 5, com relação a topoisomerase I, observa-se que os ligantes ficaram agrupados em dois locais do sítio ativo. Comparando esse resultado com os scores obtidos, nota-se que, em sua maioria, os compostos localizados em A apresentaram os melhores scores, enquanto aqueles posicionados no ponto B, tiveram os piores scores (Figura 21).

Com relação as interações, não foi possível observar um padrão de interação com os resíduos, fato que está relacionado com a variação de locais em que os ligantes interagiram na macromolécula. Os compostos AMTAC01 e 10 (tabela 6), não formaram ligações de hidrogênio, apresentando apenas interações hidrofóbicas (para mais detalhes, visualizar em apêndice). Destaca-se dentre as moléculas estudadas, a AMTAC13 ($R_1=NO_2$) que apresentou menor valor de energia sendo -9,7500 Kcal/mol, com consequente perfil de interação do tipo pontes de hidrogênio com diversos resíduos de aminoácidos (tabela 6).

Tabela 6. Resíduos que formaram ligações de hidrogênio com os ligantes para TOP1 de *Leishmania*.

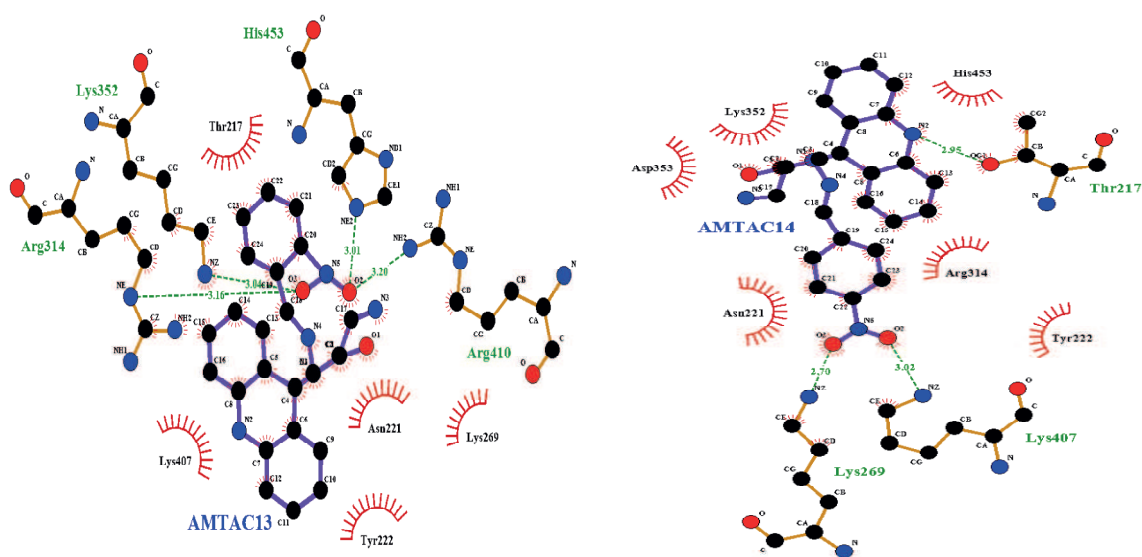
Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Resíduos de aminoácidos
AMTAC01	-H	-H	-H	-H	-H	
AMTAC06	-H	-H	-Cl	-H	-H	Asp 353
AMTAC07	-H	-H	-F	-H	-H	Val 315
AMTAC08	-Cl	-H	-Cl	-H	-H	Asp 353
AMTAC09	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H	Tyr 222
AMTAC10	-Cl	-H	-H	-H	-Cl	
AMTAC11	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	-H	Asp 352
AMTAC13	-NO ₂	-H	-H	-H	-H	Arg 314; Lys 352; His 453; Arg 410
AMTAC14	-H	-H	-NO ₂	-H	-H	Lys 269, Lys 407; Thr 217
AMTAC16	-H	-OCH ₂ CH ₃	-OH	-H	-H	Ser 354

Figura 21. Complexo formado pelo *docking* molecular dos compostos (ligantes) com a topoisomerase I (alvo), seguido da interação dos compostos AMTAC 13 e AMTAC 01 com o alvo.

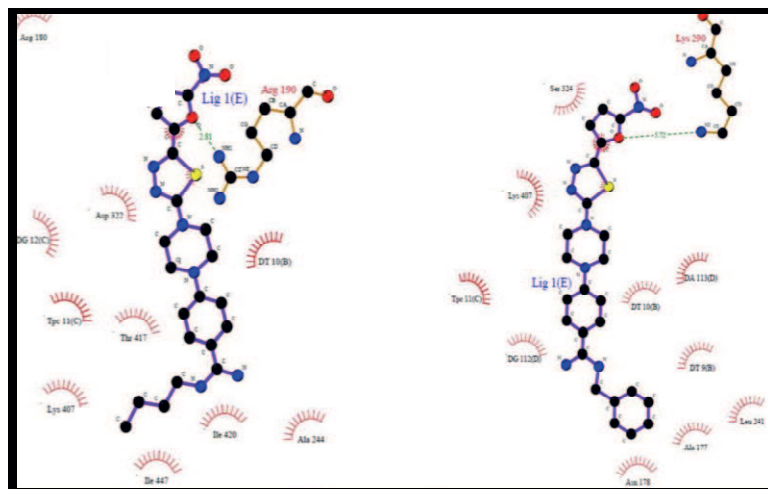


A AMTAC 13 possui como substituinte o grupamento nitro ($-\text{NO}_2$) na posição *orto*, enquanto a AMTAC 14 possui o mesmo grupo em *para*. Possivelmente o efeito mesomérico negativo dos grupamentos nitro favoreceram sobretudo na interação com seus sítios alvo, porém a mudança na posição do mesmo substituinte interferiu favorecendo melhor interação para a AMTAC 13, como podemos observar na tabela 6 e Figura 22).

Figura 22. Composto 13 e 14 com suas respectivas interações com o alvo Topoisomerase I.



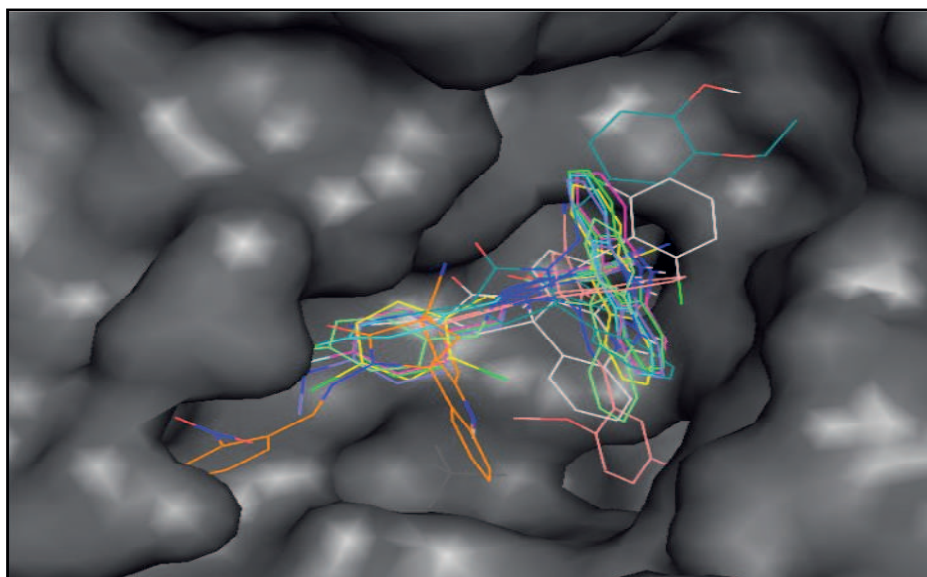
Tahghighi *et al* (2016) em seu estudo de QSAR com derivados tiazolidínicos, trouxe a importância dos estudos de modelagem molecular, onde constatou um potencial efeito anti-*Leishmania* com o mesmo alvo deste estudo em questão, onde seus compostos apresentaram interações do tipo pontes de hidrogênio também com resíduos de Lisina e Arginina e hidrofóbicas no sítio ativo (Figura 23). Esses resultados podem ser usados para o desenho de novas drogas e seu desenvolvimento baseado na estrutura de novos e seletivos inibidores de topoisomerase de *Leishmania*.



5.2.3 Alvo biológico: Tripanotiona redutase (TryR)

Os scores gerados no *docking* (Tabela 4) apontam que novamente o AMTAC 13, $\Delta G = -9,75 \text{ kcal / mol}$, ($R_1 = \text{NO}_2$) apresentou melhor grau de interação, seguido pela AMTAC 14, $\Delta G = -9,67 \text{ kcal / mol}$ ($R_3 = \text{NO}_2$). Na figura 24, pode-se observar como os ligantes ficaram posicionados no sítio ativo. O composto AMTAC13 (Em laranja na figura 24) ficou posicionado em uma coordenada um pouco diferente das demais, o que possivelmente determinou seu melhor score.

Figura 24. Complexo formado pelo *docking* molecular dos compostos (ligantes) com a tripanotona redutase (alvo)



Quando analisado as interações formadas entre os ligantes no sitio ativo, apenas os compostos AMTAC16, 14 e 13 formaram ligações de hidrogênio, as demais moléculas realizaram apenas interações hidrofóbicas (ver em apêndice). O composto AMTAC16 ($R_2 = -OCH_2CH_3$; $R_3 = -OH$), que dispõe de grupos doadores de elétrons, obteve interação do tipo pontes de hidrogênio com os resíduos Valina 362 e Glicina 376, tornando-se importante para sua possível ação frente ao alvo.

Já os compostos AMTAC13 e 14, apresentando como substituinte o grupo ($-NO_2$) fortemente retirador de elétrons, formam pontes de hidrogênio com arginina 228 (Figura 25 e 26), o que é um indicativo para os melhores scores desses dois compostos.

Além disso, o composto AMTAC 14 (Figura 26) interagiu por ponte de hidrogênio com os resíduos Leu227 e Try221 e seu substituinte na posição *para*. Apesar dos compostos 13 e 14 possuem o mesmo efeito eletrônico referente ao grupamento nitro, a mudança na posição *orto* para a posição *para* influenciaria possivelmente na atividade inibitória da enzima, nos resultados de estudo de *docking* de acordo com os scores observados.

Figura 25. Interações entre AMTAC13 e tripanotona redutase

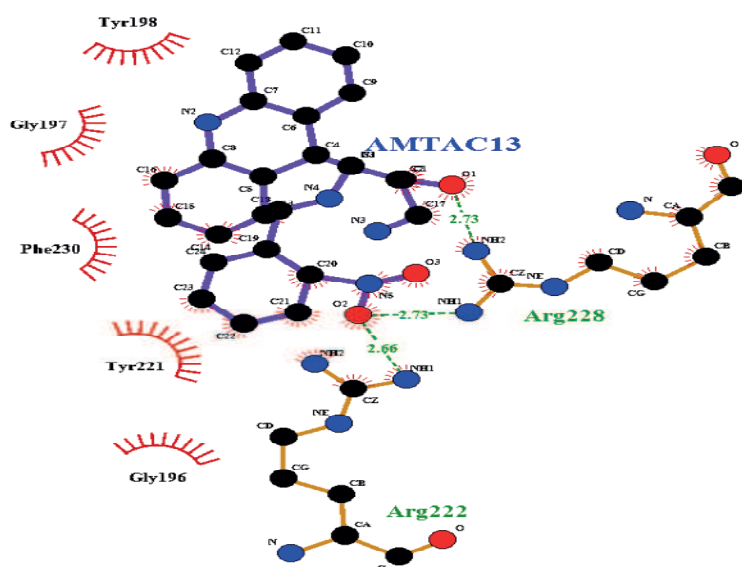
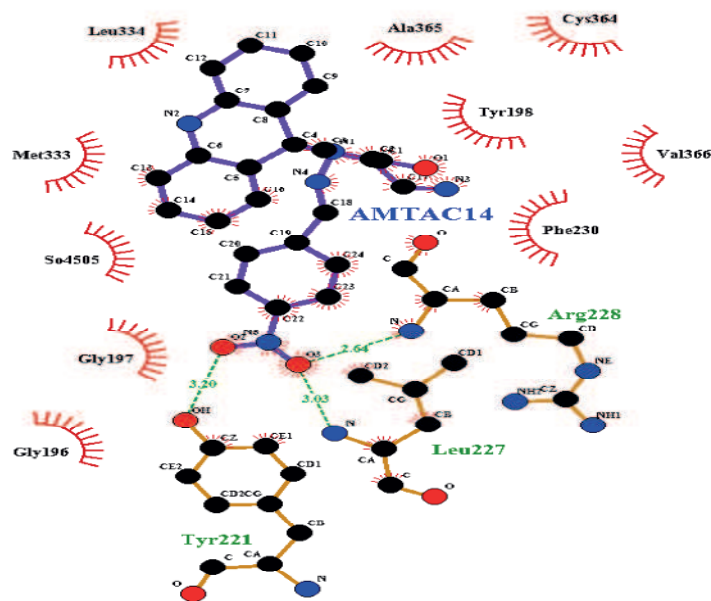
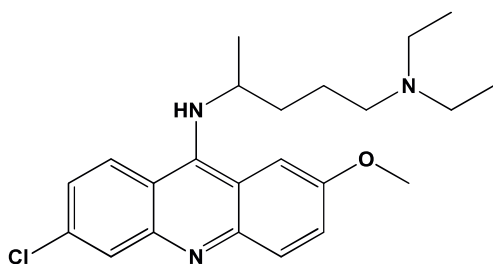


Figura 26. Interações entre AMTAC14 e tripanotiona redutase.



Venkatesan *et al* (2010) em seu estudo *in silico* com a Mepacrina, fármaco antiprotozoário desenvolvido na década de 1930, (Figura 27) via Tripanotiona redutase mostrou possíveis perfis de interação com a mesma, contudo os compostos obtiveram ligações de hidrogênio formadas pelas cadeias laterais protonadas com Glu466 e Glu467, além de Lys60, Thr335 e His461, demonstrando assim o perfil promissor dos derivados acridínicos.

Figura 27. Estrutura química da Mepacrina.



Fonte: Venkatesan *et al* (2010)

Assim, devido a notável capacidade de uma possível inibição das vias enzimáticas sugeridas, espera-se, portanto, que esta série de compostos apresentem atividade anti-leishmania. Neste estudo o composto AMTAC 13 seria o mais promissor para os 3 alvos, a partir de então seguimos para a análise da atividade *in vitro* destas moléculas.

5.3 Avaliação da atividade antipromastigota de novos derivados spiro-acridínicos

Visando a busca por potenciais alvos leishmanicidas e após verificado em estudo *in sílico*, os compostos spiro-acridínicos foram testados *in vitro* para a forma promastigota de *Leishmania infantum*, responsável por causar a forma mais agressiva da leishmaniose no novo mundo.

Todas as acridinas apresentaram potencial atividade de inibição de crescimento, apresentando diferentes valores de IC₅₀ que variaram entre 1,109 e 7,463 µg/ml, com exceção da AMTAC 09 (R1= -OCH₃; R4= Br) que apresentou resultados > 400 µM (tabela 7). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, onde após obtido o *screening* molecular, houveram suscetíveis repetições das moléculas mais promissoras.

Tabela 7. Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) dos derivados espiro-acridínicos frente as formas promastigotas de *L.infantum*.

Compostos	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µM
AMTAC 01	2,039 ± 0,06	5,4
AMTAC 06	5,681 ± 0,56	13,8
AMTAC 07	4,109 ± 0,87	10,4
AMTAC 08	3,891 ± 0,79	8,7
AMTAC 09	>400	>400
AMTAC 10	2,630 ± 0,20	5,9
AMTAC 11	1,109 ± 0,42	2,6
AMTAC 13	3,779 ± 0,38	9,0
AMTAC 14	5,331 ± 1,47	12,7
AMTAC 16	6,058 ± 1,40	13,9

Legenda: A tabela representa à média ± erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. Utilizou-se regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

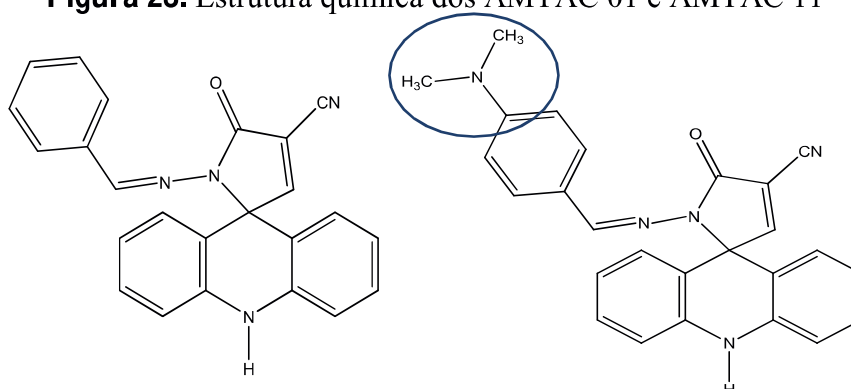
Os compostos que apresentaram maior potencial de inibição de crescimento foram as AMTAC 01 e AMTAC 11 (figura 27). O primeiro, tido como estrutura base para o desenvolvimento dos variados spiro-acridínicos aqui estudados, com diferentes substituintes em diferentes posições no anel benzilideno, apresentou uma ótima inibição do crescimento.

Esta molécula já fora previamente estudada como alvo para topoisomerase II humana, apresentando inibição da mesma (ALMEIDA et al., 2016), assim tornando-se um potencial agente para o tratamento de câncer devido a este mecanismo.

E devido a replicação rápida de parasitas como *Leishmania*, fazem com que, assim como as células tumorais, tornem-se um alvo comum para o estudo da atividade anti-*Leishmania* (DELMAS et al, 2004; DI GIORGIO et al, 2007; GIRAULT et al., 2000; JULIEN et al, 2005; PRAJAPATI et al, 2012; WERBOVETZ et al., 1992).

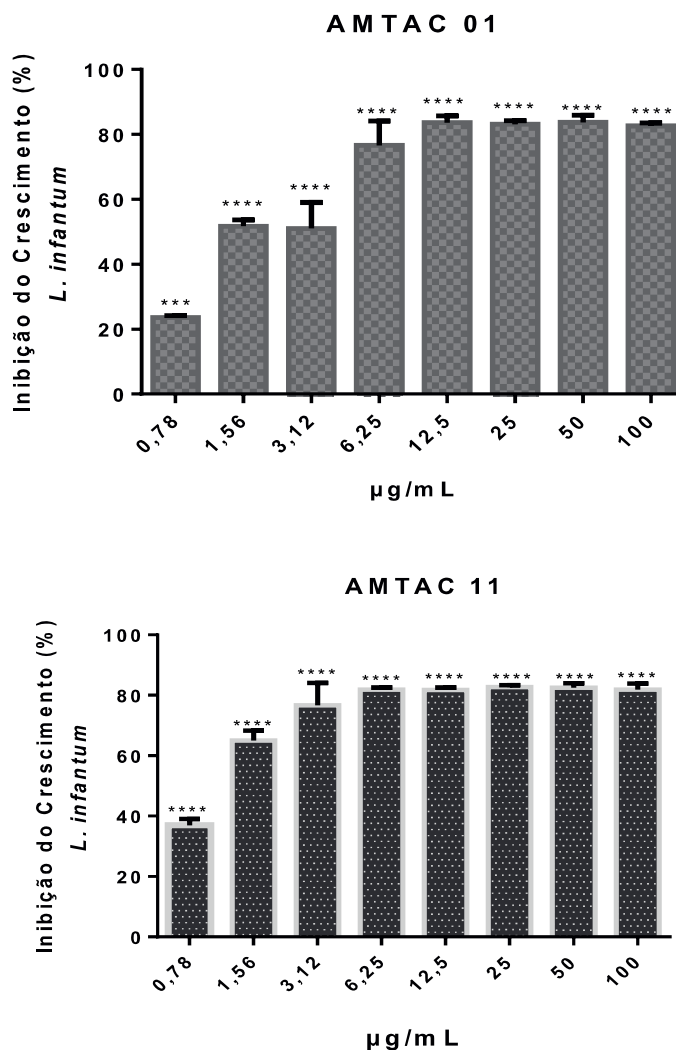
Quanto a AMTAC 11, ela apresentou a inibição de crescimento mais potente de todos os compostos estudados ($IC_{50} = 1,109 \mu\text{g/ml}$) (gráfico 1), sendo então o derivado mais promissor, seguindo da AMTAC 01. Na figura 28 temos as estruturas das duas moléculas, onde podemos concluir que a adição do grupamento 4-dimetilamina favoreceu bastante em sua atividade, possivelmente devido ao seu efeito eletrônico doador em *para*.

Figura 28. Estrutura química dos AMTAC 01 e AMTAC 11



A AMTAC 01 e 11 nas concentrações testadas inibiram o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* (gráfico 1), onde o aumento das concentrações destes dois derivados induziu a um aumento na inibição do crescimento, consequentemente, diminuição da viabilidade celular destes parasitas. O composto 11 testado com a menor concentração avaliada ($0,78 \mu\text{g/mL}$) exibiu uma redução de 37% ($\pm 2,1$) no crescimento dessa cultura quando comparado ao controle (0% inibição), demonstrando-se mais efetivo que o composto 01, pois inibiu o crescimento da cultura em 23,6 % ($\pm 0,56$).

Gráfico 1. Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações dos derivados acridínicos AMTAC 01 e AMTAC 11. Os gráficos representam à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

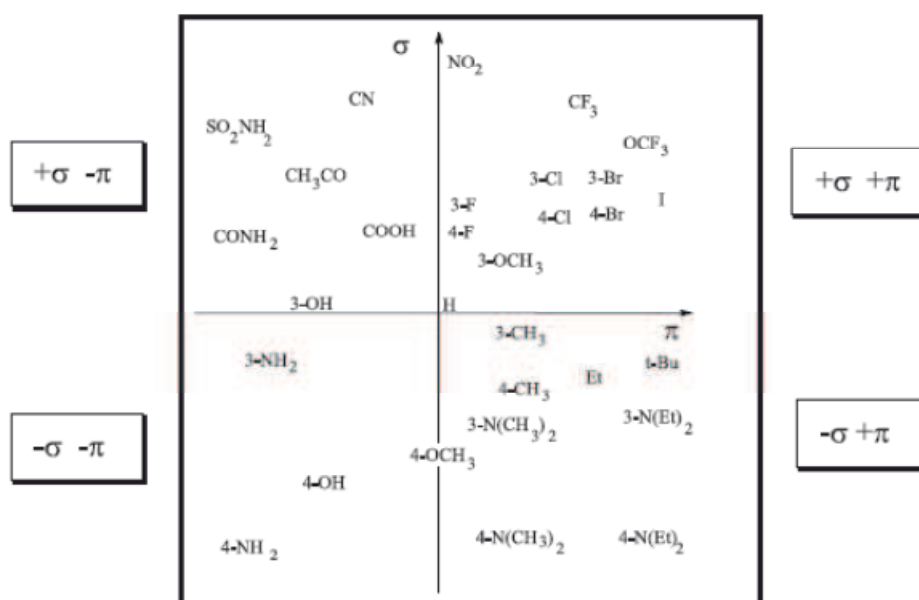


É notável o potencial efeito da AMTAC 11 quando podemos observar que dentre as concentrações testadas de 100 a 6,25 µg/mL, ela manteve uma porcentagem de inibição maior que 80%. Observa-se que os valores calculados de IC₅₀ destas moléculas estão de acordo com os gráficos de porcentagem de inibição, no qual apresentou um ótimo valor de significância na análise da variância em relação ao controle.

Quanto a análise estrutural da AMTAC 11, pode-se sugerir um forte efeito mesomérico positivo para o anel aromático, além de um grupo volumoso, que poderia favorecer a interações mais fortes com diferentes regiões da molécula alvo o que poderia justificar sua maior atividade.

Para uma compreensão maior destes efeitos eletrônicos, temos o Diagrama de Craig (1971), o qual é utilizado no planejamento de séries e estudos de relação estrutura-atividade. Este Diagrama apresenta descritores estruturais de hidrofobicidade (π) e efeitos eletrônicos (σ) nos compostos com *meta* e *para*-substituição aromática. Assim, aplicando o Diagrama de Craig, podemos observar que os efeitos eletrônicos negativos, principalmente do AMTAC11 e o efeito lipofílico positivo, cujo substituinte se encontra no quadrante inferior direito ($-\sigma + \pi$), implica na melhora da atividade biológica. A Figura 29 mostra o Diagrama de Craig para os descritores estruturais π e σ .

Figura 29. Diagrama de Craig para os descritores estruturais π e σ



Fonte: Tavares (2004).

No estudo de *docking*, esta molécula não apresentou os melhores perfis para os alvos do estudo em questão, podendo estar relacionado a interações extras entre o composto e outros alvos biológicos aqui ainda não foram estudados.

Ademais, apesar da AMTAC 11 e 01 não apresentarem melhores scores de energia, não exclui o fato delas atuarem por algum destes mecanismos enzimáticos. Porém existem vários fatores que podem levar a mudança no perfil de atividade *in vitro*, como a própria metodologia para a realização destes testes. Por exemplo, as condições do meio de cultura. O meio Schneider apresenta um pH próximo a neutralidade, e neste caso o composto AMTAC 11, que apresenta como grupo substituinte uma amina terciária, onde este grupamento que

apresenta característica básica em pH fisiológico, tende a protonar. Como exemplo disto, temos os próprios resíduos aminoácidos que se apresentam na sua forma ionizada. O efeito da amina protonada pode ter favorecido de alguma forma a interação com o possível alvo, porém, não foi realizado um teste *in silico* com o composto nesta condição, além do mais isso mudaria completamente o perfil eletrônico desse composto, todavia, essa possibilidade também pode significar um outro possível tipo de interação ainda não estudado nesta pesquisa.

Quanto as espiro-acridinas que tem como grupo substituinte o cloro, podemos continuar estabelecendo uma relação estrutura atividade (SAR). O AMTAC 06 ($R_1 = \text{Cl}$) apresentou IC_{50} de $5,68 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$, porém quando temos a adição de um segundo átomo de cloro, em posição *orto* ($R_1 = \text{Cl}$; $R_3 = \text{Cl}$) levando ao composto di-substituído, o AMTAC 08, o seu IC_{50} ($3,89 \mu\text{g/ml} \pm 0,79$) foi reduzindo, sendo considerado, portanto mais ativo (figura 30). Já quando mudamos a posição do átomo de cloro em *para* para *orto*, (AMTAC 10), observamos uma potencialização da atividade anti-*Leishmania*, sendo um dos compostos mais ativos ($\text{IC}_{50} = 2,63 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$). Assim temos que o efeito mesomérico positivo contribui para a potencialização da atividade, também como efeitos estéricos que podem influenciar quanto a posição de encaixe no receptor alvo.

Estes derivados da série AMTAC nas concentrações testadas inibiram, portanto, o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* (gráfico 2), e o aumento das concentrações dos derivados induziu um aumento na inibição do crescimento à medida que se aumentava as concentrações dos mesmos. Os derivados dicloro substituídos, AMTAC 08 e AMTAC 10, testados com a menor concentração avaliada ($1,56 \mu\text{g/mL}$) exibiram uma redução em torno de 25%, no crescimento dessa cultura quando comparados ao controle (0% inibição).

Figura 30. Estrutura química dos AMTAC 06, AMTAC 08 e AMTAC 10, respectivamente

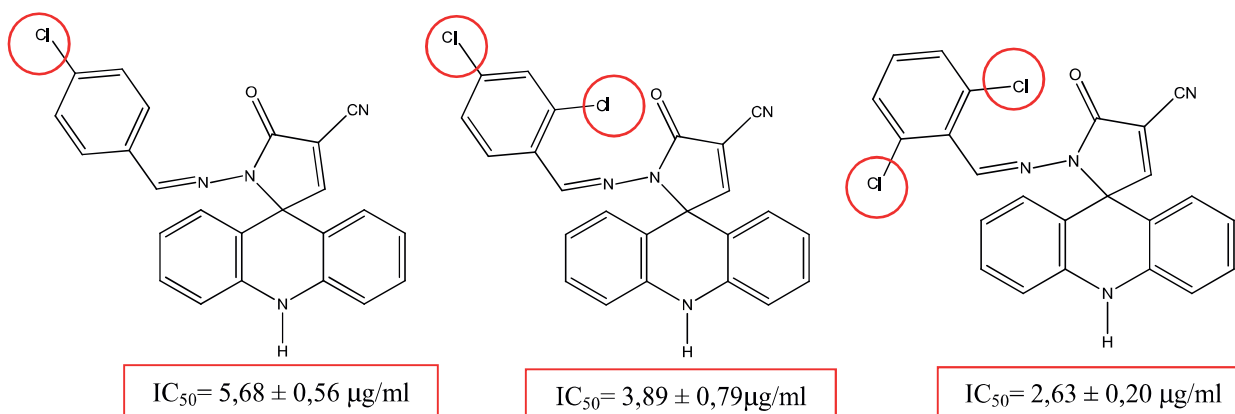
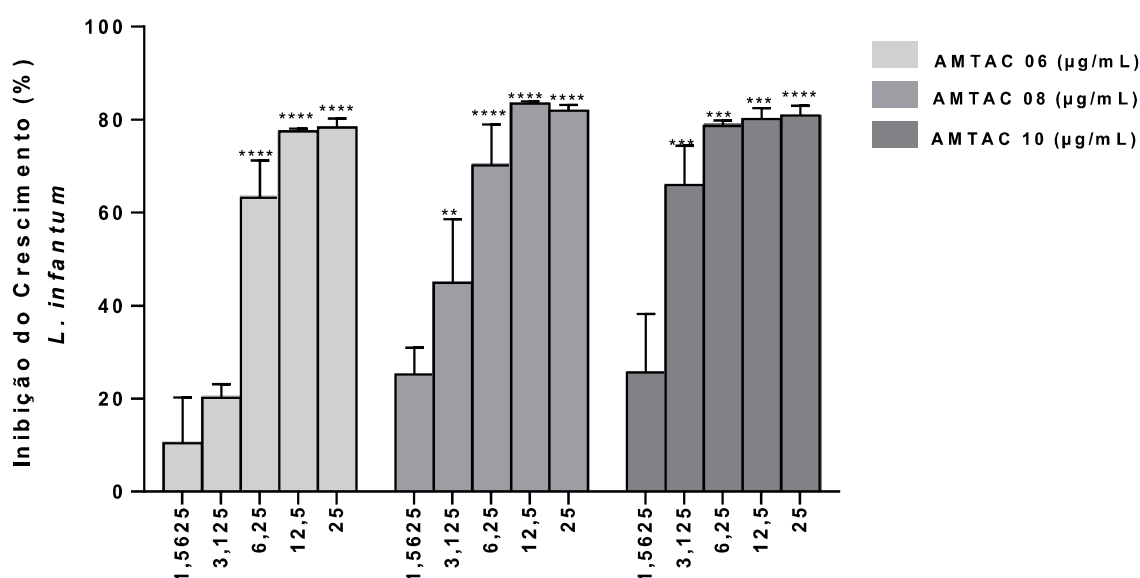


Gráfico 2. Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro- acridínicos AMTAC 06, AMTAC 08 e AMTAC 10.

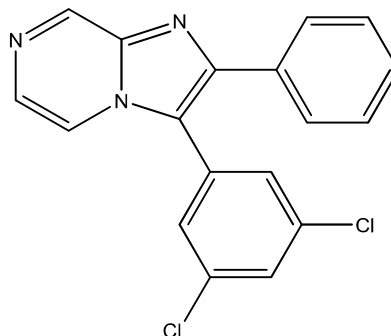


Legenda: As formas promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença das substâncias avaliadas. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

Nossos estudos foram de acordo com os resultados obtidos por Marchand *et al* (2015). Em seu estudo com compostos imidazol-pirazínicos, os autores perceberam que a adição de

mais um átomo de cloro no anel fenílico, (3,5-dicloro substituído), aumentou a potência na atividade frente a *L. major*.

Figura 31. Estrutura química do composto 3-aryl-2-fenilimidazo[1,2-a]pirazino [3,5-(Cl₂)C₆H₃]



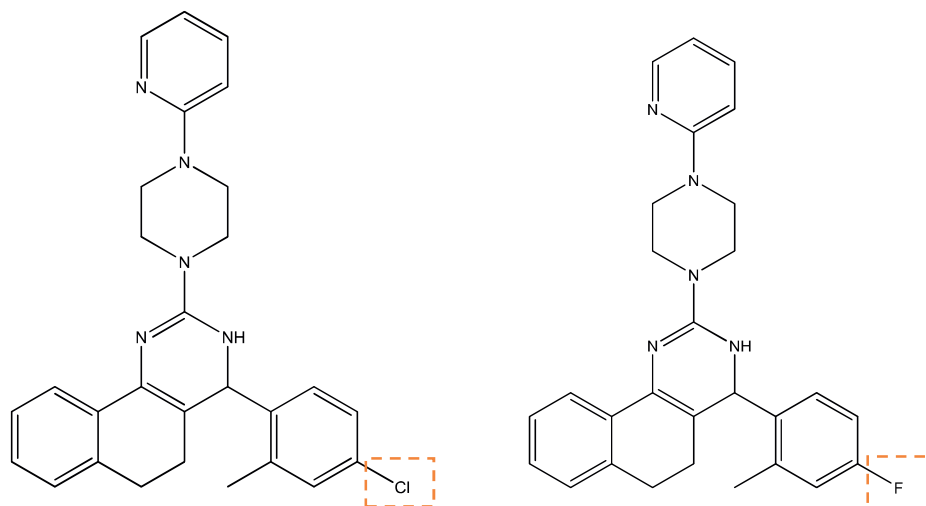
Fonte: Marchand *et al* (2015).

Podemos concluir, portanto, que os efeitos da adição de um substituinte e a modificação da posição dos mesmos afetam diretamente na sua atividade. Neste caso, o aumento da lipofilicidade (tabela 3) e os efeitos eletrônicos do cloro favoreceu de forma positiva seu impacto na inibição do crescimento da *L. infantum*.

A substituição de um elemento cloro em posição *para* (AMTAC 06) pelo também halogênio Flúor (AMTAC 07), promoveu uma diminuição do IC₅₀ de $5,681 \pm 0,56$ para $4,109 \pm 0,87$ $\mu\text{g} / \text{Ml}$, respectivamente. Isso pode ser justificado pelo bioisosterismo não-classico entre flúor e o H, que torna o AMTAC 07 (R₃= F) mais próximo ao AMTAC 01 do que o AMTAC 06 (R₃= Cl) na resposta biológica, uma vez que não há mudanças drásticas de efeitos lipofílicos, apenas perturbações eletrônicas, devido ao forte efeito eletronegativo do flúor.

Segundo Agarwal *et al* (2009) (figura 32), em seu estudo da atividade antil-leishmania de derivados quinazolínicos, relatou que a substituição do átomo de cloro por um átomo de fluor, que é mais eletronegativo, levou também a uma diminuição do valor de IC₅₀ dos seus compostos. Portanto o efeito eletrônico positivo (+ σ) pode contribuir positivamente para a atividade destes compostos.

Figura 32. Estrutura química dos compostos 4- (3-benzilidina substituída) -2-substituído-3, 4, 5, 6-tetrahidrobenzo [h] quinazolina



Fonte: Agarwal *et al* (2009).

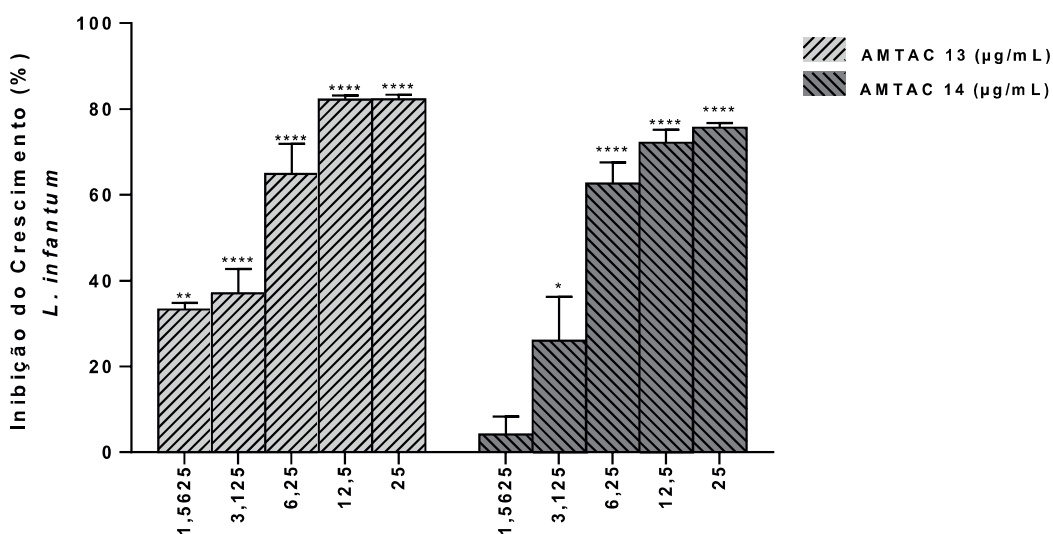
Guetzoyan e colaboradores (2009), assim como Kumar *et al* (2009) sintetizaram uma série de derivados de acridina e avaliaram a atividade antimalárica contra cepas de *Plasmodium falciparum* susceptível e resistente a cloroquina. A relação estrutura-atividade demonstrou que os substituintes 6-cloro no anel de acridina melhorou a atividade. Enquanto que no segundo estudo, os substituintes na posição 4 e 6 em torno do núcleo triazínico potencializou a atividade.

Permanecendo na mesma compreensão anterior, podemos observar o perfil de inibição de crescimento no gráfico 4 e as estruturas químicas das AMTAC 13 e 14 na figura 33, onde a mudança de posição *orto* do grupamento nitro para a posição *para* interferiu diretamente numa diminuição da sua atividade (tabela 7), mesmo sendo o mesmo substituinte com os mesmos efeitos eletrostáticos. Estes resultados são condizentes com o estudo de *docking*, onde o AMTAC 13 apresentou melhores *scores* de energia (TryR = -12.1200 Kcal/mol; CYP51= -11.0500 Kcal/mol; TOP1= -9,7500 Kcal/mol) com os 3 alvos estudados em relação ao AMTAC14 (TryR = -11.2100 Kcal/mol; CYP51= -8.3100 Kcal/mol; TOP1= -9,6700 Kcal/mol).

A AMTAC 13 testada com a menor concentração avaliada no gráfico exibiu uma redução de 33,8 % no crescimento dessa cultura quando comparado ao controle (0% inibição),

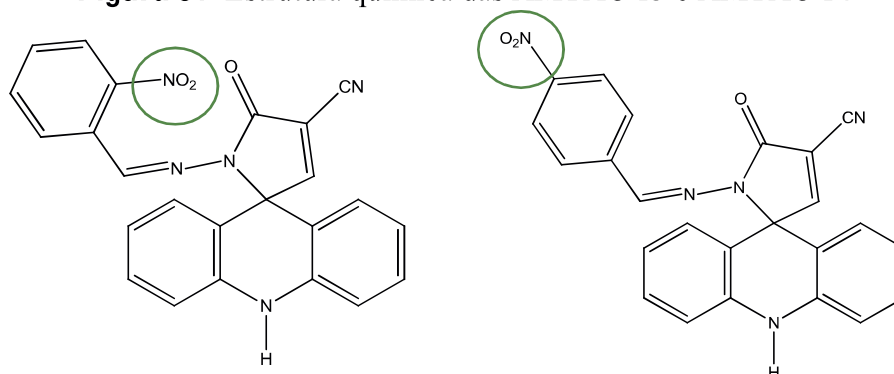
demonstrando-se mais efetivo que a AMTAC 14 na sua menor concentração testada (1,5625 µg/mL) inibiu apenas uma média de 4%. A partir da concentração de 25 µg/mL, a porcentagem de inibição variou de 75 a 82% entre os dois derivados AMTAC nitro-substituído, respectivamente. Os AMTAC 13 e 14, portanto, inibiram o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* (gráfico 3), onde o aumento das concentrações-teste destes dois derivados induziu a um aumento na inibição do crescimento do parasito.

Gráfico 3. Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro-acridínicos AMTAC 13 e AMTAC 14.



Legenda: As formas promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença das substâncias avaliadas. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

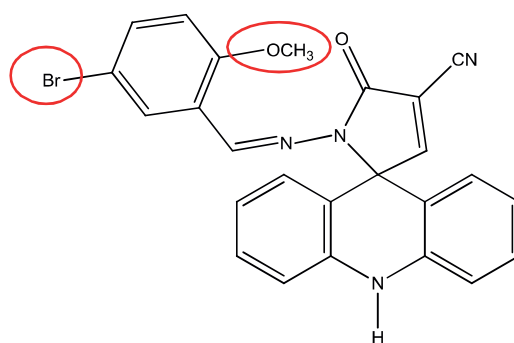
Figura 31. Estrutura química das AMTAC 13 e AMTAC 14



Paralelamente temos que no estudo *in silico* para os três alvos enzimáticos, o AMTAC 13 obteve melhores scores de energia, sendo a molécula de melhor perfil os alvos estudados, estando de acordo com os resultados *in vitro* em relação ao AMTAC 14, demonstrando portanto, ser como um composto de potencial atividade e também promissor a fármaco para o tratamento de leishmaniose.

Na figura 34 temos a estrutura química da AMTAC 09, este composto foi o único que não apresentou atividade frente a forma promastigota de *L. infantum*. Seria necessário um estudo mais aprofundado que esclareça o motivo de tal acontecimento, pois este composto apresentou melhor perfil no estudo de docking com a enzima esterol 14-alfa-desmetilase. Apesar deste composto apresentar efeitos eletrônicos e lipofílicos relativamente desejáveis, as posições desses átomos ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{Br}$) talvez não estejam favorecendo a interação com outros alvos farmacológicos, que não foram aqui estudados até então.

Figura 34. Estrutura química da AMTAC 09



A literatura nos traz exemplos de derivados acridínicos com atividade anti-*Leishmania sp* (DELMAS et al., 2004; DI GIORGIO et al., 2005; JULIEN et al., 2005; SERAFIM, 2016), sendo promissores na tentativa do desenvolvimento de novos fármacos para a leishmaniose. Este estudo trouxe uma série não antes publicada para este fim, as espiro-acridinas, que vem, portanto, mostrando potencial para o tratamento desta patologia, em especial para a leishmaniose visceral, onde há negligência de estudos e relativo descaso na saúde pública, como relatado anteriormente, pois o grau de mortalidade é muito alto para quem não alcança um tratamento correto.

Todavia são necessários estudos mais aprofundados quanto a tentativa de interpretar seu mecanismo de ação, além da citotoxicidade frente as células humanas, que será relatado posteriormente.

Os medicamentos Glucantime[®] (Antimoniato de meglumina) e Anfotericina B foram utilizados como fármacos de referência nestes ensaios, visto que são os medicamentos escolhidos no tratamento das leishmanioses no Brasil, (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). Os resultados referentes a estes ensaios estão apresentados nos gráficos 4 e 5.

Gráfico 4. Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações da droga de referência: Anfotericina B. Os gráficos representam a média \pm erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

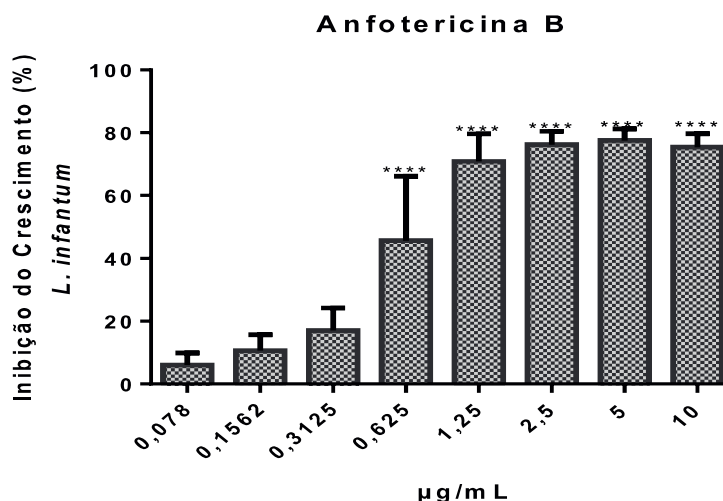
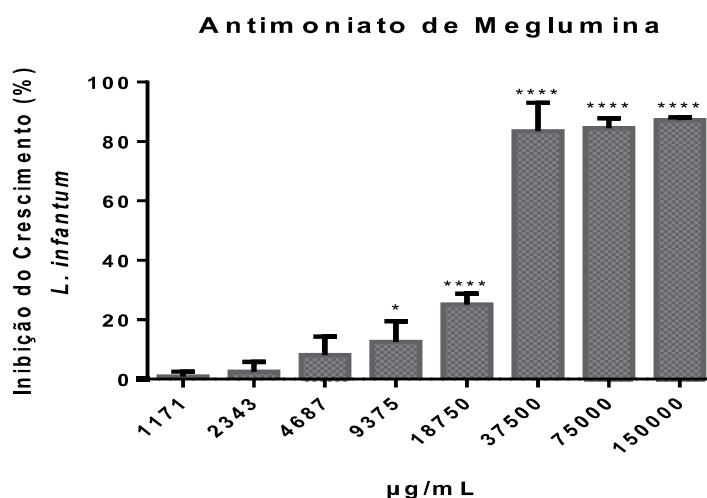


Gráfico 5. Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações da droga de referência: Glucantime[®] (Antimoniato de Meglumina)



Conforme observado na tabela 8, verificamos que a AmB foi o fármaco mais eficaz sobre formas promastigotas de *L. infantum*, visto que este possui um IC₅₀ de 0,90 µg/mL, enquanto que os antimoniais pentavalente possui um valor bem maior (25610 µg/mL).

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) de promastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações dos fármacos de referência: Glucantime e Anfotericina B.

Fármacos de referência	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM)
Glucantime®	25610(±1,46)	50512,8
Anfotericina B	0,90(±0,11)	1,0

Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

A Anfotericina B exibiu uma expressiva atividade antipromastigota, apresentando melhor perfil de inibição de crescimento do que todos os novos derivados analisados neste estudo. Os resultados estão de acordo com os relatados na literatura, no qual apresenta uma atividade muito satisfatória sobre as formas promastigotas de *Leishmania* sp., em especial nossa espécie em estudo (DI GIORGIO et al., 2007; DUARTE et al., 2016; PASSALACQUA et al., 2015). Vale destacar também que o composto AMTAC 11 obteve um valor de inibição de crescimento muito próximo ao fármaco Anfotericina B, tornando-se um alvo promissor a fármaco, fortificando a sua importância como um alvo anti-*Leishmania*.

Ademais quando comparamos os resultados dos compostos estudados, eles apresentaram superior atividade antipromastigota em relação ao fármaco de referência, o Glucantime (antimonial pentavalente), visto que este apresentou um valor alto de IC₅₀ [25610(±1,46)µg/mL].

A literatura traz divergências quanto aos valores de inibição de crescimento do Glucantime. E apesar da sua atividade não expressiva e os efeitos colaterais que esse tipo de medicamento trás, ele ainda continua sendo o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose (BORBOREMA et al., 2011; KHADEM VATAN et al., 2013).

A avaliação biológica dos derivados espiro-acridínicos que consistiu na análise anti-*Leishmania* permitiu observar que estes compostos são candidatos promissores a terapêutica das leishmanioses, visto que apresentaram atividade bastante promissora para as formas promastigotas, com exceção da AMTAC 09, onde esses resultados foram melhores do que o antimonial de meglumina. Nesta série foi possível observar uma relação de estrutura atividade, onde a AMTAC 11, que é um núcleo espiro-acridínico substituído pelo radical 4-dimetilamina, parece favorecer a atividade farmacológica, provavelmente devido aos efeitos eletrônicos doadores, visto que teve os melhores valores de IC_{50} , porém estudos complementares tanto *in silico* quanto *in vitro* e *in vivo* e toxicológicos serão necessários para comprovar sua eficácia e atividade.

5.4 Avaliação da citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos para células de mamíferos: investigação da atividade hemolítica sobre hemácias de origem humana e Índice de seletividade

A avaliação da citotoxicidade para células de mamíferos foi realizada investigando a atividade hemolítica dos compostos em estudo. Esta análise demonstrou que nenhum dos derivados espiro-acridínicos apresentaram citotoxicidade para hemácias humanas até a maior concentração estudada, o que nos permite afirmar que, caso haja alguma citotoxicidade, esses valores deverão ser maiores que seu HC_{50} ($>400\mu\text{g/mL}$), conforme demonstrado na tabela 9. Porém quando comparamos o índice de seletividade da AMTAC 09 pode-se afirmar que o composto não demonstrou citotoxicidade, mas também não demonstrou seletividade para o parasito, já que este composto não inibiu o crescimento do parasito.

Tabela 9.Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) de promastigotas de *L.infantum*, concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC₅₀) e índice de seletividade (IS = HC₅₀/IC₅₀) de derivados espiro-acridínicos.

Compostos	IC ₅₀ µg/ml	HC ₅₀ (µg/mL)	IS
AMTAC 01	2,039 ± 0,06	>400	196,17
AMTAC 06	5,681 ± 0,56	>400	70,41
AMTAC 07	4,109 ± 0,87	>400	97,35
AMTAC 08	3,891 ± 0,79	>400	102,80
AMTAC 09	>400	>400	-
AMTAC 10	2,630 ± 0,20	>400	152,09
AMTAC 11	1,109 ± 0,42	>400	360,68
AMTAC 13	3,779 ± 0,38	>400	105,85
AMTAC 14	5,331 ± 1,47	>400	75,03
AMTAC 16	6,058 ± 1,40	>400	66,03

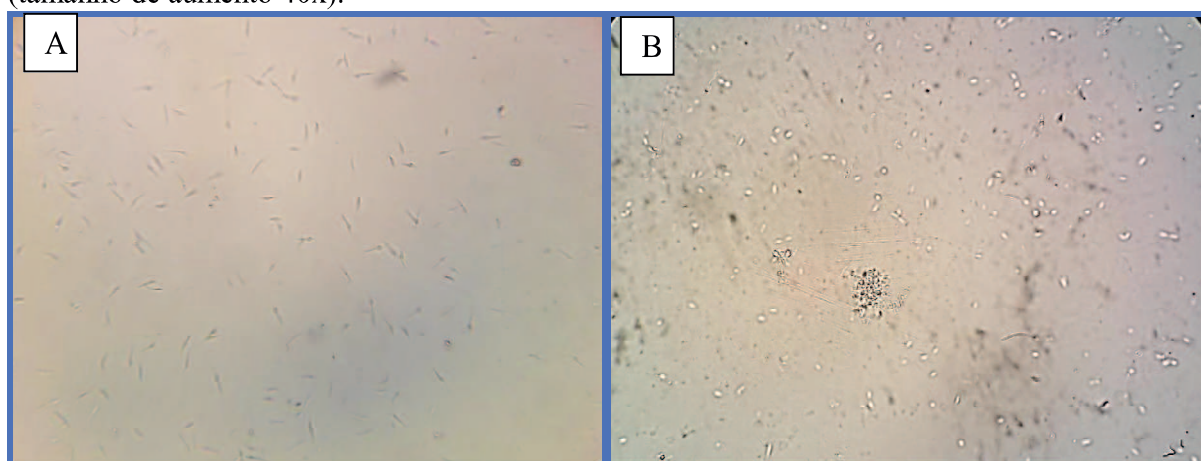
Dentre as 10 moléculas estudadas foram escolhidas as moléculas AMTAC 01 e AMTAC 11 para estudos posteriores. Onde tal escolha levou em consideração o melhor valor de IC₅₀ quando comparado as demais da mesma série. Além disso, estas moléculas não mostraram toxicidade contra hemácias e apresentaram-se, portanto, mais seletivas ao parasito do que as demais.

Estes resultados *in vitro* sugerem que estes compostos podem não apresentar toxicidade significativa *in vivo*. É necessário, ainda, ensaios de toxicidade *in vitro* mais específico, como citotoxicidade em células mononucleares do sistema periférico (PBMC) e posteriormente a resposta em ensaios *in vivo*.

5.5 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos AMTAC 01 e AMTAC11 sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum*

Visando a continuidade da pesquisa com os compostos mais ativos a partir dos resultados anti-promastigota, foi avaliado, após o processo de validação da metodologia (figura 35), a atividade dos compostos 01 e 11 contra a forma amastigota axênica da *L. infantum*. É de suma importância verificar o potencial destas moléculas, já que a forma amastigota intracelular se encontra nos macrófagos de seu hospedeiro vertebrado e o homem é um deles, e é responsável pela fase mais virulenta da doença. Neste ensaio nós obtivemos a dose efetiva capaz de eliminar 50% do parasita, já que não mais se encontra em fase log de crescimento, mas sim em sua fase estacionária

Figura 35. Formas promastigota (A) e amastigota (B) de *L. infantum* em microscopia óptica (tamanho de aumento 40x).



Na tabela 10 temos os valores calculados de concentração efetiva dos compostos estudados, obtidos a partir de, no mínimo, 3 experimentos independentes feitos em triplicata, juntamente com os fármacos de referência (3 experimentos independentes feitos em triplicata) e seus respectivos erros padrão da média. Podemos ver o efeito potencializado da AMTAC 11, apresentando um EC_{50} de $0,974 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$.

Houve um déficit da atividade em relação ao IC_{50} da AMTAC 01, que para a forma amastigota agora apresenta um EC_{50} de $4,964 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$. O composto 11, portanto, continua tornando-se o derivado espiro-acridínico mais promissor no estudo.

Destaca-se também a atividade dos compostos estudados em relação aos controles positivos, ou seja, os fármacos de referência, principalmente ao relacionarmos a AMTAC 11 a Anfotericina B, fármaco que sempre apresenta potente atividade segundo a literatura.

Tabela 10. Concentração Dose efetiva 50% (EC₅₀) de amastigotas de *L. infantum* dos compostos AMTAC 01 e AMTAC 11 e os fármacos de referência: Glucantime e Anfotericina B.

Drogas	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µM)
AMTAC 01	4,964 ±0,6	13,2
AMTAC 11	0,974 ±0,2	2,3
Glucantime[®]	112.800 ±12	222485,2
Anfotericina B[®]	1,597±0,26	1,7

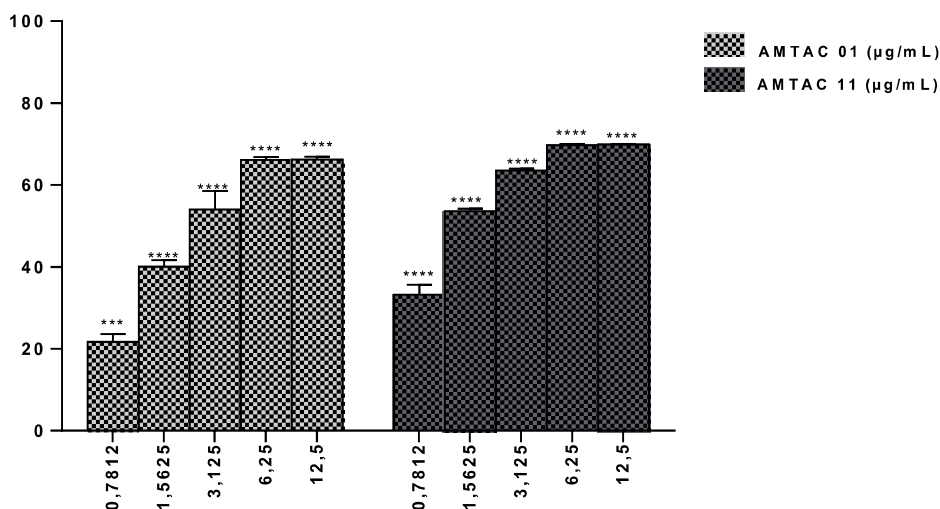
Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

Os gráficos 6 e 7 representam o tratamento da forma amastigota da *L. infantum* nas diversas concentrações teste com as AMTAC 01 e AMTAC 11 e seus respectivos fármacos controle, Anfotericina B e o Antimoniato de meglubina (Glucantime).

O composto AMTAC 01 apresentou atividade anti- amastigota sobre *L. infantum*, nas concentrações de 0,7812; 1,5625; 3,125; 6,25 e 12,5 µg/mL, apresentando uma taxa de inibição de viabilidade celular de 21,7 ± 1,9; 40,0 ± 1,6; 54,02 ± 4,5; 66,11 ± 0,72 e 66,17 ± 0,68 %, respectivamente, quando comparados ao controle. Enquanto que o AMTAC 11 apresentou uma taxa de inibição de 33,2 ± 2,4; 53,6 ± 0,64; 63,56 ± 0,37; 69,72 ± 0,27 e 69,85 ± 0,2 %. Também quando comparado ao controle.

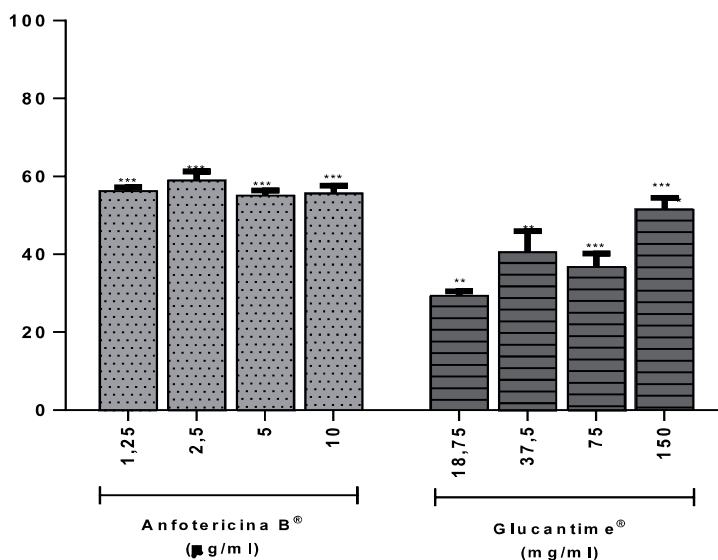
A Anfotericina B apresentou atividade anti-amastigota de 56,19 ± 1,0 % na menor concentração testada (1,25µg/mL) quando comparado ao controle negativo (0% inibição). No entanto, a análise do medicamento Glucantime[®] exibiu uma média inibição de 51,49 ± 3,1 µg/mL apenas na maior concentração testada, de 150 mg/mL que corresponde a 150 000 µg/mL, mostrando o potencial das espiro-acridinas como fármacos promissores.

Gráfico 6. Viabilidade celular das formas amastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações dos derivados espiro-acridínicos AMTAC 01 e AMTAC 11.



Legenda: As formas promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença das substâncias avaliadas. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

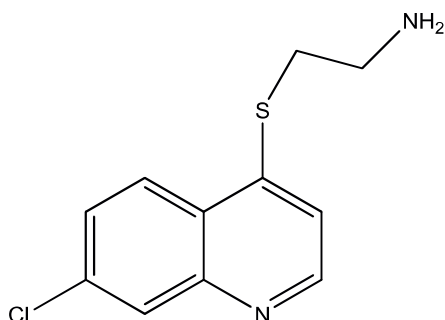
Gráfico 7. Viabilidade celular das formas amastigotas de *L. infantum* na presença de diferentes concentrações das drogas de referência: Anfotericina B e Glucantime.



Legenda: As formas promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 24 horas a 26°C na presença das substâncias avaliadas. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

Coimbra *et al* (2016) em seu estudo com derivados quinolínicos, baseados na estrutura química da Cloroquina que é o fármaco de referência utilizado no tratamento da Malária, em busca da atividade anti-*Leishmania* desses compostos para *L. amazonensis*; pode observar que seu composto amino-substituído (Figura 36) apresentou um aumento potencial na atividade amastigota ($EC_{50} = 0,0911 \mu M$) do seu em relação a atividade anti-promastigota, ($IC_{50} = 52,9 \mu M$).

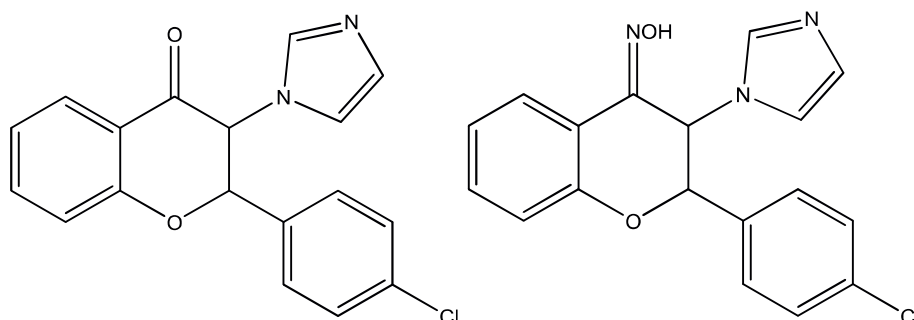
Figura 36. Estrutura química do composto QuinDer1.



Fonte: Coimbra *et al*, 2016.

De forma semelhante, Shokri e colaboradores (2017), observaram a atividade anti-*Leishmania* para a forma amastigota de *L. major* potencializada para os seus compostos mais ativos IF-2 de $8,7 \pm 0,3 \mu g/mL$ para $0,2 \pm 0,06 \mu g/mL$ e IFO-2 de $15,2 \pm 3,0 \mu g/mL$ para $2,05 \pm 0,01 \mu g/mL$ (Figura 37). Baseado na estrutura de antifúngicos azóis, como o Cetoconazol, que apresenta como mecanismo de ação a inibição da enzima esterol 14α -demetilase, levando ao bloqueio da biossíntese de ergosterol destes micro-organismos, a atividade dos seus derivados 3-imidazolflavona obtiveram resultado promissor.

Figura 37. Estrutura química dos compostos IF-2 e IFO-2.



Fonte: Shokri *et al*, 2017.

Podemos observar, portanto, que a atividade de um composto pode variar de acordo com o estágio do ciclo de vida do parasito. Neste estudo, a atividade do AMTAC 11 potencializou de certa forma ($EC_{50}= 0,974 \mu\text{g}/\text{ml}$) enquanto que o AMTAC 01 reduziu em relação a atividade anti-promastigota ($EC_{50}= 4,964 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Vários fatores, incluindo o pH intracelular, as diferenças proteômicas envolvidas nas vias metabólicas, a metabolização do fármaco, a insuficiência de absorção / inativação do composto pela célula hospedeira, entre outros, podem estar associados à atividade específica do estágio celular. Em espécies de *Leishmania*, existe uma diferença na sensibilidade entre promastigotas e amastigotas para vários fármacos, como antimônias pentavalente e anfotericina B (ESCOBAR et al., 2002).

Apesar da literatura não vasta em relação aos estudos com derivados acridínicos para atividade anti-*Leishmania*, as espiro-acridinas apresentam destaque diante deste cenário, e os resultados obtidos induzem a prosseguir com estudos de aprofundamento em relação aos seus possíveis mecanismos de ação, visando a busca de fármacos para o tratamento da Leishmaniose Visceral.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

No estudo *in silico*, que visa a possibilidade de um possível mecanismo de ação para os potenciais compostos ativos, todos os compostos apresentaram interação com os alvos estudados, do tipo pontes de hidrogênio e hidrofóbicas, que foram significativas, apresentando portanto, um perfil *mult-target* (múltiplos alvos terapêuticos). O fato dos medicamentos de referência não possuírem mecanismo de ação comprovado faz com que a interpretação se torne difícil e não conclusiva.

Os compostos 13 e 14 se destacaram mais neste estudo e também apresentaram uma boa atividade *in vitro*, porém não obtiveram os melhores valores de IC₅₀. Talvez o principal mecanismo de ação responsável pela ação contra a *Leishmania* em estudo não seja a via dos 3 alvos estudados. Para isso, seria necessário um aprofundamento destes estudos a partir de ensaios *in vitro* com estas enzimas ou outros alvos, ou *in vivo* para compreender melhor a ação destes compostos no próprio hospedeiro infectado.

Esperava-se também que a AMTAC 09 tivesse uma atividade significativa para *Leishmania*, já que esta apresentou melhor valor de energia de interação com a CYP51, porém inúmeros fatores, até então desconhecidos, podem ter feito com que esta molécula não expressasse atividade.

Nesta série foi possível observar através da relação estrutura- atividade que o AMTAC 01 (IC₅₀ = 2,039 ± 0,06 µg/ml), tido como estrutura base para o desenvolvimento dos variados spiro-acridínicos aqui estudados, e o AMTAC 11 (IC₅₀ = 1,109 µg/mL), grupo dimetilamino, parece favorecer a atividade farmacológica, provavelmente devido aos efeitos eletrônicos doadores e lipofílicos positivos.

Quanto a atividade na forma amastigota da *L. infantum*, destaca-se expressiva atividade da AMTAC 11 a partir do seu EC₅₀ (0,974 µg/m), sendo melhor que os próprios controles positivos, principalmente em relação a Anfotericina B.

Nenhum dos derivados apresentou citotoxicidade para hemácias de origem humana até a maior concentração avaliada (400 µg/ml). Contudo, pode-se relatar que todas as moléculas que apresentaram atividade anti-*Leishmania*, foram mais tóxicas para o parasito do que para hemácias, demonstrando uma atividade seletiva.

Contudo é necessário o aprofundamento com estudos que auxiliem a fortificar uma via de ação para esta série de acridinas, já que a literatura vem relatando o potencial efeito da mesma.



REFERÊNCIAS

ADAUI, Vanessa et al. Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: diversity of expression profiles among clinical isolates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1021, 2011.

ALBERT, A. **The acridine**. 2^o Ed. London: Edward Arnold Publishers, Ltd. p. 1966.

ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, n.16, 13023-13042, 2015.

ALMEIDA, S. M. V.; et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 92. 467–475. 2016.

AGARWAL, K. C. et al. Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 18, p. 5474-5477, 2009.

ANSARI, Md Yousuf et al. Recent advancement and treatment of leishmaniasis based on pharmacoinformatics approach: Current and future outlook. **Gene Reports**, v.9, n. 86-97, 2017.

ANTONINI, Ippolito. DNA-binding antitumor agents: from pyrimido [5, 6, 1-de] acridines to other intriguing classes of acridine derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1701-1716, 2002.

BARATA, Ricardo Andrade et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARROS, F. W. A.; et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.

BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P. A.; ROGERS, Matthew E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BELLO, Murilo Lamim et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 16, p. 5046-5052, 2011.

BHATTACHARYA, Sujit K. et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 2, p. 217-221, 2004.

BORBOREMA, SamantaEtelTreiger et al. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in Leishmania (Leishmania) major-infected macrophages. **International jornal of antimicrobialagents**, v. 38, n. 4, p. 341-347, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2016 a. *Casos de Leishmaniose Visceral*. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/LV-Casos.pdf>> Acesso em: 29 Jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2016 b. *Casos de Leishmaniose Tegumentar*. Disponível em: <
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>> Acesso em: 08 Nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1.ed., Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora do Ministério da Saúde, p. 182, 2007.

CABRERA-SERRA, María Gabriela et al. In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of Leishmania species. **Parasitology research**, v. 100, n. 5, p. 1155-1157, 2007.

Nursing. Leishmaniose – Todas as Informações. Causas, Diagnóstico e Tratamentos . Disponível em: < <http://www.nursing.com.br/leishmaniose-todas-informacoes/>>. Acesso em: 16 Set 2017.

CHARMANTRAY, F. et al. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 17, p. 1703-1724, 2001.

CHAUHAN, N.; SHARAN VIDYARTHI A.; PODDAR R. Pharmacophore Modeling and 3D-QSAR Study of Acridine Derivatives for the Development of Better Antileishmanial Agents. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v.2, n.11, p. 6254-6261, 2013.

CHOLEWIŃSKI, Grzegorz; DZIERZBICKA, Krystyna; KOŁODZIEJCZYK, Aleksander M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 2, p. 305-336, 2011.

CHILIN, A.; MARZARO, G.; MARZANO, C.; DALLA VIA, L.; FERLIN, M. G.; PASTORINI, G.; GUIOTTO, A. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine

analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. **Bioorganic& Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 523-529, 2009.

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

CONCEIÇÃO, Jacilara Alexandrino. O papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmaniabraziliensis*—BA. 2015.

COOMBS, Graham H. et al. Changes in hepatic xenobiotic-metabolising enzymes in mouse liver following infection with *Leishmaniadonovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 41, n. 1, p. 17-24, 1990.

GONZÁLEZ, Rosario Díaz et al. Structural insights on the small subunit of DNA topoisomerase I from the unicellular parasite *Leishmaniadonovani*. **Biochimie**, v. 89, n. 12, p. 1517-1527, 2007.

CORTÁZAR, Tania M.; COOMBS, Graham H.; WALKER, John. *Leishmaniapanamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 4, p. 475-482, 2007.

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, Simon L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Tropical medicine & international health**, v. 6, n. 11, p. 899-905, 2001.

DAS, BenuBrata et al. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 221, 2006.

DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DELMAS, Florence et al. Synthesis and antileishmanial activity of (1, 3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 685-690, 2004.

DENNY, William A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655-1665, 2002.

DE SOUSA, Jacira MA et al. Characterization of *Leishmaniachagasi* DNA topoisomerase II: a potential chemotherapeutic target. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 35, n. 11-12, p. 826-829, 2003.

DE VITA, Daniela et al. In vitro screening of 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-phenylethanol derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on *Trypanosoma cruzi* CYP51. **European journal of medicinal chemistry**, v. 113, p. 28-33, 2016.

DI GIORGIO, Carole et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3, 6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277-1284, 2007.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

DUARTE, Mariana Costa et al. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against Leishmania species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 217, p. 81-88, 2016.

ESCOBAR, Patricia et al. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH 3 (edelfosine) and amphotericin B. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

E SILVA, Simone Carolina Soares Petri et al. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against Leishmania (Leishmania) infantum promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental parasitology**, v. 163, p. 68-75, 2016.

EMAMI, Saeed; TAVANGAR, Pegah; KEIGHOBADI, Masoud. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 241-259, 2017.

FANG, L. et al. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 4, p. 713-716, 2008.

FEASEY, Nick et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, p. ldp046, 2009.

FERNANDES, Ítalo A. et al. Synthesis and biological evaluation of novel piperidine-benzodioxole derivatives designed as potential leishmanicidal drug candidates. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 16, p. 3346-3349, 2015.

FERREIRA, Sabrina B. et al. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 1388-1395, 2007.

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

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GAMAGE, S. A.; et al. Structure-activity relationships for the antileishmanial and antitrypanosomal activities of 1'-substituted 9-anilinoacridines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 16, p. 2634-2642, 1997.

GAO, Chunmei et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800-1807, 2015.

GIRAULT, S. et al. Antimalarial, Antitrypanosomal, and Antileishmanial Activities and Cytotoxicity of Bis (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the Linker#. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.

GOLVEIA, Rawny Galdino. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual da Paraíba. Paraíba, 2016.

GOMES, Regis; OLIVEIRA, Fabiano. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 110, 2012.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 36, p. 857-872, 1995.

GUETZOYAN, L.; YU, X. M.; RAMIANDRASOA, F.; PETHE, S.; ROGIER, C.; PRADINES, B.; CRESTEILC, T.; PERRÉE-FAUVETA, M.; MAHY, J. P.

Antimalarial acridines: Synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hematin. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 23, p. 8032-8039, 2009.

GUIDO, Rafael VC; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HEFNAWY, Aya et al. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends in Parasitology**, 2016.

GILBERT, Ian; LEROY, Didier; A FREARSON, Julie. Finding new hits in neglected disease projects: target or phenotypic based screening?. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1284-1291, 2011.

HOTEZ, Peter J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

JANOVEC, L. et al. Cytotoxic 3, 6-bis((imidazolidinone) imino) acridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1790-1801, 2011.

JULIEN, Chiron et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5560-5568, 2005.

KHADEM VATAN, Shahram et al. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 208-216, 2013.

- KUMAR, Ashok et al. Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 24, p. 6996-6999, 2009.
- LAGE, Hermann. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 3, p. 188-199, 2003.
- LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 21, 4170–4177. 2013.
- LAFAYETTE, Elizabeth Almeida et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035-15050, 2013.
- LOISEAU, Philippe M.; BORIES, Christian. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 6, n. 5, p. 539-550, 2006.
- LI, B.; GAO, C-M.; SUN, Q-S.; LI, L-L.; TAN, C-Y.; LIU, H-L.; JIANG, Y-Y. Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I Inhibitors. Chinese **Chemical Letters**. 25, 1021–1024. 2014.
- LIU, Qiang et al. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono-or bis-acridine moieties. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5302-5308, 2010.
- MCCONKEY, Brendan J.; SOBOLEV, Vladimir; EDELMAN, Marvin. The performance of current methods in ligand–protein docking. **Current Science**, p. 845-856, 2002.
- MAJUMDER, Hemanta K. Topoisomerases. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, v.1, n. 2, p. 78-79, 2013.
- MARCHAND, Pascal et al. Synthesis, antileishmanial activity and cytotoxicity of 2, 3-diaryl- and 2, 3, 8-trisubstituted imidazo [1, 2-a] pyrazines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 103, p. 381-395, 2015.
- MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2016.
- MARRAPU, Vijay K. et al. Design and synthesis of novel tetrahydronaphthyl azoles and related cyclohexyl azoles as antileishmanial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 5, p. 1407-1410, 2011.
- MASOOD, Mir Mohammad et al. Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 9, p. 1886-1891, 2017.

MAYRINK, Wilson et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14-21, 2006.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quartely Journal of Medicine**. doi:10.1093/qjmed/hct116. v.107: p. 7–14. 2014.

MESSARITAKIS, Ippokratis et al. Drug resistance in natural isolates of *Leishmaniadonovanis* promastigotes is dependent of Pgp170 expression. **PloSone**, v. 8, n. 6, p. e65467, 2013.

MONTE-NETO, R. L. **Atividade leishmanicida de derivados vegetais sobre formas promastigotas de *Leishmaniachagasi***. 2004. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Paraíba. 2004. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. João Pessoa – PB. Brasil. 2004.

MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAGLE, A.S et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NEVES, Leandro Ourives et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-101, 2011.

OLSZEWSKA, P.; MIKICIUK-OLASIK, E.; BŁASZCZAK-SWIATKIEWICZ, K.; SZYMANSKI, J.; SZYMANSKI, P. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 68, 959–967. 2014.

PANDEY, Rajan Kumar et al. High-throughput virtual screening and quantum mechanics approach to develop imipramine analogues as leads against trypanothione reductase of leishmania. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 141-152, 2016.

PASSALACQUA, Thais Gaban et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 16, p. 3342-3345, 2015.

PATEL, B. B.; PATEL, R. G.; PATEL, M. P. Synthesis and studies of the biological activity of novel pyrimido fused acridine derivatives. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 71, n. 10, p. 1015-1023, 2006.

PONTE-SUCRE, Alicia. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 2, n. 1, p. 14, 2003.

PRAJAPATI, Sita Prasad et al. Synthesis, characterization and antimalarial evaluation of new β -benzoylstyrene derivatives of acridine. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; Tempone, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RODRIGUES, K. A. F et al. Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

RODRIGUES, Raquel F. et al. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1760-1766, 2012.

ROMERO, Angel H.; LÓPEZ, Simón E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected Trypanosoma cruzi and Leishmania enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 76, p. 313-329, 2017.

SAMANTA, Timir B. et al. Mechanism of impairment of cytochrome P450-dependent metabolism in hamster liver during leishmaniasis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 1, p. 75-79, 2003.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D.. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: The effect of N-and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SANTA-RITA, Ricardo M. et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against Leishmania amazonensis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 704-710, 2004.

SANTOS, S. S. **Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural**. 2012. 200p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Chapter Four-Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 115, p. 287-353, 2015.

SERAFIM, Vanessa de Lima. **Síntese e avaliação anti-leishmaniade novos derivados híbridos tiofênicos-acridínicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular)- Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2016.

SINGH, Sarman; SIVAKUMAR, Ramu. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SHOKRI, Azar et al. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. **Acta tropica**, v. 167, p. 73-78, 2017.

SONDHI, Sham M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555-563, 2010.

SOARES-BEZERRA, Rômulo José; LEON, Leonor; GENESTRA, Marcelo. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SILVA, Alessandra Ferreira da. **Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Vale do Ribeira**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia.

SUNDAR, Shyam et al. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S26-S33, 2006.

TAHGHIGHI, Azar et al. Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-amines containing N-[(1-benzyl-1H-1, 2, 3-triazol-4-yl) methyl] moieties. **European journal of medicinal chemistry**, v. 50, p. 124-128, 2012.

TAHGHIGHI, Azar et al. QSAR and docking studies on the (5-nitroheteroaryl-1, 3, 4-thiadiazole-2-yl) piperazinyl analogs with antileishmanial activity. **Journal of Chemometrics**, v. 30, n. 5, p. 284-293, 2016.

TAVARES, L. C. QSAR: A Abordagem de Hansch. **Quimica Nova**, Vol. 27, No. 4, 631-639, 2004.

TOMAR, V.; BHATTACHARJEE, G.; RAJAKUMAR, S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, K. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 2, p. 745- 751, 2010.

TIUMAN, Tatiana S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

VENKATESAN, Santhosh Kannan; SHUKLA, Anil Kumar; DUBEY, Vikash Kumar. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 13, p. 2463-2475, 2010.

VERMELHO, Alane B. et al. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, n.1, p.1543-1555, 2017.

WALKER, John; SARAVIA, Nancy G. Inhibition of Leishmaniadonovani promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1155-1162, 2004.

WARFIELD, Jasmine; SETZER, William N.; OGUNGBE, Ifedayo Victor. Interactions of antiparasitic sterols with sterol 14 α -demethylase (CYP51) of human pathogens. **Springer Plus**, v. 3, n. 1, p. 679, 2014.

WERBOVETZ, K. A.; LEHNERT, E. K.; MACDONALD, T. L.; PEARSON, R. D. Cytotoxicity of acridine compounds for Leishmania promastigotes *in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 495-497, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015 a. **Diseases covered by NTD Department**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 05 jun 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015 b. **Diseases covered by NTD Department**. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_VL_2015_rev.png/>. Acesso em: 16 Set 2017

WHO. World Health Organization. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf?ua=1>. Acessado em 04 de jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 01 jul 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017 a, **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 02 ago 2017.

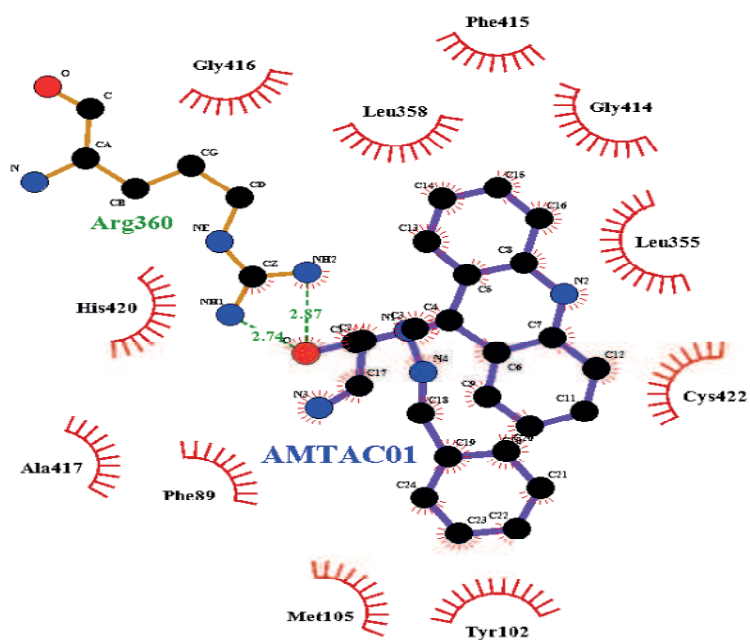
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017 b, **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>>. Acesso em: 16 Set 2017.

ZHANG, B.; LI, X.; LI, B.; GAO, C.; JIANG, Y. Acridine and its derivatives: a patent review (2009–2013). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 6, p. 647-664, 2014.

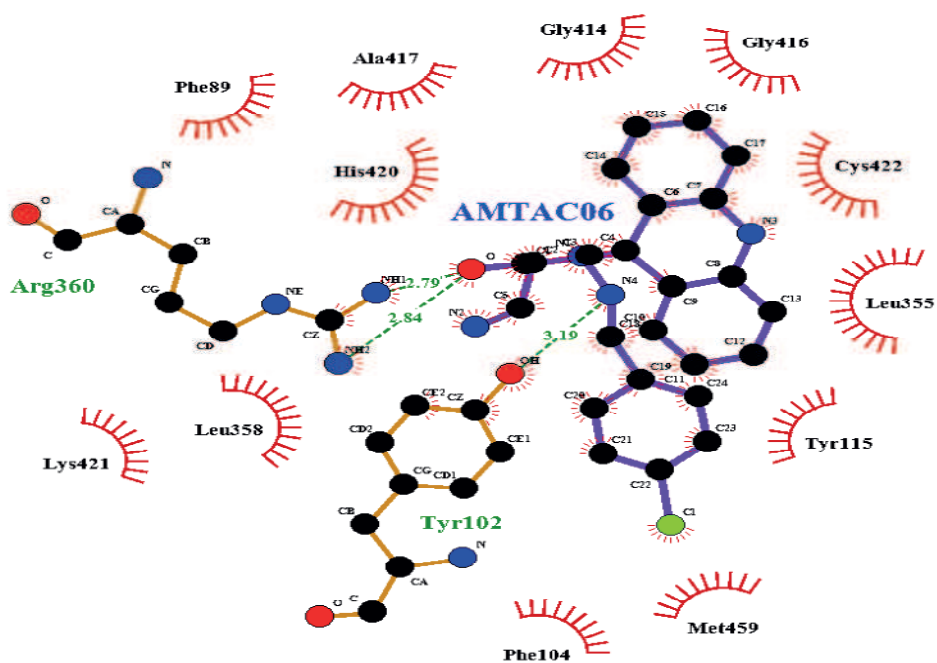
ZHAO, J.; LI, W.; MA, R.; CHEN, S.; REN, S.; JIANG, T. Design, Synthesis and DNA Interaction Study of New Potential DNA Bis-Intercalators Based on Glucuronic Acid. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p.16851-16865, 2013.

APÊNDICE

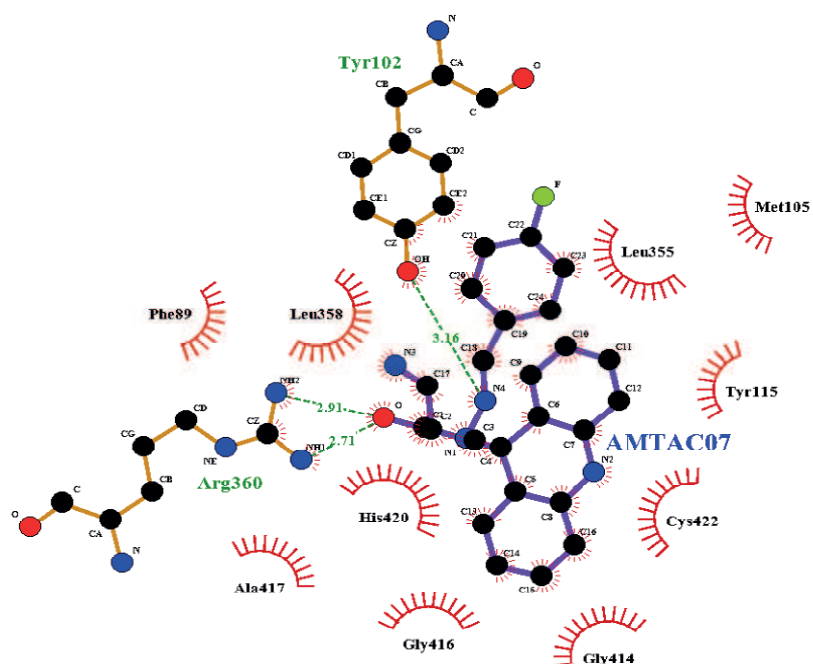
APÊNDICE 1- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 01 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



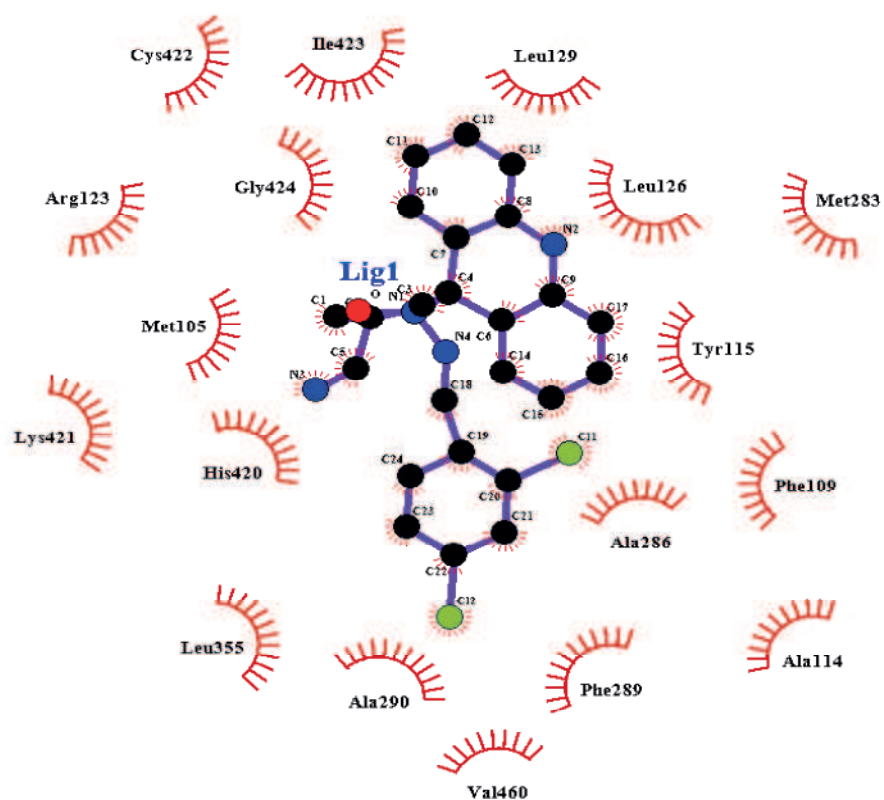
APÊNDICE 2- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 06 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



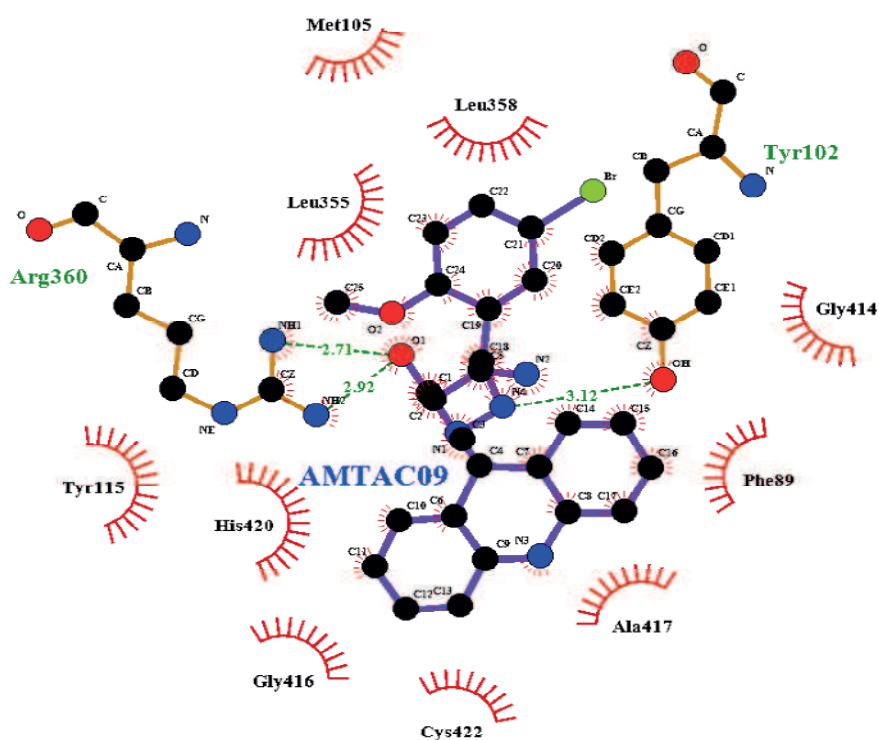
APÊNDICE 3- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 07 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



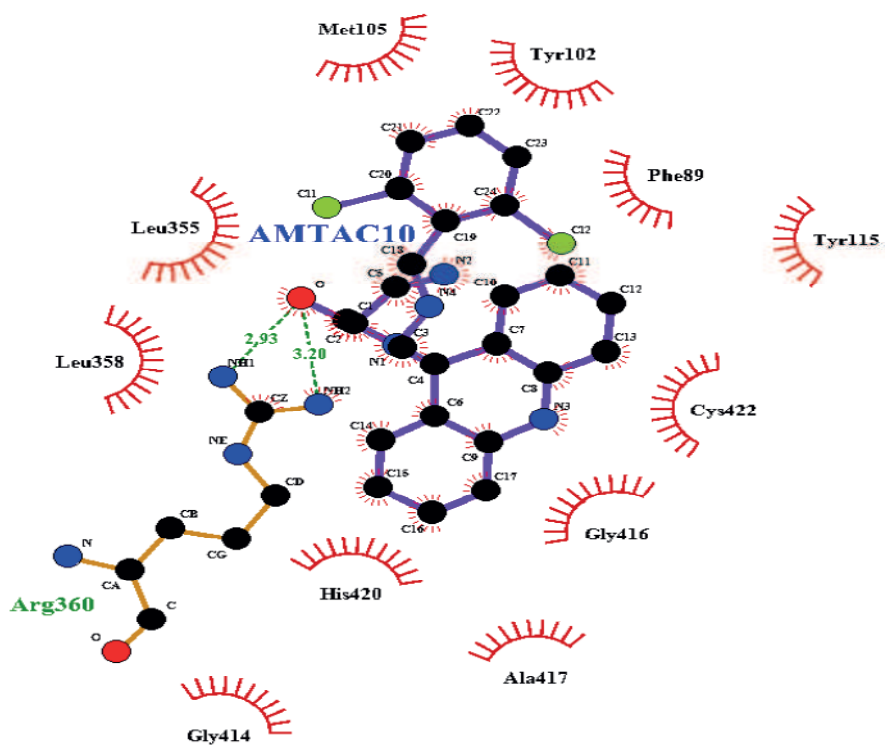
APÊNDICE 4- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 08 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



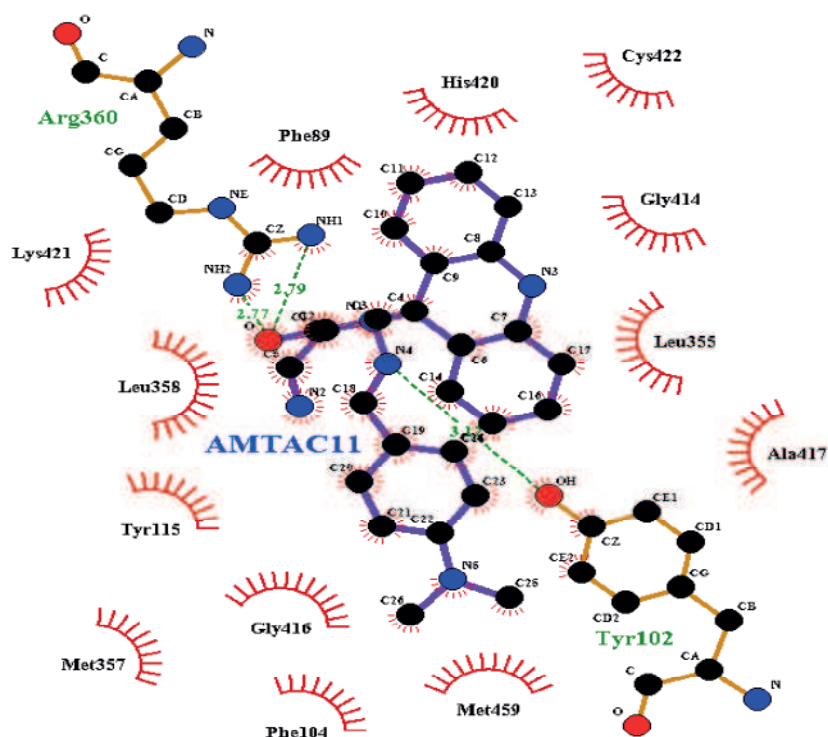
APÊNDICE 5- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 09 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



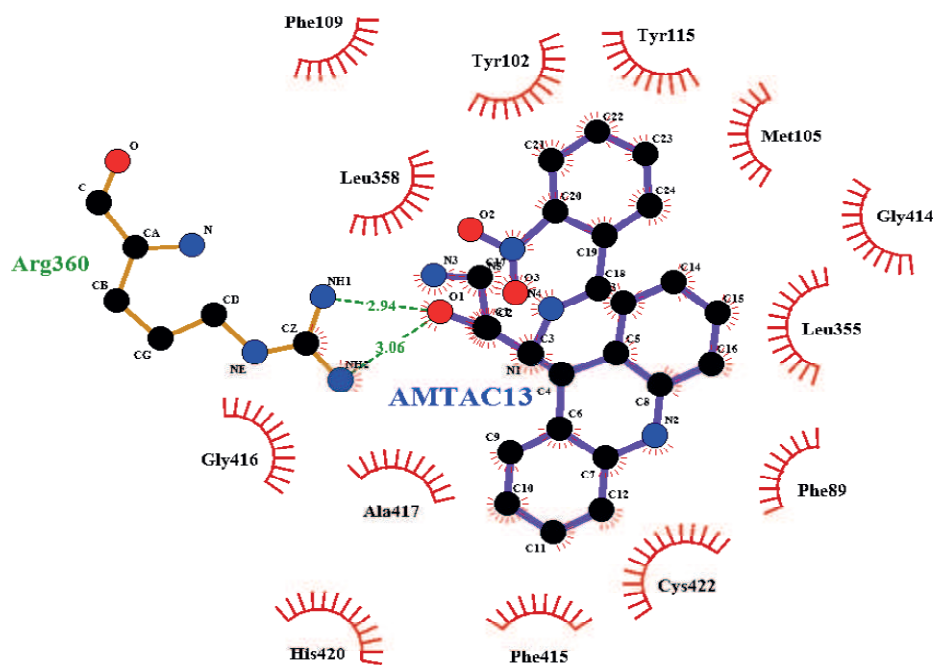
APÊNDICE 6- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 10 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



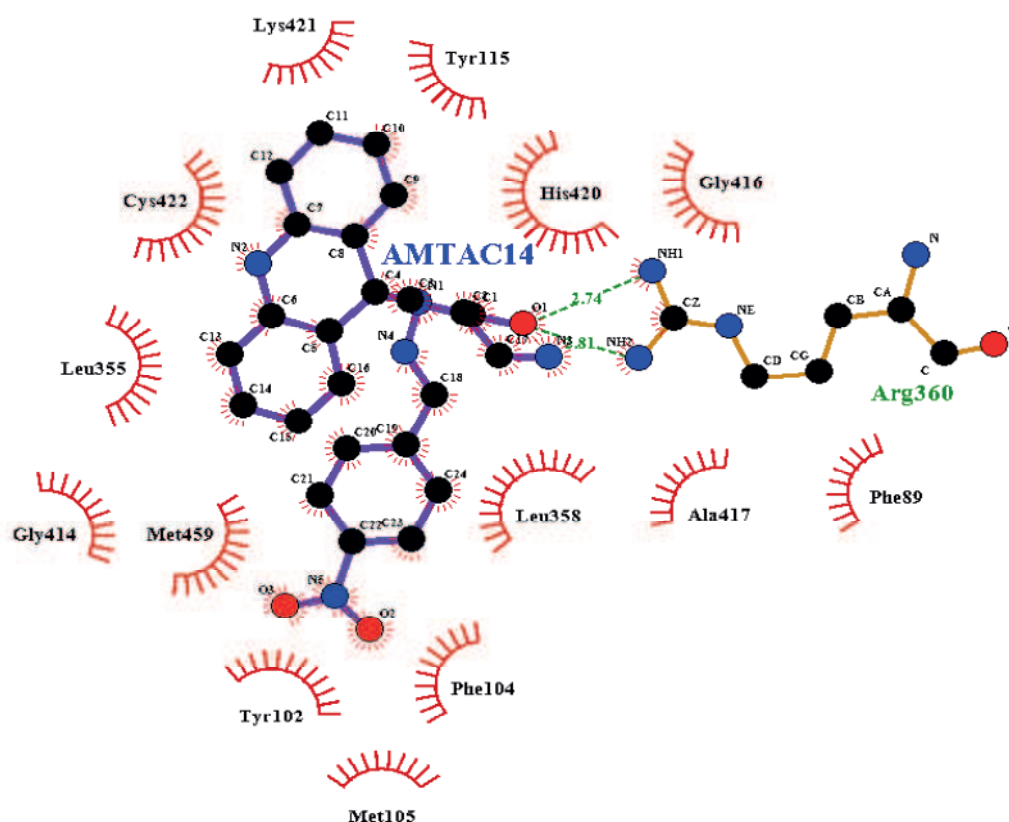
APÊNDICE 7- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 11 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



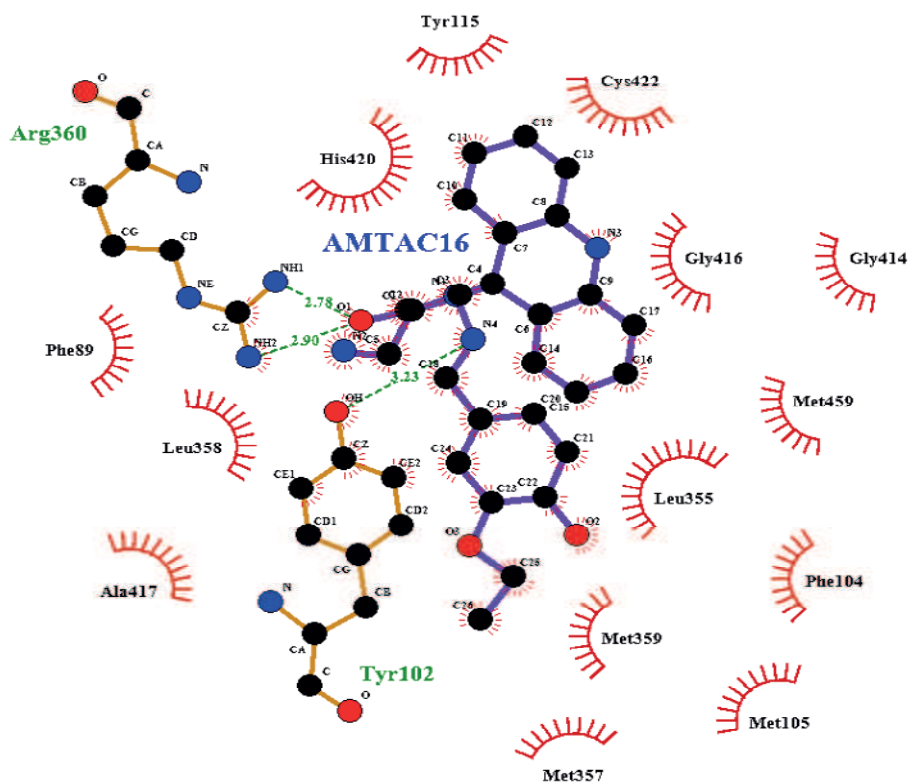
APÊNDICE 8- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 13 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



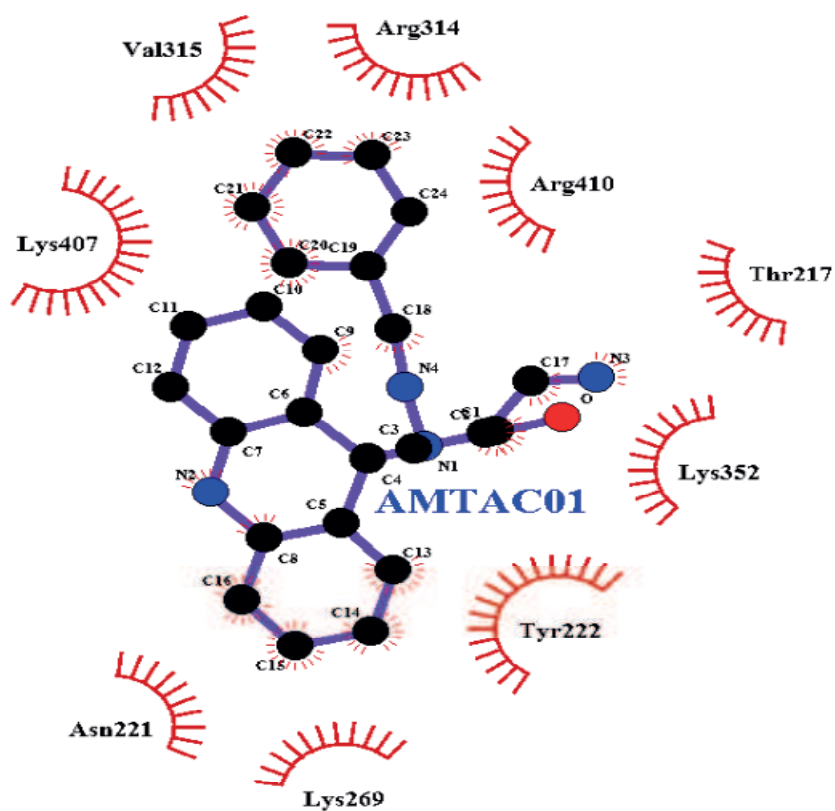
APÊNDICE 9- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 14 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



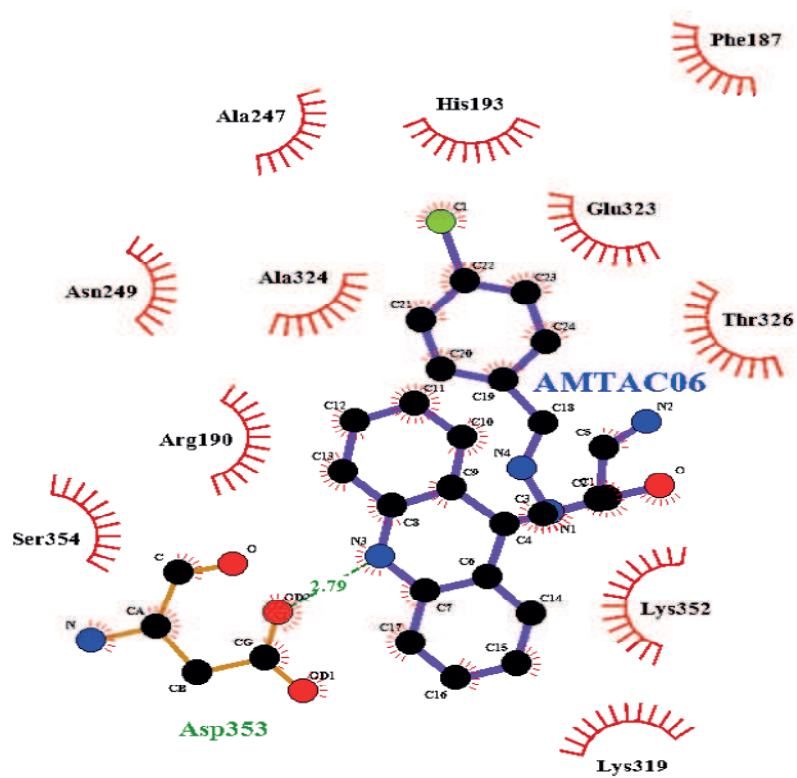
APÊNDICE 10- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 16 E ESTEROL 14-ALFA DIMETILASE



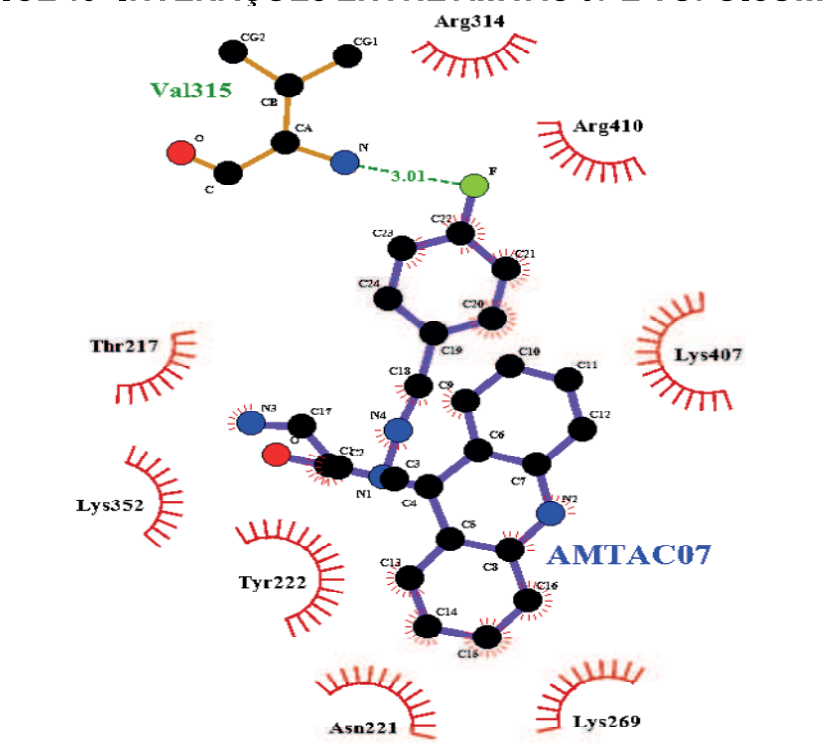
APÊNDICE 11- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 01 E TOPOISOMERASE 1



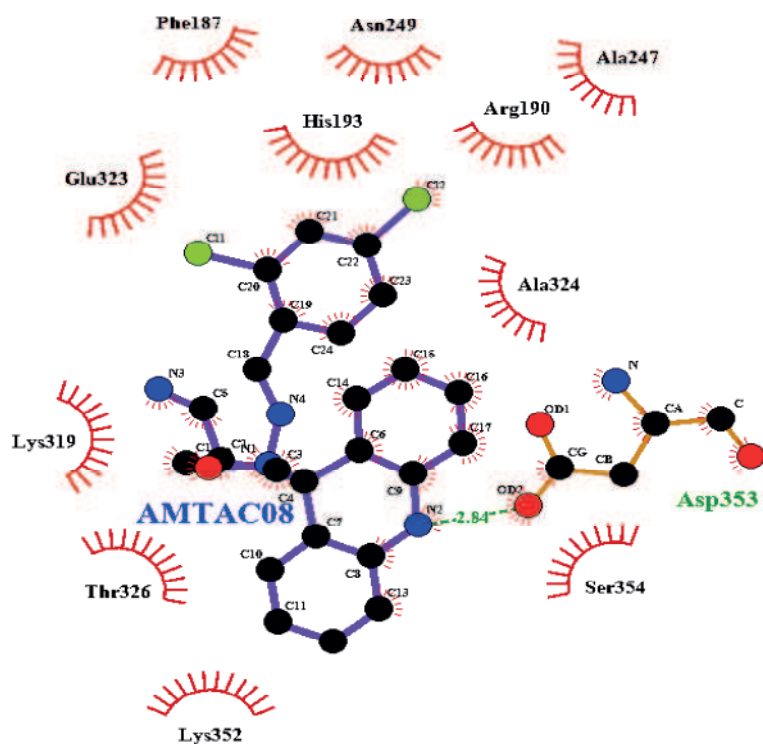
APÊNDICE 12- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 06 E TOPOISOMERASE 1



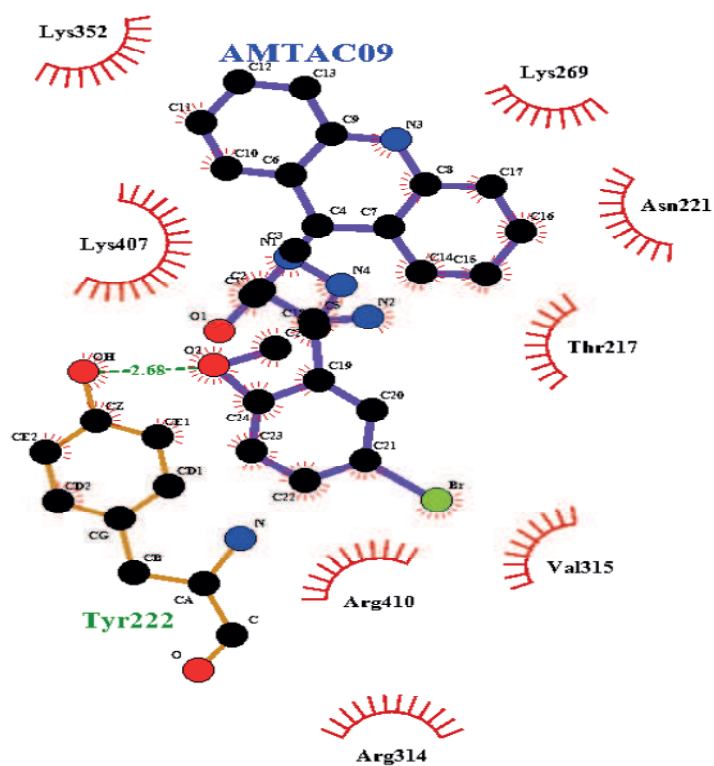
APÊNDICE 13- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 07 E TOPOISOMERASE 1



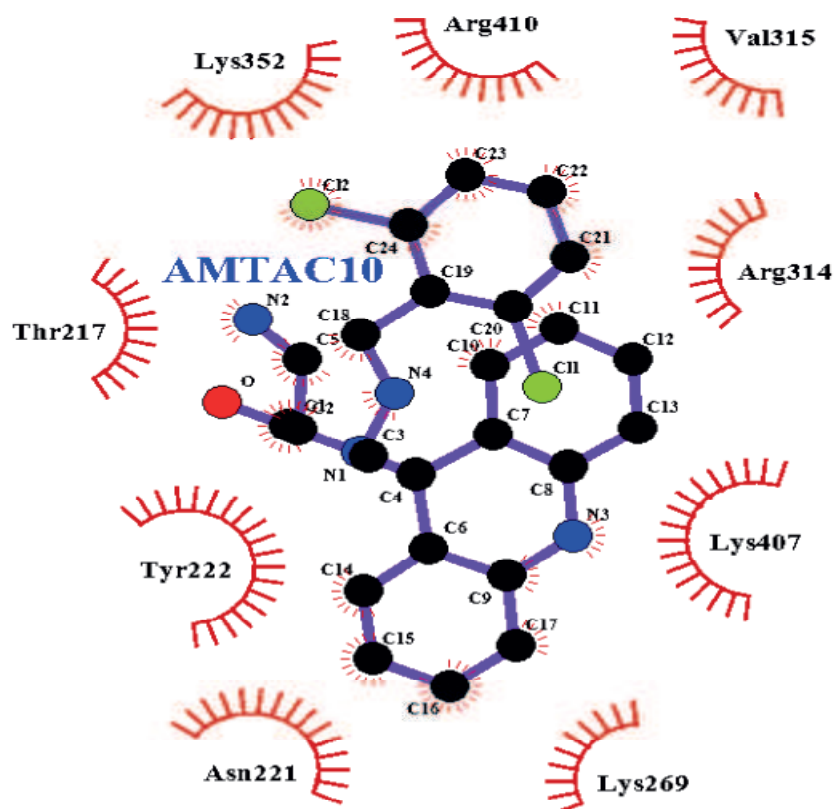
APÊNDICE 14- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 08 E TOPOISOMERASE 1



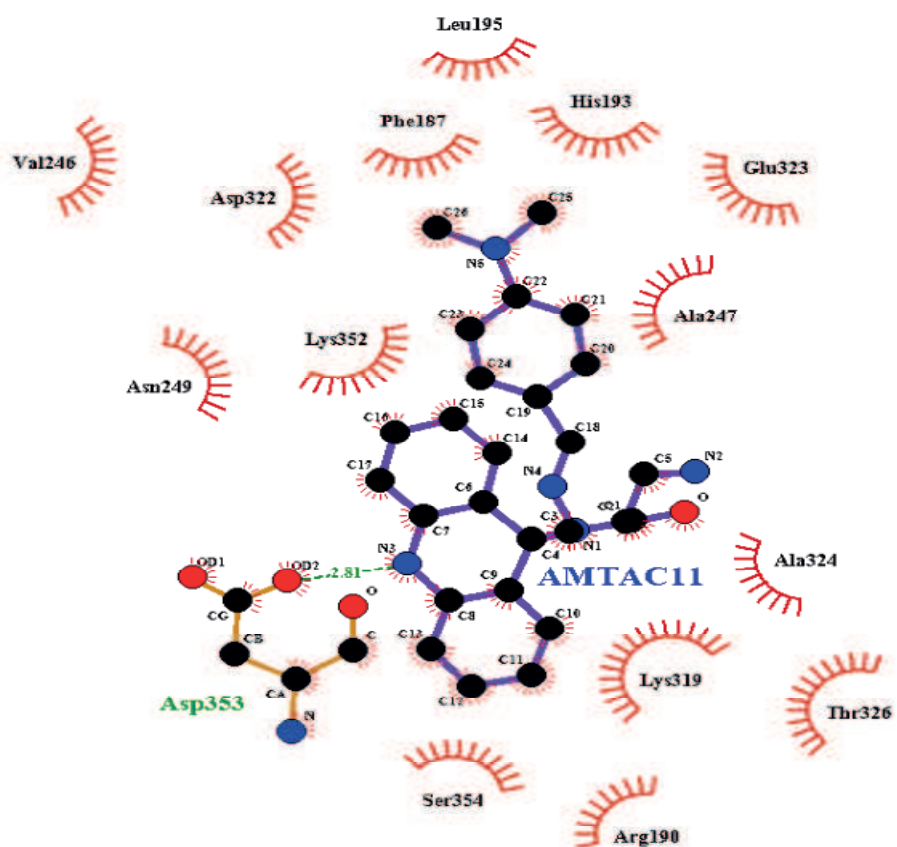
APÊNDICE 15- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 09 E TOPOISOMERASE 1



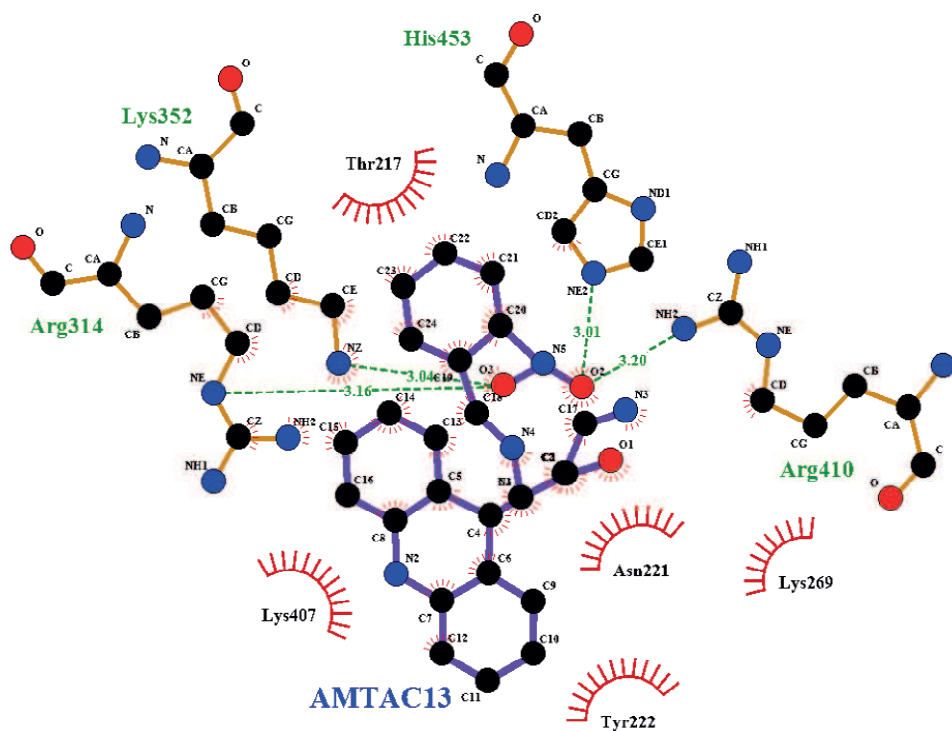
APÊNDICE 16- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 10 E TOPOISOMERASE 1



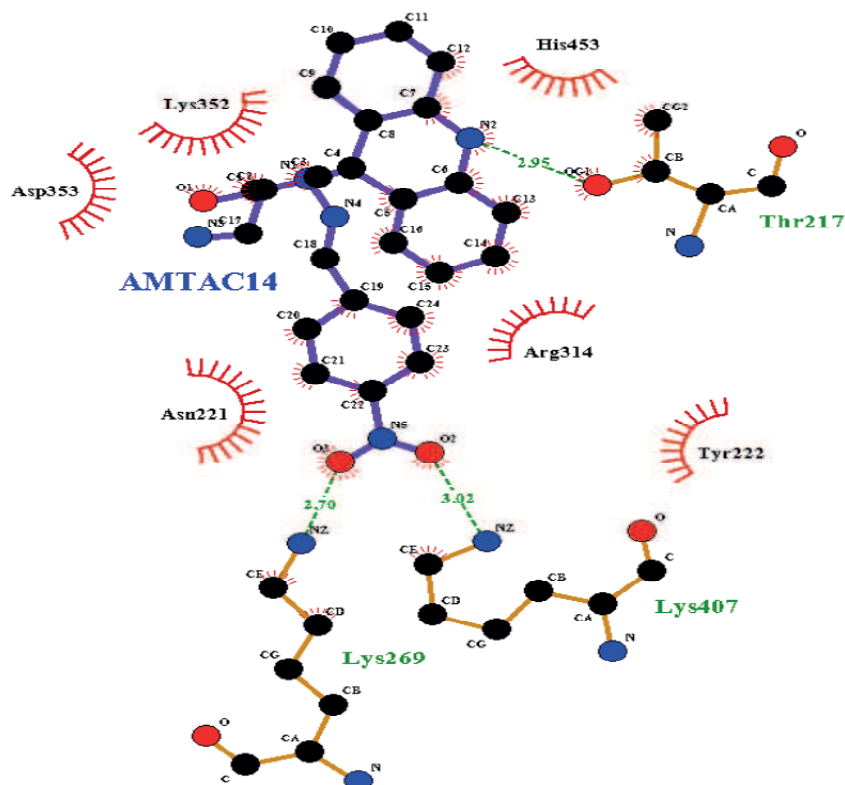
APÊNDICE 17- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 11 E TOPOISOMERASE 1



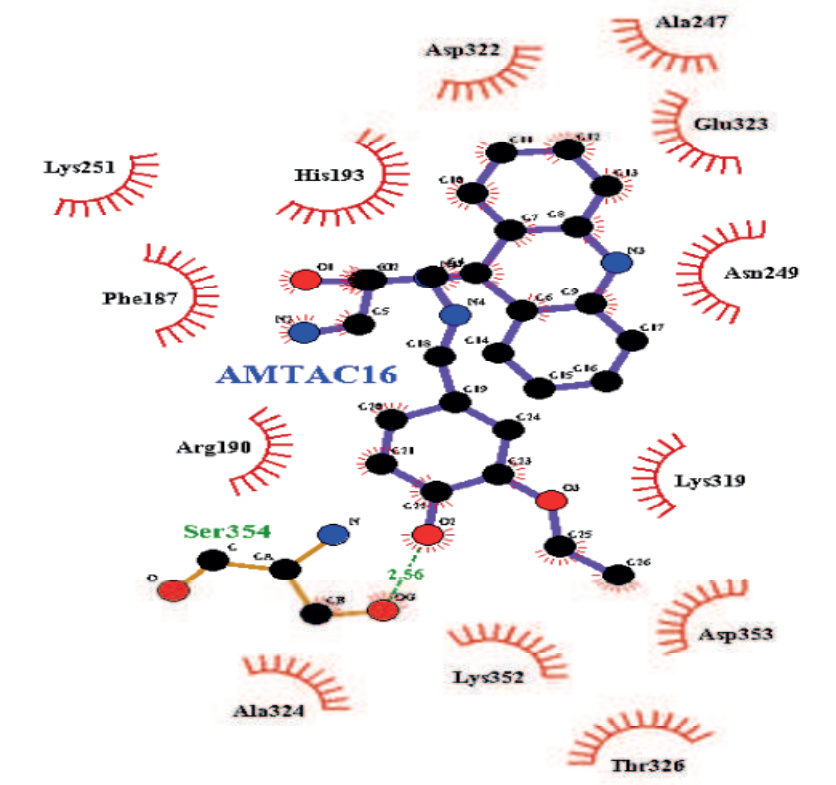
APÊNDICE 18- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 13 E TOPOISOMERASE 1



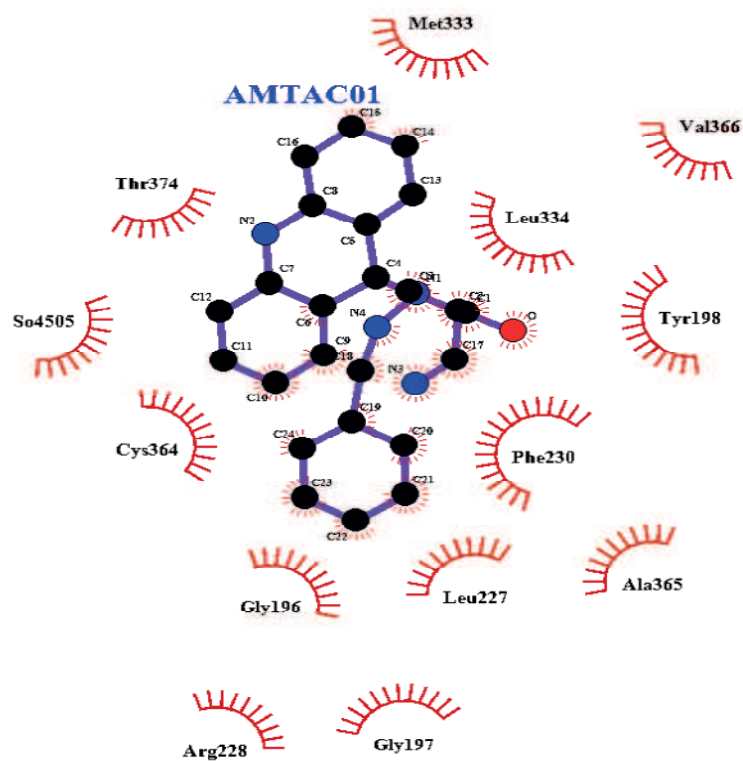
APÊNDICE 19- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 14 E TOPOISOMERASE 1



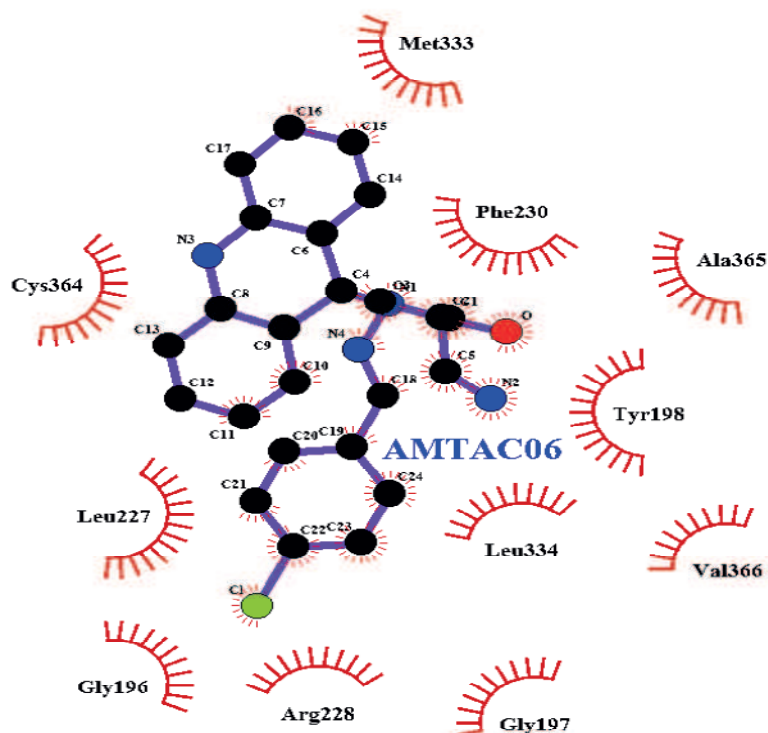
APÊNDICE 20- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 16 E TOPOISOMERASE 1



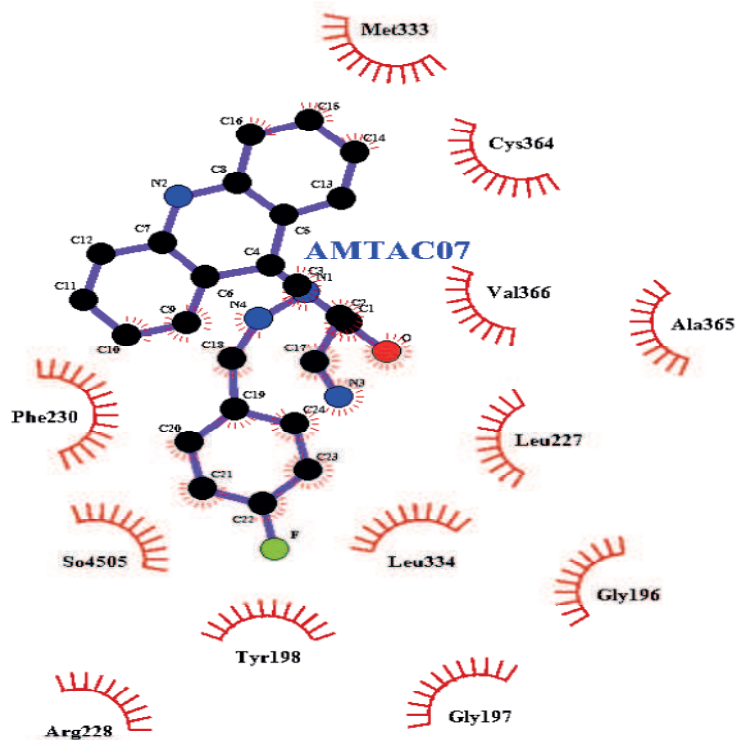
APÊNDICE 21- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 01 E TRIPANOTIONA REDUTASE



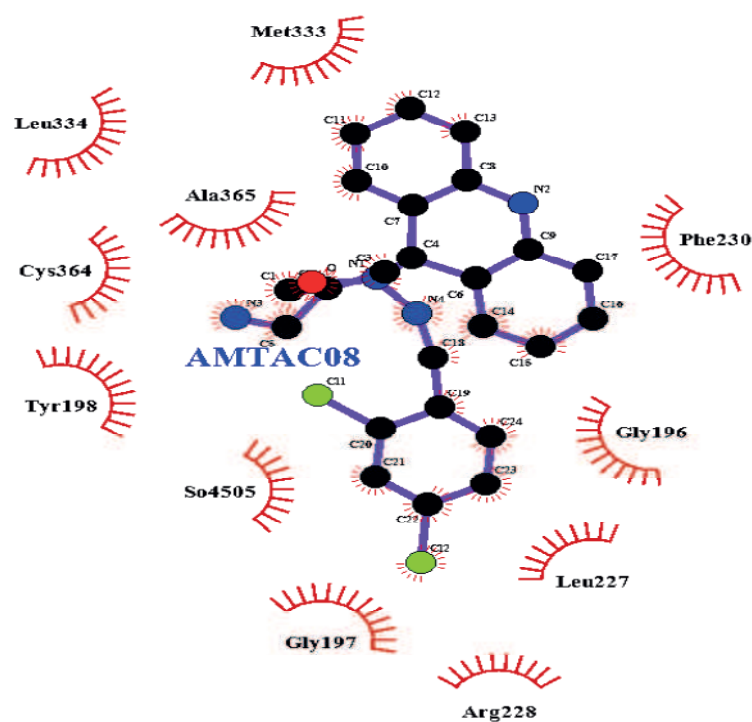
APÊNDICE 22- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 06 E TRIPANOTIONA REDUTASE



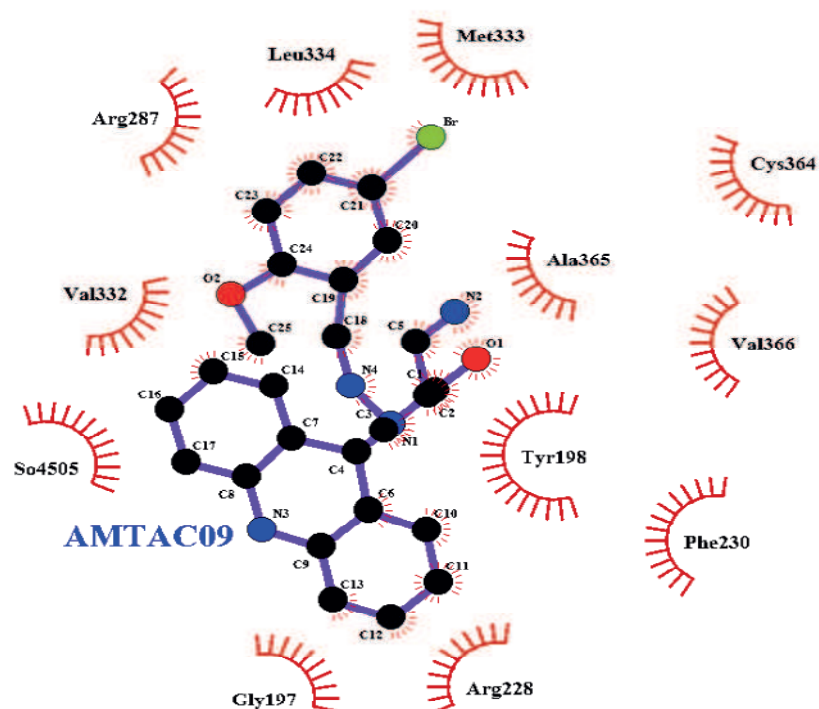
APÊNDICE 23- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 07 E TRIPANOTIONA REDUTASE



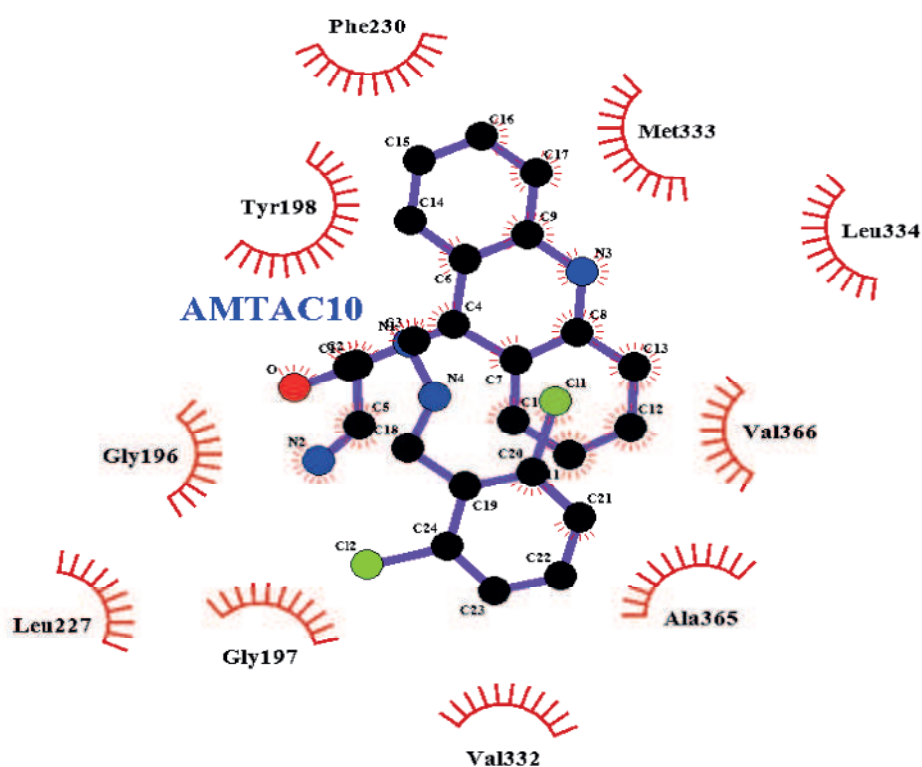
APÊNDICE 24- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 08 E TRIPANOTIONA REDUTASE



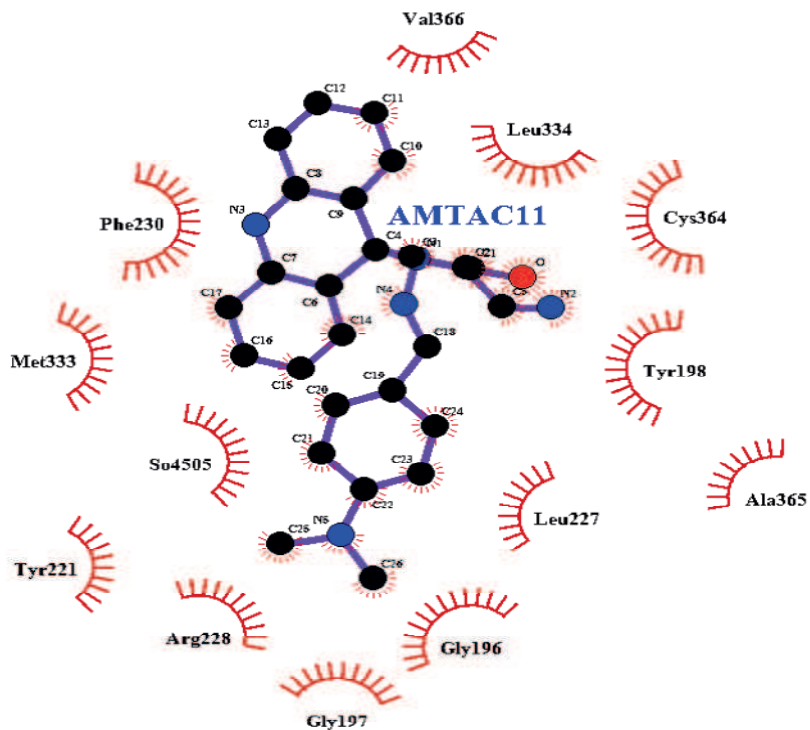
APÊNDICE 25- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 09 E TRIPANOTIONA REDUTASE



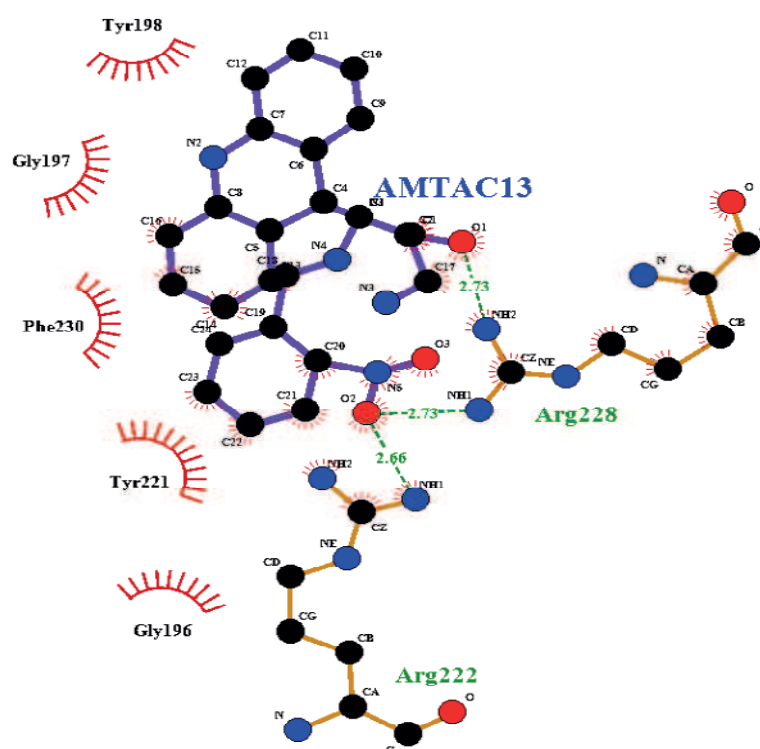
APÊNDICE 26- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 10 E TRIPANOTIONA REDUTASE



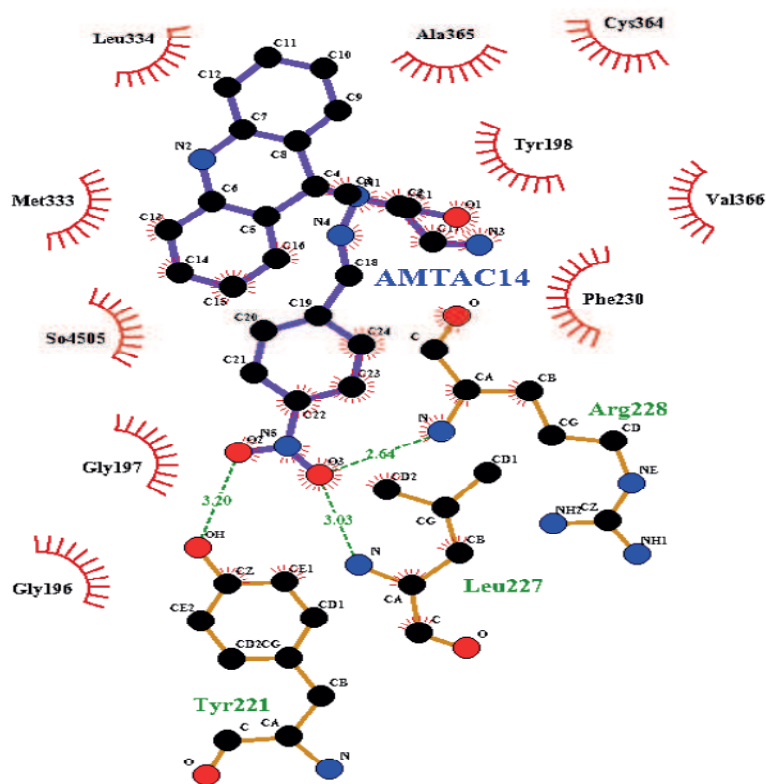
APÊNDICE 27- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 11 E TRIPANOTIONA REDUTASE



APÊNDICE 28- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 13 E TRIPANOTIONA REDUTASE



APÊNDICE 29- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 14 E TRIPANOTIONA REDUTASE



APÊNDICE 30- INTERAÇÕES ENTRE AMTAC 16 E TRIPANOTONA REDUTASE

