

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas - CCB
Departamento de Microbiologia e Parasitologia - MIP
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

DANIELA GASPAR DA SILVA

**Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares
de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de
chalconas**

FLORIANÓPOLIS
2008

DANIELA GASPAR DA SILVA

**Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares
de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de
chalconas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

**FLORIANÓPOLIS
2008**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia, coordenado pelo Professor Dr. Mário Steindel (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Dedico este trabalho ao meu companheiro Michel, pelo amor, amizade, apoio e pelos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em todas as suas formas;

A meus pais, pelo amor, apoio e confiança;

Ao meu orientador, Dr. Mário Steindel pela confiança, orientação e exemplo;

A Michel, pelo amor acima de tudo;

À grande família Grando, amigos sempre presentes. Obrigada pelo carinho e apoio;

Aos professores do MIP pela convivência agradável;

À amiga Iriane pelos ensinamentos, trabalho em conjunto e correções da dissertação, desejo tudo de bom no teu caminho!

À colega de mestrado e amiga Pati, pela companhia, desabafos e pegações de pé ;);

À amiga Ize, pelas *Leishmanias* e bafões compartilhados;

Às amigas Lari, Thaís, Maísa, Cacá e Elisa P. pela amizade e companheirismo;

Às pupilas Carol, Elisa e Mariana, pela ajuda nos experimentos e nas intermináveis contagens de amastigotas;

Aos colegas do LIA e LVA pela constante troca de informações e materiais;

À Carla Frohner pelo trabalho em colaboração;

Aos Doutores Ricardo Nunes e Valdir Cechinel Filho pelo fornecimento das Chalconas;

Ao Doutor Renato A. Mortara, pelo fornecimento do anticorpo Mab1B10;

Ao Doutor Kwang-Poo Chang pelos longos e-mails sobre a infecção das células;

Ao Dr. Kevin Tyler pelo incentivo inicial;

Aos funcionários do Departamento e pessoal da limpeza;

Enfim, a todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

Daniela
Florianópolis, 2008.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

[Albert Einstein]

RESUMO

Neste estudo, padronizamos a obtenção de amastigotas axênicos e a infecção da linhagem celular J774.A1 com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis in vitro* e seu uso na avaliação da atividade leishmanicida de 34 chalconas naturais e sintéticas substituídas. Amastigotas axênicos foram obtidos a partir do cultivo de formas promastigotas durante 72 horas a 34°C em meio Schneider com 20% SBF em pH 5,5 e 6,3 para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente. A infecção da linhagem J774.A1 com amastigotas axênicos foi padronizada a 34°C. Para os bioensaios envolvendo chalconas, 180µl da suspensão de promastigotas (5×10^6 /ml), amastigotas axênicos (10^7 /ml) ou células da linhagem J774.A1 (2×10^5 /ml) foram incubados em microplacas de 96 orifícios por 48 horas a 26°C (promastigotas), 34°C (amastigotas axênicos) e 37°C (células), na presença de 20µl dos compostos em diferentes concentrações. Como controles foram utilizados DMSO 1% e Anfotericina B. A atividade leishmanicida e a citotoxicidade foram avaliadas pelo método do MTT. A avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares foi realizada utilizando-se culturas de J774.A1 infectadas com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em placas de 96 poços na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos por 48 horas. As monocamadas foram fixadas e coradas pelo Giemsa e a taxa de infecção e o número de amastigotas intracelulares determinados em 200 células escolhidas aleatoriamente. Todos os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata. A linhagem celular J774.A1 apresentou-se como um modelo adequado para avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos. Uma baixa correlação da atividade leishmanicida dos compostos testados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares e/ou axênicos foi observada. Doze das 34 chalconas apresentaram porcentagem de inibição (PI) superior a 30% em concentrações variando de 5 a 100µM. Os resultados obtidos neste estudo mostram que algumas chalconas substituídas podem se constituir em moléculas protótipos de interesse para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida; chalconas; amastigotas axênicos; *Leishmania braziliensis*; *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

In the present study we have optimized the differentiation of axenic amastigotes and intracellular amastigotes for *L. amazonensis* and *L. braziliensis* species *in vitro* and its use for the evaluation of leishmanicidal activity of 34 natural and synthetic chalcones. Axenic amastigotes were obtained by culturing promastigotes for 72 hours at 34°C in Schneider's medium 20% FCS, pH 5.5 and 6.3 for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively. The infection of J774.A1 cell line with axenic amastigotes was realized at 34°C. For the bioassays involving chalcones, 180µl of promastigotes suspension (5×10^6 /ml), axenic amastigotes (10^7 /ml) or J774.A1 cell line (2×10^5 /ml) were incubated in 96 well plates for 48 hours at 26°C (promastigotes), 34°C (amastigotes) and 37°C (cells), in the presence of 20µl of different concentrations of chalcones. DMSO 1% and Amphotericin B were used as controls. The leishmanicidal activity and cytotoxicity were evaluated by the MTT method. The *in vitro* evaluation of leishmanicidal activity against axenic amastigotes was realized by using J774.A1 cultures infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in 96 well plates in the presence of different chalcone dilutions for 48 hours. The monolayers were fixed and Giemsa stained, and the infection rate and intracellular amastigote numbers were determined in 200 randomly chosen cells. All assays were performed two times in triplicate. The J774.A1 cell line represented an adequate model for leishmanicidal activity evaluation *in vitro*. A low correlation between the leishmanicidal activity of the tested compounds against promastigotes and intracellular and/or axenic amastigotes was observed. Twelve out of the 34 chalcones presented inhibition percentage higher than 30% in concentrations ranging from 5 to 100µM. The results obtained in the present study showed that some substituted chalcones can be prototype molecules for the development of a new drug for leishmaniasis treatment.

Keywords: Leishmanicidal activity; chalcones; axenic amastigotes; intracellular amastigotes; *Leishmania braziliensis*; *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius
CC₅₀: Concentração citotóxica a 50%
CI₅₀: Concentração inibitória 50%
cm: Centímetro
CO₂: Dióxido de carbono
DMSO: Dimetilsulfóxido
HIV: vírus da imunodeficiência humana, do inglês *human infection virus*
IS: Índice de seletividade
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose visceral
mg: miligrama
ml: mililitro
mM: milimolar
μl: microlitro
μm: micrômetro
μM: micromolar
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide
nm: nanômetro
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: Tampão salina fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
PI: Porcentagem de inibição
SBF: Soro bovino fetal
U: unidade
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia das formas morfológicas mais comuns de <i>Leishmania</i> spp.	2
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	3
Figura 3: Diversidade de manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).	6
Figura 4: Estrutura básica de chalconas contendo substituintes.	16
Figura 5: Curvas de crescimento das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (cepa 575) e <i>L. braziliensis</i> (cepa 2904) cultivadas em 10ml de meio Schneider completo a 26°C em frasco de cultivo celular de 25cm ² .	30
Figura 6: Microscopia de interferência Nomarski mostrando amastigotas axênicos fixados com formaldeído 4%.	35
Figura 7: Correlação entre a concentração de amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i> e a absorvância a 540nm após incubação por 18 horas com 50µl de MTT na concentração 2mg/ml.	36
Figura 8: Morfologia de células da linhagem J774.A1 infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , cultivadas por 48 horas em diferentes temperaturas.	38
Figura 9: Células da linhagem J774.A1 infectadas com <i>Leishmania</i> coradas pelo Giemsa.	40
Figura 10: Resultados representativos da avaliação microscópica de células da linhagem J774.A1 infectadas com <i>L. amazonensis</i> coradas pelo Giemsa.	49
Figura 11: Resultados representativos da avaliação microscópica de células da linhagem J774.A1 infectadas com <i>L. braziliensis</i> coradas pelo Giemsa.	52

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR) **19**
- Quadro 2:** Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas das séries C e CL **21**
- Quadro 3:** Código, estrutura e peso molecular das chalconas naturais da série C0. **22**
- Quadro 4:** Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona **23**
- Quadro 5:** Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas derivadas da 2-naftilacetofenona. **24**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de parasitos, porcentagem de amastigotas e de parasitos viáveis após 72 horas de diferenciação de promastigotas de fase exponencial tardia de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i> em duas condições de pH, a partir de um inóculo de 50×10^6 parasitos/ml.	32
Tabela 2: Porcentagem de células infectadas e número médio de amastigotas por 100 células da linhagem J774.A1 infectadas com amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i> em diferentes tempos de cultivo pós infecção.	37
Tabela 3: Taxa média de infecção e número de amastigotas por célula da linhagem J774.A1 infectada com amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> .	41
Tabela 4: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade da 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR).	42
Tabela 5: Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> da 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR) contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .	44
Tabela 6: Citotoxicidade frente a linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade de chalconas das séries C, CL, C0.	46
Tabela 7: Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de chalconas das séries C, CL e C0 contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .	47
Tabela 8: Citotoxicidade frente a linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> contra formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> e índice de seletividade de chalconas das séries L e R.	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmania – o parasito	1
1.2. As Leishmanioses	3
1.2.1. Leishmaniose visceral (LV)	4
1.2.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	5
1.3. O tratamento da LTA	9
1.4. Pesquisa experimental	10
1.5. O cultivo de amastigotas axênicos	13
1.6. Infecção de linhagens celulares por espécies de <i>Leishmania</i>	14
1.7. Chalconas	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Chalconas substituídas	19
3.2. Cultivo de parasitos	24
3.3. Curvas de crescimento	25
3.4. Cultivo de promonócitos murinos da linhagem J774.A1	25
3.5. Estabilização do cultivo de amastigotas axênicos	25
3.6. Caracterização das formas arredondadas obtidas como amastigota- semelhantes	25
3.7. Reação de imunofluorescência indireta	26
3.8. Padronização da infecção dos promonócitos J774.A1 com amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	26

3.9. BIOENSAIOS	27
3.9.1. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas promastigotas	27
3.9.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas amastigotas axênicas	28
3.9.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares	28
3.9.4. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade celular pelo método do MTT	29
3.10. Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Cultivo das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	30
4.2. Obtenção das formas amastigotas axênicas	31
4.3. Caracterização das formas obtidas como tipo amastigota	34
4.4. Padronização do ensaio de MTT para avaliação da atividade antiparasitária de compostos em formas amastigotas axênicas	35
4.5. Infecção de células da linhagem J774.A1	37
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade e atividade leishmanicida de chalconas	41
4.6.1. Chalcona 4-metoxichalcona e seus derivados sulfonados	41
4.6.2. Chalconas C, CL e C0	46
4.6.3. Chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxi-acetofenona (Série L) e da 2-naftilacetofenona (série R)	50
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS	56
7. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* – o parasito

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos digenéticos da ordem kinetoplastida, família Trypanosomatidae (SHAW, 1994). Durante seu ciclo de vida, circulam entre dois hospedeiros distintos, insetos da ordem Diptera, família Psychodidae (flebotomíneo) e o hospedeiro mamífero. A sobrevivência em organismos tão diversos foi possibilitada pela evolução de formas parasitárias distintas, adaptadas às diferentes condições de vida encontradas em ambos hospedeiros (HANDMAN, 2000).

A forma flagelada promastigota (FIGURA 1A), encontrada no vetor flebotomíneo, reproduz-se extracelularmente no trato alimentar do inseto. Esta forma é cultivada *in vitro* em meios livres de células (axênicos) que mimetizam os nutrientes, o pH e a temperatura encontrados no trato digestivo do inseto (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

A forma encontrada no hospedeiro mamífero, amastigota (FIGURA 1B), tem origem no interior do vacúolo parasitóforo, a partir da diferenciação de formas promastigotas regurgitadas pelo vetor e fagocitadas pelos macrófagos. Estas formas não apresentam flagelo livre e são adaptadas à temperatura do organismo do mamífero e ao pH presente no vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam (CUNNINGHAM, 2002).

Uma vez dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem diversos mecanismos de defesa celular, que deveriam ser responsáveis por sua lise, tais como fusão fagossomo-endossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas. (CUNNINGHAM, 2002).

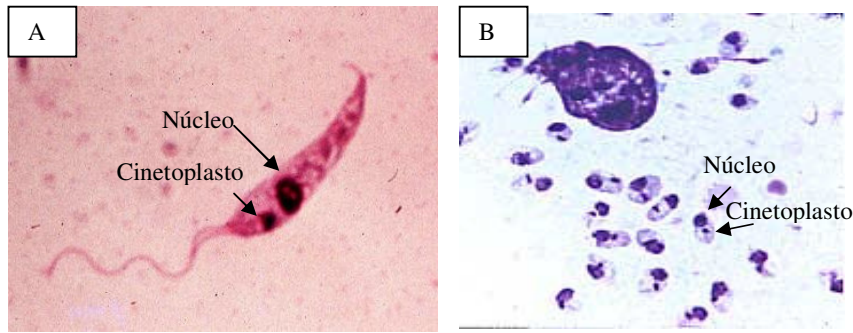


Figura 1: Micrografia das formas morfológicas mais comuns de *Leishmania* spp. (A) Promastigota; (B) Amastigotas. Fonte: (A) <<http://www.med.uni-marburg.de/stpg/ukm/lt/hygiene/schwarz/projects.html>>; (B) <<http://www.vet.upenn.edu/schoolresources/communications/publications/bellwether/48/foxhounds.html>>

A infecção por *Leishmania* spp. ocorre quando um flebotomíneo infectado pica o homem e regurgita as formas promastigotas metacíclicas sobre a pele lesionada. Estas formas são fagocitadas por macrófagos e, no interior do vacúolo parasitóforo, se diferenciam para formas amastigotas que ali multiplicam. Os amastigotas podem então ser liberados e infectar novos macrófagos, disseminando o parasito. Um flebotomíneo não infectado adquire o parasito ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, através da ingestão de amastigotas livres ou intramacrofágicos no tecido subcutâneo. As formas intracelulares são liberadas no trato digestivo do inseto, diferenciam-se para formas promastigotas procíclicas, multiplicando-se por divisão binária. Estas formas procíclicas diferenciam-se para formas infectivas metacíclicas e migram então para a probóscide do inseto, de onde poderão infectar um novo hospedeiro mamífero (FIGURA 2).

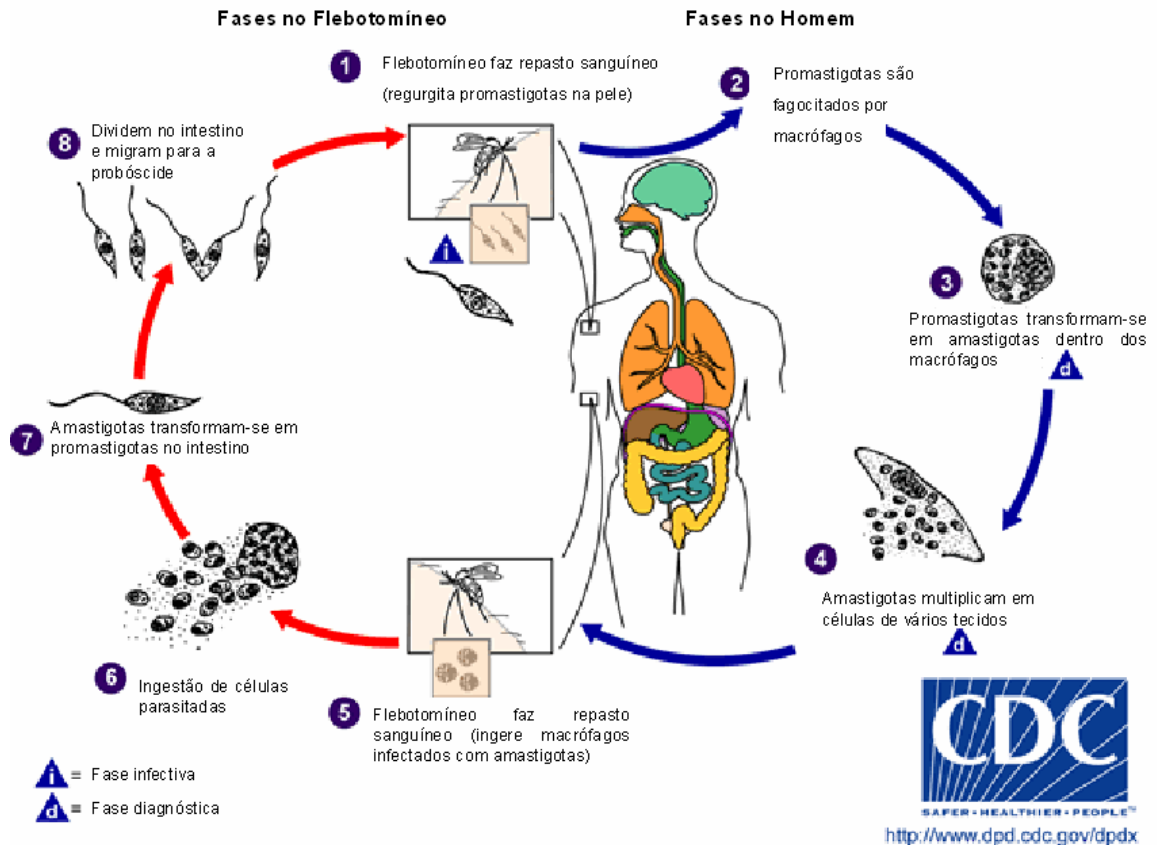


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: CDC.

1.2. As Leishmanioses

Mais de 12 milhões de pessoas em 88 países encontram-se sabidamente infectadas por parasitos do gênero *Leishmania* e estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam vivendo em áreas de risco, sendo recomendado o estabelecimento de intensivos esforços em pesquisa e controle (WHO, 1990).

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças com elevada variedade clínica e complexidade epidemiológica, envolvendo diferentes espécies de *Leishmania*, de vetores flebotomíneos e de hospedeiros reservatórios, em ciclos de transmissão zoonóticos e antroponóticos. São descritas aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* causadoras de doença, transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (CUNNINGHAM, 2002).

A contribuição do parasito no polimorfismo clínico das leishmanioses tem sido sugerida e sustentada há anos por estudos que demonstram correlação entre determinados genótipos de espécies e cepas de *Leishmania* e manifestações clínicas da doença (REITHINGER et al., 2007).

Os aspectos das leishmanioses variam ainda conforme região geográfica, provavelmente indicando interação entre propriedades dos parasitos locais, biologia dos vetores presentes na área e fatores da população. Com relação ao papel do hospedeiro; idade, estado nutricional, eficácia do sistema imune e co-infecções com HIV alteram significativamente as manifestações clínicas da doença (MURRAY et al., 2005).

A coinfeção *Leishmania*/HIV é considerada uma ameaça emergente em diversos países. O aumento no número de casos na última década é marcante, levando a mudanças na epidemiologia, apresentação e clínica das leishmanioses. O comprometimento do sistema imune do doente pode acarretar em manifestações clínicas em pacientes antes assintomáticos, assim como a evolução de casos complexos e de difícil tratamento, como a forma cutânea disseminada ou a visceralização de espécies tipicamente dermatrópicas (DESJEUX; ALVAR, 2003; CRUZ et al., 2006).

1.2.1. Leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais grave das leishmanioses. Os amastigotas residem em células do sistema retículo endotelial de vísceras, incluindo baço, fígado, linfonodos e intestino. A doença pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2-4 meses apresentar sintomas como febre baixa de desenvolvimento lento, prostração geral, anemia e protusão do abdome devido aumento do fígado e baço (MURRAY et al., 2005).

A LV é causada tipicamente por *L. donovani* no subcontinente Indiano, Ásia e África e por *L. infantum* (sinônimo para *L. chagasi*) na região do Mediterrâneo, Sudeste e região central da Ásia e América do Sul. Países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil respondem por 90% dos casos de LV do globo (DESJEUX, 2001; MURRAY et al., 2005). No Brasil, o calazar é documentado em Estados litorâneos do Pará ao Paraná e em Estados centrais como Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, não há registros de casos autóctones da LV (GENARO, 2003).

A mortalidade global da leishmaniose visceral é oficialmente de 59.000 casos ao ano, contudo este número é subestimado. Uma vez que a notificação da LV não é obrigatória e que o diagnóstico da doença muitas vezes não é corretamente realizado, dados oficiais ficam defasados (HOTEZ et al., 2004).

1.2.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença amplamente dispersa, que atinge principalmente indivíduos nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes (FIGURA 3). De modo geral, a maioria das infecções leishmanióticas permanece localizada na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, algumas espécies podem escapar para mucosas, múltiplos locais na pele ou para fígado, baço e linfonodos distantes. Os pontos de disseminação da doença variam principalmente, mas não exclusivamente, devido a diferentes

propriedades do parasito: sensibilidade a temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão e persistência (MURRAY et al., 2005).

Na leishmaniose cutânea, a infecção pode evoluir após o período de incubação de 1-12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente ulcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido (FIGURA 3A).

A leishmaniose mucosa (FIGURA 3B), manifestação mais severa da LTA, nunca cura espontaneamente e é de difícil tratamento. Pode ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias (HEPBURN, 2000).

A disseminação, de espécies como *L. braziliensis*, para as mucosas ocorre em 1-10% das infecções, após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas. Embora cerca de 90% dos pacientes com a forma mucosa apresentem uma cicatriz de lesão cutânea anterior, há alguns casos que coincidem com lesões ativas (MURRAY et al., 2005).

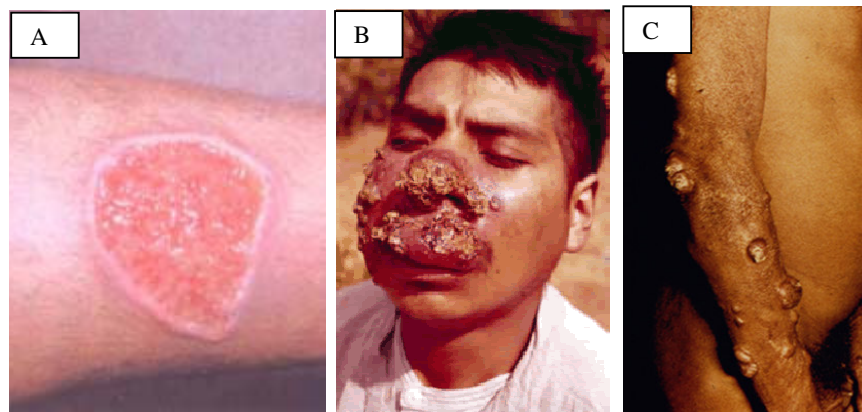


Figura 3: Diversidade de manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). (A) Lesão cutânea típica; (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa. Fontes: (A) <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/dermatologia/v11_n1/leishmaniasis.htm>; (B) <http://www.latinpharma.net/expo2004/documentos/burstein_p.html>; (C) <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>.

Outra manifestação da LTA, a leishmaniose cutânea difusa (FIGURA 3C), caracteriza-se por nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção e pode cobrir todo o corpo do paciente. Esta manifestação da doença é típica em pacientes com anergia do sistema imune, sendo comum em casos de co-infecção HIV-*Leishmania* (REITHINGER et al., 2007).

Embora o homem seja um hospedeiro acidental, infecções com *Leishmania* spp. são bastante comuns. Em áreas endêmicas, até 9% da população sadia pode responder positivamente para testes de hipersensibilidade tardia, indicativos de infecção anterior, por vezes assintomática (HEPBURN, 2000).

No Brasil, a LTA apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos de LTA têm sugerido mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas, sendo presente em todos os Estados do Brasil (Vigilância epidemiológica/MS, 2007).

A mudança ambiental resultante das atividades humanas tem modificado o perfil epidemiológico da doença, tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, como nas áreas onde a transmissão é peri-urbana e peridomiciliar, com possível envolvimento de reservatórios domésticos (COSTA, 2005).

Atualmente é possível observar a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, ocasionada pela manutenção de casos oriundos de focos antigos ou de áreas próximas a estes, e pelo surgimento de surtos epidêmicos. A ocorrência de tais surtos tem sido associada a fatores decorrentes de atividades econômicas, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, e condições ambientais altamente favoráveis para o desenvolvimento do vetor e transmissão da doença (Vigilância epidemiológica/MS, 2007).

Em Santa Catarina, os primeiros dados sobre LTA datam de 1987, quando foi detectado um foco da doença na região oeste do Estado nos antigos municípios de Quilombo e Coronel Freitas. Na ocasião, foram identificados 11 casos autóctones da doença entre 14 trabalhadores rurais adultos infectados (SÃO THIAGO; GUIDA, 1990). De 1997 em diante, novos casos foram notificados em municípios do Oeste e também nordeste do Estado e Vale do Itajaí (GRISARD et al., 2000).

No ano de 2005, além da inclusão de novos municípios no mapa da LTA, o aumento no número de casos autóctones da doença registrados nos municípios de Balneário Camboriú, Itapema e Camboriú, caracterizaram a ocorrência de surto em áreas localizadas destes municípios (EGER-MANGRICH et al., 2005; DIVE/SC, 2007).

Em 2006, um novo surto foi detectado, no município de Blumenau, com 107 casos autóctones. Neste mesmo ano, o total de casos registrados em Santa Catarina foi de 158, dos quais 151 adquiriram a doença no Estado (EGER-MANGRICH et al., 2005; DIVE/SC, 2007). No ano de 2007 foram registrados os primeiros casos humanos no município de Florianópolis, sugerindo a existência do ciclo de transmissão ao longo de uma grande faixa litorânea do Estado (Mário Steindel, 2007, comunicação pessoal).

Estudos epidemiológicos realizados em Santa Catarina demonstram a existência, até o presente momento, de duas espécies, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, circulando em pacientes e vetores. Em concordância com o que ocorre no restante do país, *L. braziliensis* é a espécie predominante em Santa Catarina (GRISARD et al., 2000; MACHADO, 2004).

Marcondes et al. (2005) encontraram três espécies de flebotomíneos no foco de LTA no município de Piçarras, coletados nas proximidades de residências. Estudos posteriores mostraram que a espécie *Nyssomyia neivai* foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania braziliensis*, sugerindo que esta espécie responda pela transmissão do parasito no local (MARCONDES et al., 2008).

1.3. O tratamento da LTA

Os fármacos rotineiramente utilizados para tratamento da LTA pertencem à classe dos antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]), os quais foram desenvolvidos há mais de 60 anos. Ambos apresentam toxicidade e casos de falha do tratamento são comuns, tanto por resistência de determinadas cepas do parasito, quanto por baixa atividade em pacientes imunodeprimidos ou descontinuidade do tratamento por parte do paciente devido aos efeitos colaterais (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Em casos de resistência do parasito, a Anfotericina B é a segunda opção de tratamento, sendo, entretanto, mais tóxica que o Pentostam[®] e o Glucantime[®]. A fim de reduzir a toxicidade, novas formulações de Anfotericina B têm sido desenvolvidas, como a forma lipossomada (AmBisome[®]), a forma lipídeo complexada (Abelcet[®]) e uma Anfotericina B em dispersão coloidal (AmphocilTM). Entretanto, estas possuem custos elevados e por este motivo têm sido utilizadas primariamente apenas para tratamento da leishmaniose visceral. Devido a menor problemática da LTA, poucos esforços têm sido despendidos para avaliar o uso destas formulações em seu tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Na última década, medicamentos alternativos e novas formulações de fármacos tradicionais têm sido disponibilizados e já estão em uso em alguns países (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Outros ainda estão na fase dos testes clínicos, como miltefosine, paramomicina em nova formulação, imiquimod e anti-fúngicos azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Entretanto, é pouco provável que estes estudos levem ao desenvolvimento de um único fármaco capaz de tratar todas as variantes das leishmanioses, com suas diferentes espécies causadoras e diferentes graus de resistência aos tratamentos tradicionais (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Apesar das posologias e das respostas ao tratamento serem variáveis de acordo com a espécie do parasito, região

endêmica e fatores do hospedeiro, geralmente os mesmos fármacos e posologias continuam sendo utilizados para tratar as leishmanioses independentemente da espécie causadora (REITHINGER et al., 2007).

1.4. Pesquisa experimental

Por se tratarem de doenças de países subdesenvolvidos e fortemente atreladas à pobreza, as doenças tropicais têm sido negligenciadas ao longo das décadas quanto ao desenvolvimento de fármacos pela indústria farmacêutica, devido aos grandes investimentos e baixo retorno financeiro (TROUILLER et al., 2001). Estudos de Trouiller e Olliaro (1999) enfatizam esta carência ao revelar que, dos 1393 novos fármacos trazidos ao mercado entre 1975 e 1996, apenas 1% destinava-se ao tratamento de doenças tropicais.

Tais doenças, além do impacto sobre a vida dos habitantes, tornam-se um peso aos países nos quais elas ocorrem, ao debilitarem um grande número de trabalhadores ativos e superlotarem o sistema de saúde pública, gerando uma redução significativa no potencial de desenvolvimento sócio-econômico (WATKINS, 2003).

A OMS, frente à necessidade imperiosa de novos fármacos para o tratamento das doenças parasitárias, vem incentivando o estudo de compostos que possam abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes (WHO, 1990).

As possibilidades de fármacos são praticamente ilimitadas. Virtualmente qualquer extrato natural ou composto sintético pode ser candidato a fármaco para o tratamento de uma doença. Em vista disso, a triagem inicial requer testes que sejam simples de manipular, reprodutíveis, fáceis de quantificar e que, idealmente, reflitam as condições encontradas pelo agente patogênico no hospedeiro; condições em geral difíceis de obter conjuntamente (SERENO et al., 2007).

Neste sentido, a triagem de agentes leishmanicidas, classicamente utiliza formas promastigotas, devido à sua simplicidade e baixo custo do cultivo (FUMAROLA; SPINELLI;

BRANDONÍSIO, 2004). Nesta abordagem as formas promastigotas são expostas *in vitro* a diferentes concentrações dos compostos a serem testados e a taxa de inibição do crescimento dos parasitos é determinada após 48 a 72 horas de incubação.

Entretanto, cabe ressaltar que no ciclo natural a forma promastigota é encontrada apenas no hospedeiro invertebrado, não sendo o alvo para o tratamento das leishmanioses. Diferenças morfológicas e bioquímicas entre as formas promastigota e amastigota são bem descritas e responsáveis pela diferente susceptibilidade observada entre estes dois estágios evolutivos frente a compostos leishmanicidas (CALLAHAN et al., 1997; SERENO; LEMESRE, 1997a; SERENO et al., 1998; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONÍSIO, 2004).

Desta forma, nem sempre os resultados obtidos com a pesquisa experimental utilizando promastigotas são relevantes quando se visa o tratamento das leishmanioses. Sendo assim, o uso das formas amastigotas encontradas no hospedeiro mamífero, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, pode produzir resultados mais próximos do modelo animal.

Tais ensaios, até meados de 1990, eram realizados utilizando-se amastigotas obtidos de células infectadas *in vitro* ou a partir da biópsia da lesão de animais experimentalmente infectados. Estas metodologias são caras, pouco práticas, produzem número limitado de parasitos e possibilitam a presença de contaminantes do tecido infectado. Além disso, o uso de animais, embora imprescindível em alguns casos, deve ser substituído por métodos alternativos sempre que possível (PETERS et al. 1995; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONÍSIO, 2004).

O recente desenvolvimento de técnicas para cultivo axênico de amastigotas de *Leishmania* spp. e sua semelhança morfológica, bioquímica e antigênica com amastigotas intracelulares obtidos *in vivo*, tem sido apresentada como uma alternativa para somar a facilidade do cultivo em meio axênico com a vantagem de utilizar-se a forma clinicamente

relevante do parasito na triagem de fármacos, a baixo custo e livre de contaminantes celulares (BALANCO et al, 1998; GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001; DEBRABANT et al., 2004).

A avaliação de compostos leishmanicidas utilizando amastigotas axênicos tem apresentado resultados confiáveis, reprodutíveis e algumas vezes semelhantes aos obtidos com a forma intracelular (CALLAHAN et al., 1997; SERENO; LEMESRE, 1997a, b; CASTILLO et al., 2007).

Para determinar o número de parasitos axênicos viáveis, após a incubação com os fármacos de interesse, a contagem manual utilizando câmara de Neubauer em microscopia óptica é barata e confiável, embora consuma muito tempo e necessite experiência do avaliador, podendo fornecer resultados tendenciosos.

Métodos de contagem automatizada através de marcação dos parasitos com fluoróforos ou radioisótopos simplificam o processo e minimizam os erros humanos, mas necessitam de equipamentos e reagentes sofisticados e caros, nem sempre disponíveis para pesquisa básica nos países em desenvolvimento (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONÍSIO, 2004).

Já os métodos colorimétricos apresentam-se práticos, sensíveis e de baixo custo (MIKUS; STEVERDING, 2000; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONÍSIO, 2004). A técnica do MTT é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade, sendo também utilizado na triagem inicial em busca de compostos com atividade leishmanicida, quer para formas promastigotas ou amastigotas (SERENO; LEMESRE, 1997b; SERENO et al., 1998; DUTTA et al., 2005). A redução do sal de tetrazólio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide] pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial gera o cristal violeta formazan. Uma vez que esta redução somente ocorre em células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas no experimento (DUTTA et al., 2005).

1.5. O cultivo de amastigotas axênicos

Amastigotas são organismos acidófilos com um metabolismo ótimo no pH ácido mantido no vacúolo parasitóforo. Esta adaptação deve estar ligada à expressão, na membrana plasmática dos parasitos, de bombas de prótons estágio-específicas envolvidas na captura de metabólitos e manutenção do pH citoplasmático normal dos amastigotas (ANTOINE et al., 1998).

As formas amastigotas de *Leishmania* spp. caracterizam-se pela forma ovalada/arredondada e ausência de flagelo livre. São bioquimicamente bastante distintas das formas promastigotas e expressam proteínas exclusivas como a amastina (SHAW, 1994).

A primeira tentativa para obtenção de formas amastigota de *Leishmania* em meio axênico e seu posterior cultivo por longos períodos foi realizada por PAN (1984). Neste estudo, o autor induzia o processo de diferenciação de *Leishmania pifanoi* através da elevação da temperatura.

Desde então, a metodologia foi aperfeiçoada e amastigotas axênicos têm sido obtidos para várias espécies de *Leishmania*, utilizando-se diferentes temperaturas e condições de pH do meio de cultura (BALANCO et al., 1998; GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001; TEIXEIRA et al., 2002; DEBRABANT et al., 2004).

Darling e Blum (1987) descreveram a transformação reversível de promastigotas para formas elipsoidais de *L. braziliensis panamensis* depois de transferidas de 26°C para 34°C. No ano seguinte, Smejkal, Wolff e Olenick (1988) descreveram aumento da infectividade de *L. braziliensis panamensis* quando submetida a tratamento de choque térmico.

A obtenção de anticorpos monoclonais que especificamente reconhecem amastigotas de *Leishmania* forneceu uma comprovação molecular de que as formas axênicas e intracelulares são semelhantes, senão idênticas (EPERON; McMAHON-PRATT, 1989a, b).

Embora tenha sido demonstrado que o pH ácido e temperatura elevada sejam fatores essenciais para ativar a diferenciação *in vitro* (BARAK et al., 2005), as condições ideais de temperatura e pH para o cultivo dos amastigotas variam entre as diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, ressaltando sua heterogeneidade biológica. Desta forma as condições de cultivo devem ser padronizadas para cada novo isolado a ser estudado (GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001).

Cabe ressaltar também, que não necessariamente as mudanças morfológicas induzidas através de aumento de temperatura e redução de pH estão relacionadas com mudanças metabólicas. Os amastigotas obtidos axenicamente precisam ser bioquimicamente semelhantes aos amastigotas intracelulares para que inferências possam ser feitas a partir de seu uso como substituintes dos mesmos em estudos diversos (CALLAHAN et al., 1997; GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001).

Crítérios biológicos, imunológicos, bioquímicos e moleculares como a infectividade, epítomos antigênicos, aglutinação por lectinas e expressão gênica diferencial, têm sido utilizados para diferenciar os estágios evolutivos de *Leishmania* spp. e confirmar a semelhança entre os amastigotas axênicos com aqueles obtidos de tecidos infectados (EPERON; McMAHON-PRATT, 1989a, b; GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001).

1.6. Infecção de linhagens celulares por espécies de *Leishmania*

Por se tratar de um parasito intracelular, após a triagem inicial dos fármacos utilizando formas axênicas de *Leishmania*, a avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* contra a forma intracelular é o modelo mais próximo do animal sem requerer a utilização do mesmo.

Esta metodologia também fornece informações sobre a capacidade do composto de chegar em níveis adequados ao vacúolo parasitóforo, mantendo seu efeito leishmanicida. Este tipo de estudo avalia ainda potenciais efeitos do fármaco sobre a célula, favorecendo ou

inibindo o desenvolvimento das leishmanias em seu interior (CHANG, 1980; MORISHIGE et al., 1995). Nestes estudos, classicamente são utilizados macrófagos peritoniais murinos. Entretanto, este procedimento é de baixo custo-benefício, uma vez que envolve a criação de animais e o número de células obtidas é limitado, com elevados riscos de microorganismos contaminantes.

A disponibilidade de linhagens celulares, como fonte inesgotável de células hospedeiras e a padronização da infecção e cultivo de *Leishmania* utilizando as mesmas, permitiu o seu uso para experimentos *in vitro* (SERENO et al., 2007).

Diversas linhagens celulares humanas e murinas vêm sendo utilizadas para estudos de interação parasito/célula e avaliação de fármacos. Dentre elas podemos citar as linhagens derivadas de monócitos humanos THP-1 e U-937 (GEBRE-HIWOT et al., 1992; DEBRABANT et al., 2004) e as linhagens murinas RAW e J774 (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005; BRITO et al., 2006).

Chang (1980) descreveu pela primeira vez o uso da linhagem de macrófagos murinos J774 para propagação e isolamento de *L. amazonensis*. Posteriormente, esta linhagem passou a ser utilizada em experimentos para avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*, sendo considerada fidedigna da célula primária murina e de fácil cultivo e manutenção, dispensando processos de diferenciação exigidos por outras linhagens (GASPAR et al., 1992; CALLAHAN et al, 1997; TIUMAN et al., 2005; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007).

1.7. Chalconas

Dentre os compostos pesquisados como potenciais fármacos leishmanicidas, os do grupo das chalconas têm apresentado resultados promissores. As chalconas, ou 1,3-diaryl-2-propen-1-onas (FIGURA 4) são compostos naturais ou sintéticos precursores dos flavonóides e isoflavonóides (DIMMOCK et al. 1999; NI; MENG; SIKORSKI, 2004).

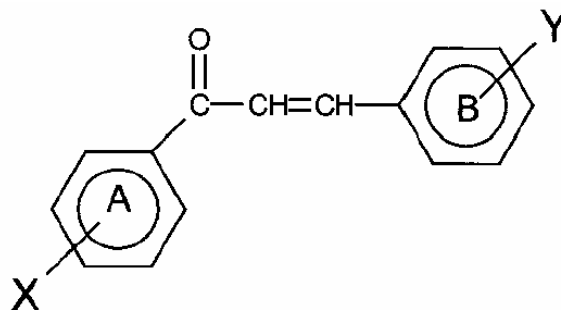


Figura 4: Estrutura básica de chalconas contendo substituintes (X e Y). Fonte: Lunardi et al. (2003).

Quimicamente são definidas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas, constituídas por dois anéis benzênicos conectados por uma ponte de 3 carbonos, tendo conjugados um grupamento carbonílico e uma porção olefínica (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001).

Constituem uma das maiores classes de produtos naturais, com ampla distribuição em plantas rasteiras ou superiores e têm sido motivo de grande interesse por suas funções farmacológicas (NOWAKOWSKA, 2007). Plantas que naturalmente contêm chalconas, tais como das famílias Fabaceae (*Glycyrrhiza*), Piperaceae (*Piper*) e Ruscaceae (*Ruscus*) têm sido largamente utilizadas pela medicina popular na Ásia, África e América do Sul (NI; MENG; SIKORSKI, 2004).

As chalconas naturais e seus derivados sintéticos são amplamente descritos por apresentarem propriedades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, bactericida, antimalárica, antifúngica, antiviral e leishmanicida (NOWAKOWSKA, 2007; NI; MENG; SIKORSKI, 2004).

A licochalcona A, uma chalcona oxigenada isolada das raízes de uma planta chinesa (*Glycyrrhiza*), inibiu o crescimento de amastigotas intracelulares e promastigotas de *L. major* e *L. donovani* (CHEN et al., 1993). Da mesma forma, Torres-Santos et al. (1999)

demonstraram significativa atividade *in vitro* da chalcona 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC) contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Boeck et al. (2006) sintetizaram e testaram a atividade leishmanicida de análogos da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC), contendo grupamentos nitro, flúor ou bromo na posição *para* do anel A, e estes apresentaram atividade seletiva aumentada contra os parasitos, quando comparados com DMC.

Lunardi et al. (2003) testaram a atividade leishmanicida de análogos de chalconas contendo grupamentos cloro ou bromo. Estes compostos apresentaram inibição concentração-dependente do crescimento de promastigotas de *L. braziliensis*. Os resultados deste trabalho juntamente com os de Boeck et al. (2006) demonstram que a presença de substituintes nos anéis aromáticos das chalconas são críticas para sua atividade leishmanicida.

Estudos da relação estrutura-atividade das chalconas têm permitido deduzir que a adição de substituintes a cadeias de chalconas é uma importante estratégia para reduzir a toxicidade e aumentar o potencial leishmanicida (KO et al., 2003; LIU et al., 2003; GUTTERIDGE et al., 2007).

Diante dos promissores resultados e da facilidade de síntese de chalconas contendo substituintes diversos, a continuidade na síntese e na avaliação da atividade leishmanicida deste grupo de moléculas na busca de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses é relevante.

Neste sentido, o presente estudo estabelece o cultivo de amastigotas axênicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, a infecção da linhagem J774 com ambas as espécies e utiliza estes modelos para avaliar a atividade leishmanicida de 34 chalconas naturais e sintéticas. Desta forma, a avaliação dos compostos foi realizada contra a forma clinicamente relevante do parasito e com as espécies predominantes no Brasil, visando à seleção de potenciais fármacos para estudos *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

- Padronizar o cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *L. amazonensis* e *L. braziliensis in vitro* e seu uso na avaliação da atividade leishmanicida de chalconas.

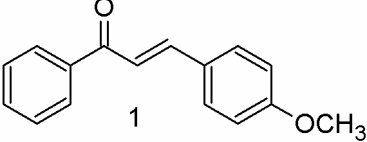
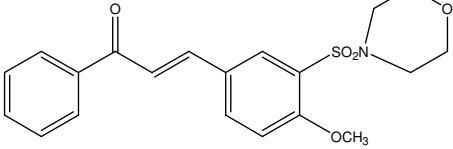
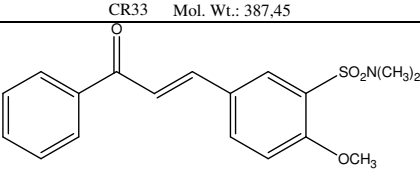
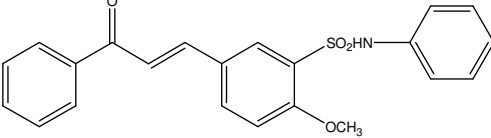
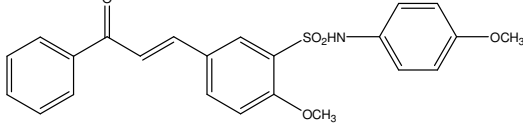
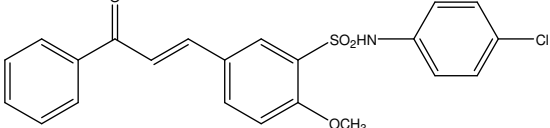
2.2. Objetivos específicos:

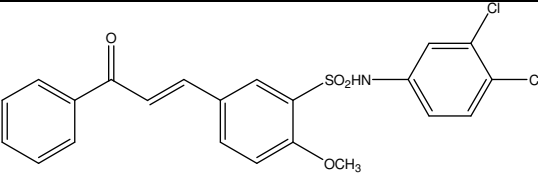
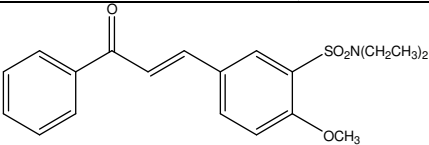
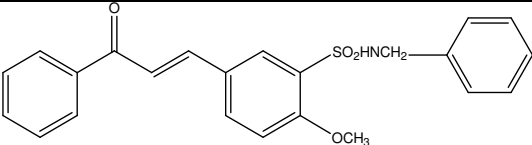
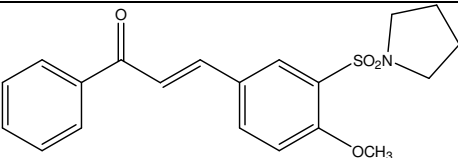
- Padronizar o cultivo de formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- Padronizar a infecção de promonócitos da linhagem J774 com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos frente a células da linhagem J774;
- Avaliar e comparar a atividade leishmanicida de chalconas frente a formas promastigotas e amastigotas axênicas *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de chalconas contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

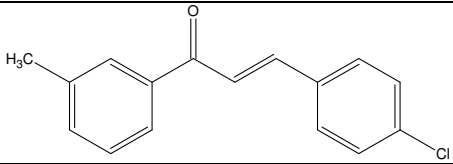
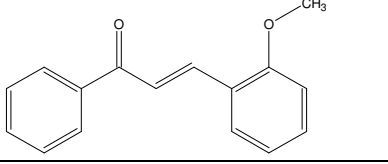
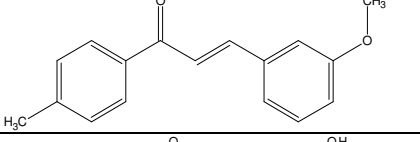
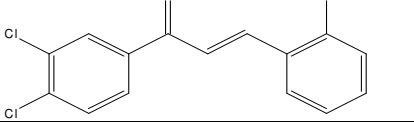
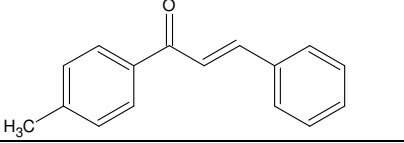
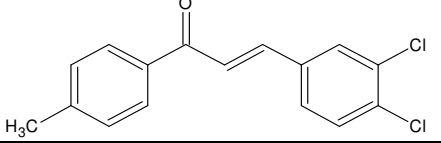
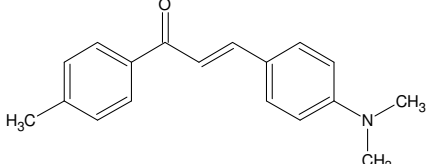
3.1. Chalconas substituídas

No presente estudo foram utilizadas chalconas naturais e sintéticas gentilmente fornecidas pelo Dr. Ricardo Nunes (UFSC) e pelo Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI). Um total de 34 chalconas (quadros 1, 2, 3, 4 e 5) que previamente haviam apresentado bom índice de seletividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e/ou *L. braziliensis* em estudos anteriores foram utilizadas. Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), filtrados em membrana de nylon de 0,22µm e armazenados a 4°C até o uso.

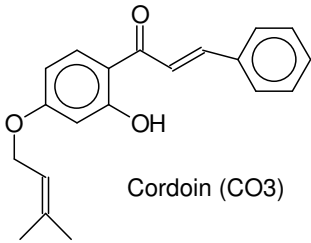
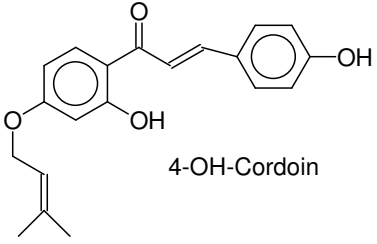
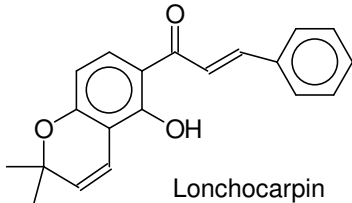
Código	Estrutura	Peso molecular
MET	 1	238
CR33	 CR33 Mol. Wt.: 387,45	387,45
CR34	 CR 34 Mol. Wt.: 345,41	345,41
CR50	 CR50 Mol. Wt.: 393,46	393,46
CR51	 CR51 Mol. Wt.: 423,48	423,48
CR52	 CR52 Mol. Wt.: 427,90	427,90

CR53	 <p style="text-align: center;">CR53 Mol. Wt.: 462,35</p>	462,35
CR54	 <p style="text-align: center;">CR54 Mol. Wt.: 373,47</p>	373,47
CR55	 <p style="text-align: center;">CR55 Mol. Wt.: 407,48</p>	407
CR57	 <p style="text-align: center;">CR57 Mol. Wt.: 371,45</p>	371

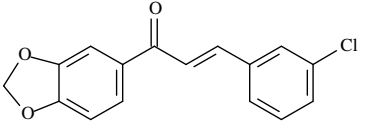
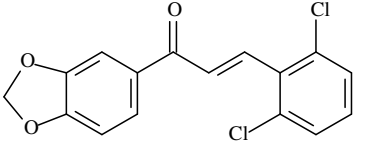
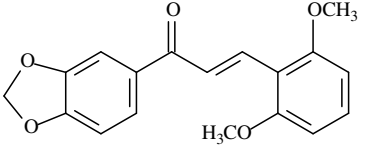
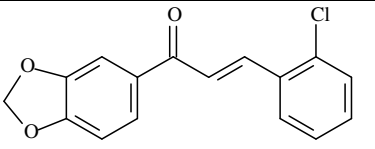
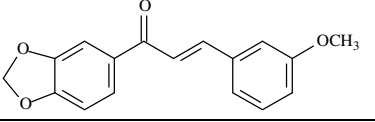
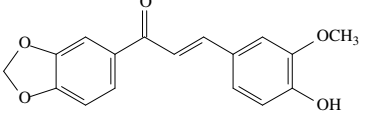
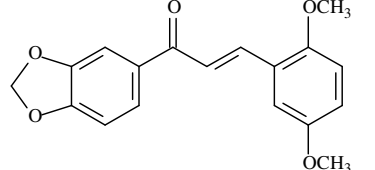
Quadro 1: Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR)

Código	Estrutura	Peso molecular
C4		256,73
C17		238,28
C19		252,31
C26		224
CL2		222,3
CL8		291,2
CL10		265,3

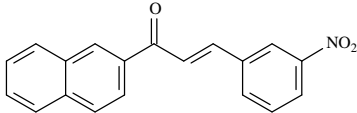
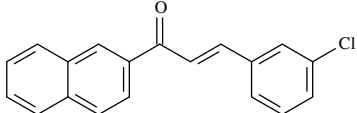
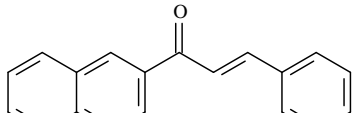
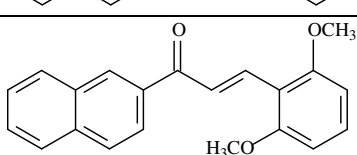
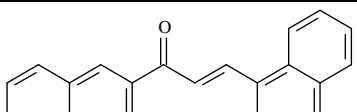
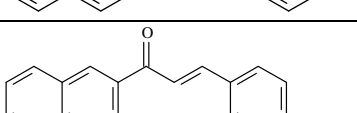
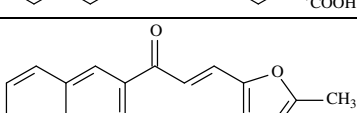
Quadro 2: Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas das séries C e CL.

<p>C03</p>	 <p>Cordoin (C03)</p>	<p>308</p>
<p>C05</p>	 <p>4-OH-Cordoin</p>	<p>324</p>
<p>C09</p>	 <p>Lonchocarpin</p>	<p>305</p>

Quadro 3: Código, estrutura e peso molecular das chalconas naturais da série C0.

Código	Estrutura	Peso molecular
L2		286,71
L3		321,16
L17		312,32
L23		286,71
L25		282,30
L26		298,30
L29		312,32

Quadro 4: Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona.

Código	Estrutura	Peso molecular
R7		303,32
R13		292,76
R15		258,32
R19		318,37
R29		308,38
R32		302,33
R36		362,31

Quadro 5: Código, estrutura e peso molecular das chalconas sintéticas derivadas da 2-naftilacetofenona.

3.2. Cultivo de parasitos

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa 575) e *L. braziliensis* (cepa 2904) foram obtidas a partir de aspirado da pata de hamster previamente infectado, cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich) pH 7,4 contendo 5% de Soro Bovino Fetal (SBF), 2% de urina, 10U/ml de penicilina e 10µg/ml estreptomicina (meio Schneider completo), mantidas a 26°C através de repiques semanais.

3.3. Curvas de crescimento

Promastigotas na fase exponencial de crescimento em meio Schneider completo foram lavados duas vezes em Tampão Salina Fosfato (136mM de NaCl, 2,6mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 1,7mM de KH₂PO₄) (PBS) pH 7,4 a 1,500xg/10 minutos e suspensos em 10ml de meio Schneider completo na concentração de 5x10⁶ promastigotas/ml em frasco de cultivo celular 25cm² (TPP).

O crescimento foi monitorado diariamente através de contagem em câmara de Neubauer e as médias e desvios padrão (dois experimentos independentes) foram utilizados para gerar um gráfico utilizando-se o programa Excel[®] (Microsoft).

3.4. Cultivo de promonócitos murinos da linhagem J774.A1

Células J774.A1 (ATCC: TIB67) foram cultivadas em frascos de cultivo celular 25cm² contendo meio RPMI-1640 (GibcoBRL) suplementado com 10% de SBF, 10U/ml de penicilina e 10µg/ml estreptomicina, mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para os repiques e os experimentos, as células foram removidas por raspagem e mantidas em banho de gelo até o uso.

3.5. Estabilização do cultivo de amastigotas axênicos

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* cultivadas até a fase exponencial tardia ou fase estacionária de crescimento foram lavadas uma vez em PBS pH 7,4 a 2.000xg/10 minutos. Em seguida, a concentração foi ajustada para 50x10⁶ promastigotas/ml em meio Schneider suplementado com 20% de SBF, pH 5,5 ou 6,3 em frasco de cultivo celular 25cm² e mantidos a 34°C sem CO₂. Após 1 a 5 dias as culturas foram repicadas conforme Hoodkinson et al. (1996), Balanco et al. (1998) e Teixeira et al. (2002), com algumas modificações.

Sempre que necessário, os parasitos foram passados 3 vezes por agulha 26G½ para desagregação dos grumos de amastigotas axênicos formados.

3.6. Caracterização das formas arredondadas obtidas como amastigota-semelhantes

As formas arredondadas obtidas com a metodologia descrita no item 3.5 foram avaliadas quanto à morfologia (forma oval/arredondada e flagelo livre ausente) por coloração Giemsa e microscopia óptica e também por microscopia diferencial de Nomarski após fixação dos parasitos com paraformaldeído 4%.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e/ou método de exclusão do azul de tripan (0,02%).

A confirmação da ausência do bastão paraflagelar foi realizada por imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal Mab1B10, conforme previamente descrito por Balanco et al. (1998).

3.7. Reação de imunofluorescência indireta

Promastigotas na fase exponencial de crescimento ou amastigotas axênicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram lavados três vezes em PBS pH 7,4 e fixados em paraformaldeído 2% em PBS, por 12 horas a 4°C. Os parasitos foram então lavados duas vezes em PBS por centrifugação a 2.000xg/ 10 minutos tendo sua concentração final ajustada para 1×10^6 parasitos/ml em PBS acrescido de 1% de soro albumina bovina (BSA). A seguir, 5µL da suspensão de parasitos foi distribuída por poço, em lâminas próprias para imunofluorescência. As lâminas foram codificadas e, após secagem à temperatura ambiente, embaladas individualmente e mantidas a -20°C até seu uso.

O anticorpo monoclonal Mab1B10, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Renato A. Mortara (Unifesp), direcionado ao bastão paraflagelar de *Trypanosoma cruzi* foi utilizado para determinar a presença ou ausência de flagelo nos parasitos.

As lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente e incubadas com 20µL/poço do anticorpo Mab1B10 puro ou 1/10 por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 30 minutos com conjugado fluoresceinado anti-IgG murino Sigma, diluído 1:100 em azul de Evans 0,01%. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS e uma vez em água destilada, secas, montadas com glicerina tamponada (pH 9,5) e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX-40 FLA. Como controles negativo e positivo foram utilizados soro de camundongo sadio diluído a 1:40 e soro de camundongo infectado com *T. cruzi*, respectivamente.

3.8. Padronização da infecção dos promonócitos J774.A1 com amastigotas axênicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Os promonócitos e os amastigotas axênicos (5 ou 10 parasitos:célula) foram colocados em contato em suspensão na concentração de 10^6 células e 5×10^6 ou 10×10^6 parasitos por ml de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF em tubo cônico de

15ml. Os parasitos e células foram incubados a 34°C sem CO₂ por 16 horas sob agitação suave, a fim de permitir a interação e infecção.

Após esta incubação, a suspensão celular foi passada 3 vezes por agulha 21G1½ a fim de desfazer os agregados celulares e 100µl da suspensão foram semeados sobre lamínulas circulares de vidro no interior de placas de 24 poços, incubadas por 4 horas a 34°C ou 37°C na presença de 5% de CO₂ para adesão das células, recebendo 1ml de meio RPMI-1640 20% SBF por poço após este período. Como controle, monocamadas celulares não infectadas foram utilizadas.

A infecção foi monitorada desde o princípio da interação (momento zero) até 72 horas pós-infecção por microscópio invertido. A cada 24 horas, lamínulas foram lavadas em meio RPMI-1640 a fim de remover células não aderentes; imediatamente secadas com jato de ar e então fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Procedimento de descoloração em álcool 70% foi utilizado sempre que necessário a fim de permitir melhor visualização dos parasitos intracelulares. Após secas, as lamínulas foram montadas em lâmina de vidro própria utilizando a resina de montagem DPX[®].

A taxa de infecção foi determinada através de análise randômica de 200 células, avaliando-se a porcentagem de células infectadas e o número médio de parasitos intracelulares, conforme descrito por Chang (1980).

3.9. BIOENSAIOS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes de maneira independente. Como controles foram utilizados o solubilizante dos compostos (DMSO 1%) e o fármaco Anfotericina B na concentração de 1µM.

3.9.1. Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas promastigotas

As formas promastigotas foram semeadas em placas de 96 orifícios, em concentração de 5x10⁶ parasitos/ml em meio Schneider completo e incubadas por 48 horas a 26°C na presença de diferentes concentrações (100µM a 5µM) dos compostos a serem testados.

A atividade leishmanicida de cada composto foi avaliada através da técnica do MTT, conforme Sieuwerts et al. (1995). Após o período de incubação, cada placa foi centrifugada a 1,700xg por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e 50µl de uma solução de MTT 1mg/ml em meio Schneider completo foi adicionada a cada poço. A placa foi então incubada a 26°C por 4 horas no escuro. O MTT foi então removido, 100µl de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais de formazan e a densidade óptica foi determinada a 540nm em leitor

de microplacas ELx800 (Bio-tek instruments, INC). Alternativamente, o número de parasitos foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

3.9.2. Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas amastigotas axênicas

As formas amastigotas axênicas foram semeadas em placas de 96 orifícios, em concentração de 10^7 amastigotas/ml em meio definido para sua manutenção, e incubadas por 48 horas na presença de diferentes concentrações (50 μ M a 5 μ M) dos compostos a serem testados a 34°C e 5% de CO₂.

A atividade leishmanicida de cada composto foi avaliada através da técnica do MTT, conforme Sieuwerts et al. (1995). Após o período de incubação, cada placa foi centrifugada a 1.700xg por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e 50 μ l de uma solução de MTT 2mg/ml em meio Schneider completo foi adicionada a cada poço. A placa foi então incubada a 34°C por 18 horas no escuro. Após este período, a placa foi novamente centrifugada a 1.700xg por 10 minutos. O MTT foi então removido, 100 μ l de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais de formazan e a densidade óptica foi determinada a 540nm em leitor de microplacas ELx800. Alternativamente, o número de parasitos foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

3.9.3. Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares

Os amastigotas axênicos (5 ou 10 parasitos:célula) e os promonócitos em suspensão foram colocados em contato na concentração de 10^6 células e 5×10^6 ou 10×10^6 parasitos por ml de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF em tubo cônico de 15ml. Os parasitos e células foram então incubados a 34°C sem CO₂ por 16 horas sob agitação suave, a fim de permitir a interação e infecção. Após as 16 horas de incubação, a suspensão celular foi passada 3x por agulha 21G1½ a fim de desfazer os agregados celulares, e então diluída 10x em meio RPMI-1640 20% SBF. Cento e oitenta microlitros da suspensão foram semeados em orifícios de placa de 96 poços. Após 1 hora de incubação a 34°C a fim de permitir a adesão das células ao fundo da placa, 20 μ l das diferentes concentrações dos compostos foram adicionados e as células mantidas por 48 horas a 34°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi aspirado com bomba de vácuo, os orifícios foram secos com jato de ar, fixados com metanol e corados pelo Giemsa.

A taxa de infecção foi determinada através de análise randômica de 200 células, avaliando-se a porcentagem de células infectadas e o número médio de parasitos intracelulares em aumento de 600x em microscópio invertido.

A porcentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com Guru et al. (1989). PI superior a 25% foram considerados significativos.

3.9.4. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade celular pelo método do MTT

Promonócitos da linhagem J774.A1 foram suspensos em meio próprio para seu cultivo, o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2×10^5 células/ml. Cento e oitenta microlitros da suspensão celular foram cultivados em placas de 96 orifícios a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas para formação de monocamada. A seguir, 20µl das diluições dos compostos foram adicionados por poço e as células mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após as 48 horas de incubação, o meio de cultura foi removido, 50µl de uma solução de MTT a 1mg/ml (em meio RPMI-1640) foram adicionados e a placa incubada por 4 horas a 37°C. O MTT foi então removido, 100µl de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais de formazan e a densidade óptica foi determinada a 540nm em leitor de microplacas ELx800.

3.10. Análise estatística

As médias foram analisadas através do teste T ou da análise de variância (ANOVA) e pelo teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância. Os valores de CI₅₀ (concentrações dos compostos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle) e de CC₅₀ (concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular) foram estimados a partir dos valores médios de dois experimentos independentes, realizados em triplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 3[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivo das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Através da curva de crescimento é possível determinar a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento de microorganismos em cada sistema de cultivo. Para *Leishmania* spp., a determinação desta fase é importante uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso na obtenção e manutenção de amastigotas axênicos (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

No presente estudo, a fase exponencial tardia e a fase estacionária foram determinadas observando-se a curva de crescimento e a morfologia dos promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Para *L. amazonensis*, a fase exponencial tardia e a fase estacionária ocorreram, respectivamente, no 5º e 6º dia de cultivo. Para *L. braziliensis*, a fase exponencial tardia ocorreu no 7º dia de cultivo e a fase estacionária no 8º (FIGURA 5). As diferenças observadas nas curvas de crescimento, sob as mesmas condições de cultivo, ressaltam diferenças no tempo de replicação celular das duas espécies.

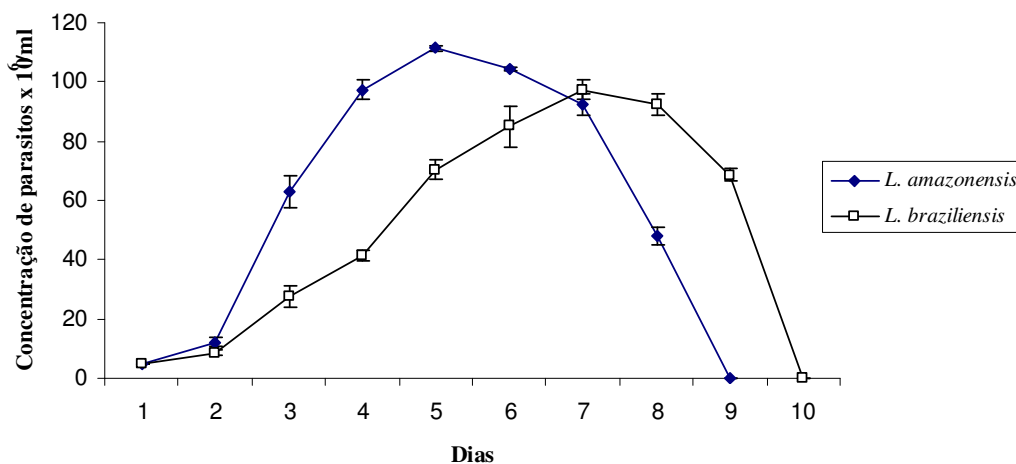


Figura 5: Curvas de crescimento tempo dependente das formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa 575) e *L. braziliensis* (cepa 2904) cultivadas em 10ml de meio Schneider completo a 26°C em frasco de cultivo celular de 25cm².

Durante o cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania*, dois tipos principais ocorrem na cultura: os promastigotas procíclicos e os promastigotas metacíclicos. Promastigotas procíclicos são formas mais alongadas, não infectivas para o hospedeiro mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial de crescimento *in vitro*. *In vivo*, procíclicos são encontrados no intestino médio do vetor flebotomíneo, onde se multiplicam e se diferenciam para as formas infectivas metacíclicas. Promastigotas metacíclicos são definidos como formas pequenas, delgadas, com flagelo relativamente longo e que ocorrem em grande número em uma população de fase estacionária *in vitro*. *In vivo*, metacíclicos são encontrados no intestino anterior do flebotomíneo e são infectivos para o hospedeiro mamífero (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

4.2. Obtenção das formas amastigotas axênicas

O cultivo de formas amastigotas axênicas das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi reportado previamente por alguns autores para cepas diversas (HODGKINSON et al., 1996; BALANCO et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002). Entretanto, considerando-se as diferenças de crescimento, fisiologia e bioquímica entre as diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, as condições para diferenciação de promastigotas de *L. amazonensis* (cepa 575) e *L. braziliensis* (cepa 2904) em amastigotas axênicos foram otimizadas em nosso laboratório a partir de protocolos previamente descritos para outras cepas, com modificações.

A diferenciação foi realizada inicialmente a partir de promastigotas na fase estacionária e na fase exponencial tardia de crescimento, em condições de pH 5,5 e 6,3 conforme a metodologia item 3.5. A indução da diferenciação a partir das formas promastigotas de fase estacionária ocasionou elevada mortalidade (80%) e reduzida taxa de diferenciação para ambas as espécies. Por outro lado, o uso de promastigotas de fase exponencial tardia, resultou em um elevado rendimento de amastigotas axênicos após 72

horas em ambas as condições de pH. Para *L. amazonensis*, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre o crescimento, porcentagem de amastigotas, porcentagem de parasitos viáveis nas condições de pH 5,5 e 6,3. Já para *L. braziliensis*, a maior taxa de crescimento foi observada em 6,3, não tendo sido, entretanto, observadas diferenças significativas para os demais parâmetros analisados (Tabela 1).

Tanto para *L. amazonensis* quanto para *L. braziliensis*, os amastigotas obtidos puderam ser subcultivados por até três passagens através de repiques em intervalos de quatro dias em uma concentração inicial de 2×10^6 parasitos/ml. Contudo, após a terceira passagem observamos a perda da viabilidade dos parasitos em ambas as espécies.

Tabela 1: Número de parasitos, porcentagem de amastigotas e de parasitos viáveis após 72 horas de diferenciação de promastigotas de fase exponencial tardia de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em duas condições de pH, a partir de um inóculo de 50×10^6 parasitos/ml.

Espécie	pH	Parasitos x 10^6 /ml	% de amastigotas	% de parasitos viáveis
<i>L. amazonensis</i>	5,5	$112 \pm 9,5$	$97 \pm 1,2$	$95 \pm 3,2$
	6,3	$83 \pm 8,1$	$95 \pm 2,0$	$88 \pm 2,5$
<i>L. braziliensis</i>	5,5	$56,3 \pm 5,2$	$82 \pm 8,7$	$90 \pm 3,6$
	6,3	$103 \pm 10,9$	$93 \pm 2,6$	$96 \pm 2,1$

Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, a viabilidade determinada pela coloração com azul de tripan e a porcentagem de amastigotas através da análise de 200 células em esfregaço corado pelo Giemsa. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Cysne-Finkelstein et al. (1998) observaram relação direta entre a porcentagem de promastigotas metacíclicos (estacionária do crescimento) e a taxa de diferenciação em formas amastigotas *in vitro*. Entretanto, diversos autores e o presente estudo obtiveram semelhante sucesso na obtenção de amastigotas axênicos a partir de cultura em fase exponencial de crescimento (HODGKINSON et al., 1996; DEBRABANT et al., 2004). Desta forma, não está ainda esclarecido se a metaciclogênese é mesmo essencial neste processo de diferenciação.

Hodgkinson et al. (1996) descreveram o cultivo e a caracterização de amastigotas axênicos de *L. amazonensis* utilizando redução gradual de pH e aumento gradual da

temperatura, chegando ao pH 5,5 e a temperatura de 32°C. Já Cysne-Finkelstein et al. (1998) descrevem o cultivo dos promastigotas de *L. amazonensis* inicialmente em pH 5,5 e após 6 dias a 26°C, a transferência dos parasitos para 32°C.

Hodgkinson et al. (1996) afirmam que para manter a morfologia de amastigotas em taxas de 95%, é necessário repicar a cultura sempre que esta atinja a concentração de 2×10^7 parasitos/ml. Isto ressalta a dificuldade de se obter uma cultura contendo 100% amastigotas e limita a quantidade de parasitos a serem obtidos através da metodologia de diferenciação *in vitro*.

Para *L. braziliensis*, Balanco et al. (1998) obtiveram amastigotas axênicos através do cultivo em meio modificado (UM54) pH 6,3 com adaptação gradual (aumento de 1°C por semana) na temperatura de cultivo dos parasitos, chegando a 34°C. Os autores relatam considerável perda de viabilidade na cultura e a necessidade de 10 subcultivos para obtenção dos amastigotas axênicos.

Teixeira et al. (2002) descrevem a diferenciação de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em amastigotas através da variação simultânea de pH e temperatura, conforme realizado no presente estudo. Estes autores obtiveram culturas com altas taxas de amastigotas (aproximadamente 98%), mas verificaram que a partir do quinto dia de cultivo, para *L. braziliensis* e do segundo repique para *L. amazonensis*, as células apresentavam sinais de injúria e morriam.

Embora a manutenção da cultura de amastigotas axênicos em longo prazo não tenha sido possível em nosso laboratório, as formas obtidas foram confirmadas como amastigotas e foram altamente infectivas tanto para modelo *in vivo* (dados não mostrados) quanto para células da linhagem J774 *in vitro*.

A utilização de meios de cultivo complexos, bem como o aumento de temperatura e redução no valor de pH realizados de modo gradual mostram-se mais eficazes para a obtenção

de amastigotas axênicos e permitem o cultivo dos parasitos por até 150 subpassagens (HODGKINSON et al., 1996; BALANCO et al., 1998). Entretanto, o longo tempo necessário para obtenção de tais culturas (até 2 meses) e o baixo número de amastigotas gerados devido às exigências nutricionais dos parasitos torna estas metodologias pouco práticas para a triagem de fármacos.

4.3. Caracterização das formas obtidas como tipo amastigota

As formas obtidas pelo processo de diferenciação foram analisadas quanto a sua morfologia através de observação em microscopia óptica de preparações coradas pelo Giemsa. Os parasitos obtidos apresentaram morfologia ovalada/arredondada, com a presença de núcleo e cinetoplasto bem corados e ausência de flagelo livre.

A ausência do flagelo livre, principal característica morfológica que distingue amastigotas de promastigotas, foi confirmada por ensaios de imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal Mab1B10 conforme descrito no item 3.7 da metodologia. Os amastigotas obtidos não apresentaram marcação com o anticorpo, conforme esperado, enquanto as formas promastigotas apresentavam o flagelo fortemente marcado (dados não mostrados).

A observação de preparações fixadas com formaldeído 4% através de microscopia de interferência Nomarski permite comparar o tamanho dos amastigotas obtidos para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (FIGURA 6).

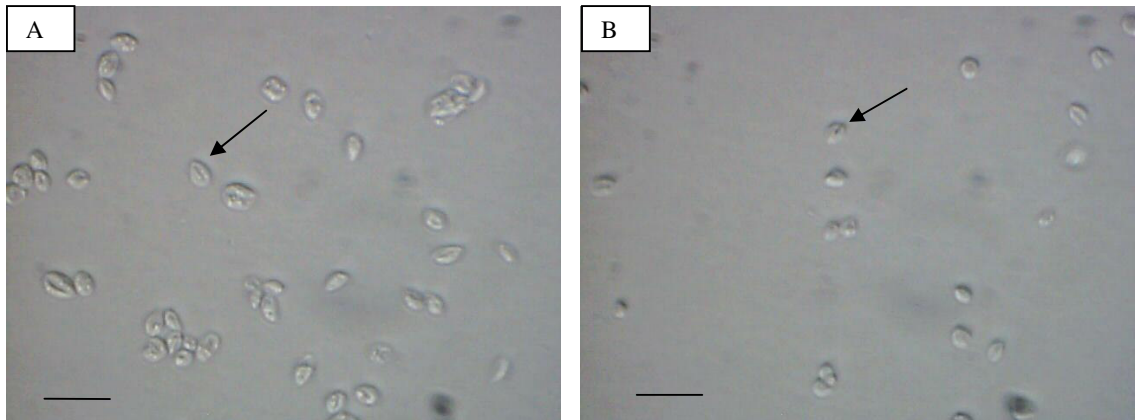


Figura 6: Microscopia de interferência Nomarski mostrando amastigotas axênicos fixados com formaldeído 4%. (A) *L. amazonensis*; (B) *L. braziliensis*. As setas indicam amastigotas. A barra representa 10 μ m.

As formas amastigotas axênicas obtidas no presente estudo foram mais infectivas para as células hospedeiras que as formas promastigotas e mantiveram a capacidade de reverter à forma promastigota quando transferidas para condições de cultivo adequadas. Estas características são típicas de formas amastigotas intracelulares e têm sido descritas para amastigotas obtidos axenicamente por outros autores (PAN et al., 1993; BALANCO et al., 1998; GUPTA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2002).

4.4. Padronização do ensaio de MTT para avaliação da atividade antiparasitária de compostos em formas amastigotas axênicas

O método enzimático do MTT é bem descrito para quantificação de formas axênicas de *Leishmania* (SERENO; LEMESRE, 1997a, b; TANAKA et al., 2007). A fim de padronizar o uso desta técnica para determinar o número e a viabilidade dos amastigotas axênicos em nosso laboratório, diferentes concentrações dos parasitos foram incubadas com o MTT e a correlação entre densidade óptica e o número de amastigotas foi avaliada (FIGURA 7).

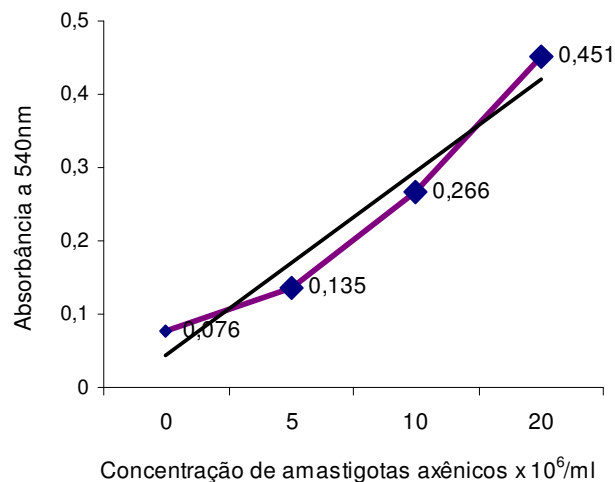


Figura 7: Correlação entre a concentração de amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e a absorbância a 540nm após incubação por 18 horas com 50µl de MTT na concentração 2mg/ml.

Os resultados obtidos demonstram a existência de correlação direta entre a concentração de parasitos e a absorbância, corroborando dados da literatura e confirmando a utilização do método colorimétrico como metodologia adequada para determinação da atividade antiparasitária dos compostos, em substituição à contagem manual (SERENO; LEMESRE, 1997a, b; SERENO et al., 1998).

Ainda assim, a avaliação da atividade leishmanicida de fármacos utilizando apenas amastigotas axênicas apresenta limitações: (i) fármacos que precisam ser metabolizados pelo hospedeiro (pré-droga) antes de atuar no parasito são perdidos; (ii) fármacos que têm que ser concentrados pelo macrófago podem demonstrar apenas uma pequena atividade no modelo axênico; (iii) o MTT pode não ser sempre preciso, uma vez que alguns grupos químicos podem interagir com a formação do formazan (SERENO; LEMESRE, 1997b; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

4.5. Infecção de células da linhagem J774.A1

A fim de utilizar o modelo dos amastigotas intracelulares para avaliação da atividade leishmanicida de chalconas, a infecção de células da linhagem J774.A1 com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi padronizada em nosso laboratório.

Estudos prévios demonstram a infecção e cultivo de amastigotas em macrófagos em temperaturas variando de 33°C a 37°C para diferentes espécies de *Leishmania* (CHANG, 1980; ANTOINE et al., 1998; CHANG et al., 2003; BRITO et al., 2006). Neste sentido, a fim de definir a temperatura ideal de cultivo, comparamos a infecção da linhagem J774 por *L. amazonensis* nas temperaturas de 34°C e 37°C. Como pode ser observado na Tabela 2, a partir de 48 horas a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula foi significativamente ($p < 0,05$) maior na temperatura de 34°C.

Durante o cultivo dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* a 37°C, foi observada a destruição dos amastigotas na ausência de fármacos leishmanicidas e a presença de numerosos pequenos vacúolos vazios no citoplasma celular (FIGURA 8). Resultados semelhantes foram obtidos para *L. braziliensis* (dados não mostrados).

Tabela 2: Porcentagem de células infectadas e número médio de amastigotas por 100 células da linhagem J774.A1 infectadas com amastigotas axênicos de *L. amazonensis* em diferentes tempos de cultivo pós infecção.

Temperatura	Parâmetros	Tempo pós infecção		
		24h	48h	72h
34°C	% Células infectadas	46 ± 6,2	39 ± 4,3	35 ± 5,2
	Número de amastigotas/100 células	246 ± 40	190 ± 27	196 ± 22
37°C	% Células infectadas	56 ± 5,6	10 ± 2,5	3,3 ± 1,2
	Número de amastigotas/100 células	297 ± 45	27 ± 5	7 ± 1

Os resultados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

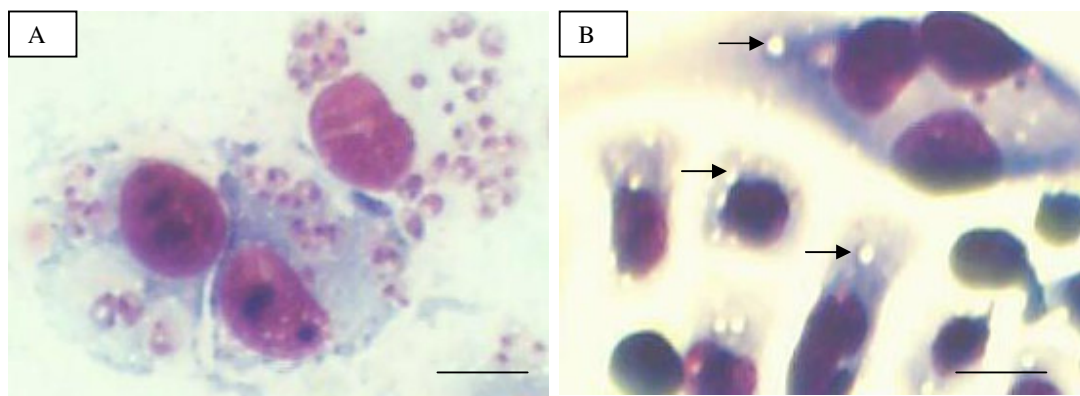


Figura 8: Morfologia de células da linhagem J774.A1 infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*, cultivadas por 48 horas em diferentes temperaturas. (A) 34°C (B) 37°C. As setas apontam vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa 10µm.

Estes resultados concordam com aqueles previamente descritos por Chang (1980), que observou que, para *L. amazonensis* temperaturas superiores a 35°C induzem a morte dos parasitos intracelulares e que, após 72 horas a 37°C, os parasitos desaparecem da cultura. Considerando-se a infecção humana por Leishmanias dermatóricas, verifica-se que as lesões se desenvolvem geralmente na pele, onde a temperatura corporal é inferior a 37°C, demonstrando que estes parasitos são termosensíveis. A utilização de termoterapia no tratamento de lesões de pacientes sem a utilização de fármacos leishmanicidas e a conseqüente cura clínica das lesões, corrobora esta hipótese (REITHINGER et al., 2005; AMEEN, 2007).

Para facilitar a avaliação da atividade leishmanicida de compostos é importante que a taxa de infecção celular esteja ao redor de 30-60%. Além disso, o número de parasitos por célula não deve ser excessivamente grande. O excesso de parasitos torna a avaliação laboriosa ao passo que uma taxa de infecção muito reduzida torna difícil a observação do efeito antiparasitário do composto testado.

Em virtude das características intrínsecas das cepas, a proporção de parasitos/célula no momento da infecção necessita ser ajustada para que as taxas de infecção e o número de parasitas por célula sejam adequados para a análise. BALANCO et al. (1998) descrevem a infecção de macrófagos derivados da medula óssea de ratos com amastigotas axênicos de *L. braziliensis* nas taxas de 10 e 5 parasitos por célula. Neste estudo, uma maior porcentagem de amastigotas intracelulares foi obtida na taxa 10:1 em relação à 5:1, chegando a 62,6% de células parasitadas 24 horas após a infecção e caindo para 34% 48 horas após a infecção. Estes resultados e ensaios preliminares realizados em nosso laboratório (dados não mostrados) nos levaram a estabelecer a taxa de 10:1 para infecção e avaliação da atividade leishmanicida das chalconas contra formas intracelulares de *L. braziliensis*, uma vez que esta razão (parasito/célula) fornece um número adequado de parasitos intracelulares após 48 horas da infecção (MADEIRA; BARBOSA-SANTOS; MARZOCHI, 1999).

Já para *L. amazonensis*, a infecção de macrófagos utilizando uma razão de cinco parasitos por célula resulta em taxas de infecção $\geq 50\%$ mesmo após 48 horas, com um grande número de amastigotas intracelulares, possivelmente devido a características de infectividade diferenciada desta espécie de *Leishmania* (CHANG, 1980).

Na infecção por *L. amazonensis* realizada no presente estudo, observa-se a presença de vacúolos parasitóforos que podem atingir até 25 μ m de tamanho contendo vários amastigotas aderidos à membrana dos mesmos ou soltos em seu interior (FIGURA 9A). Tais vacúolos parecem estar preenchidos por fluido, como se uma pressão de turgor os mantivesse armados, fazendo-os parecer esferas dentro dos macrófagos quando as células estão infectadas por *L. amazonensis* (FIGURA 9A). Cabe ressaltar que nem todos os vacúolos produzidos na infecção por *L. amazonensis* em macrófagos apresentam tal morfologia, especialmente em células sofrendo mitose ou com infecção muito elevada, nas quais os vacúolos se tornam pequenos e estão totalmente tomados por amastigotas.

Antoine et al. (1998) e Chang et al. (2003) descreveram a presença deste tipo de vacúolo em distintas linhagens celulares quando infectadas por *L. amazonensis*, sugerindo que a formação do vacúolo seja induzida pela espécie de *Leishmania*. Segundo Chang (1980), para *L. amazonensis*, a presença destes vacúolos está associada à infecção por parasitos vivos e virulentos, uma vez que os mesmos são ausentes em células infectadas com parasitos mortos fixados ou avirulentos e regridem com o tratamento anti-*leishmania*.

Já na infecção por *L. braziliensis*, foi observada a formação de vacúolos pequenos contendo um ou dois amastigotas (FIGURA 9B), conforme descrito anteriormente por Balanco et al. (1998) para esta mesma linhagem celular. Resultados semelhantes são observados em preparações obtidas de animais ou de pacientes infectados, sugerindo ser esta uma característica da espécie de *Leishmania*. Apesar da importância clínica e epidemiológica desta espécie na América Latina, o modelo de infecção celular *in vitro* por *L. braziliensis* para avaliação de fármacos é pouco explorado na literatura, devido às dificuldades de cultivo e manutenção *in vitro* do parasito.

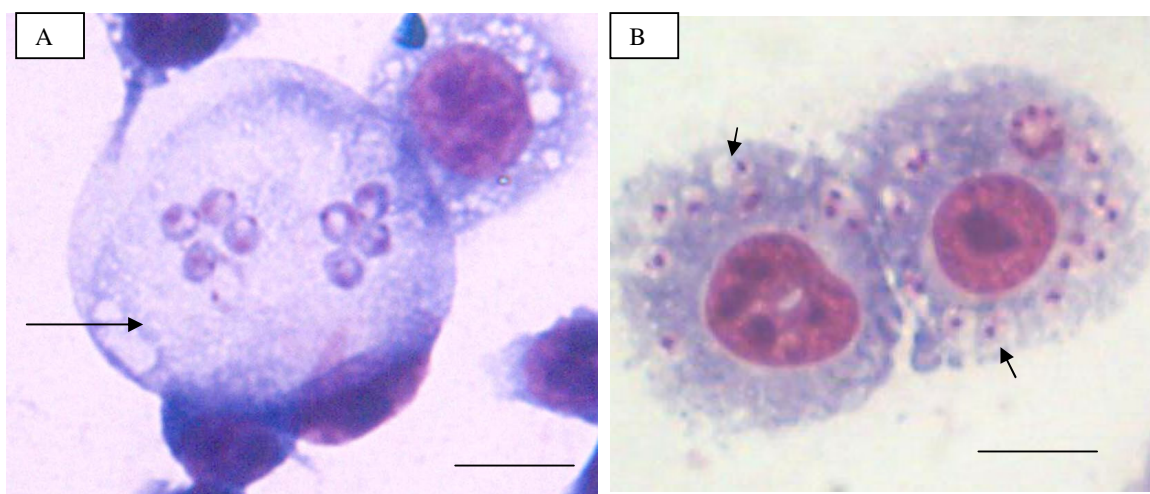


Figura 9: Células da linhagem J774.A1 infectadas com *Leishmania* coradas pelo Giemsa. (A) *L. amazonensis* (B) *L. braziliensis*. As setas indicam o(s) vacúolo(s) parasitóforo(s). A barra representa 10 μ m.

Mesmo utilizando o dobro de amastigotas axênicos para infectar os promonócitos com *L. braziliensis*, a taxa de infecção e o número de amastigotas obtidos por célula foram sempre inferiores aos obtidos com *L. amazonensis* (TABELA 3). Isto sugere fortemente diferenças nos tempos de geração destes amastigotas e/ou em suas interações com a célula hospedeira, enfatizando diferenças interespecíficas.

Tabela 3: Porcentagem média de infecção e número de amastigotas por célula da linhagem J774.A1 infectada com amastigotas axênicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Espécie	Porcentagem média de infecção	Número médio de amastigotas por célula infectada
<i>L. amazonensis</i> (5:1)	47,8 ± 13	4,5 ± 1,8
<i>L. braziliensis</i> (10:1)	30,1 ± 6,7	2,9 ± 1,1

Os resultados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Espécies como *L. amazonensis* e *L. major* são modelos amplamente utilizados em estudos diversos envolvendo parasitos do gênero *Leishmania* e os resultados obtidos com estas são inferidos também para outras espécies, como *L. braziliensis*. Entretanto, a conhecida diferença entre as espécies de *Leishmania* no que se refere, por exemplo, à sensibilidade aos fármacos, ressalta a importância de pesquisas voltadas para o tratamento específico de formas clínicas das leishmanioses causadas por *L. braziliensis*.

4.6. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e atividade leishmanicida de chalconas

4.6.1. Chalcona 4-metoxichalcona e seus derivados sulfonados

As chalconas derivadas da 4-metoxichalcona (MET) foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade frente a células da linhagem J774.A1 e quanto a sua atividade leishmanicida contra promastigotas e amastigotas axênicos de *L. amazonensis* (TABELA 4).

Os derivados sulfonados da MET foram significativamente ($p < 0,05$) mais tóxicos para as células da linhagem J774.A1 ($CC_{50} = 15,3$ a $61,2\mu\text{M}$) do que a MET não substituída ($CC_{50} = 92,2\mu\text{M}$). Entretanto, com exceção do composto CR50, os demais compostos sulfonados apresentaram significativamente ($p < 0,05$) maior atividade leishmanicida ($CI_{50} = 3,9$ a $15,0\mu\text{M}$) frente às formas promastigotas quando comparados com MET ($CI_{50} = 43,3\mu\text{M}$).

Com exceção do composto CR54, todos os derivados sulfonados apresentaram índices de seletividade (IS) de 2 a 5 vezes superiores ao de MET. O índice de seletividade indica quantas vezes o composto é mais tóxico para o parasito que para a célula hospedeira.

Tabela 4: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e índice de seletividade da 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR).

Chalcona	Linhagem celular		<i>L. amazonensis</i>	
	J774.A1	Promastigotas	Amastigotas axênicas	
	CC_{50} (μM)	CI_{50} (μM)	IS (CC_{50}/CI_{50})	CI_{50} (μM)
MET	92,2 (89,5 – 94,9)	43,3 (31,1 – 60,2)	2,1	153,4 (129 – 182,3)
CR33	55,3 (55,1 – 55,6)	10,7 (9,1 – 12,6)	5,1	116,2 (98,4 – 137,4)
CR34	55,0 (54,3 – 55,7)	13,0 (9,0 – 18,9)	4,2	123,7 (100,8 – 151,9)
CR50	54,7 (53,4 – 55,9)	SA	SA	122,7 (82,7 – 181,9)
CR51	54,5 (54,1 – 54,9)	5,6 (3,2 – 9,8)	9,7	88,6 (72,4 – 108,4)
CR52	54,5 (54,0 – 54,9)	3,9 (1,4 – 11,1)	14	55,6 (42,7 – 72,5)
CR53	61,2 (59,0 – 63,5)	5,6 (4,31 – 7,31)	10,9	54,6 (46,3 – 64,6)
CR54	15,3 (13,7 – 17,0)	15,0 (10,4 – 21,7)	1	121,1 (76,9 – 190,7)
CR55	24,3 (22,1 – 26,9)	7,2 (5,7 – 9,3)	3,4	171,4 (120,6 – 243,5)
CR57	70,1 (64,9 – 75,3)	9,8 (7,1 – 13,6)	7,1	NA
Anfotericina B	NA	0,21 (0,18 – 0,24)	NA	0,43 (0,35 – 0,49)

SA= Sem atividade inibitória contra *Leishmania*; NA= Não avaliado. Dados da CI_{50} para formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidos por Carla Regina Andrighetti-Fröhner (dados não publicados). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%.

A presença dos substituintes na amina aromática do grupo sulfonamida parece ser importante para a eficiência da atividade leishmanicida. A ausência de grupos substituintes, como o composto CR50 anula qualquer atividade contra *L. amazonensis*. Quase todos os substituintes na posição *para* do anel anilina aromático aumentam a atividade leishmanicida (CR51, CR52 e CR53). Pode ser observado que não somente substituintes aceptores de elétrons como também doadores de elétrons na posição 4 aumentam a atividade leishmanicida relativa ao composto CR50. No composto CR55, o grupamento metila parece contribuir significativamente com esta atividade, uma vez que a presença do mesmo faz com que a atividade leishmanicida inexistente em CR50 passe para $CI_{50} = 7,2\mu M$ em CR55.

Quando avaliados contra amastigotas axênicos de *L. amazonensis*, os compostos mostraram atividade significativamente menor (variando de 3 a 23 vezes) do que contra promastigotas da mesma espécie. A falta de disponibilidade do composto CR57 nos impossibilitou de avaliar sua atividade frente às formas amastigotas axênicas.

Contra formas amastigotas axênicas, os compostos mais potentes foram CR51 ($CI_{50} = 88,6\mu M$), CR52 ($CI_{50} = 55,6\mu M$) e CR53 ($CI_{50} = 54,6\mu M$). Entretanto, considerando a atividade da anfotericina B, fármaco utilizado como controle em nossos experimentos, os compostos avaliados foram cerca de 260 a 800 vezes menos ativos que a Anfotericina B contra amastigotas axênicos de *L. amazonensis*.

A grande diferença observada na atividade dos compostos contra formas promastigotas e amastigotas axênicas corrobora as diferenças bioquímicas existentes entre as duas formas do parasito (SERENO; LEMESRE, 1997a; SERENO et al., 1998; CALLAHAN et al., 2001; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONÍSIO, 2004).

Sereno e Lemesre (1997a) obtiveram resultados variados quanto a suscetibilidade de amastigotas axênicos e promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* frente a compostos leishmanicidas tradicionalmente utilizados no tratamento clínico das

leishmanioses. Para o fármaco Pentostan, a CI_{50} variou de 248 a 470 μ g/ml contra promastigota e de 134 a 270 μ g/ml contra amastigotas axênicos. Já a Pentamidina foi aproximadamente dez vezes mais ativa contra promastigotas variando de 0,45 a 1,03 μ M em relação a formas amastigotas onde a CI_{50} variou de 4,52 a 7,95 μ M. Ephros et al. (1999) relatam a atividade estágio-específica do Antimônio Pentavalente (SbV), sendo este 73 a 271 vezes mais ativo contra amastigotas axênicos do que contra promastigotas.

Mesmo observando-se baixa atividade destas chalconas contra amastigotas axênicos, todos os compostos foram avaliados contra formas intracelulares de *L. amazonensis*, para fins comparativos (TABELA 5).

Tabela 5: Atividade leishmanicida *in vitro* da 4-metoxichalcona (MET) e seus derivados sulfonados (CR) contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Chalcona	Porcentual de Inibição (PI) <i>L. amazonensis</i>		
	25 μ M	5 μ M	1 μ M
MET	SA	SA	SA
CR33	SA	SA	SA
CR 34	33,3 \pm 16	SA	SA
CR50	55,3 \pm 22,7	SA	SA
CR51	60,1 \pm 6,5	SA	SA
CR52	77,8 \pm 5,8	57,7 \pm 3,6	SA
CR53	59,5 \pm 19	SA	SA
CR54	95,1 \pm 3	29,1 \pm 8,2	SA
CR 55	SA	SA	SA
CR57	83,5 \pm 10	SA	SA
Anfotericina B	NA	NA	99 \pm 0,7

NA= Não avaliado; SA= Sem atividade inibitória contra *Leishmania*. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Sete dos 10 compostos (70%) apresentaram atividade inibitória da proliferação intracelular na concentração de 25 μ M, com PI (porcentagem de inibição) variando de 33,3% (CR34) a 95,1% (CR54). Destes, apenas dois mantiveram a atividade na concentração de 5 μ M (CR52 e CR54) e em taxas bem menores (PI= 57,7% e PI=29,1%, respectivamente). Nenhum composto apresentou atividade leishmanicida intracelular na concentração de 1 μ M.

A combinação dos grupos chalcona e sulfonamida aumentou a atividade leishmanicida dos compostos contra formas amastigotas intracelulares, quando comparados à chalcona original, MET e seus derivados sulfonados.

A maior atividade dos compostos contra amastigotas intracelulares comparando-se com amastigotas axênicos pode ser devida aos mecanismos de defesa celular como, por exemplo, a produção de óxido nítrico induzida pelo composto (não avaliada no presente estudo). Além disso, é possível que a maior atividade intracelular se deva a mecanismos de concentração e/ou transformação dos compostos no vacúolo parasitóforo favorecendo a atividade antiparasitária (NI; MENG; SIKORSKI, 2004; NOWAKOWSKA, 2007).

Sereno e Lemesre (1997a) utilizando concentrações de Pentamidina iguais às presentes no soro de pacientes em tratamento (0,5 a 0,8 μ M), contra amastigotas axênicos de *Leishmania* não observaram nenhuma atividade leishmanicida. Segundo estes autores, dada a conhecida atividade deste fármaco no tratamento da leishmaniose, tais resultados sugerem um papel importante do macrófago na atividade leishmanicida da pentamidina através da metabolização ou concentração do composto. Contudo, o mecanismo de atuação dos derivados de antimônio permanece ainda desconhecido, apesar de estes compostos estarem em uso clínico há cerca de 100 anos (EPHROS et al., 1999).

4.6.2. Chalconas C, CL e C0

As chalconas das séries C, CL e C0 foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade frente a células da linhagem J774.A1 e quanto à atividade leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (TABELAS 6 e 7).

Tabela 6: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e índice de seletividade de chalconas das séries C, CL, C0.

Chalcona	J774.A1	Promastigotas <i>L. amazonensis</i>	
	CC ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀)
C4	282,1 (271,4 – 293,1)	33,9 (20,9 – 55,0)	8,3
C17	94,0 (92,7 – 95,4)	20,7 (15,6 – 27,5)	4,5
C19	62,2 (58,8 – 65,7)	17,5 (10,2 – 29,6)	3,6
C26	45,8 (41,3 – 50,3)	30,1 (22,9 – 39,8)	1,5
C03	497,6 (312,7 – 792,1)	10,0	49,7
C05	93,1 (92,8 – 93,4)	35,0 (19,4 – 66,8)	2,7
C09	93,3 (92,1 – 94,5)	29,0 (12,9 – 65,0)	3,2
CL2	33,5(32,6– 34,4)	10,0	3,3
CL8	69,3 (57,1 – 84,1)	18,0 (16,7 – 19,3)	3,9
CL10	245,3 (215,2 – 300,5)	90,6 (71,6 – 114,7)	2,7
Anfotericina B	NA	0,21 (0,18 – 0,24)	NA

NA= Não avaliado. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7: Atividade leishmanicida *in vitro* de chalconas das séries C, CL e C0 contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Chalcona	Porcentual de Inibição (PI) <i>L. amazonensis</i>				
	200 μ M	100 μ M	50 μ M	25 μ M	5 μ M
C4	NA	74,8 \pm 6,6	SA	SA	SA
C17	NA	Citotóxico	SA	SA	SA
C19	NA	Citotóxico	67,7 \pm 12,2	SA	SA
C26	NA	Citotóxico	Citotóxico	SA	SA
C03	98,8 \pm 1	93,6 \pm 5,3	55,2 \pm 7,9	SA	SA
C05	NA	94,7 \pm 3	SA	SA	SA
C09	NA	99,6 \pm 0,4	SA	SA	SA
CL2	NA	Citotóxico	SA	SA	SA
CL8	NA	Citotóxico	SA	SA	SA
CL10	NA	SA	SA	SA	SA

NA= Não avaliado; SA= Sem atividade inibitória contra *Leishmania*. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Este grupo de compostos apresentou citotoxicidade e atividade leishmanicida contra promastigotas variando de $CC_{50} = 33,5\mu\text{M}$ (CL10) a $497,6\mu\text{M}$ (C03) e $CI_{50} = 10\mu\text{M}$ (C03 e CL2) a $90,6\mu\text{M}$ (CL10). O índice de seletividade dos compostos variou de 1,5 a 49,7.

As chalconas da série C0 (C03, C05 e C09) que tiveram atividade biológica mais expressiva, são chalconas naturais que possuem no anel A um radical oxigenado. Estas três chalconas foram as que apresentaram maior atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares, sugerindo correlação entre a presença do radical oxigenado e a atividade. A chalcona C03 apresentou o melhor índice de seletividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (49,7) e foi o composto mais ativo contra formas intracelulares.

A diferença entre os compostos C03 e C05 é a presença do grupo hidroxila na posição *para* do anel B em C05. O composto C05 foi mais citotóxico e menos ativo, tanto contra

promastigotas quanto contra amastigotas intracelulares. De forma semelhante, modificações na estrutura do radical ligado ao anel A em C09 causaram redução no índice de seletividade do composto contra promastigotas e amastigotas intracelulares.

Os compostos da série CL apresentaram atividade semelhante aos da série C0 contra formas promastigotas, não tendo por outro lado apresentado atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares. Além disso, todos os compostos CL mostraram-se muito citotóxicos frente a células da linhagem J774.A1.

Para a série C de compostos, o índice de seletividade variou de 1,5 a 8,3. O composto C4, que apresenta um Cloro na posição 4 do anel B apresentou o melhor índice de seletividade e reduziu a infecção celular em 74,8% na concentração de 100µM. O composto C26 que apresenta duas moléculas de Cloro no anel A e uma hidroxila no anel B apresentou uma elevada citotoxicidade ($CC_{50} = 45,8 \mu\text{M}$) e nenhuma atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares.

Boeck et al. (2006) avaliaram a atividade de chalconas e seus análogos, verificaram uma correlação positiva entre a atividade citotóxica do composto e o número de radicais Cl na molécula. Em nossos estudos, os compostos C26, CR53, CL8 que apresentam dois átomos de Cloro foram também os mais citotóxicos, corroborando os dados da literatura.

A figura 10 apresenta resultados representativos da avaliação microscópica dos experimentos contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

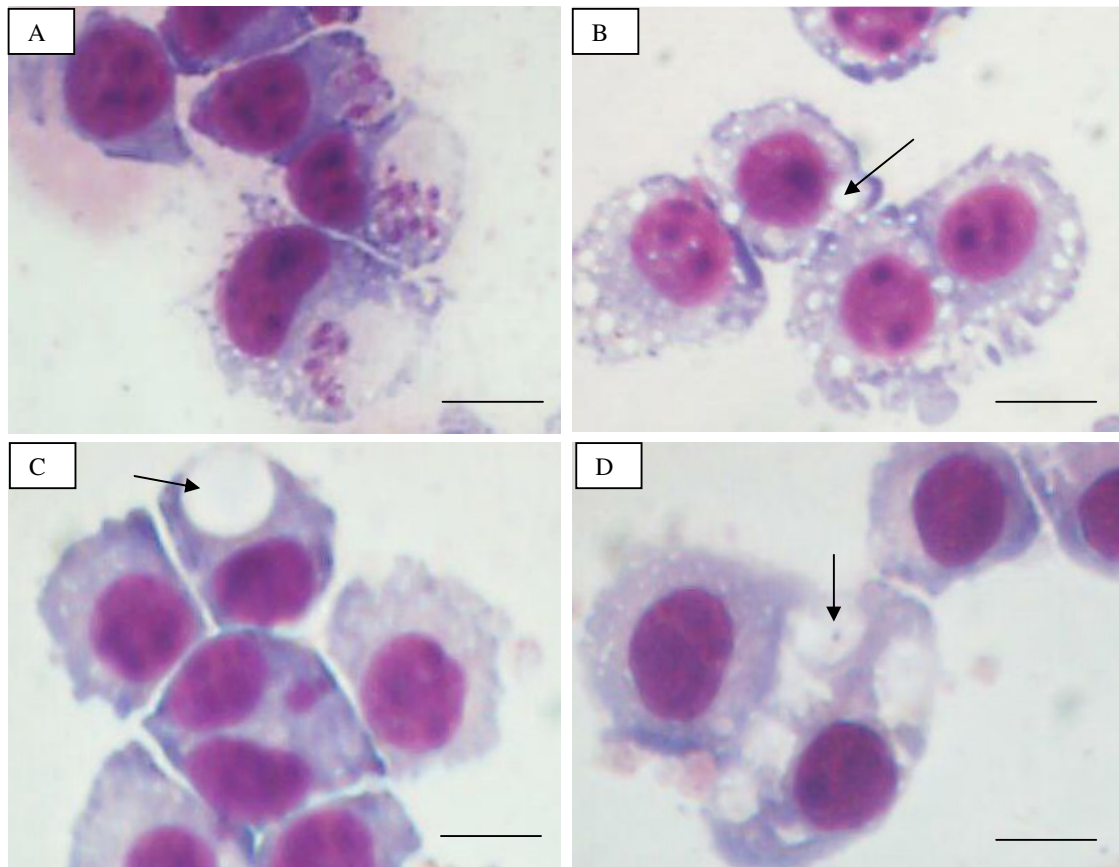


Figura 10: Resultados representativos da avaliação microscópica de células da linhagem J774.A1 infectadas com *L. amazonensis* coradas pelo Giemsa (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO por 48 horas; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de $1\mu\text{M}$ por 48 horas; (C) Tratamento com CR54 na concentração de $25\mu\text{M}$ por 48 horas; (D) Tratamento com C03 na concentração de $100\mu\text{M}$ por 48 horas. As setas apontam os vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa $10\mu\text{m}$.

4.6.3. Chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona (série L) e da 2-naftilacetofenona (série R)

As chalconas das séries L e R foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade frente a células da linhagem J774.A1 e atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* (TABELA 8).

Tabela 8: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1, atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e índice de seletividade de chalconas das séries L e R.

Chalcona	J774.A1	Promastigotas <i>L. braziliensis</i>	
	CC ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀)
L2	56,0 (54,9 – 57,2)	8,3 (6,9 – 9,9)	6,7
L3	110,5 (97,3 – 125,4)	13,6 (12,9 – 14,3)	8,1
L17	248,1 (196,0 – 314,1)	13,1 (12,2 – 14,0)	18,9
L23	56,0 (54,7 – 57,4)	14,5 (12,8 – 16,4)	3,9
L25	54,2 (53,0 – 55,4)	11,6 (10,2 – 13,2)	4,7
L26	55,8 (54,5– 57,1)	7,1 (5,2 – 9,6)	7,9
L29	53,9 (51,6 – 56,3)	13,2 (12,7 – 13,8)	4,1
R7	33,9 (33,3 – 34,6)	6,7 (5,1 – 8,9)	5,1
R13	35,5 (35,0 – 36,0)	4,8 (2,9 – 8,0)	7,4
R15	45,9 (44,3 – 47,6)	12,5 (11,8 – 13,3)	3,7
R19	76,0 (68,2 – 84,7)	10,9 (9,2 – 13,0)	7,0
R29	1375,0 (337,3 – 1901,6)	16,4 (14,6 – 18,5)	83,8
R32	56,0 (55,4 – 56,5)	< 1	> 56
R36	58,9 (56,4 – 57,3)	11,7 (11,3 – 12,0)	5,0
Anfotericina B	NA	0,23 (0,16 – 0,26)	NA

Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%.

Todos os 14 compostos avaliados apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas com índice de seletividade variando de 3,7 a 88,3. No entanto, nenhum destes compostos apresentou atividade contra formas amastigotas intracelulares em concentrações \leq que 50 μ M (FIGURA 11). À exceção dos compostos L3, R19 e R29 que não foram citotóxicos para macrófagos infectados, os demais compostos destruíram totalmente as monocamadas na concentração de 50 μ M. O composto L17, que apresentou baixa citotoxicidade ($CC_{50}=248,1\mu$ M), causou destruição nas monocamadas de J774.A1 infectadas com *L. braziliensis* na concentração de 50 μ M. É plausível aceitar que células infectadas por *Leishmania* apresentem maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos de compostos que células não infectadas. BRITO et al. (2006) mostraram que macrófagos da linhagem J774 infectados por *L. braziliensis* foram significativamente mais sensíveis que as células não infectadas frente ao composto testado. Esta maior susceptibilidade de células infectadas pode ser decorrente de alterações no potencial de membrana do macrófago causadas pelo parasito, conforme demonstrado por Forero et al. (1999).

Com estas séries de chalconas L e R, observamos a total ausência de correlação entre atividade contra promastigotas e amastigotas intracelulares. O composto R32, apesar de haver apresentado boa atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. braziliensis* ($CI_{50} < 1\mu$ M) não apresentou atividade contra formas amastigotas intracelulares em concentrações $\leq 25\mu$ M (FIGURA 11).

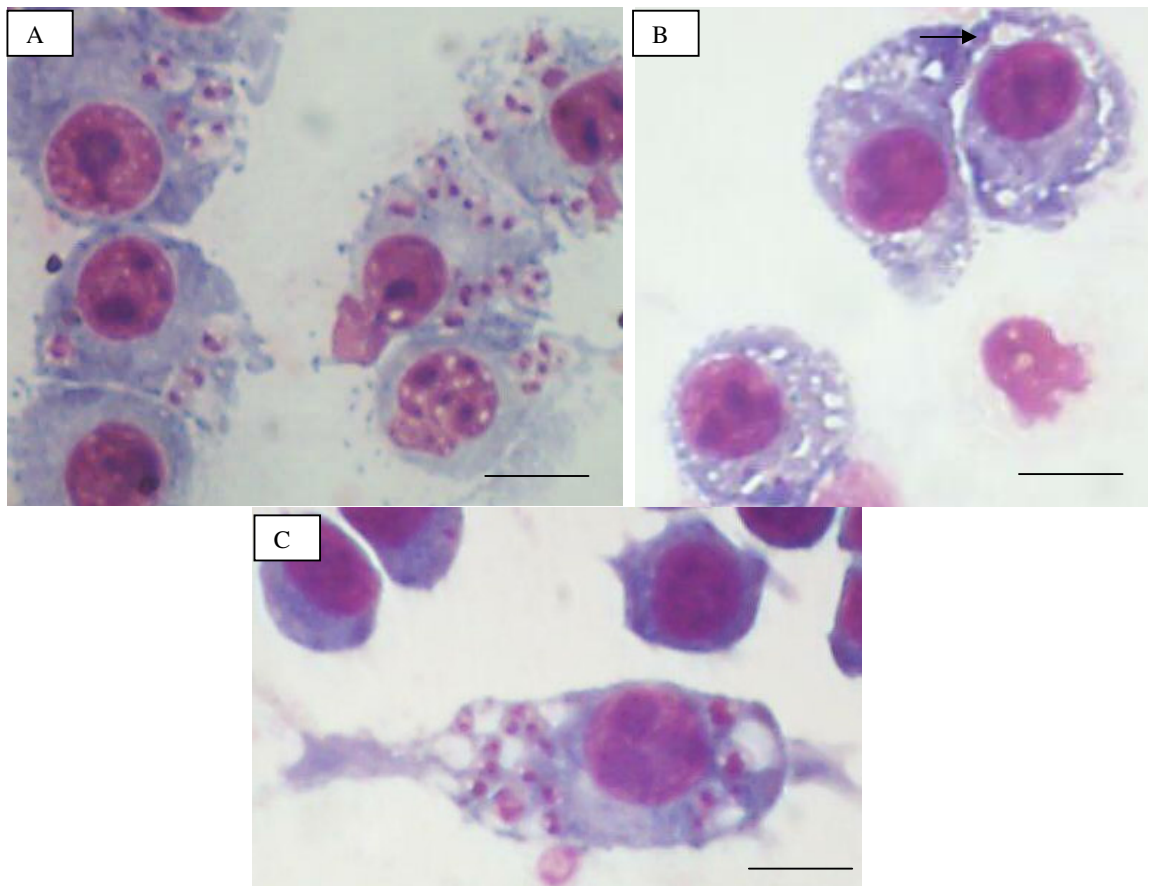


Figura 11: Resultados representativos da avaliação microscópica de células da linhagem J774.A1 infectadas com *L. braziliensis* coradas pelo Giemsa. (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de $1\mu\text{M}$ por 48 horas; (C) Tratamento com R32 na concentração de $25\mu\text{M}$. A seta aponta um vacúolo parasitóforo vazio. A barra representa $10\mu\text{m}$.

Neste sentido, embora mais trabalhoso, o modelo de amastigotas intracelulares apresenta vantagens significativas em relação ao modelo de promastigota, uma vez que os resultados obtidos permitem avaliar não apenas a atividade leishmanicida do composto, mas também determinar a atividade citóxica do mesmo.

No presente estudo, o mecanismo de ação das chalconas que apresentaram atividade leishmanicida não foi investigado. Diversos autores tem relacionado a atividade leishmanicida de chalconas à uma ação inibitória sobre enzimas mitocondriais do parasito, como a fumarato redutase, succinato desidrogenase, NADH desidrogenase, succinato redutase e NADH citocromo c redutase (CHEN et al., 1993; ZHAI et al., 1995; TORRES-SANTOS et al., 1999; ZHAI et al., 1999; CHEN et al., 2001; NOWAKOWSKA, 2007).

A Licochalcona A, uma chalcona oxigenada isolada das raízes de uma planta chinesa (*Glycyrrhiza*), inibiu o crescimento de *L. major* e *L. donovani*, com $CI_{50} = 2,5 - 4 \mu\text{g/ml}$ contra formas promastigotas e causou redução significativa no número de amastigotas intracelulares em concentrações de $1 - 0,5 \mu\text{g/ml}$ (CHEN et al., 1993). Estes autores verificaram um completo desaparecimento dos amastigotas intracelulares em concentrações de 5 e $10 \mu\text{g/ml}$ do composto. A atividade leishmanicida de licochalcona A foi atribuída a alterações estruturais e funcionais causadas especificamente na mitocôndria do parasito (ZHAI et al., 1995). Estudos posteriores envolvendo outras chalconas oxigenadas demonstraram que a atividade leishmanicida destes compostos é devida à inibição da enzima mitocondrial fumarato redutase bloqueando especificamente a captação e transporte de glicose pelo parasito (ZHAI et al., 1999; CHEN et al., 2001).

Entretanto, nem todas as chalconas parecem agir de forma semelhante. Boeck et al. (2006) sintetizaram e testaram atividade leishmanicida de análogos da DMC e 3 destes, contendo grupamentos nitro, flúor e bromo apresentaram atividade seletiva aumentada contra os parasitos, quando comparados com a chalcona não substituída. Os autores sugerem que a atividade destas chalconas não parece ser relacionada à inibição da enzima fumarato-redutase, divergindo então do mecanismo de ação da Licochalcona A.

A 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC), isolada de inflorescências de *Piper aduncum*, demonstrou significativa atividade *in vitro* contra promastigotas e amastigotas

intracelulares de *L. amazonensis*, com doses efetivas 50% de 0,5 e 24µg/ml, respectivamente (TORRES-SANTOS, 1999). Segundo estes autores, o efeito inibitório em amastigotas é aparentemente devido a uma ação direta do composto no parasito, e não a uma ativação do metabolismo oxidativo de nitrogênio da célula hospedeira, uma vez que a produção de óxido nítrico por macrófagos, estimulados ou não com interferon gama recombinante foi reduzida e não aumentada na presença da DMC.

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complexo e moroso que requer além de uma sofisticada infraestrutura e equipes multidisciplinares, um considerável aporte de recursos financeiros. O fármaco a ser colocado no mercado tem que ter propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desejáveis (meia vida de pelo menos 12 horas, capacidade de penetrar o citoplasma celular e atingir a molécula alvo) e não causar efeitos colaterais (TROUILLER et al., 2001; URBINA; DOCAMPO, 2003).

A importância de se trabalhar com compostos sintetizados reside na possibilidade de alterações dirigidas na estrutura química, incluindo ou substituindo radicais à molécula para torná-la mais ativa e direcionada para alvos específicos e desta forma aumentar sua atividade específica e minimizar seus efeitos colaterais.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que algumas chalconas substituídas, bem como chalconas naturais podem se constituir em moléculas protótipos de interesse para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento das leishmanioses.

5. CONCLUSÕES

- Nas condições de cultivo padronizadas no presente estudo foi possível obter amastigotas axênicos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* com taxas de $93 \pm 2,6$ e $97 \pm 1,2$, respectivamente;
- Utilizando amastigotas axênicos de *L. braziliensis* (10:1) e *L. amazonensis* (5:1) foi possível obter taxas de infecção de $30,1 \pm 6,7$ e $47,8 \pm 13$ para a linhagem celular J774.A1 submetida a infecção por 16 horas em meio RPMI-1640 suplementado com 20% SBF a 34°C;
- A linhagem celular J774.A1 constitui-se em um modelo adequado para avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos;
- Uma baixa correlação da atividade leishmanicida dos compostos testados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares e/ou axênicos foi observada;
- As chalconas que apresentaram a maior atividade leishmanicida foram em geral também as mais citotóxicas para a linhagem J774.A1;
- A combinação de dois grupamentos farmacofóricos distintos (chalcona e sulfonamida) aumentou a atividade leishmanicida dos compostos;
- As chalconas das séries R e L embora ativas contra formas promastigotas, não apresentaram qualquer atividade leishmanicida contra formas intracelulares em concentrações $\leq 50\mu\text{M}$.
- Os compostos mais promissores para futuros estudos *in vivo* são os do grupo C0: C03, C05 e C09.

6. REFERÊNCIAS

- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 8, n. 16, p. 2689-2699, 2007.
- BALANCO, J.M.F.; PRAL, E.M.F.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A.T.; MORTARA, R.A.; ALFIERI, S.C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitol.**, v. 116, p. 103-113, 1998.
- BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N.; ZILBERSTEIN, D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 141, p. 99-108, 2005.
- BOECK, P.; FALCÃO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; FILHO, V.C.; TORRES-SANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BRITO, S.; CRESCENTE, O.; FERNÁNDEZ, A.; CORONADO, A.; RODRIGUEZ, N. Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Biomédica**, v. 26, supl. 1, p. 180-187, 2006.
- CALLAHAN, H.L.; PORTAL, A.C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.
- CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J.L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 410-4, 2007.
- CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.
- CHANG, K.P. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, v. 209, p. 1240-1242, 1980.
- CHANG, K.P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B.S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Trop.**, v. 85, n. 3, p. 375-90, 2003.
- CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, n. 12, p. 2550-2556, 1993.

- CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S.B.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n. 7, p. 2023-2029, 2001.
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, p. 3-17, 2005.
- CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 399-410, 2006.
- CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CAÑAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian J. Med Res.**, v. 123, n. 3, p. 357-88, 2006.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, p. 132-141, 2002.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.
- DA SILVA, S.A.; COSTA, G.S.S.; ROSSI-BERGMAN, B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. **Parasitol.**, v. 118, pt. 6, p. 575-82, 999.
- DARLING, T.N.; BLUM, J.J. *In vitro* reversible transformation of *Leishmania braziliensis panamensis* between promastigote and ellipsoidal forms. **J. Protozool.**, v. 34, n. 2, p. 166-168, 1987.
- DEBRABANT, A.; JOSHI, M.B.; PIMENTA, P.F.P.; DWYER, D.M. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 205-217, 2004.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-43, 2001.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, p. 3-15, 2003.
- DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BEAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.
- Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria do Estado de Saúde (DIVE/SC) Informativo epidemiológico. Ano V – nº 01/2007. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/informativo_epidemiologico/Informativo_Epidemiologico_2007-01.pdf> Acessado em 15/12/2007.

- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol. Int.**, v. 54, p. 119-122, 2005.
- EGER-MANGRICH I.; SCHOLL, D.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Levantamento clínico epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no Estado de Santa Catarina no período de 2003 a 2005. Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. Uberaba, MG, 2005.
- EPERON, S.; McMAHON-PRATT, D.I. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. **J. Protozool.**, v. 36, n. 5, p. 502-510, 1989a.
- EPERON, S.; McMAHON-PRATT, D.I. Extracellular amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. II. Stage- and species-specific monoclonal antibodies. **J. Protozool.**, v.36, n. 5, p. 510-518, 1989b.
- EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 2, p. 278-82, 1999.
- FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 224-230, 2004.
- GASPAR, R.; OPPERDOES, F.R., PREAT, V.; ROLAND, M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania. donovani*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 86, n. 1, p. 41-9, 1992.
- GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S.L.; FROMMEL, D. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta trop.**, v. 51, p. 237-245, 1992.
- GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana In **Parasitologia Humana** NEVES, D.P. editor. Editora Atheneu, 10^a edição, p. 97-100, 2003.
- GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A.K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 3, p. 150-153, 2001.
- GUTTERIDGE, C.E.; VO, J.V.; TILLET, C.B.; VIGILANTE, J.A.; DETTMER, J.R.; PATTERSON, S.L.; WERBOVETZ, K.A.; CAPERS, J.; NICHOLS, D.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; GERENA, L. Antileishmanial and antimalarial chalcones: Synthesis, efficacy and cytotoxicity of pyridinyl and naphthalenyl analogs. **Med. Chem.**, v. 3, p. 115-119, 2007.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; CARVALHO-PINTO, C.J.; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H.K.; LIMA, J.H.; ROMANHA, A.J.; CAMPBELL, D.A. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Trop.**, v. 74, p. 89-93, 2000.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. In *Advances in Parasitology* John Baker; Ralph Muller; David Rollinson, v. 44, Academic Press, 2000.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-70, 2000.

HODGKINSON, V.H.; SOONG, L.; DUBOISE, S.M.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Exp. Parasitol.**, v. 83, n. 1, p. 94-105, 1996.

HOTEZ, P.J.; REMME, J.H.; BUSS, P.; ALLEYNE, G.; BREMAN, J.G. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n.6, p.871-8, 2004.

KO, H.H.; TSAO, L.T.; YU, K.L.; LIU, C.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, n. 1, p. 105-11, 2003.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2056-7, 2005.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; CROFT, S.L.; TAN, A.L.; GO, M.L. Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, n. 13, p. 2729-38, 2003.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORRÊA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

MACHADO, P.E. **Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania* spp. Em amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Santa Catarina.** 2004. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MADEIRA, M.; BARBOSA-SANTOS, E.; MARZOCHI, M. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic *Leishmania* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 645-8, 1999.

MARCONDES, C.B.; CONCEIÇÃO, M.B.; PORTES, M.G.; SIMÃO, B.P. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 4, p. 353-5, 2005.

MARCONDES, C.B.; BITTENCOURT, I.A.; STOCCO, P.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. First report of natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (Viannia) sp. in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 2008 *in press*.

MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue[®]. **Parasitol. Int.**, v. 48, p. 265-269, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, 2ª Edição, 182 p., 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acessado em: 20/01/2008.

MORISHIGE, K.; AJI, T.; ISHII, A.; YASUDA, T.; WATAYA, Y. *Leishmania donovani*: Pilot study for evaluation of therapeutic effects of inosine analogs against amastigotes *in vitro* and *in vivo*. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 665-671, 1995.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-77, 2005.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opin. Ther. Patents**, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 125-137, 2007.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M.A.; TORRADO, J.J.; BOLÁS-FERNADEZ, F.; ALUNDA, J.M. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, n. 4, p. 325-9, 2007.

PAN, A. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. **Exp. Parasitol.**, v. 58, p. 72-80, 1984.

PAN, A.A.; DUBOIE, M.; EPERON, S.; RIVAS, L.; HODGKINSON, V.; TRAUB-CSEKO, Y.; McMAHON-PRATT, D. Developmental life cycle of *Leishmania* – Cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. **J. Euk. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 213-223, 1993.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 108, n. 12, p. 3715-3724, 1995.

REITHINGER, R.; MOHSEN, M.; WAHID, M.; BISMULLAH, M.; QUINNELL, R.J.; DAVIES, C.R.; KOLACZINSKI, J.; DAVID, J.R. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. 8, p.1148-55, 2005.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, v. 7, n.9, p. 581-596, 2007.

SÃO-THIAGO, P.T.; GUIDA, U. Cutaneous leishmaniasis in western region of the state of Santa Catarina, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, n. 4; p. 201-3, 1990.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 12, p. 3097-102, 1998.

SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Int.**, v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007.

SERENO, D.; LEMESRE, J.L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 972-6, 1997a.

SERENO, D.; LEMESRE, J.L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Parasitol. Res.**, v. 83, n.4, p. 401-3, 1997b.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their applications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471-478, 1994.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SMEJKAL, R.M.; WOLFF, R.; OLENICK, J.G. *Leishmania braziliensis panamensis*: Increased infectivity resulting from heat shock. **Exp. Parasitol.**, v. 65, n. 1, p.1-9, 1988.

TANAKA, A.K.; VALERO, V.B.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 3, p. 487-92, 2007.

TEIXEIRA, M.C.A.; SANTOS, R.J.; SAMPAIO, R.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS-SANTOS, W.L.C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 963-968, 2002.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; FILHO, B.P.D.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 1, p.176-82, 2005.

TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 5, p. 1234-1241, 1999.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.L. Drug development output from 1975 to 1996: what proportion for tropical diseases? **Int. J. Infect. Dis.**, v. 3, p. 61-63, 1999.

TROUILLER, P.; TORREELE, E.; OLLIARO, P.L.; WHITE, N.; FOSTER, S.; WIRTH, D.; PÉRCOUL, B. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, n. 11, p. 945-51, 2001.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v.19, n.11, p.495-501, 2003.

Vigilância epidemiológica/ Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21918> Acessado em 12/12/07.

WATKINS, B.M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 447-448, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Control of Leishmaniasis. **WHO Tech. Rep. Ser.**, v. 793, 1990.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 12, p. 2742-2748, 1995.

ZHAI, L.; CHEN, M.; BLOM, J.; THEANDER, T.G.; CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, p. 793-803, 1999.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 449-470, 1994.

7. ANEXOS

Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population

Daniela Gaspar da Silva^a, Emma Barton^a, Nancy Bunbury^{b,c},
Patricia Lunness^a, Diana J. Bell^b, Kevin M. Tyler^{a,*}

^a BioMedical Research Centre, School of Medicine, Health Policy and Practice, University of East Anglia, Norwich, Norfolk NR4 7TJ, United Kingdom

^b Centre for Ecology, Evolution and Conservation, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, Norfolk NR4 7TJ, United Kingdom

^c Mauritian Wildlife Foundation, Grannum Road, Vacoas, Mauritius

Received 18 July 2006; received in revised form 8 January 2007; accepted 9 January 2007

Available online 16 January 2007

Abstract

Columbids (pigeons and doves) are the primary host of *Trichomonas gallinae*, the flagellate protozoon which causes avian trichomoniasis, a widespread, often lethal disease. Although predominantly apathogenic, the organism is paradigmatic for the study of strain-specific virulence, with some strains causing greater than 75% mortality and epizootic die-offs in wildlife populations. In recent years, research on this important emerging pathogen has been neglected and genetic variation within the parasite has not hitherto been investigated. The pink pigeon (*Columba mayeri*), endemic to Mauritius and one of the world's rarest pigeons, suffers high levels of nestling/fledgling mortality from trichomoniasis. As a closed oceanic island population with recorded life-history parameters for all birds, this species represents a unique resource for the study of this host–parasite interaction. To investigate genetic variation within *T. gallinae* in Mauritian columbids, isolates were collected from pink pigeons and another widespread species, the Madagascar turtle-dove (*Streptopelia picturata*). Comparison of the 5.8S region of rDNA and surrounding internally transcribed spacer regions (ITS) showed no sequence variation between isolates or with an unrelated but previously sequenced *T. gallinae* isolate (Genbank). This confirmed all 24 isolates as *T. gallinae*, and defined this section of the genome as a good species marker. In contrast, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of the isolates revealed considerable genotypic variation between isolates. RAPD genotypes appeared to correlate with geographic distribution and host species, suggesting inter-species transmission and rapid host adaptation by the parasite.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trichomonas gallinae*; Endangered species; Molecular epidemiology; Molecular evolution; Pink pigeon

1. Introduction

Trichomonas gallinae is the causative agent of avian trichomoniasis, or canker, an often lethal and epizootic disease. Although columbiform birds (pigeons and doves) are considered to be the primary hosts of *T. gallinae*, infection occurs in many other avian orders worldwide, including both wild and domestic birds (Stabler, 1954). Because it is not known whether *T. gallinae* is a single species or a group of species and whether virulent strains are simply the result of shifts in one or two key virulence determinants, or represent entirely different genotypes which could be described as separate species or

subspecies; this study set out to assess the degree of genetic diversity between isolates of this pathogen.

Trichomonas gallinae is widespread in columbiforms but is often apathogenic, with strains varying markedly in their virulence, and this has been attributed to phenotypic features such as haemolytic activity. Differential virulence has been demonstrated for other trichomonads, such as *T. vaginalis*, and is strongly associated with genetic strain variability (Vanacova et al., 1997). Virulent strains of *T. gallinae* cause large economic impacts through the loss of avian livestock, and pose problems for wild avian species. For instance, *T. gallinae* has been implicated in recent die-offs of greenfinches *Carduelis chloris* in the UK (Holmes and Duff, 2005; Lawson et al., 2006). Historically it has been speculated that *T. gallinae* may have played a role in the final demise of the extinct passenger

* Corresponding author. Tel.: +44 1603 591225; fax: +44 1603 593752.

E-mail address: k.tyler@uea.ac.uk (K.M. Tyler).

pigeon, *Ectopistes migratorius* (Stabler, 1954; Hoefle et al., 2004).

The oceanic island of Mauritius has seen a number of avian extinctions since human colonisation, including that of the dodo, *Raphus cuculatus*. The last remaining endemic columbid species, the pink pigeon, *Columba mayeri*, declined to just 15–20 individuals in the 1970s (Durrell, 1984; Jones, 1987). An integrated species and habitat recovery programme has successfully increased the total pink pigeon population size to around 350 birds in 5 subpopulations. As a result of intensive monitoring, all birds have been individually marked with numbered and coloured leg rings and long-term data on life-history parameters, such as reproductive success and survivorship, have been collected (Jones, 2004). In addition to the endemic pink pigeon, other species such as the Madagascar turtle-dove, *Streptopelia picturata*, are now widespread across Mauritius and may be acting as reservoir hosts for *T. gallinae* infection (Bunbury, 2006). The pink pigeon population has fluctuated between 300 and 370 individuals since 2000 and trichomoniasis has been highlighted as a major mortality factor (Swinnerton et al., 2005; Bunbury, 2006).

Strain variation as an explanation of differential virulence for avian trichomonads is well established (BonDurant and Honigberg, 1994) and may contribute to the fluctuating levels of infection, morbidity and mortality observed within pink pigeon subpopulations. Virulence also depends on other factors such as previous exposure to the pathogen (protective immunity) and individual immunocompetence. The latter can be affected by factors such as age, concurrent disease, genetic heterogeneity and food availability (Stabler and Braun, 1975; Swinnerton et al., 2005).

In the present study, we used molecular techniques (amplification and sequencing of the ITS1/5.8S/ITS2 region) to confirm that the parasites found in the crop of the Mauritian pink pigeon and Madagascar turtle-dove are *T. gallinae* and then investigate the genetic variability between these isolates using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. We also relate *T. gallinae* genotype to life-history parameters

available for those individuals from which the parasite isolates were collected to investigate the genetic heterogeneity of *T. gallinae* in Mauritius.

2. Material and methods

2.1. Parasites

Samples were derived from primary (crop) cultures incubated in InPouch TF culture kits (BioMed Diagnostics, San Jose, Ca, USA) from 24 *Trichomonas*-infected, Mauritian columbids including 19 pink pigeons of known sex, age and subpopulation and 5 Madagascar turtle-doves (for further details on sampling technique see Bunbury et al., 2005).

Each sample consisted of 25–50 μ l of primary culture suspended in 1 ml DNazol[®] stored at room temperature for no more than 1 month prior to processing. Samples were collected from birds in all five pink pigeon subpopulations; Combo, Bel Ombre, Ile aux Aigrettes, Pigeon Wood and Plaine Lievre (Fig. 1). To determine whether isolates were species-specific, samples were also collected from infected Madagascar turtle-doves, sampled at a sixth location (Petrin) in Mauritius. Details of the life-history of all birds sampled are compiled in Table 1.

2.2. DNA preparation

Genomic DNA was isolated from each DNazol[®] homogenised sample using protocol detailed at www.mrcgene.com/dnazol.htm with slight modifications. Samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at room temperature and 500 μ l of 100% ethanol was added to the resulting supernatant. Samples were mixed by inversion and left to stand at room temperature for 3 min. Further centrifugation of $10,000 \times g$ for 10 min at room temperature, was used to separate out DNA by sedimentation. The DNA pellet was washed twice, using 75% ethanol. Following each addition of ethanol, the pellet was resuspended and sedimented by 10 min centrifugation at $10,000 \times g$. The DNA pellet was air-dried, solubilised in

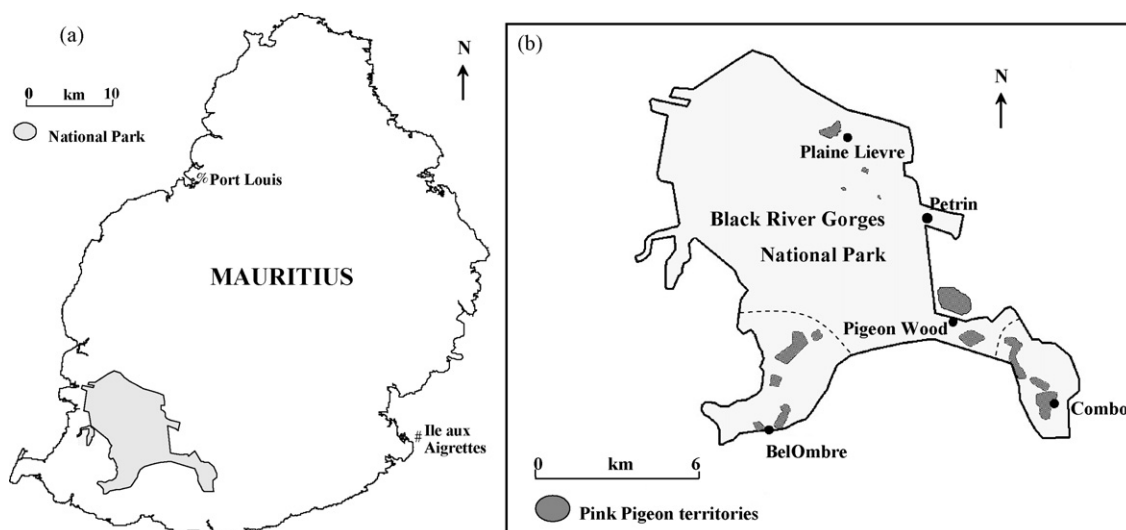


Fig. 1. Map of Mauritius Island, showing the location of the 5 pink pigeon populations. Taken from Bunbury (2006) with consent.

Table 1
Summary of information from life-histories for each columbid

#	ID	Species	Age (years)	Sex	Capture site	Hatch site
1	0729	CM	7	F	BO	Captive
2	0731	CM	7	F	BO	Captive
3	6-84263	CM	1	F	PW	PL
4	6-84255	CM	1	F	PW	PL
5	6-23079	CM	2	M	PL	PL
6	R226	SP	n/a	n/a	PETRIN	n/a
7	R232	SP	n/a	n/a	PETRIN	n/a
8	R239	SP	n/a	n/a	PETRIN	n/a
9	R241	SP	n/a	n/a	PETRIN	n/a
10	R244	SP	n/a	n/a	PETRIN	n/a
11	A157	CM	8	M	PW	PW
12	A202	CM	9	M	BO	BO
13	6-23000	CM	3	M	IAA	IAA
14	6-23176	CM	0	F	IAA	IAA
15	6-23181	CM	0	M	IAA	IAA
16	0732	CM	7	F	BO	Captive
17	6-23024	CM	4	M	COMBO	COMBO
18	6-22891	CM	5	M	COMBO	IAA
19	6-22938	CM	2	F	BO	BO
20	6-22949	CM	2	F	COMBO	COMBO
21	6-23034	CM	3	M	COMBO	COMBO
22	6-23051	CM	4	M	PL	PL
23	6-23107	CM	4	M	BO	PW
24	6-23127	CM	3	M	COMBO	PW

CM: *Columba mayeri*, SP: *Streptopelia picturata*, F: female, M: male, BO: Bel Ombre, PW: Pigeon Wood, IAA: *Ile aux Aigrettes*, PL: Plaine Lievre, n/a: not available data.

100 µl distilled water and stored at 4 °C. DNA concentrations for each isolate were obtained by spectrophotometry, based on absorbance readings at 260 nm.

2.3. PCR amplification of the ITS1/5.8S/ITS2 region

Amplification of the ITS1/5.8S/ITS2 region was adapted from Felleisen (1997). Oligonucleotide primers, TFR1 (TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC) and TFR2 (CGGT-AGGTGAACCTGCCGTTGG) were obtained from Qiagen (Qiagen Ltd., Crawley, UK). PCR reactions were undertaken using Taq DNA polymerase reagent kit (Invitrogen Ltd.,

Paisley, UK). Fifty microlitres reaction volumes were used as described in the accompanying protocol, with slight modifications: 1× buffer, 0.5 mM MgCl₂, 80 pmol dNTP mix (Bioline Ltd., London, UK), 1–4 µl DNA, 1.25 U Taq, 0.05% W-1 detergent and autoclaved distilled water to 50 µl. Following 5 min initial denaturation at 94 °C the following profile was applied: 35 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C, annealing for 30 s at 67 °C, extension for 1 min at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 5 min. The amplified product was observed under UV light after ethidium bromide staining of a 1.5% agarose gel.

2.4. Sequencing and phylogenetic analysis of the ITS region

Amplified PCR products were purified at room temperature using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen Ltd.) Sequencing was carried out using ABI capillary DNA sequencer (John Innes Genome Laboratory, Norwich, UK), applying the same primers (TFR1 and TFR2) used for amplification. Results in both directions were aligned and reverse complemented using lasergene analysis software seqman and editseq (DNASTar Inc, Maddison, WI). Sequences were also manually trimmed using the same software. Chromatograms were manually checked and edited using Chromas 2.3 (www.technelysium.com.au). Sequences were submitted online to Genbank using BankIt (identifier: bankit872251 accession number: EF208019).

Homology between available *T. gallinae* strains at this locus was compared using ClustalW software (available in <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/#>). In addition to the 24 newly determined sequences, 13 ITS-1/5.8S/ITS-2 rRNA nucleotide gene sequences from Trichomonadidae were obtained from NCBI Genbank™ (Table 2).

ClustalW version 1.82 was used to generate a pairwise and then multiple alignment algorithm containing the Mauritius consensus nucleotide sequence and the 13 sample sequences. The neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987) was used to generate this alignment and a corresponding phylogenetic tree.

Table 2
List of species and additional GenBank™ information used for comparisons with Mauritian isolates

Species	GenBank™ accession number	Strain	Host	Length of ITS-1/5.8S/ITS-2 region (bp)
<i>Trichomonas gallinae</i>	AY349182	G7	Pigeon	300
<i>Trichomonas gallinae</i>	U8B614	TG	Pigeon	369
<i>Trichomonas canistomae</i>	AY244652	FJRIXI	Dog	328
<i>Trichomonas</i> sp. ^a	AJ784785	24 K	Dog	373
<i>Trichomonas tenax</i>	U86615	Hs-4	Human	368
<i>Trichomonas vaginalis</i>	AY349185	JT	Human	297
<i>Trichomonas vaginalis</i>	AY349184	TO63	Human	297
<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	AY244649	1-11-M2	Chicken	328
<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	AY244648	Z26/7	Chicken	328
<i>Trichomonas</i> sp.	AF236105	–	Pekin duck	372
<i>Tritrichomonas foetus</i>	AF466751	NCSU-TCa	Cat	1395
<i>Tritrichomonas foetus</i>	AF4B6749	NCSU Tfs-1	Cat	1395
<i>Tritrichomonas augusta</i>	AY245163	HYLA	Common tree frog	325

^aTrichomonad species not determined.

2.5. RAPD analysis

Ten nanograms genomic DNA was randomly amplified in 20 μ l final reaction volume, containing 1 \times PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.05U/ μ l *Taq* from *Taq* DNA polymerase reagent kit (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) plus 0.25 μ mol primer. The primers used for this analysis, OPD1, OPD2, OPD3, OPD4, OPD5, OPD6, OPD7, OPD8, OPD9, OPD10, were obtained from Operon Technologies Inc. (Alameda, California). PCR was performed in 0.2 ml eppendorf tubes in a thermocycler using the following conditions: 5 min initial denaturation at 94 °C, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 36 °C for 1 min, extension at 72 °C for 2 min and a final extension of 15 min at 72 °C. A no template control was used for each reaction. PCR products were separated using 10% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide, visualised under UV light and digitally recorded using a Multi Doc-it imaging system (UVP, Inc.).

Amplification was repeated at least twice for each primer, in order to confirm the obtained pattern.

2.6. Heterogeneity analyses

The presence or absence of each band was visually scored (single investigator blinded) and a taxon/character matrix was

constructed. The program FreeTree was used for all computations (Pavlicek et al., 1999). The data was analysed using the Dice similarity coefficient (Dice, 1945), based on band-sharing between all possible pairs in an analysis group, and a matrix of similarity was constructed. The similarity data was then used for unweighted pair group method analysis (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1962), and bootstrap values (for 1000 replicates) were computed. The phenon line marked on the UPGMA indicates the point of reference for dividing the organisms into separate groups.

3. Results

3.1. *ITS1/5.8S/ITS2* amplification and sequencing

Amplification of all 24 isolates produced fragments of 216 base pairs, comprising all of the 5.8S region (158bp) and partial ITS1 (20bp) and ITS2 (38bp) regions. Sequencing of these fragments revealed that all sequences were identical within the region amplified in this study. The consensus sequence (EF208019) was compared to previously known trichomonad ITS sequences. Within the Genbank™ database, sequences corresponding to this region of trichomonad DNA are meagre, with only two *T. gallinae* sequences available. Alignments of these and the Mauritian consensus sequence, revealed the

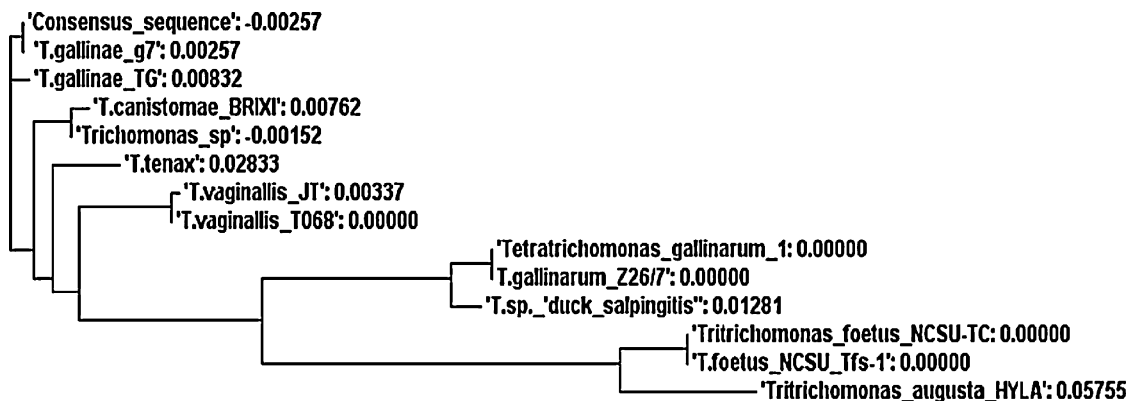
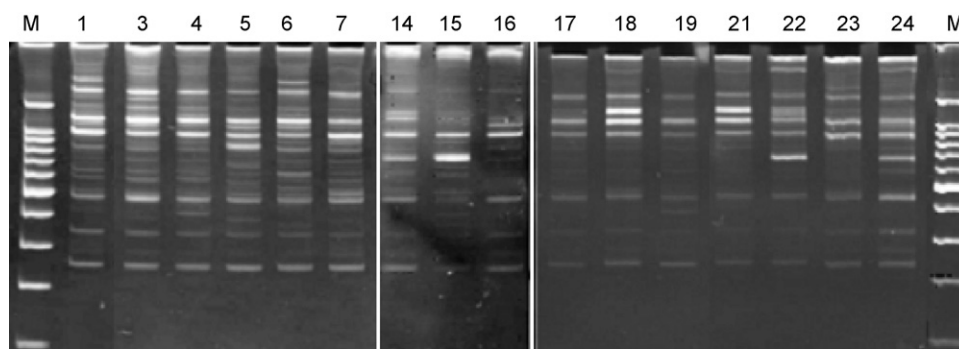


Fig. 2. Phylogenetic tree determining genetic relationship and evolutionary distance between related Trichomonad species. Mauritian *T. gallinae* DNA corresponding to partial ITS-1/5.8S/partial ITS-2 sequence was analysed against other members of the Trichomonad order. Data for tree construction obtained from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The length of each branch is proportional to the amount of evolutionary distance between the different species.



M=100bp DNA ladder *T. gallinae* isolates as numbered.

Fig. 3. Representative RAPD pattern obtained for the isolates. An EtBr stained 10% polyacrylamide gel separating OPD5 obtained pattern is shown.

Mauritian isolates were identical to the *T. gallinae* Brazilian G7 strain sequence (Kleina et al., 2004), and differed at three bases from the other *T. gallinae* isolate available from the Rivolta 1878 strain. One of these base changes was found within the ITS1 sequence, and the other two within the 5.8S sequence. To determine the length of inferred evolutionary change that has occurred between the sampled *T. gallinae* and other members of the Trichomonad order, a phylogenetic tree was constructed (Fig. 2), which clearly segregates *T. gallinae* sequences from other trichomonad species.

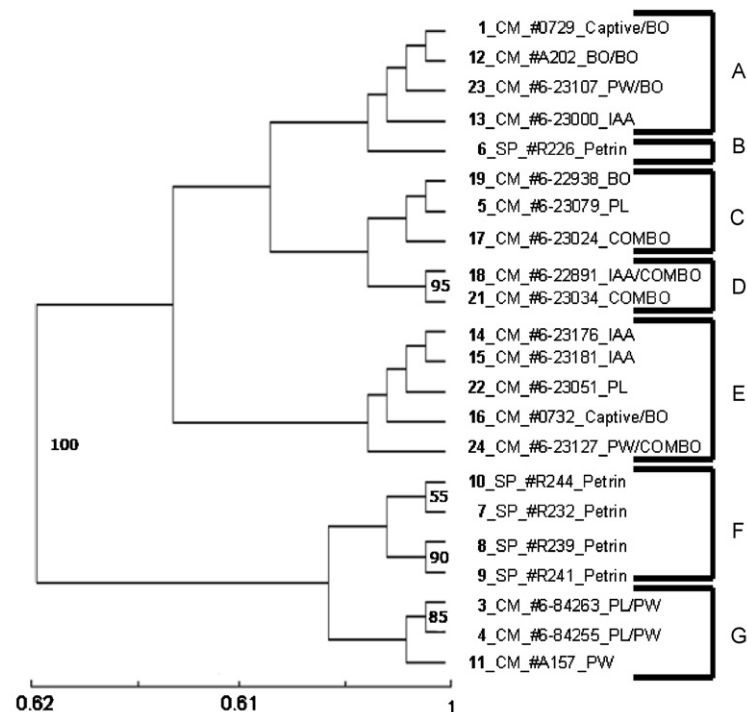
3.2. Heterogeneity

The RAPD technique was used to assess intraspecific variability within *T. gallinae*. Amplification of the DNA samples was tested using 10 random primers. Of these, four resulted in a pattern useful for heterogeneity analysis: OPD3 (GTCGCCGTCA), OPD5 (TGAGCGGACA), OPD7 (TTGGCACGGG) and OPD8 (GTGTGCCCA). Two pink pigeon samples were excluded from the analysis due to weak and inconsistent amplification. Fig. 3 is a representative example of patterns obtained for the other samples. Of the bands obtained, 22 were considered consistent and reliable (reproducing the same band pattern in at least three independent amplifications) and were therefore scored for the different isolates. Of these, eight bands were common to all individuals while 14 were polymorphic. The phenogram divided the isolates into seven distinct groups (Fig. 4). All *T. gallinae* genotypes from the Madagascar turtle-dove were

clustered within two groups, B and F, whilst the pink pigeon isolates were more polymorphic, comprising five groups, with some geographical correlation. Genetic heterogeneity was found within the *T. gallinae* isolates, indicating strain variation within these two columbid species in Mauritius, and demonstrating species-specific and geographical correlations.

3.3. Correlation with geographical distribution and host species

Trichomonas genotypes varied between pink pigeon subpopulations (Fig. 4). By UPGMA analysis of the genotypes two lineages are discerned with a high degree of confidence, with four out of five of the Madagascar turtle-dove derived isolates clustering together within one group (F) of lineage I. Geographically, all samples collected from the Pigeon Wood subpopulation clustered together in group G. In group A, three of the four birds sampled were from Bel Ombre, while in group D, both birds were from Combo. Group E was the most heterogeneous group, comprising birds from the Ile aux Aigrettes, Bel Ombre, Combo and Plaine Lievre subpopulations. Isolates 14 and 15 were from the Ile aux Aigrettes subpopulation clustered closely, whilst the other isolate from the Ile aux Aigrettes, is in group A, together with Bel Ombre isolates. In the case of Group F it is worth further considering that parasites specific to the Madagascar turtle-dove were drawn from a distinct geographical location at Petrin.



CM = *Columba mayeri*, SP = *Streptopelia picturata*, BO= Bel Ombre, PW= Pigeon Wood, IAA = Ile aux Aigrettes, PL= Plaine Lievre. When two locations are indicated, the first is the hatch site and the second is the capture site of the bird.

Fig. 4. Phenogram for *T. gallinae* isolates based on the RAPD data. UPGMA Dice bootstrapping for 1000 replicates was used; the distance matrix was calculated with dice coefficient based on RAPD data from OPD3, OPD5, OPD7 and OPD8 primers, totalling 22 bands.

4. Discussion

Trichomonas gallinae is an economically important pathogen, since it affects avian livestock; and poses a considerable threat to the conservation of threatened species of columbid, their avian predators and also to small passerine species such as finches. Species definition and diagnosis of *T. gallinae* to date remains the product of traditional microbiological methods; trichomonads found in the upper digestive tract of birds are typically named as *T. gallinae*, whilst those from the lower digestive tract and caecum are assumed to be *Tetratrichomonas gallinarum*, another important pathogen of poultry. These two trichomonads are morphologically (and genetically) distinct, allowing for simple differential diagnosis by microscopic examination.

Trichomonas gallinae is a ubiquitous pathogen of columbids; infection is usually asymptomatic but periodically virulent strains of *T. gallinae* cause high mortality among affected pigeons and doves. *T. gallinae* has been recognised as a good model for the study of virulence on the basis of these characteristics (Stabler and Braun, 1975; Narcisi et al., 1991) but these studies did not use molecular techniques to gauge the degree of actual genetic variation. Thus, at the outset of the present study it was unclear whether *T. gallinae* is a single or group of species and whether virulent strains are simply the result of shifts in one or two key virulence determinants (such as haemolytic activity), or represent entirely different genotypes which could be described as separate species or subspecies. To our knowledge, this is the first attempt to assess the degree of diversity within this pathogen.

The ITS1/5.8S/ITS2 region is commonly used to investigate polymorphism within organisms, at both interspecific and intraspecific levels (Cupolillo et al., 1995; Snipes et al., 2000; Walker et al., 2003). The rDNA sequences from a given organism can be important in identifying levels of genetic variability and may, therefore, be potentially useful in characterising different strains or species, being specially recommended for epidemiological studies (Zingales et al., 1999). Phylogenetic studies of the trichomonadidae family (Felleisen, 1997; Kleina et al., 2004) have revealed variation between species in the ITS1/5.8S/ITS2 region. These latter studies did not examine intraspecific variation per se, but previous analysis of the 5.8S sequence from the human trichomoniasis agent, *T. vaginalis*, found complete homology amongst strains sequenced for this region (Katiyar et al., 1995; Snipes et al., 2000).

Our comparison shows that all wildlife isolates of *T. gallinae* sequenced to date at this locus (ITS1/5.8S/ITS2) have identical sequences which differ markedly from sequences of other *Trichomonas* species, pointing this region as a strong species marker and confirming previous morphological and pathological observations in field studies on Mauritius which have identified parasites found in the crops of pigeons and doves as *T. gallinae*. The Rivolta 1878 strain showed polymorphism at three positions within this region. This strain had been in long-term culture, so it is not clear whether some degree of natural polymorphism exists at these nucleotides or whether this was an

artefact of extended culture. Clearly a larger study with diverse isolates would be desirable to evaluate this further.

An interesting point arising from our analysis of this locus is that the *T. gallinae* sequence is quite distinct from that of another avian trichomonad, *Tetratrichomonas gallinarum*, but genetically similar to the canine pathogen *Trichomonas caninistomae*, which causes superficial infection of the canine oral mucosa. Pigeons form part of the prey spectrum of dogs, raising the possibility that *T. gallinae* may have infected (carnivorous) mammals in the past. Although apparent morphological differences argue against a recent species jump, it is clear that *T. gallinae* pathogenesis is not entirely restricted to birds since it is long established as being able to induce pathology in laboratory infected murine models (Honigberg, 1961). Moreover, an analogous species jump for *T. gallinarum* to the human oral mucosa has recently been documented (Cepicka et al., 2005; Kutisova et al., 2005).

Worldwide, there may be more heterogeneity at this locus in *T. gallinae* than is apparent from our small and localised study. If this is supported by subsequent work, the 100% conservation of the ITS1/5.8S/ITS2 observed among the Mauritian *T. gallinae* isolates may be due to the parasite having been introduced relatively recently into the closed island ecosystem. This is believed to have occurred with the introduction of exotic columbid species in the 18th and 19th century (Swinnerton et al., 2005). The absence of heterogeneity amongst Mauritian isolates at the ITS1/5.8S/ITS2 prompted the subsequent use of another procedure for further investigation of strain variation in *T. gallinae*.

The RAPD technique has been found to produce suitable markers for intraspecific analysis of a variety of different organisms including trichomonadidae (Vanacova et al., 1997; Pavlicek et al., 1999; Snipes et al., 2000; Sedinova et al., 2003). RAPD patterns are mainly due to point nucleotide substitutions and allow for phylogenetic relationships to be inferred between strains. However, as most nucleotide changes are selectively neutral, this does not necessarily imply phenotypic variation (Jukes and Kimura, 1984; Williams et al., 1990).

It is likely that interspecies transmission was the route by which *T. gallinae* was introduced into the current pink pigeon population following the bottleneck. The genetic heterogeneity of the isolates uncovered by our RAPD analysis suggests that this was unlikely to be a single event followed by clonal transmission through the species. It is possible that variation has been introduced by multiple instances of inter-specific transmission and that the apparent geographical correlation reflects this. Pink pigeons appear to be more susceptible to infection with *T. gallinae* than the exotic columbid species present in Mauritius (Swinnerton et al., 2005; Bunbury, 2006) which may reflect a relatively short period of exposure and host adaptation to the parasite.

Pigeon Wood is the site where the last remaining wild birds, whose infection status is unknown, were found in the 1970s and isolates from this site are closely related to the Madagascar turtle-dove isolates collected at the nearby Petrin location (Fig. 1).

Birds 3 and 4 both hatched in the Plaine Lievre subpopulation before later dispersal to Pigeon Wood. The strain carried by these two birds was the same as that carried by bird 11 which originated at Pigeon Wood, which suggests acquisition of a local strain and provides evidence for horizontal transmission within the pink pigeon population.

Within the pink pigeon population as a whole, movement between subpopulations, mate-switching and the possibility of simultaneous infections with different strains may explain the non-geographical pattern observed for some isolates such as group C. It is important to note that the presence of multiple infecting strains in an individual could confound the analysis by yielding apparently complex genotypes. The number of samples used in this study, corresponding to 5–6% of the total pink pigeon population, precluded statistically valid correlation between genotypic features, host-specificity and limited geographic correlations. A more wide-ranging analysis, with a larger number of birds and multiple time-points, is planned.

In summary, this study, the first evaluation of *T. gallinae* genotypic heterogeneity, finds no evidence of multiple subspecies of *T. gallinae* in Mauritian columbids. It does, however, confirm that the ITS1/5.8S/ITS2 is an effective species marker and also that there is significant and apparently rapidly evolved genetic heterogeneity between isolates detectable through RAPD analysis, which appears to correlate with host species and geography. Further studies in Mauritius and worldwide, on this neglected pathogen, are strongly warranted.

Acknowledgments

We are grateful to the National Parks and Conservation Service of Mauritius for permission to screen birds within the National Park, C. Jones and the Mauritian Wildlife Foundation for financial and logistical field support, D. Richardson for critical reading of the manuscript, A. Greenwood for veterinary expertise, M. Wexler and P. Hunter for specialist analytical help and BioMed Diagnostics (San José, CA) and Chester Zoo (UK) for financial support. E.B. was part-funded from Wellcome vacation scholarship (# VS/04/EAN/A1/OA/AM/FH).

References

- BonDurant, R.H., Honigberg, B.M., 1994. Trichomonads of veterinary importance. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, pp. 111–206.
- Bunbury, N., 2006. Parasitic disease in the endangered Mauritian pink pigeon *Columba mayeri*. PhD Thesis. University of East Anglia, Norwich, UK.
- Bunbury, N., Bell, D., Jones, C., Greenwood, A., Hunter, P., 2005. Comparison of the InPouch TF culture system and wet-mount microscopy for diagnosis of *Trichomonas gallinae* infections in the pink pigeon *Columba mayeri*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1005–1006.
- Cepicka, I., Kutisova, K., Tachezy, J., Kulda, J., Flegr, J., 2005. Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Vet. Parasitol.* 128, 11–21.
- Cupolillo, E., Grimaldi Junior, G., Momen, H., Beverley, S.M., 1995. Inter-genic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 145–155.
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26, 297–302.
- Durrell, G.M., 1984. *Golden Bats and Pink Pigeons*. Simon and Schuster, New York.
- Felleisen, R.S., 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 115, 111–119.
- Hoefle, U., Gortazar, C., Oritz, J.A., Knipsel, B., Kaleta, E.F., 2004. Outbreak of trichomoniasis in a woodpigeon (*Columba palumbus*) wintering roost. *Eur. J. Wildl. Res.* 50, 73–77.
- Holmes, P., Duff, P., 2005. Inguvitis and oesophagitis in wild finches. *Vet. Rec.* 157, 455.
- Honigberg, B.M., 1961. Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. I: Gross pathology, quantitative evaluation of virulence, and some factors affecting pathogenicity. *J. Parasitol.* 47, 545–571.
- Jones, C.G., 1987. The larger land-birds of Mauritius. In: Diamond, A.W. (Ed.), *Studies of Mascarene Island Birds*. University Press, Cambridge, pp. 181–217.
- Jones, C.G., 2004. Conservation Management of endangered birds. In: Sutherland, W.J., Newton, I., Green, R.E. (Eds.), *Bird Ecology and Conservation*. Oxford University Press, Oxford.
- Jukes, T.H., Kimura, M., 1984. Evolutionary constraints and the neutral theory. *J. Mol. Evol.* 21, 90–92.
- Katiyar, S.K., Visvesvara, G.S., Edlind, T.D., 1995. Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 152, 27–33.
- Kleina, P., Bettim-Bandinelli, J., Bonatto, S.L., Benchimol, M., Bogo, M.R., 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int. J. Parasitol.* 34, 963–970.
- Kutisova, K., Kulda, J., Cepicka, I., Flegr, J., Koudela, B., Teras, J., Tachezy, J., 2005. Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology* 131, 309–319.
- Lawson, B., Cunningham, A., Chantry, J., Hughes, L., Kirkwood, J., Pennycott, T., Simpson, V., 2006. Epidemic finch mortality. *Vet. Rec.* 159, 367.
- Narcisi, E.M., Sevoian, M., Honigberg, B.M., 1991. Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eiberg). *Avian Dis.* 35, 55–61.
- Pavlicek, A., Hrdá, S., Flegr, J., 1999. Free-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness, Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol. (Praha)* 45, 97–99.
- Saito, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sedinova, J., Flegr, J., Ey, P.L., Kulda, J., 2003. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis* subtypes and phylogenetic tree construction. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 198–203.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R., 1962. Numerical taxonomy. *Nature* 193, 855–860.
- Snipes, L.J., Gamard, P.M., Narcisi, E.M., Beard, C.B., Lehmann, T., Secor, W.E., 2000. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3004–3009.
- Stabler, R.M., 1954. *Trichomonas gallinae*: a review. *Exp. Parasitol.* 3, 368–402.
- Stabler, R.M., Braun, C.E., 1975. Effect of virulent *Trichomonas gallinae* on the band-tailed pigeon. *J. Wildl. Dis.* 11, 482–483.
- Swinnerton, K.J., Greenwood, A.G., Chapman, R.E., Jones, C.G., 2005. The incidence of the parasitic disease trichomoniasis and its treatment in reintroduced and wild pink pigeons *Columba mayeri*. *Ibis* 147, 772–782.
- Vanacova, S., Tachezy, J., Kulda, J., Flegr, J., 1997. Characterization of trichomonad species and strains by PCR fingerprinting. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 545–552.
- Walker, R.L., Hayes, D.C., Sawyer, S.J., Nordhausen, R.W., Van Hooser, K.A., BonDurant, R.H., 2003. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal

- transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 14–20.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535.
- Zingales, B., Stolf, B.S., Souto, R.P., Fernandes, O., Briones, M.R., 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (suppl 1), 159–164.

Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides

Luiz Everson da Silva,^{a,*} Antônio Carlos Joussef,^b Letícia Kramer Pacheco,^c Daniela Gaspar da Silva,^c Mário Steindel^c and Ricardo Andrade Rebelo^d

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 78060-900 Mato Grosso, Brazil

^bDepartamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, 88040-900 Santa Catarina, Brazil

^cDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, 88040-900 Santa Catarina, Brazil

^dDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 89010-971 Santa Catarina, Brazil

Received 3 August 2007; revised 2 September 2007; accepted 7 September 2007

Available online 12 September 2007

Abstract—In the present paper 12 *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides synthesized by coupling 8-aminoquinolines with various aryl-sulfonylchlorides were assayed in vitro against *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* and *Trypanosoma cruzi* strains. This series of new compounds were found to be selective for *Leishmania* spp. promastigote and amastigote forms. The most active compound was the *N*-(8-quinolyl)-3,5-difluoro-benzenesulfonamide **10** with an IC₅₀ against *L. amazonensis* and *L. chagasi* of 2.12 and 0.45 μM, respectively. The less cytotoxic biphenyl derivative **7** was very effective against intracellular *L. amazonensis* with a reduction of macrophage cell infection of 82.1% at 25 μM. In addition, a copper complex **17** of an inactive ligand was readily synthesized and showed high leishmanicidal and trypanocidal activity against both extra and intracellular forms.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diseases caused by protozoan parasites are severe global public health problem, especially in the tropical and subtropical regions of the world. Despite the socioeconomical importance of these tropical infectious diseases, efforts directed towards the discovery of new drugs and/or vaccines are insufficient. In addition, most drugs currently in use were developed several decades ago showing variable efficacy. They promote serious side effects, are expensive, require long-term treatment, show low activity in immunosuppressed patients and parasites may be resistant to the drugs.¹ Thus, the need for developing new, effective, cheap and safe drugs continues to be a major goal in the field of leishmaniasis and trypano-

somiasis chemotherapy. For the last decade, new potential therapies have been introduced for leishmaniasis. These include Amphotericin B, Miltefosine, Aminosidine and Sitamaquine (Fig. 1). The latter has completed phase II trials in India, Kenya and Brazil.² In addition, a great number of both natural and synthetic compounds have been tested in recent years in antileishmanicidal and antitrypanosomal assays.³

In this context, the use of quinoline derivatives as anti-protozoal agents is well established.⁴ Although there is a large amount of experimental work on this heterocyclic system, it still remains an area of active research.⁵ On the other hand, sulfonamides have long been the subject of pharmaceutical interest as a result of their potent biological activities.⁶ Indeed, the sulfonamide derivatives have been reported to possess antitrypanosomal and antileishmanial activities.⁷ As part of our efforts to develop new compounds aimed at the therapy of parasitic infection,⁸ we have synthesized and assayed against leishmania and trypanosome some

Keywords: Quinolinyarylsulfonamides; Quinolinyarylsulfonamide-copper and zinc complexes; Leishmanicidal activity; Trypanocidal activity; Vero cells; Macrophages.

* Corresponding author. Tel.: +55 65 3615 8797; fax: +55 65 3615 8798; e-mail: luiz_everson@yahoo.de

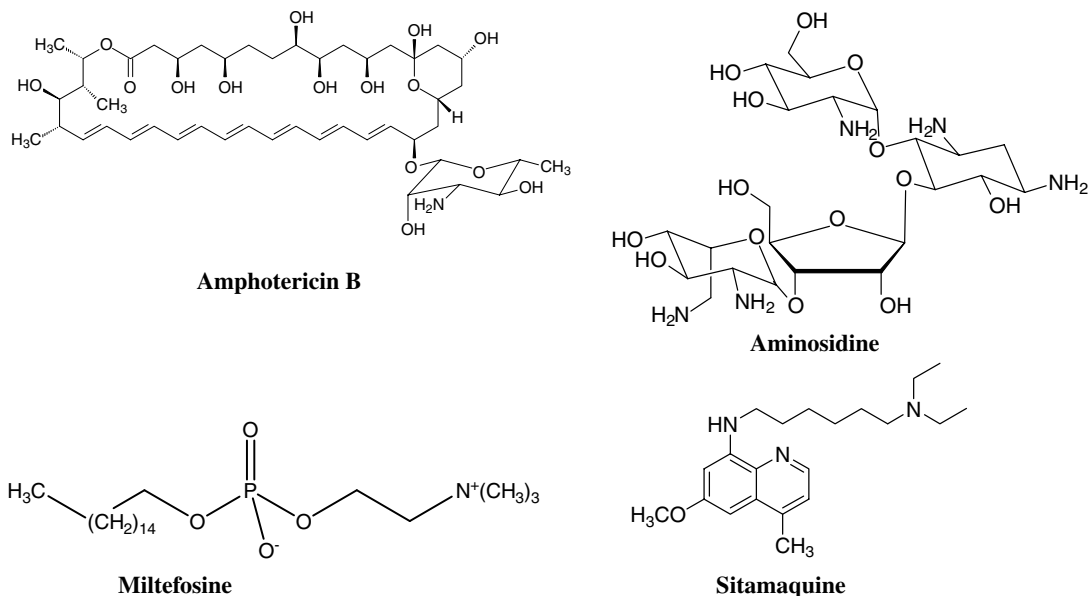


Figure 1. Drugs currently used in the treatment of leishmaniasis.

quinolinylarylsulfonamides and two of their copper and zinc complexes.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

A series of quinolinylarylsulfonamides were obtained by direct reaction of the corresponding commercial available 8-aminoquinoline **1** and arylsulfonylchlorides in pyridine⁹ at 0 °C (Scheme 1). The titled **3–12** were obtained in good yields (65–97%) and their corresponding octanol-water partition coefficients ($C \log P$) were calculated using free software available on the web (Table 1).

8-Aminoquinoline (**1**) was allowed to react with bromine in acetic acid to afford the expected 5,7-dibromo-8-aminoquinoline **13**.¹⁰ Reaction of the 5,7-dibromoderivative **13** with 4-*n*-propylbenzenesulfonylchloride in pyridine at the 0 °C gave the corresponding compound **14** (Scheme 2).

The quinoline **15** containing a quite similar substitution pattern of sitamaquine was prepared as described by Kimber et al.¹¹ and placed to react with 4-*n*-propylbenzenesulfonylchloride in pyridine at the 0 °C to fur-

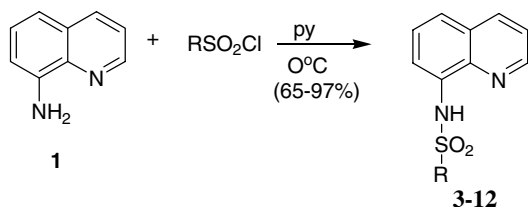
nish the *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamide **16** in 70% yield (Scheme 3).

Recent studies have suggested that the leishmanicidal activity of copper complex could be associated with their interaction with the parasite DNA.¹² Furthermore important biological activities have been associated to chelated copper and zinc cations.¹³ These prompted us to synthesize the copper and zinc complexes **17** and **18**¹⁴ (Fig. 2). The copper and zinc cations were chelated by two bidentate quinolinylsulfonamides in methanol at room temperature. Their unambiguous structures were established by X-ray analysis.¹⁵

2.2. Antiprotozoal activity

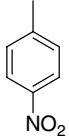
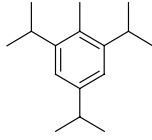
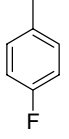
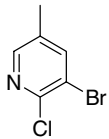
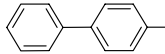
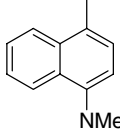
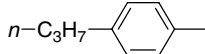
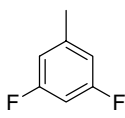
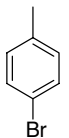
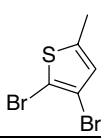
Due to the facility of cultivation, both promastigotes and epimastigotes forms are largely used for in vitro compounds screening. Therefore, the efficacy of the synthesized quinolinylarylsulfonamides on promastigotes of *L. amazonensis*, *L. chagasi* and epimastigotes of *T. cruzi* was assessed by a previously described method.⁸ Results are summarized in Table 2 and show a high selectivity towards *Leishmania* spp. The only exception was observed for compound **6**, which presented a moderate activity against *T. cruzi* (31.75 μM). However, its index of selectivity (IS) defined as the ratio of the CC₅₀ value on Vero cells to the IC₅₀ value on the epimastigotes *T. cruzi* strains, was only 2.1.

The quinolinylarylsulfonamides **6**, **10**, **11** and **12** were found to be the most active compounds against promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi* with IC₅₀ ranging from 2.12 to 2.85 μM and 0.45 to 2.99 μM, respectively. These are outstanding results since the IC₅₀ for compounds **6**, **10** and **12** are just two times greater than the IC₅₀ of the control Amphotericin B in the *L. chagasi* bioassay. The IS for these three compounds was remarkable, where values ranging from 24



Scheme 1. General structure of synthesized *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides derivatives **3-12**.

Table 1. *N*-Quinolin-8-yl-arylsulfonamides and the corresponding partition coefficients (*ClogP*)

Compound	<i>ClogP</i>	R
3	3.19	
4	6.23	
5	2.68	
6	2.92	
7	4.20	
8	3.87	
9	3.85	
10	2.84	
11	3.46	
12	4.18	

to 30 for *L. amazonensis* and 120 to 147 for *L. chagasi* were observed. Structurally three different aryl moieties are associated to these compounds: basic π -deficient in **6**, homocyclic in **10** and π -excessive in **12**, although they have in common dihalide substituents.

With respect to the sulfonamides **7**, **8** and **9**, which can be regarded as the lipophilic members of this series (*ClogP* from 3.85 to 4.20), their activity was inferior to the previous set of compounds but still very significant, with IC_{50} ranging from 6.27 to 14.47 μ M against *L. amazonensis* and from 2.18 to 13.96 μ M against

L. chagasi. The IS for the most active compound **7** within this set was 39 and 112 for *L. amazonensis* and *L. chagasi*, respectively. The IS for compounds **8** and **9** dropped considerably, ranging from 4.4 to 11 for *L. amazonensis* and 4.6 to 23 for *L. chagasi*.

The presence of either a nitro group or fluorine atom at 4-position of the phenyl moiety as in compounds **3** and **5**, respectively, induced total loss of activity ($IC_{50} > 100 \mu$ M). It is important to notice that bromine at 4-position of the phenyl moiety promoted different effect as described previously for **11**. Similar result to compounds **3** and **5** was observed for compound **4** containing bulky groups on the aryl moiety.

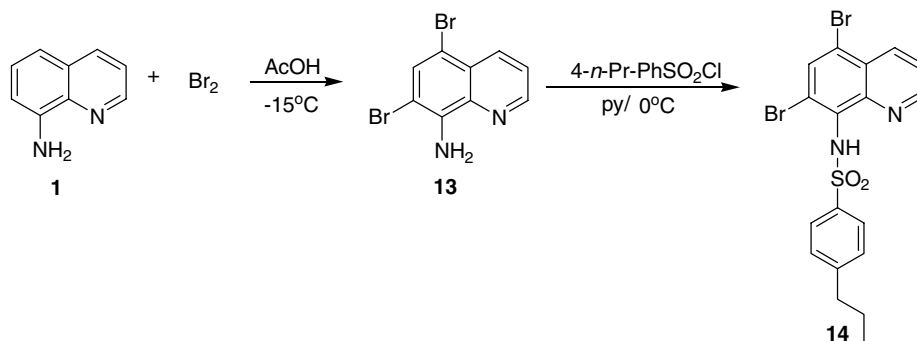
Another interesting finding of the present study is the sensitivity of this series towards the introduction of substituents on the quinoline ring. The presence of dibromine as in compound **14** and methoxy and methyl groups as in **16** led to the loss of activity.

A preliminary study related to metal complex of quinolinylarylsulfonamides was undertaken. The readily made and purified copper **17** and zinc **18** complexes were assayed against *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigote and *T. cruzi* epimastigote forms. The results are summarized in Table 2. A drastically change in the anti-protozoal activity was observed since the corresponding sulfonamide ligands **5** and **3** were inactive. The copper complex showed significant activity against *Leishmania amazonensis* ($IC_{50} = 2.28 \mu$ M), *L. chagasi* ($IC_{50} = 1.10 \mu$ M) and *T. cruzi* ($IC_{50} = 4.10 \mu$ M) whereas the zinc complex was slightly less active against *Leishmania* spp. strains (6.46 μ M for *L. amazonensis*, and 3.00 μ M for *L. chagasi*). Moreover, compound **17** was found more active than the reference compound benznidazole, although its IS was only 3.3.

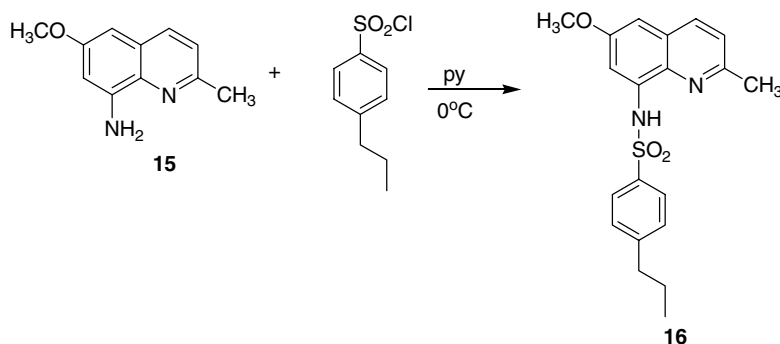
It is well known that extracellular and intracellular forms of these protozoans exhibit metabolic differences and distinct levels of sensitivity to drugs. Amastigote is the relevant clinical form for both diseases and its use on the evaluation of antiparasitic activity of compounds might be very useful.¹⁶

Limited by the availability of some compounds representatives of the quinolinylarylsulfonamide series were selected and tested against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* (infected macrophages) and *T. cruzi* (infected Vero cells). Three different concentrations of the selected compounds were considered and the results are summarized in Table 3.

Compounds **6** and **17** were active against both *Leishmania* and *Trypanosoma* as observed in the bioassay against promastigote and epimastigote forms. These compounds presented a significant activity against *L. amazonensis*, promoting at the concentration 5 μ M a reduction of cell infection in 67.1% and 88.2%, respectively. A remarkable result was obtained against *T. cruzi* amastigote forms with a reduction of cell infection in 96.4% promoted by **6** at 25 μ M concentration, and 98.0% reduction for the complex **17** at 5 μ M concentra-



Scheme 2. Synthesis of *N*-(5,7-dibromo-8-quinolyl)-4-*n*-propylbenzenesulfonamide **14**.



Scheme 3. Synthesis of *N*-(6-methoxy-2-methyl-8-quinolyl)-4-*n*-propylbenzenesulfonamide **16**.

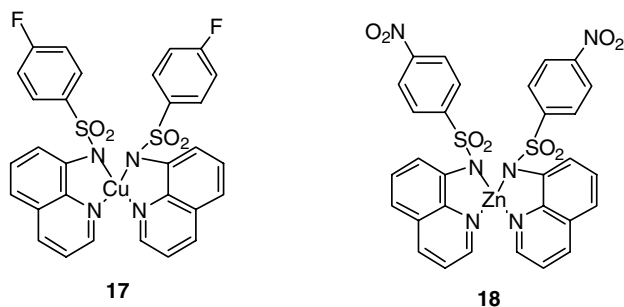


Figure 2. Chemical structures of copper and zinc complexes **17** and **18**.

tion, which was also the most cytotoxic as previously observed. These compounds were more active than the control benznidazol that reduced in 92.0% the cell infection at 25 μ M. With respect to the zinc complex **18**, it showed an activity against *L. amazonensis* inferior to compounds **6** and **17**. This result is compatible to the bioassay with *L. amazonensis* culture.

The lipophilic series **7–9** was also tested against in vitro *L. amazonensis*. Compound **7**, containing the biphenyl moiety, was found to be the most active, promoting a reduction of cell infection in 82.1% at 25 μ M concentration. In fact its activity was similar to compound **6** confirming a trend observed for other classes of antiparasitic compounds where the increase of lipophilicity seems to favor the compound distribution to the intracellular target.¹⁷

The *ClogP* observed for compound **12** (4.18) was similar to compound **7** (*ClogP* = 4.20) and indicates that is

necessary to investigate the activity of the former in the cell infected bioassays. Furthermore, the lipophilicity increment associated to the bromine atom could be exploited in the preparation of derivatives of compounds **6**, **10** and **11**.

In conclusion, several new quinolin-8-yl-arylsulfonamides were prepared from the reaction of 8-aminoquinolines with various arylsulfonylchlorides in pyridine. The in vitro bioassay showed the compounds to possess significant antiprotozoal activity against promastigote and amastigote forms of *Leishmania* spp. The only representative of this series active against *T. cruzi* was the sulfonamide containing a pyridine moiety.

The active general molecular structure may embody a variety of features at the aryl moiety, but not at the quinoline ring where the substituents investigated led to the total loss of activity.

Copper and zinc complexes were prepared from the corresponding sulfonamide and copper or zinc salt in methanol. Their activity was investigated against *Leishmania* and *Trypanosoma* strains. The complex increased the sulfonamide activity although its cytotoxicity as well.

No quantitative correlation was carried out and further pharmacological study should be now investigated to determine the target of action. These series has provided leading compounds for further pharmacomodulations.

Table 2. In vitro effect of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides and copper and zinc derivatives on the growth of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi* promastigotes, *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and toxicity to Vero cells

Compound	<i>L. amazonensis</i> (575 strain) IC ₅₀ (μM)	<i>L. chagasi</i> (PP75 strain) IC ₅₀ (μM)	<i>T. cruzi</i> (Y strain) IC ₅₀ (μM)	Vero cells CC ₅₀ (μM)
3	>100	>100	>100	ND
4	>100	>100	>100	ND
5	>100	>100	>100	ND
6	2.25 (1.63–3.09)	0.56 (0.51–0.63)	31.75 (26.63–37.85)	67.38 (54.46–83.36)
7	6.27 (4.46–8.82)	2.18 (1.65–2.88)	>100	244.93 (189.04–317.36)
8	7.18 (6.91–7.47)	3.53 (2.28–5.46)	>100	84.22 (60.52–117.21)
9	14.47 (14.14–14.81)	13.96 (12.09–16.13)	>100	64.36 (58.15–71.24)
10	2.12 (1.88–2.40)	0.45 (0.14–1.45)	>100	66.33 (45.80–96.06)
11	4.94 (4.73–5.17)	2.99 (2.73–3.26)	>100	88.70 (74.35–105.83)
12	2.85 (2.59–3.14)	0.53 (0.51–0.55)	>100	68.73 (41.72–113.23)
14	>100	>100	>100	ND
16	>100	>100	>100	ND
17	2.28 (1.41–3.67)	1.10 (0.57–2.11)	4.10 (2.79–6.03)	13.76 (9.59–19.75)
18	6.46 (6.04–6.89)	3.00 (2.81–3.21)	>100	11.43 (11.33–11.53)
Amphotericin B	0.31 (0.25–0.35)	0.25 (0.21–0.26)	—	98.35 (78.85–115.06)
Benznidazole	—	—	14.58 (13.10–16.24)	>1000

IC₅₀ with their respective 95% confidence limit; CC₅₀ with their respective 95% confidence limit; ND, not determined.

Table 3. Activity of synthesized compounds against intracellular amastigotes of *L. amazonensis* in mice peritoneal macrophages and *Trypanosoma cruzi* in Vero cells after a 48 h treatment

Compound	Concentration (μM)	<i>L. amazonensis</i> (575 strain) Reduction of cell infection (%)	<i>T. cruzi</i> (Y strain) Reduction of cell infection (%)
6	25	84.8	96.4
	5	67.1	85.2
7	1	52.0	78.6
	25	82.1	NT
	5	72.3	NT
8	1	60.0	NT
	25	Citotoxic	NT
	5	48.2	NT
9	1	25.7	NT
	25	63.7	NT
	5	52.2	NT
17	1	18.7	NT
	25	Citotoxic	Citotoxic
	5	88.2	98.0
18	1	76.0	84.1
	25	Citotoxic	NT
	5	65.7	NT
Amphotericin B	10	97.0	NT
	25	NT	92.0

The results represent the mean of two experiments. The infection rate was determined evaluating 500 Giemsa stained cells chosen randomly in each slide. NT, not tested.

3. Experimental

3.1. Biological assays

3.1.1. In vitro *L. amazonensis* promastigotes and *T. cruzi* epimastigotes culture and drug assays. *L. amazonensis* (strain 575) promastigotes and *T. cruzi* (Y strain) epimastigotes were grown at 28 °C in Schneider's and LIT media containing 5% and 10% of heat inactivated (56 °C for 30 min) fetal bovine serum (FBS), respec-

tively, and 200 U/ml penicillin and 100 μg/ml of streptomycin (Gibco, UK). Parasites were harvested from 4 days old culture and washed twice in phosphate-buffered saline by centrifugation at 1000g for 10 min at 4 °C. Parasite concentration was adjusted to 1 × 10⁶ cells/ml in Schneider's or LIT medium supplemented with 5% or 10% of FBS. For leishmanicidal and trypanocidal activity assays, 150 μl of the parasite suspension was added to 96-well microplates and incubated at 28 °C for 72 h in the presence or absence of the *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides (0.2–100 μM) and the standard drugs Amphotericin B (0.1–10 μM) and benznidazole (10–100 μM) were used as controls. For each compound three experiments were carried out in triplicate and the number of surviving parasites was determined in Neubauer chambers.⁸

3.1.2. Cell toxicity tests. Cytotoxic effects of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides were evaluated in Vero cells using the MTT (tetrazolium-dye) assay.¹⁸ Briefly, cells cultivated in the presence of different compounds for 72 h at 37 °C were incubated with MTT (2 mM/ml) for 4 h. Thereafter supernatant was removed and 100 μl of DMSO was added to solubilize the formazan crystals from viable cells. The samples were read at a wavelength of 540 nm using an ELISA plate reader.¹⁹ Benznidazole and Amphotericin B were used as control drugs. Variance analysis followed by Dunnett's multiple comparison tests were used for data analysis. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) for parasites and 50% cell cytotoxicity (CC₅₀) was determined by linear regression analysis using (GraphPad Software, San Diego, California).

Macrophages were collected from the peritoneal cavity of normal female albino Swiss mice and cultivated on sterile 13 mm glass slides in DMEM supplemented with 20% of heat inactivated FBS at 37 °C, 5% CO₂ as described previously.²⁰ Vero cells (ATCC CCL81) were cultivated on 13 mm glass slides in DMEM supplemented with 5% of FBS at 37 °C, 5% CO₂.²⁰ Macrophages

were infected with *L. amazonensis* promastigotes, using a 1:10 cell:parasite ratio and after 4 h period of infection cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ with different concentrations of the compounds for 48 h. Slides were washed with PBS, methanol fixed and stained with Giemsa.²¹ Vero cells were incubated with cell culture derived trypanomastigotes at 1:10 cell:parasite ratio and after 6 h of infection cells were washed for removing the non-adherent parasites and the cell monolayer incubated for 48 h with different concentrations of the compounds.²⁰ Slides were methanol fixed and Giemsa stained and 500 random cells were microscopically examined (1000×). The cell infection rate and the number of infected cells as well as the number of parasite/cell were determined.

3.2. Chemistry

The compounds were characterized by ¹H NMR. The purity of the compounds was determined by TLC using several solvent systems of different polarity. Nuclear magnetic resonance spectra were recorded with on a Bruker AC-300 spectrometer using tetramethylsilane as internal standard. Infrared spectra were determined with a Perkin-Elmer 16PC spectrophotometer. Mass spectra were obtained with on a Bruker-Franzen Esquire LC instrument.

3.2.1. General Procedure for the synthesis of the sulfonamides derivatives. To an ice-cooled solution of the aminoquinoline (1 equiv) in pyridine were added the corresponding sulfonylchloride derivative (1.1 equiv). The mixture was stirred at 0 °C for 90 min and overnight at room temperature. The reaction mixture was quenched with ice water and the precipitated product filtered off. The sulfonamide was recrystallized from MeOH:CH₂Cl₂ solution.

3.2.2. 4-Nitro-*N*-(8-quinolyl)benzenesulfonamide (3). Crystalline solid: 84%. Mp:170 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.26–7.54 (m, Ar-H); 7.93 (dd, *J* = 1.6 and 8 Hz, 1H-H7); 8.08 (d, *J* = 8 Hz, 2H-H2'-H6'); 8.14 (d, *J* = 8 Hz, 2H-H3'-H5'); 8.78 (dd, *J* = 1.6 and 6 Hz, 1H-H2); 11.45 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 329 (M⁺; 100); 202 (80).

IR (KBr): 3218 (NH), 1573, 1383, 1359 (SO₂N), 1169 (SO₂N), 926, 686, 585, 559 cm⁻¹.

3.2.3. 2,4,6-Triisopropyl-*N*-(8-quinolyl)benzenesulfonamide (4). Crystalline solid: 65%. Mp:141 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.27 (s, 18H-CH₃); 2.82 (m, 1H-CH); 4.37 (m, 2H-CH); 7.09 (s, 2H-CH-H3'-H5'); 7.25–7.46 (m, 4H-Ar-H); 7.68 (dd, *J* = 2 and 6.7 Hz, 1H-H7); 8.09 (dd, *J* = 1.6 and 6 Hz, 1H-H5); 8.74 (dd, *J* = 1.6 and 6 Hz, 1H-H2); 9.31 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 433 (M⁺; 100).

IR (KBr): 3245 (NH), 1375 (SO₂N), 1164 (SO₂N), 918, 679, 558, 546 cm⁻¹.

3.2.4. 4-Fluoro-*N*-(8-quinolyl)benzenesulfonamide (5). Crystalline solid: 79%. Mp: 140 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.03 (t, *J* = 6 Hz, 2H-H3-H6); 7.42–7.48 (m, 3H-H3'-H4'); 7.88 (dd, *J* = 2 and 7 Hz, 1H-H7); 7.90 (dd, *J* = 2 and 7 Hz, 2H-H3-H6); 8.12 (dd, *J* = 1.6 and 8 Hz, 1H-H5); 8.76 (dd, *J* = 2 and 6 Hz, 1H-H2); 9.24 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 302 (M⁺; 35); 238 (90); 143 (100); 116 (60).

IR (KBr): 3260 (NH), 1307 (SO₂N), 1160 (SO₂N), 922, 666, 570, 545 cm⁻¹.

3.2.5. *N*-(8-Quinolyl)-5-bromo-6-chloropyridine-3-sulfonamide (6). Yellow solid: 89%. Mp: 155–157 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (m, 3H-Ar-H); 7.94 (dd, *J* = 1.6 and 6 Hz, 1H-H5); 8.19 (dd, *J* = .6 and 6.7 Hz, 1H-H4); 8.41 (s,1H-H1'); 8.79 (s, 1H-H2'); 8.8 (dd, *J* = 1.6 and 6 Hz, 1H, H2); 9.43 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 399 (M⁺; 25); 334 (55); 143 (100); 116 (65).

IR (KBr): 3192 (NH), 1612,1584, 1368 (SO₂N), 1173 (SO₂N), 941, 776, 679, 587, 545 cm⁻¹.

3.2.6. *N*-(8-Quinolyl)-*n*-biphenylsulfonamide (7). White solid: 95%. Mp: 158–159 °C.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.40–7.44 (m, 6H-Ar-H); 7.57 (s, 2H-H2''-H6''); 7.89 (dd, *J* = 9 Hz, 1H-H3'-H5'); 7.90 (s, 4H-H3'-H5'-H2'-H6'); 8.07 (d, *J* = 9 Hz, 1H-H5); 8.71 (dd, *J* = 2 and 9 Hz, 1H-H2); 9.29 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 360 (M⁺); 296 (100); 143 (35); 116 (20).

IR (KBr): 3250 (NH), 1317 (SO₂N), 1123 (SO₂N), 959, 664, 567, 552 cm⁻¹.

3.2.7. *N*-(8-Quinolyl)-5-(dimethylamino)naphthalenesulfonamide (8). Green solid: 90%. Mp: 155–156 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.79 (s, 6H-CH₃); 7.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H-H6); 7.32 (dd, *J* = 4.2 and 7 Hz, 2H-H6'-H7'); 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H-H3-H6); 7.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H-H7-H3'); 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H-H5); 8.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H-H4'); 8.46 (d, *J* = 8.7, 1H-H8'); 8.50 (d, *J* = 8.7,1H-H2'); 8.69 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H-H2); 9.45 (s, 1H-NH).

Mass spectrometry: *m/z* = 377 (M⁺; 75); 313 (100); 170 (40).

IR (KBr): 3248 (NH), 1314 (SO₂N), 1139 (SO₂N), 936, 678, 573, 551 cm⁻¹.

3.2.8. *N*-(8-Quinolyl)-4-*n*-propylbenzenesulfonamide (9). White solid: 77%. Mp: 105 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H- CH_3); 1.48 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H- CH_2); 2.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H- CH_2); 7.06 (d, $J = 9$ Hz, 2H- $\text{H}3'$ - $\text{H}5'$); 7.36 (dd, $J = 2$ and 7 Hz, 1H, H5); 7.38 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H6); 7.40 (d, $J = 7$ Hz, 1H, H7); 7.69 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H3); 7.75 (d, $J = 9$ Hz, 2H- $\text{H}2'$ - $\text{H}6'$); 8.02 (dd, $J = 2$ and 6 Hz, 1H- $\text{H}2$); 8.69 (dd, $J = 2$ and 6 Hz- $\text{H}4$); 9.17 (s, 1H- NH).

Mass spectrometry: $m/z = 326$ (M^+ ; 18); 262 (50); 233 (100); 143 (60); 116 (45).

IR (KBr): 3218 (NH), 1359 (SO_2N), 1169 (SO_2N), 926, 686, 585, 559 cm^{-1} .

3.2.9. *N*-(8-Quinoly)-3,5-difluoro-benzenesulfonamide (10). White solid: 96%. Mp: 120–121 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 6.82 (t, $J = 9$ Hz, 1H- $\text{H}4'$); 7.21 (s, 2H- $\text{H}2'$ - $\text{H}6'$); 7.36–7.50 (m, 3H- Ar-H); 7.79 (d, $J = 6$ Hz, 1H- $\text{H}7$); 8.06 (d, $J = 6$ Hz, 1H- $\text{H}5$); 8.70 (dd, $J = 2$ and 6 Hz, 1H- $\text{H}2$); 9.23 (s, 1H- NH).

Mass spectrometry: $m/z = 320$ (M^+ ; 45); 256 (70); 143 (100); 116 (55).

IR (KBr): 3245 (NH), 1375 (SO_2N), 1164 (SO_2N), 952, 692, 596, 584 cm^{-1} .

3.2.10. *N*-(8-Quinoly)-4-bromobenzenesulfonamide (11). White solid: 56%. Mp: 160–162 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.41–7.33 (m, 3H); 7.40 (d, $J = 8$ Hz, 2H- $\text{H}3'$ - $\text{H}5'$); 7.68 (d, $J = 8$ Hz, 2H- $\text{H}2'$ - $\text{H}6'$); 7.75 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H); 8.01 (d, $J = 8$ Hz, 1H); 8.66 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H); 9.18 (s, 1H- NH).

IR (KBr): 3250 (NH), 1320 (SO_2N), 1169 (SO_2N), 961, 655, 570, 550 cm^{-1} .

3.2.11. 4,5-Dibromo-*N*-(8-quinoly)tiophene-2-sulfonamide (12). White solid: 57%. Mp: 143 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.19 (s, 1H- $\text{H}5'$); 7.44–7.53 (m, 3H- Ar-H); 7.83 (dd, $J = 2$ and 6 Hz, 1H- $\text{H}7$); 8.10 (d, $J = 9$ Hz, 1H- $\text{H}5$); 8.73 (dd, $J = 2$ and 6 Hz, 1H- $\text{H}2$); 9.12 (s, 1H- NH).

Mass spectrometry: $m/z = 448$ (M^+ ; 25); 384 (35); 303 (100); 223 (75); 143 (85); 116 (77).

IR (KBr): 3249 (NH), 1443, 1376 (SO_2N), 1164 (SO_2N), 920, 758, 685, 662, 585, 559 cm^{-1} .

3.2.12. 5,7-Dibromoquinolin-8-amine (13). Brown solid. mp: 119–122 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5.36 (s, 2H- NH_2); 7.40 (dd, $J = 4.2$ and 8.7 Hz, 1H- $\text{H}3$); 7.72 (s, 1H- $\text{H}6$); 8.32 (dd, $J = 1.5$ and 8.4 Hz, 1H- $\text{H}4$); 8.70 (dd, $J = 1.8$ and 4.2 Hz, 1H- $\text{H}2$).

3.2.13. *N*-(5,7-Dibromo-8-quinoly)-4-*n*-propylbenzenesulfonamide (14). Crystalline solid: 50%. Mp: 150 °C.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz) δ 1.12 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H- CH_3); 1.25 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H- CH_2); 2.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H- CH_2); 6.31 (s, 1H- NH); 6.83 (d, $J = 9$ Hz, 2H, $\text{H}3'$ - $\text{H}5'$); 7.08 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H3); 7.34 (s, 1H- $\text{H}6$); 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H- $\text{H}4$); 7.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H- $\text{H}2'$ - $\text{H}6'$); 8.25 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H2).

Mass spectrometry: $m/z = 484$ (M^+ ; 10); 420 (100); 391 (85); 301 (90); 220 (50); 141 (25).

IR (KBr): 3240 (NH), 1357 (SO_2N), 1163 (SO_2N), 929, 667, 557, 545 cm^{-1} .

3.2.14. *N*-(6-Methoxy-2-methyl-8-quinoly)-4-*n*-propylbenzenesulfonamide (16). Crystalline solid: 70%. Mp: 111–113 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H- CH_3); 1.46 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H- CH_2); 2.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H- CH_2); 2.65 (s, 3H- CH_3); 3.73 (s, 3H- OCH_3); 6.48 (s, 1H- $\text{H}7$); 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $\text{H}3'$ - $\text{H}5'$); 7.18 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H3); 7.8 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H4); 7.36 (s, 1H, H7); 7.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $\text{H}2'$ - $\text{H}6'$); 9.34 (s, 1H- NH).

Mass spectrometry: $m/z = 370$ (M^+ ; 90); 277 (30); 187 (75); 172 (100); 144 (30).

IR (KBr): 3325 (NH), 1610, 1600, 1317 (SO_2N), 1166 (SO_2N), 925, 686, 569, 554 cm^{-1} .

3.2.15. Synthesis of the complexes. The copper complex **17** prepared according to a procedure given in the literature.²² Into 50 ml of a methanolic solution of copper (II) acetate (0.1996 g, 1 mmol), 100 ml of a methanolic solution containing 0.5965 g (2 mmol) of the ligand was slowly added under stirring. The solution became dark and after one day the crystals appeared.

3.2.16. Bis[4-Fluoro-*N*-(quinolin-8-yl)benzenesulfonamide- $\kappa_2\text{N},\text{N}'$]copper(II) (17).¹⁵ Green dark solid: 80%. Mp: 278 °C.

IR (KBr): 1322, 1139, 580, 555, 948, 665 cm^{-1} .

Mass spectrometry: $m/z = 665$ ($\text{M}^+ - 1$; 48); 347 (25); 237(75); 143 (100).

The zinc complex **18** was prepared according to a procedure found in the literature.²³ About 1.5 mmol of the sulfonamide was dissolved in 75 ml methanol and 2 ml 2 M NH_4OH were added. While this solution was magnetically stirred, 0.75 mmol of ZnCl_2 dissolved in 50 ml methanol were added dropwise. When addition was completed a green yellow precipitate was formed which was separated by filtration.

3.2.17. Bis[4-Nitro-*N*-(quinolin-8-yl)benzenesulfonamide- $\kappa_2\text{N},\text{N}'$]zinc(II) (18).¹⁵ Green/yellow crystalline solid: 88%. Mp: >300 °C.

IR (KBr): 1324, 1284, 1142, 1120, 569, 554, 962, 656 cm^{-1} .

Mass spectrometry: $m/z = 720$ (M^+ ; 10); 329 (40); 265 (75); 143 (100).

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq and CAPES for financial support.

References and notes

- Ouellette, M.; Drummelsmith, J.; Papadopoulou, B. *Drug Resist. Updat.* **2004**, *7*, 257; Croft, S. L.; Barret, M. P.; Urbina, J. A. *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 508; Croft, S. L.; Coombs, G. H. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 502.
- Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111.
- Foroumadi, A.; Pournourmohammadi, S.; Soltani, F.; Asgharian-Rezaee, M.; Dabiri, S.; Kharazmi, A.; Shafiee, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1983; Khan, K. M.; Rasheed, M.; Ullah, Z.; Hayat, S.; Kaukab, F. K.; Choudhary, M. I.; Rahman, A.-u.; Perveen, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1381; Tempone, A. G.; Borborema, S. E. T.; De Andrade, H. F., Jr.; Gualda, N. C. A.; Yogi, A.; Carvalho, C. S.; Bachiega, D.; Lupo, F. N.; Bonotto, S. V.; Fischer, D. C. H. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 382; Gonzales, P.; Marin, C.; Rodriguez-G, I.; Illana, A.; Mateo, H.; Longoni, S. S.; Rosales, M. J.; Gonzales-C, A.; Reina, M.; Sanchez-M, M. *Pharmacology* **2006**, *76*, 123.
- Carrol, F. I.; Berrang, B. D.; Linn, P. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 581; Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunite, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N.; Marzal, P. C.; Junior, H. F. A.; Tempone, A. G. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 550; Fakhkakh, M. A.; Fournet, A.; Prina, E.; Mouscadet, J.-F.; Franck, X.; Hocquemiller, R.; Figadère, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5013.
- Sahu, N. P.; Pal, C.; Mandal, N. B.; Banerjee, S.; Raha, M.; Kundu, A. P.; Basu, A.; Ghosh, M.; Roy, K.; Bandyopadhyay, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1687; Dardari, Z.; Lemrani, M.; Bahloul, A.; Sebban, A.; Hassar, M.; Kitane, S.; Berrada, M.; Boudouma, M. *IL Farmaco* **2004**, *59*, 195; Tempone, A. G.; da Silva, A. C. M. P.; Brandt, C. A.; Martinez, F. S.; Borborema, S. E. T.; da Silveira, M. A. B.; Andrade, H. F., Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1076; Jain, M.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Jacob, M. R.; Singh, S.; Singh, P. P.; Jain, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4458.
- Harter, W. G.; Albrecht, H.; Brady, K.; Caprathe, B.; Dunbar, J.; Gilmore, J.; Hays, S.; Kostlan, C. R.; Lunney, B.; Walker, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 809; Reddy, N. S.; Mallireddigari, M. R.; Consenza, K. G.; Bell, S. C.; Reddy, E. P.; Reddy, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4093; Stranix, B. R.; Lavallee, J.-F.; Sevegny, G.; Yelle, J.; Perron, V.; Leberre, N.; Herbart, D.; Wu, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3459.
- Bhattacharya, G.; Herman, J.; Delfin, D.; Salem, M. M.; Barszcz, T.; Mollet, M.; Riccio, G.; Brun, R.; Webovetz, K. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1823.
- Lunardi, F.; Guzela, M.; Rodrigues, A. T.; Corrêa, R.; Eger-Mangrich, I.; Steindel, M.; Grisard, E. C.; Assreuy, J.; Calixto, J. B.; Santos, A. R. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1449; da Silva, L. E.; Joussef, A. C.; Pacheco, L. K.; Albino, D. B. L.; Duarte, A. M. C.; Steindel, M.; Rebelo, R. A. *Lett. Drug Des. Discov.* **2007**, *4*, 154.
- Kimber, M. C.; Mahadevan, I. B.; Lincoln, S. F.; Ward, A. D.; Tiekink, E. R. T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8204.
- Elderfield, R. C.; Claffin, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2953.
- Kimber, M. C.; Mahadevan, I. B.; Lincoln, S. F.; Ward, A. D.; Betts, W. H. A. *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 43.
- Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E. J.; Sierralta, A.; Fernández-Mestre, M.; Arrieche, P. S. D.; Marchán, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 401; Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E. J.; Fernández-Mestre, M.; Arrieche, D.; Marchán, E. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *97*, 364.
- Bush, A. *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 1031; Daniel, K. G.; Chen, D.; Orlu, S.; Cui, Q. C.; Miller, F. R.; Dou, O. P. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R897.
- Macías, B.; Villa, M. V.; Fiz, E.; García, I.; Castineiras, A.; González-Álvarez, M.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 101.
- Da Silva, L. E.; Joussef, A. C.; Foro, S.; Schmidt, B. *Acta Cryst.* **2006**, *E62*, m1606; Da Silva, L. E.; Joussef, A. C.; Foro, S.; Schmidt, B. *Acta Cryst.* **2006**, *E62*, m1773.
- Rodriguez, J. B.; Zhong, L.; Docampo, R.; Gros, E. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2783.
- Guillon, J.; Forfar, I.; Mamani-Matsuda, M.; Desplat, V.; Saliège, M.; Thiolat, D.; Massip, S.; Tabourier, A.; Léger, J.-M.; Dufaure, B.; Haumont, G.; Jarry, C.; Mossalayi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194.
- Van De Loosdrescht, A. A.; Nennie, E.; Ossenkoppele, G. L.; Beelen, R. H.; Langenhuijse, M. N. *J. Immunol. Methods* **1991**, *14*, 15.
- Andrighetti-Frohner, C. R.; Sincero, T. C.; da Silva, A. C.; Savi, L. A.; Gaido, C. M.; Bettega, J. M.; Mancini, M.; de Almeida, M. T.; Barbosa, R. A.; Farias, M. R.; Barardi, C. R.; Simoes, C. M. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 374.
- Toma, H. K.; Cerávolo, I. P.; Guerra, H. L.; Steindel, M.; Romanha, aJ. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 593.
- Chen, D. Q.; Kolli, B. K.; Yadava, N.; Lu, H. G.; Gilman-Sachs, A.; Peterson, D. A.; Chang, K. P. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 80.
- Macías, B.; Villa, M. V.; Fiz, E.; García, I.; Castineiras, A.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 101.
- Macías, B.; García, I.; Villa, M. V.; Borrás, J.; Castineiras, A.; Sanz, F. Z. *Anorg. Allg. Chem.* **2003**, *629*, 255.

**Synthesis, Biological evaluation and SAR of sulfonamide
4-methoxychalcone derivatives with Potential
Antileishmanial Activity**

Carla R. Andrighetti-Fröhner^a, Luiz E. da Silva^a, Kely N.de Oliveira^a, Daniela Gaspar-Silva^a, Letícia K. Pacheco^c, Antônio C. Joussef^a, Mário Steindel^c, Cláudia M. O. Simões^b, Alessandra M.T.de Souza^{d,e}, Uiaran Magalhaes^d, Ilídio F. Afonso^d, Carlos R. Rodrigues^{d*}, Ricardo J. Nunes^{a*}, Helena C. Castro^{e*}

^aDepartamento de Química, ^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, ^cDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Campus Universitário Trindade, Florianópolis, SC, Brazil.

^d ModMolQSAR, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^e LABioMol, Departamento de Biologia Celular e Molecular, IB-/CEG,- Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói, RJ, Brazil.

Correspondent addresses:

Helena Carla Castro. Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, 24020-150, Niterói, RJ, Brazil. Phone +55+21-26292294. E-mail: hcastrorangel@yahoo.com.br

Ricardo J. Nunes. Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Phone: (48) 37216845. Ramal: 236. E-mail: nunesqmc@ufsc.br

Carlos Rangel Rodrigues. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, ModMolQSAR, 24020-150, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone +55+21

25626444. E-mail: rangel@pharma.ufrj.br

Abstract – Disseminated leishmaniasis is an emerging infectious disease caused by *Leishmania braziliensis* in need for less toxic treatment drugs. In this work we synthesized ten sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives and biologically and theoretically evaluated them against *L. braziliensis* strains. All tested compounds presented a concentration-dependent inhibition on the Leishmania growth where the benzylamine derivative (**3i**) showed a better biological profile than that of pentamidine. Interestingly these compounds presented no effect on *T. cruzi* strain differently from some other chalcone series recently described, which may suggest different targets and/or mechanism of inhibition. The structure-function analysis revealed that the molecular volume; the HOMO density concentrated in the chalcone moiety, and the conformational structure of the compounds as important structural and stereo electronic features for the antileishmanial activity. The theoretical study of these molecules also showed that they fulfilled Lipinski rule of 5 and present druglikeness similar to antileishmanial drugs. These results suggested the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives as lead compounds for designing new candidates for leishmaniasis treatment.

Keywords: Leishmaniasis, SAR, sulfonamide 4-methoxychalcones, antiparasite.

1. Introduction

Disseminated leishmaniasis is an emerging infectious disease, mostly due to *Leishmania braziliensis*. Importantly this disease presents clinical and histopathological features distinct from cutaneous Leishmaniasis [1]. Currently these parasitic diseases cause significant morbidity and mortality, mainly in the developing world [2].

Despite the progress in important fundamental knowledge about *L. braziliensis*, the current chemotherapy for leishmaniasis is still unsatisfactory due to the limited efficacy, long-term treatment, cost expensive and undesirable side effects [3-5]. The development of drug resistance by the pathogens, especially in HIV-*Leishmania* co-infected patients, has also aggravated the health problem [6]. Thus, there is an urgent need for the development of new, efficient and safe drugs for treating leishmaniasis.

Natural and synthetic chalcones are described presenting a wide range of potential pharmacological profiles [7], such as anti-inflammatory [8], trypanocidal [9], antibacterial [10], antiviral [11,12], antitumoral [13], antimalarial [14], and antileishmanial [15-18] activities. Recently a series of substitution-containing chalcone derivatives (**1**) have been reported as antileishmanial agents (Scheme 1) [9]. In addition sulfonamide analogues with antiparasitic activity have also been described as potential for designing antiparasites based on the herbicide oryzalin (**2**), which also presents an antileishmanial profile (Scheme 1) [19].

In this work we used a rational approach and synthesized a new set of sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**) to identify the sulfonamide and

methoxy as promising adding-groups to chalcones and develop new lead antiparasite compounds. In addition we focused on the Structure-Activity Relationships (SAR) of these sulfonamides 4-methoxychalcones series to determine structural and stereoelectronic features that could lead to the antileishmanial profile (Scheme 1). On that purpose we analyzed the role of groups with different electronic and volume properties in the sulfonamide moiety of the 4-methoxychalcones B-ring.

To compare with other chalcone series described in literature [9], the new 3-sulfonamide 4-methoxychalcone series was evaluated for its antiparasite activity against *Leishmania braziliensis* promastigotes forms and against *T. cruzi* epimastigotes forms. We also tested the most active compound against the *L. braziliensis* amastigotes forms to evaluate its ability of decreasing the parasite burdens in infected host cells. In addition the cytotoxicity profile in mouse peritoneal macrophages was evaluated, which allowed the determination of their selectivity index. Finally, these biological effects were analyzed with the compounds different theoretical parameters (Dipole, E_{Homo} , E_{Lumo} , cLogP, Molecular Weight and Volume, higher HOMO coefficient orbital and density) calculated by using a molecular modeling approach in the structure-activity relationship (SAR) study [20].

2. Results and Discussion

2.1. Design and Synthesis

The sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives were prepared as shown in Scheme 2. The 4-methoxychalcone (**3**) was obtained by aldolic condensation of 4-methoxybenzaldehyde and acetophenone according to general literature procedure

[19] (Scheme 2).

Treatment of 4-methoxychalcone (**3**) with chlorosulfonic acid at room temperature for one week [21] afforded the sulfonyl chloride derivative. Preparation of sulfonamides **3a-3i** was accomplished by reaction of sulfonyl chloride derivative with different amines in the presence of methanol at room temperature. We characterized all the synthesized compounds by spectroscopic data such as IR NMR and elemental analysis [22]. The chalcones **3a**, **3b** and **3f** were prepared as previously described [20,23].

2.2. Biological Evaluation

In this work we evaluated the inhibitory profile of the 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**) against *L. braziliensis* promastigote forms (Figure 1A). Interestingly all the chalcones tested showed a concentration-dependent inhibitory profile on in vitro Leishmania growth assays (Figure 1A).

Interestingly, the addition of sulfonamide generated derivatives with a better inhibitory profile against *L. braziliensis* than the 4-methoxychalcone (**3**), except for the aniline substituted sulfonamide 4-methoxychalcone (**3e**) (Figure 1A and Table 1). In fact, according to our results, mostly of the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives showed a more potential inhibitory activity ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.6 \mu\text{M} - 8.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$) than that of 4-methoxychalcone (**3**) ($IC_{50} = 16.6 \pm 1.6 \mu\text{M}$) and other chalcones without substituent groups such as those described by Lunardi and coworkers [9] ($IC_{50} = 13.7 \mu\text{M} - 182.3 \mu\text{M}$) (Table 1). Although our compounds were less active than

amphotericin B ($IC_{50} = 0.3 \pm 0.02 \mu M$), they were more active than pentamidine isothionate ($IC_{50} = 19.6 \mu M$) [25] current used on treatment of leishmaniasis.

The addition of the aniline on the substituent group in the compound **3e** was the only one that negatively affected the inhibitory activity on growth of *L. braziliensis* promastigotes forms ($IC_{50} = 69 \pm 3.7 \mu M$) compared to **3**. Importantly, all substitutions (electron-acceptor or electron-donor substituents) at the sulfonamide moiety or at *para* position of aniline aromatic ring kept the antileishmanial profile (compounds **3a-3d** and **3f-3h**) suggesting the feasibility of new interactions on these positions (Figure 1 and Table 1).

The compound **3i** showed the best profile against *L. braziliensis* promastigotes forms ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.6 \mu M$). Apparently the benzylamine group significantly contributes to this activity, since this compound was about 20-fold more potent than the compound **3e** ($IC_{50} = 69.0 \pm 3.7 \mu M$) (Figure 1 and Table 1). Notably the addition of the carbon spacer on the substituent (**3i**) was enough to avoid the deleterious effect of the aniline group (**3e**), probably allowing hydrophobic interactions with the parasitic target. We also carried out amastigotes forms-infected macrophage assays with the most active compound (**3i**) to evaluate its ability of decreasing the parasite burdens in infected host cells. The results showed that **3i** is able to inhibit the infection of the macrophages by amastigotes suggesting its potential profile as a lead antileishmanial compound (Figure 1D).

In this work we experimentally evaluated the cytotoxic activity of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**) against mouse peritoneal macrophages. Our results showed CC_{50} values ranging from $57.8 \pm 4.8 \mu M$ to $105.7 \pm 6.5 \mu M$ (Figure 1B). Interestingly the presence of the substituents of

the sulfonamide group seems to play a more important role for the antileishmanial activity than to the cytotoxicity profile (Figure 1 and Table 1). The CC_{50} values were used to calculate the selectivity index (SI) for these derivatives, which were higher than the non-substituted 4-methoxychalcone, except for **3c** and **3e**. This result showed the improvement of the selectivity index of the derivatives compared to the leading compound (Figure 1C).

Herein we also tested the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives effects against *T. cruzi* epimastigotes forms. However, different from the chalcone series described by Lunardi et al., 2003 that was active on both *L. braziliensis* (21.9 μ M - 182.3 μ M) and *T. cruzi* strains (24.8 μ M - 126.4 μ M), this new series showed no activity even in concentrations up to 500 μ M (not shown). These data suggest that the sulfonamide 4-methoxychalcone series target is probably different from that of Lunardi series [9], due to its specificity for Leishmania. Previous studies showed that chalcone derivatives might act in the parasite mitochondria by the inhibition of fumarate reductase, succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, or succinate- and NADH-cytochrome *c* reductases activity [26,27]. However, as these enzymes may be present in *T. cruzi* and the series described herein does not affect this parasite, further investigation about its mechanism of action should be performed.

2.3. Molecular Modeling and SAR studies

In this study we compared the biological profile of this new series with their structural features to establish a structure-activity relationship. All calculations were performed using SPARTAN'06 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, 2000). The structures were minimized and the equilibrium geometry was obtained in vacuum using a semi-

empirical AM1 module. To evaluate the electronic properties of the AM1 minimal energy conformations, they were submitted to a DFT calculation with a 6-31G* basis set of the SPARTAN'06 package. The electronic properties (HOMO and LUMO energy, HOMO density and dipole moment) were calculated for all compounds. Theoretical logP (clogP) was calculated at AM1 semi-empirical level using the Villar method, included in Spartan [24,28-30].

An overall analysis of the activity of the compounds showed that the addition of sulfonamide substituent increased the activity of these compounds in comparison to compound **3**. Interestingly the increase of molecular volume, weight and dipole moment of these derivatives seem to improve the activity compared to **3** (Table 1) except for **3e**.

The conformational analysis of these compounds inferred that the enhancement of the biological activity is probably due to the new interactions in a new plane of these molecules caused by the addition of the sulfonamide group (Figure 2). The HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) density of most of the compounds is concentrated in the center of the chalcone moiety (the carbonyl group and unsaturated linker between A and B rings - scheme 1) suggesting a role for these regions in the antileishmanial activity (Figure 2).

The aniline **3e** derivative presents a substituent that significantly compromised the biological activity, compared to **3**, and that reoriented the HOMO density to the substituent (Figure 2). Importantly, the addition of chlorine, an electron-acceptor atom, in **3f** restored the activity to a significant level. However the volume, the steric and electronic features are probably important to the antileishmanial profile of this series as the addition of two chlorines (**3g**) or a methoxy (**3h**) group, which possess a bigger

volume and different electrostatic features, decreased the activity in more than 2 fold compared to **3f**. However, it should be considered that these substituents still contributed for the activity as these derivatives were more potent than **3e** (Table 1).

Interestingly the addition of a spacer (C1) in the **3i** structure, the most active compound, led to the best activity and reoriented the HOMO density to the chalcone moiety, which apparently contributed to the antileishmanial profile compared to **3e**. The most stable conformation of this derivative revealed a π - π stacking interaction between the benzyl and the chalcone ring, which may be important for the interaction with the target and for avoiding the predicted prohibitive areas (Figure 2 and 3).

We also evaluated some electronic properties of the sulfonamide 4-methoxychalcone chalcone derivatives including HOMO and LUMO (Highest and Lowest Unoccupied Molecular Orbitals) energy values, HOMO and LUMO orbital coefficients distribution, and molecular electrostatic potential (MEP). Our results showed that sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives led to different HOMO and LUMO energies values, and MEPs that alone did not present any direct correlation with the antileishmanial activity (Table 1 and Figure 2).

In the effort to study the hydrophobic pattern, we calculated the theoretical parameters related to the oral bioavailability, according to Lipinski rule of 5 [31] (Table 1). Our results revealed that the sulfonamide 4-methoxychalcone lipophilicity ($2.21 < c\text{LogP} < 4.60$) is not greater than 5.0, which, according to Lipinski, is an important feature for good drug absorption and permeation [32-34](Table 1).

In addition the molecular volume and weight of derivatives ($346.07 \text{ \AA}^3 < MV < 419.38 \text{ \AA}^3$ and $345.42 < MW < 462.35$) are similar to more than 80% of all Fluka traded drugs ($MW < 450 \text{ Da}$) and to that determined by Lipinski "Rule of 5" [31-34]. In fact, according

to our research, most of the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives described herein ($2.21 < \text{LogP} < 4.60$, $345.42 \text{Da} < \text{MW} < 423.49 \text{Da}$, hydrogen bond acceptors =2-5 and donors=0-1) fulfilled all Lipinski rules, which states that most "drug-like" molecules have $\text{logP} \leq 5$, molecular weight ≤ 500 , number of hydrogen bond acceptors ≤ 10 , and donors ≤ 5 (Table 1). These data may suggest the potentiality of these derivatives as new candidate to antileishmanial agents.

Currently, there are many approaches that assess druglikeness of compounds based on topological descriptors, fingerprints of molecular druglikeness, structural keys or other properties as clogP and molecular weights [33]. In this work we used the Osiris program (www.organic-chemistry.org/prog/peo) for calculating the fragment-based druglikeness of all compounds and other antileishmanial drugs including pentamidine and glucantime (Figure 3). Our theoretical data showed that the most active compounds presented a druglikeness value higher than the compounds currently used on therapy evaluated herein (Figure 3). In this study we also verified the drug score, which combines druglikeness, clogP, logS, molecular weight, and toxicity risks in one value and that may be used to consider the compound overall potential to qualify for a drug. Our data showed that compound **3i** presented a close value to pentamidine and a good profile based on the program values (Figure 3) [24,28-30].

According to our theoretical toxicity evaluation of the tumorigenic, irritant and reproductive profile of the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**), they show a low profile for these toxicity effects similar to glucantime and the non-substituted methoxychalcone (Figure 3), except for **3h** that presented a medium tumorigenic profile (not shown). It is important to notice that the toxicity predicted

herein neither is a fully reliable toxicity prediction, nor guarantees that these compounds are completely free of any toxic effect. However, it reinforced the promising profile of these compounds for further experimental investigation [24,28-30].

3. Conclusion

In conclusion, our data showed that the combination of two different pharmacophoric groups (i.e. chalcone and sulfonamide) enhanced the derivatives antileishmanial activity at least two fold compared to **3** and other chalcones [9]. The sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives exhibited a potential antileishmanial activity in vitro where compound **3i** presented the best activity profile against *L. braziliensis*. The structure-function analysis revealed that volume; the HOMO density concentrated in the chalcone moiety, and the conformational structure of the compounds as important structural and stereo electronic features for the antileishmanial activity. The theoretical study of these molecules also showed that they fulfilled Lipinski rule of 5 and present druglikeness similar to antileishmanial drugs. These results point the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives as lead compounds for designing new candidates for leishmaniasis treatment.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

All reagents and solvents used were analytical grade. TLC was carried out using silica gel F-254 Glass Plate (20 x 20 cm). The solid samples were measured using potassium bromide pellets. The ¹H Nuclear Magnetic Resonance (200-400MHz) and ¹³C-NMR (50-100 MHz) spectra were obtained from Bruker AC-200F and Varian

model Unity (Varian Oxford AS-400 spectrometer). Fourier transform infrared (FT-IR) absorption spectra were recorded in a Perkin-Elmer 16PC spectrophotometer using tetramethylsilane as internal standard. Microanalyses were carried out on a Carlo Erba EA 1110 instrument.

General procedure for the preparation of compounds 3a-3i. The sulfonyl chloride was treated with benzylamine in methanol at 0 °C. The mixture was reacted at room temperature for 2 h and was then poured onto iced-water. The precipitate was collected by filtration, washed with ice methanol, dried and recrystallized in hot ethanol. Compound **3a**: Yield 43%, m.p. 140-144°C. Compound **3b**: Yield 40%, m.p. 149-150°C. Compound **3c**: Yield 51%, m.p. 162-166 °C, IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} cm⁻¹ 1661, 1594, 1328, 1217, 1148, 701. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.3 (s, 1H, Ar-H), 8.05-8.01 (d, 2H, Ar-H), 7.81 (d, J = 14.28 Hz, 1H, olefinic H), 7.77 (d, 1H, Ar-H) 7.60-7.47 (m, 3H, Ar-H, 1H, olefinic H), 7.08 (d, 1H, Ar-H), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.44-3.38 (t, 4H, N-CH₂), 1.89-1.83 (q, 4H, CH₂). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃) δ 191.05; 157.36; 142.94; 137.97, 135.20, 133.13, 131.40, 128.90, 128.37, 128.11 ; 121.85; 112.76; 57.20; 48.05, 26.09. Anal. Calcd for C₂₀ H₂₁ N S: C, 64.67; H, 5.70; N, 3.77; S, 8.63. Found C, 64.22; H, 5.62; N, 3.83; S 8.49. Compound **3d**: Yield 38%, m.p. 158-158°C, IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} cm⁻¹ 1661, 1596, 1152, 1109, 699. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (d, 1H, Ar-H), 8.03 (d, 2H, Ar-H), 7.77 (d, J = 10.4 Hz, 1H, olefinic H), 7.74 (d, 1H, Ar-H), 7.64-7.45 (m, 3H, Ar-H, 1H, olefinic H), 7.08 (d, 1H, Ar-H), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (t, 4H, O-CH₂), 3.27 (t, 4H, N-CH₂). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃) δ 190.06; 158.25; 142.46; 137.95, 135.18, 132.94, 131.12, 128.66, 128.50, 127.72, 126.92; 121.81; 112.79; 66.71; 56.32; 46.01. Anal. Calcd for C₂₀ H₂₁ N S: C, 62.00; H, 5.46; N, 3.62; S, 8.28. Found C, 61.70; H, 5.37; N, 3.73; S 8.05. Compound **3e**: Yield 47%, m.p. 200-202°C.

Compound **3f**: Yield 51%, m.p. 205-207°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} cm^{-1} 3249, 1660, 1598, 1496, 1147, 689. ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ 8.15 (d, 1H, Ar-H), 8.01 (d, 2H, Ar-H), 7.71-7.65 (m, 5H, Ar-H), 7.60 (d, $J=14$ Hz, 1H, olefinic H), 7.56 (d, 1H, Ar-H), 7.26 (d, $J=14$ Hz, 1H, olefinic H), 7.03 (d, 2H, Ar-H), 7.47 (s, 1H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (50MHz, DMSO-d_6) δ 190.05; 157.90; 142.42; 138.00, 135.88, 135.83, 133.22, 131.57, 130.41, 128.67, 128.92, 128.76, 128.53, 127.70, 122.96; 122.36 ; 112.88; 57.04 . Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl N S}$: C, 61.75; H, 4.24; Cl, 8.29; N, 3.27; S, 7.49. Found C, 62.03; H, 4.22; N, 3.43; S 7.42. Compound **3g**: Yield 48%, m.p. 218-219°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} cm^{-1} 3238, 1652, 1590, 1495, 1160, 654. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.15 (s, 1H, Ar-H), 8.01 (d, 2H, Ar-H), 7.78 (d, $J=14.8$ Hz, 1H, olefinic H), 7.67 (s, 1H, Ar-H), 7.61-7.55 (m, 4H, Ar-H), 7.01 (dd, 1H, Ar-H), 7.09 (d, $J=14.8$ Hz, 1H, olefinic H), 7.24 (d, 1H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (50MHz, CDCl_3) δ 190.04 ; 157.35 ; 142.09 ; 137.86, 136.03, 135.79, 133.00, 130.92, 130.14, 129.14, 128.68, 128.53, 128.16, 126.69, 122.78, 122.23 ; 120.26; 112.76; 56.83. Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NS}$: C, 57.15; H, 3.71; Cl, 15.34; N, 3.03; S, 6.94. Found C, 56.93; H, 3.71; N, 3.09; S 6.50. Compound **3h**: Yield 60%, m.p. 183-185°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} cm^{-1} 3242, 1659, 1595, 1154, 643. ^1H NMR (200 MHz, DMSO): δ 9.85 (s, 1H, Ar-H), 8.1 (d, 2H, Ar-H), 8.09 (d, 2H, Ar-H), 7.73 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, olefinic H), 7.69 (d, $J=16$ Hz, 1H, olefinic H), 7.60-7.50 (m, 3H, Ar-H), 7.26-7.02 (m, 5H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH_3), 3.67 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (50MHz, DMSO-d_6) δ 189.68; 158.52, 157.00 ; 143.10; 138.23, 135.83, 133.78, 131.44, 130.77, 129.44, 129.22, 127.76, 127.55 ; 122.05 ; 115.42, 114.87; 57.25 , 55.76 . Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N S}$: C, 65.23; H, 5.00; N, 3.31; S, 7.57. Found C, 64.25; H, 5.07; N, 4.50; S 7.48. Compound **3i**: Yield 42%, m.p. 167-169°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} cm^{-1} 3210, 1655, 1591,

1162, 693. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (s, 1H, Ar-H), 8.04 (d, 2H, Ar-H), 7.73 (d, *J*= 15.8, 1H, olefinic H) 7.63 (d, 1H, Ar-H), 7.56-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.14 d, *J*= 15.8 Hz, 1H, olefinic H), 7.03 (m, 4H, Ar-H), 6.94 (d, 1H, Ar-H), 4.14 (d, 2H, CH₂), 4.09 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃) δ 190.73; 157.99 ; 143.12 ; 138.63, 136.75, 135.96, 133.65, 129.99, 129.37, 129.21, 129.09, 128.57 ; 122.51; 113.10 (C Ar); 57.17 ; 48.43. Anal. Calcd for C₂₃ H₂₁ N S: C, 67.79; H, 5.19; N, 3.44; S, 7.87. Found C, 67.52; H, 5.11; N, 3.50; S 7.62.

4.2. Biology

4.2.1. Drugs: All sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3**, **3a-3i**) were added in cultures as a dimethyl sulfoxide (DMSO) solution (50μM). The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 1% (v/v) and had no effect on the proliferation or morphology of parasites.

4.2.2. Parasites: *Leishmania braziliensis* promastigotes forms (strain Lb2904) were grown at 28 °C in Schneider's and LIT medium supplemented with 5 and 10% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS), respectively. The J774.A1 macrophage cell line was used to assess drug effects against intracellular amastigotes.

4.2.3. Antiparasite Assay:

4.2.3.1. Promastigotes

For the parasite growth inhibition assays, *Leishmania* promastigotes were harvested on the exponential phase of growth and the concentration was adjusted to 10 × 10⁶ parasites/ml in Schneider's medium plus 5% FBS for *Leishmania*. The compounds were dissolved in DMSO (25 mM) and further diluted to appropriate concentrations (1:4) ranging from 100 to 1.6 μM in culture medium. The parasite

suspension (100 μ L) was added to 96-well plates and incubated at 28°C for 72h in the presence of different concentrations of chalcones. We also used amphotericin B (ranging from 31.25 to 1,000 nM) as positive control, and 1% DMSO and medium only as negative controls. Three experiments were carried out in triplicate, and the number of live parasites was determined by counting in Neubauer chambers. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined by linear regression analysis, and represent the mean \pm standard error of the mean values of three independent experiments (GraphPad Software, San Diego, CA). The IC₅₀ for Pentamidine Isethionate was obtained from that described elsewhere [25].

4.2.3.2. *Amastigotes*

The J774.A1 macrophage cell line was used to assess drug effects against intracellular amastigotes. Cells were removed by scrapping and incubated at 34°C with *L. braziliensis* amastigote at a 5:1 parasite:cell ratio in RPMI medium supplemented with 20% FCS and maintained under gentle shaking overnight. One hundred microliters of the cell suspension was seeded on 13mm glass coverslips in 24 well plates, and incubated with different **3i** concentrations (0-100 μ M) for 48 hours at 34°C at 5% CO₂. After that, coverslips were air-dried, methanol fixed and Giemsa stained and mountant with DPX. The rate of cell infection as well as the number of amastigotes per cell was microscopically evaluated (1000x) by counting of 200 random cells at least of two independent experiments in duplicate. The percentage of inhibition was calculated according to Guru et al. (1989) and value higher than 25% was considered as effective. We also used amphotericin B as positive control, and 1% DMSO and medium only as negative controls.

4.2.4. *Cytotoxic assays*: The cytotoxic effect of chalcones to mouse peritoneal

macrophages was evaluated as previously described [9]. Cells were harvested from the peritonea of healthy mice after injection of 5 ml sterile phosphate saline buffer (PBS) containing EDTA 0.5%. Cells (5×10^5 cells/ml) were cultivated for 72 hours at 37°C in 96 well microplates in DMEM medium supplemented with 10% of FBS in the presence of different concentrations of compounds. Cytotoxicity (cell viability) was assessed by an MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay [34-35]. The 50% cytotoxicity concentrations (CC_{50}) were determined by linear regression analysis, and represent the mean \pm standard error of the mean values of three independent experiments (GraphPad Software, San Diego, Calif.)

4.3. Molecular Modeling and SAR studies

Molecular modeling was performed using SPARTAN'04 (Wavefunction Inc. Irvine, CA, 2000) and Osiris programs (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>) as described elsewhere [19,24,28-30]. Structures were minimized and the equilibrium geometry was obtained in vacuum using a semi-empirical AM1 module. In order to evaluate the electronic properties of the AM1 minimal energy conformations, they were submitted to a single-point calculation using DFT method with a 6-31-G* basis set of the SPARTAN'06 package. The three-dimensional isosurfaces of the molecular electrostatic potential maps (MEPs) at the van der Waals contact surface represented electrostatic potentials superimposed onto a surface of constant electron density (0.002 e/au^3). They were generated in a range from -65 to $+23$ kcal/mol. These color-coded isosurface values provide an indication of the overall molecular size and location of negative (red) or positive (blue) electrostatic potentials. The electronic properties (HOMO energy,

HOMO orbital coefficients distribution, LUMO density, dipole moment, dipole moment vector and lipophilicity-cLogP) were calculated for all compounds. Hydrogen bond acceptor and donor, molecular weight and volume and the theoretical toxicity properties were calculated in the Osiris Property Explorer property (<http://www.organic-chemistry.org/>) and in the *in silico* screening program (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

5. Acknowledgements

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Universidade Federal Fluminense (UFF) for the financial support.

6. References

1. P. T. Leopoldo, P. R. Machado, R. P. Almeida, A. Schriefer, A. Giudice, A. R. de Jesus, J. L. Ho, L. H. Guimarães, O. Bacellar, E. M. Carvalho, *BMC Infect. Dis.* 6 (2006) 75.
2. P. Trouiller, P. Olliaro, E. Torreele, J. Orbinski, R. Laing, N. Ford, *Lancet.* 22 (2002) 2188.
3. S. L. Croft, G. H. Coombs, *Trends in Parasitol.* 19 (2003) 502.
4. M. Chen, L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander, A. Kharazmi, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45 (2001) 2023.
5. S. Singh, R. J. Sivakumar, *Infect. Chemother.* 10 (2004) 307.
6. A. Ali, *Ethiopy Med. J.* 40 (2002) 37.

7. Z. Nowakowska, *Eur.J. Med. Chem.* 42 (2007)125-137.
8. H. K. Hsieh, T. H. Lee, J. P. Wang, J. J. Wang, C. N. Lin, *Pharm. Res.* 15 (1998) 39.
9. F. Lunardi, M. Guzela, A. T. Rodrigues, R. Correa, I. Eger-Mangrich, M. Steindel, E. C. Grisard, J. Assreuy, J. B. Calixto, A. R. Santos, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1449.
10. S. F.. Nielsen, T. Boesen, M. Larsen, K. Schonning, H. Kromann, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3047.
11. F. Uchiumi, T. Hatano, H. Ito, T. Yoshida, S-I. Tanuma, *Antivir. Res.* 58 (2003) 89.
12. J-H. Wu, X-H. Wang, Y-H. Yi, K-H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2003) 1813.
13. M. Cabrera, M. Simoens, G. Falchi, M. L. Lavaggi, O. E. Piro, E. E. Castellano, A. Vidal, A. Azqueta, A. Monge, A. L. de Ceráin, G. Sagrera, G. Seoane, H.Cerecetto, M. González, *Bioorg Med Chem.* 15 (2007) 3356.
14. M. L. Go, M. Liu, P. Wilairat, P. J. Rosenthal, K. J. Saliba, K. Kirk, *Antim. Agents Chemother.*, 48 (2004) 3241.
15. L. Ni, C. Q. Meng, J. Sikorski, *Expert Opin. Ther. Patents*, 14 (2004) 1669.
16. P. Boeck, C. A. B. Falcão, P. C. Leal, R. A. Yunes, V. Cechinel Filho, V. E. C. Torres-Santos, B. Rossi-Bergmann, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006)1538.
17. J. Piñero, R. M. Temporal, A. J. Silva-Gonçalves, I. A. Jiménez, I. L. Bazzocchi, A. Oliva, A. Perera, L. L. Leon, B. Valladares, *Acta Trop.* 98 (2006) 59.
18. M. M. Salem, K. A. J. Werbovetz, *Nat. Prod.* 69 (2006) 43.
19. G. Bhattacharya, M.M. Salem, K.A. Werbovetz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 (2002) 2395.

20. M. S. Costa, N. Boechat, E. A. Rangel, F. de C. da Silva, A. M. de Souza, C. R. Rodrigues, H. C. Castro, I. N. Junior, M. C. Lourenco, S. M. Wardell, V. F. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2006) 8644.
21. A. I. Vogel, B. S. Furniss, In *Vogel's textbook of practical organic chemistry* Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W., Tatchell, A.R., Ed. Longmann Scientific & Technical: New York, 1989.
22. J. R. Cremlyn, F. J. Swinbourne, O. O. J. Shode, *Chin. Chem. Soc.* 31 (1984) 383.
23. R. J. Cremlyn, F. J. Swinbourne, P. Bassin, D. Dane, K. Higgins, P. Mitchell, J. A. S. Cavaleiro, F. J. Domingues, M. Dias, *Phosphorus Sulfur* 63 (1991) 385.
24. V. F. Ferreira, A. Jorqueira, A. M. Souza, M. N. da Silva, M. C. de Souza, R. M. Gouvêa, C. R. Rodrigues, A. V. Pinto, H. C. Castro, D. O. Santos, H. P. Araújo, S. C. Bourguignon, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2006) 5459.
25. N. M. F. Lima, C. S. Correia, L. L. Leon, G. M. C. Machado, M. F. Madeira, A. E. G. Santana, M. O. F. Goulart, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99 (2004) 757.
26. L. Zhai, J. Blom, M. Chen, S. B. Christensen, A. Kharazmi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2742.
27. L. Zhai, M. Chen, J. Blom, S. B. Christensen, T. G. Theander, A. Kharazmi, *J. Antimicrob. Chemother.* 43 (1999) 793.
28. A. M. Bernardino, H. C. Castro, I. C. Frugulhetti, N. I. Loureiro, A. R. Azevedo, L. C. Pinheiro, T. M. Souza, V. Giongo, F. Passamani, U. O. Magalhães, M. G.; Albuquerque, L. M. Cabral, C. R. Rodrigues, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 313-21.

29. L. R. Dias, M. B. Santos, S. Albuquerque, H. C. Castro, A. M. de Souza, A. C. Freitas, M. A. DiVaio, L. M. Cabral, C. R. Rodrigues, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 211.
30. A. M. Bernardino, L. C. da Silva Pinheiro, C. R. Rodrigues, N. I. Loureiro, H. C. Castro, A. Lanfredi-Rangel, J. Sabatini-Lopes, J. C. Borges, J. M. Carvalho, G. A. Romeiro, V. F. Ferreira, I. C. Frugulhetti, M. A. Vannier-Santos, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2006) 5765.
31. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* 23 (1997) 3.
32. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. J. Kopple, *Med. Chem.* 45 (2002) 2615.
33. I.V. Tetko, *Drug. Discov. Today*. 15 (2005) 1497.
34. T. J. Mosmann, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55.
35. A. Sieuwerts, J. G. M. Klijn, H. A. Peters, J. A. Foekens, *Eur. J. Clin. Chem.*, 33 (1995) 813.

Figures legends

Figure 1: Biological evaluation of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**). Inhibitory effects on *L. braziliensis* in vitro proliferation (**A**), cytotoxicity profile on mouse macrophages (**B**), selectivity index (**SI**) calculated as described by Ferreira et al., 2006 [24] (**C**) and the inhibition of the amastigotes infection on macrophages by the most active compound (**3i**) (**D**).

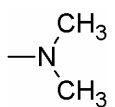
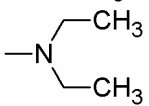
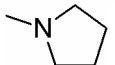
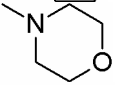
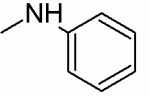
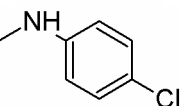
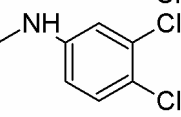
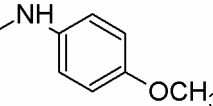
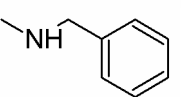
Figure 2: Conformational analysis (**A**), HOMO density encoded onto a van der Waals surface (**B**) and electrostatic potential map (**C**) of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**). HOMO absolute density coefficient (isodensity 0.002 e/au³) mapped from deepest red (0.00) to deepest blue (0.02). The chalcone moiety of all molecules is turned to the front in (**A**), (**B**) and (**C**). The position is slightly altered in (**B**) and (**C**) to allow a better view of the parameters analyzed.

Figure 3: Structural alignment of the most (**3i**) and the less active (**3e**) derivatives of the sulfonamide 4-methoxychalcone series (**A**), and the druglikeness and drugscore values (**B**) and the theoretical toxicity evaluation (**C**) of the most active compounds (**3b**, **3d**, **3f** and **3i**) compared to the non-substituted 4-methoxychalcone and antileishmanial drugs. (**A**) The most (**3i**) and the less active (**3e**) compounds are represented in stick and ball colored by element (Grey = carbon, white = hydrogen, blue = nitrogen, red = oxygen and orange = sulfur). The white color in the CPK structure shows the chalcone and sulfonamide parts in these compounds (**3i** and **3e**) whereas green represents the contributing region of the most active compound (**3i**) and purple indicates the prohibitive region of the less active derivative (**3e**).

Scheme 1. Rational approach to design the sulfonamides 4-methoxychalcones derivatives.

Scheme 2. Synthetic approach used to obtain the sulfonamides 4-methoxychalcones derivatives.

Table 1: Comparison of the antileishmanial activity (IC_{50}) of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a–i**) with their theoretical molecular electronic properties (Dipole, E_{HOMO} , E_{LUMO} , cLog P, Volume, Molecular weight - MW) and Lipinski profile, including the number of Hydrogen Bond Donor and Acceptor Groups (HDG and HAG respectively).

C	R	IC_{50} (μM)	Dipole (Debye)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Lipinski Rule of 5				
						Volume (\AA^3)	HDG	HAG	clogP	MW
3	-	16.6 ± 1.6	3.39	-8.43	2.01	263.80	0	2	3.63	238.29
3a		8.6 ± 0.4	7.32	-8.38	2.04	346.07	0	5	2.61	345.42
3b		5.6 ± 0.4	8.95	-8.40	2.09	382.91	0	5	3.29	373.47
3c		13.0 ± 1.3	7.23	-8.76	0.95	371.83	0	5	2.93	371.46
3d		5.9 ± 1.3	7.31	-8.59	1.87	379.89	0	6	2.21	387.46
3e		69.0 ± 3.7	8.67	-8.57	1.87	391.84	1	5	4.04	393.46
3f		4.6 ± 1.3	8.20	-8.19	2.09	405.13	1	5	4.60	427.91
3g		8.1 ± 1.6	7.84	-8.89	0.951	418.27	1	5	5.16	462.35
3h		7.5 ± 0.8	7.56	-8.27	2.06	419.38	1	6	3.91	423.49
3i		3.5 ± 0.6	7.17	-8.59	1.87	410.52	1	5	4.11	407.49

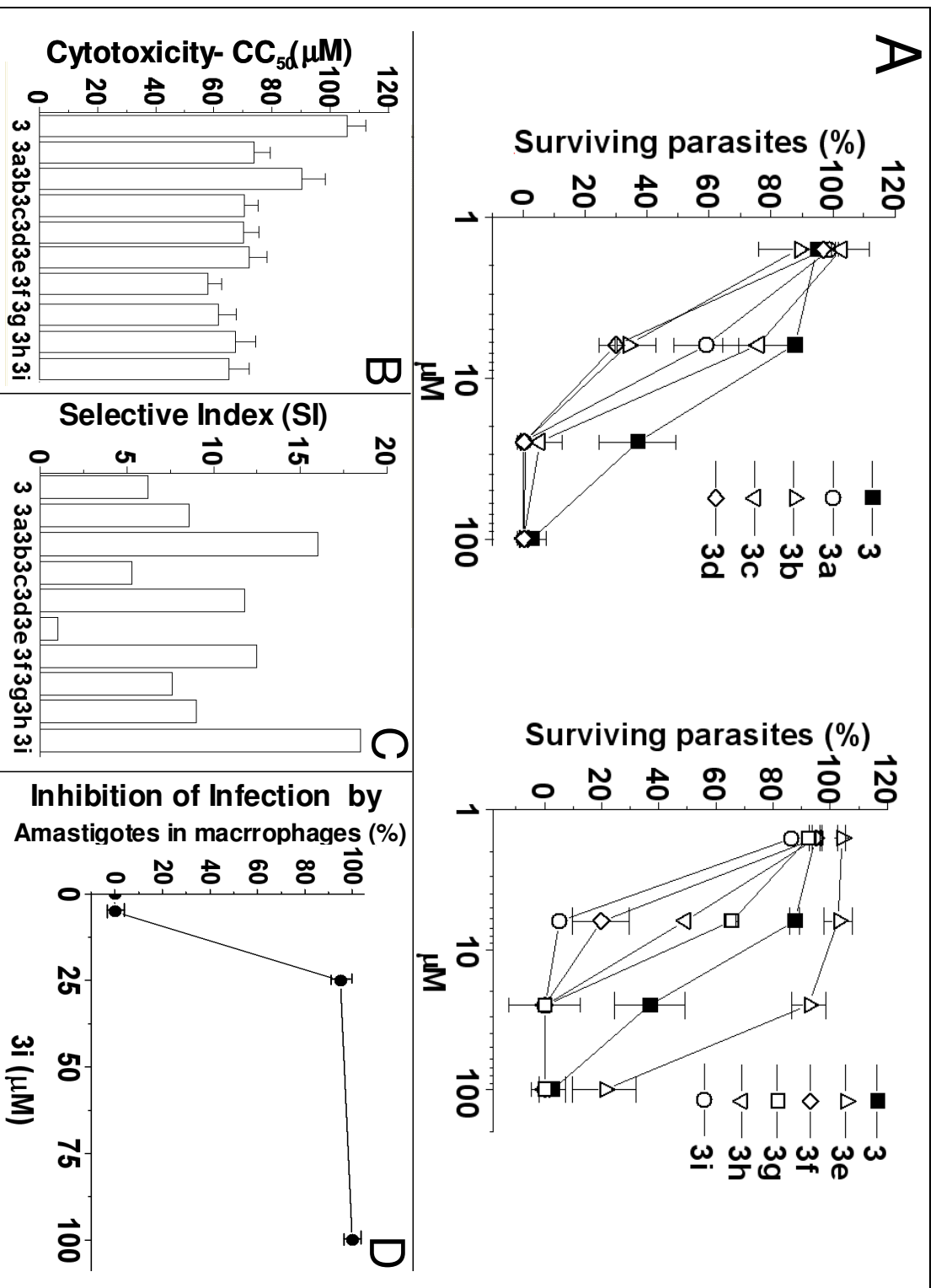


Figure 1

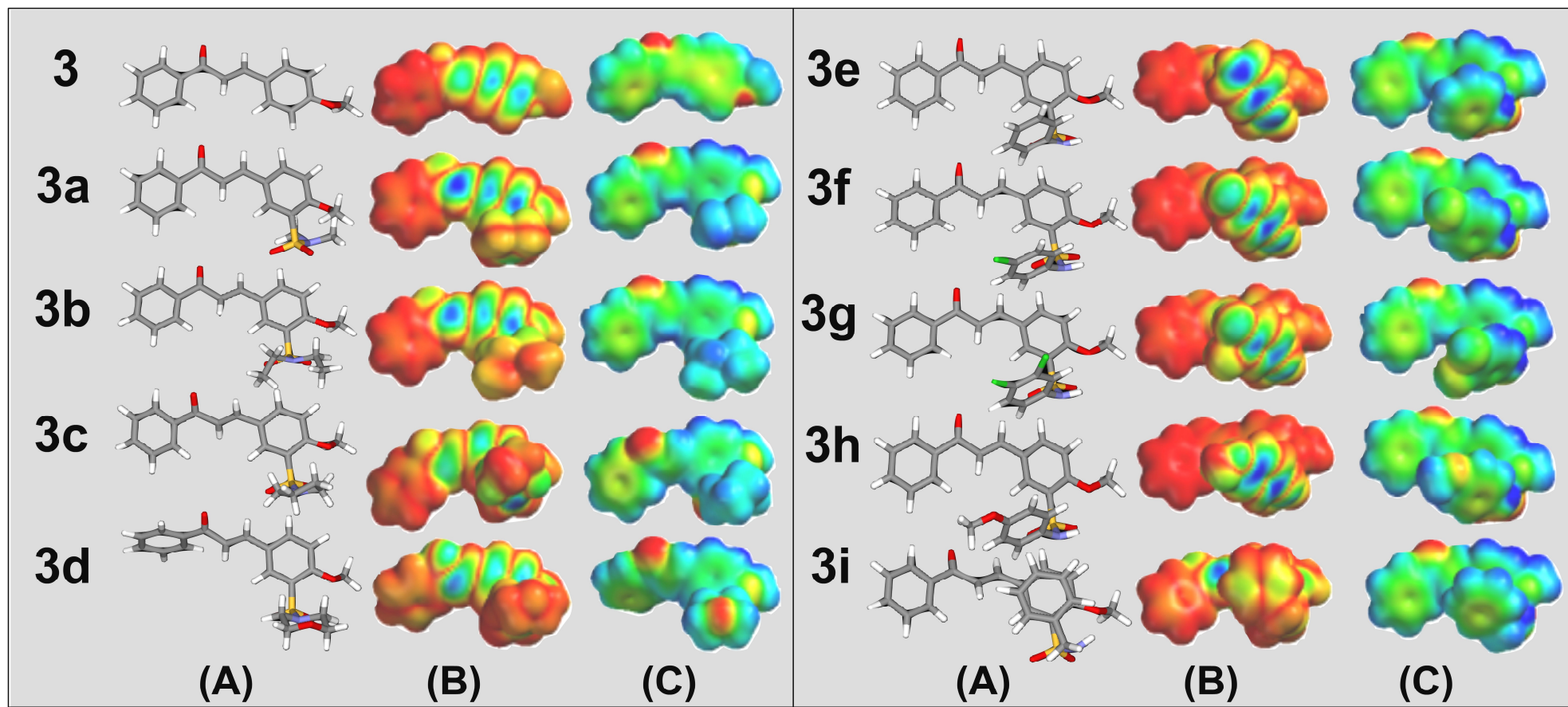


Figure 2

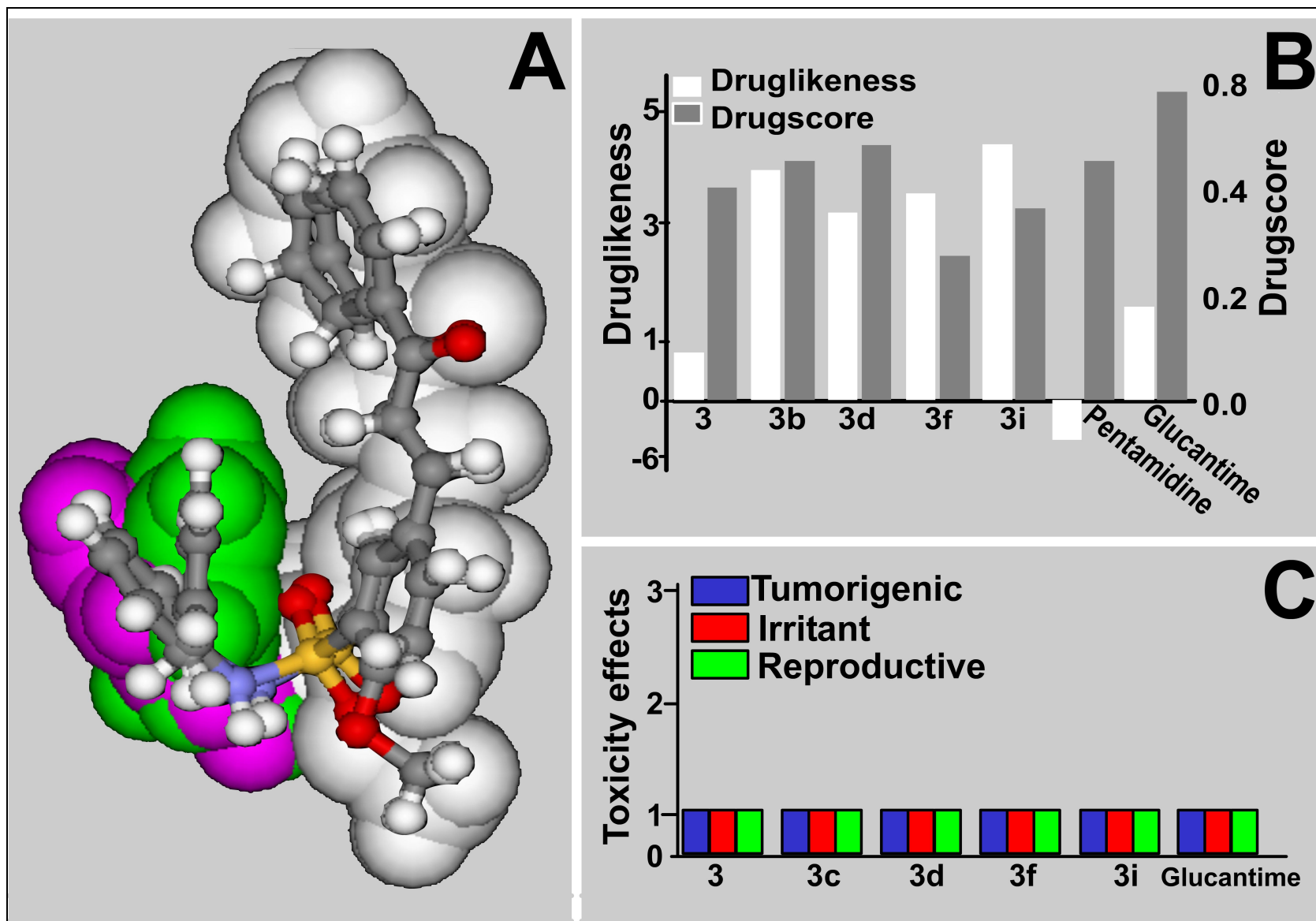
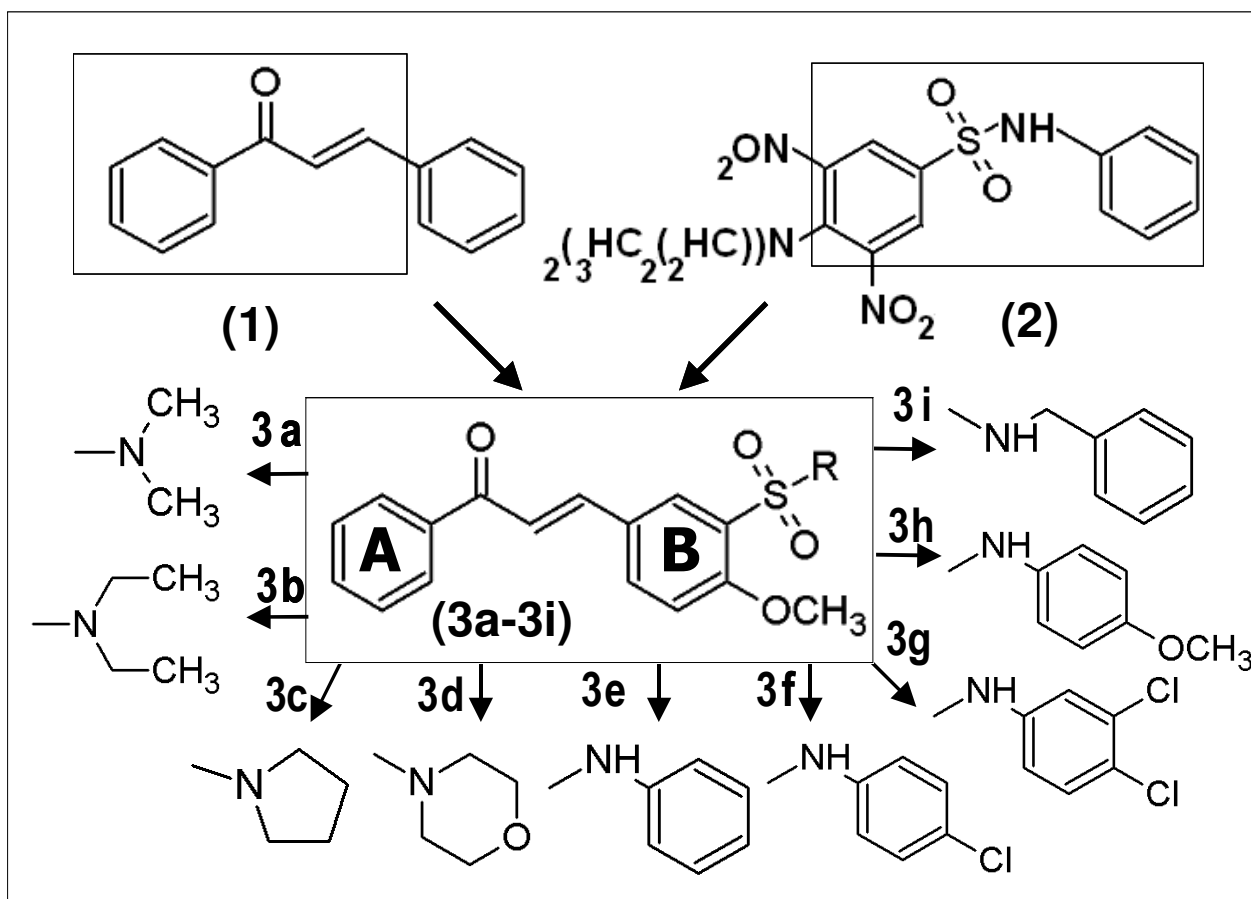
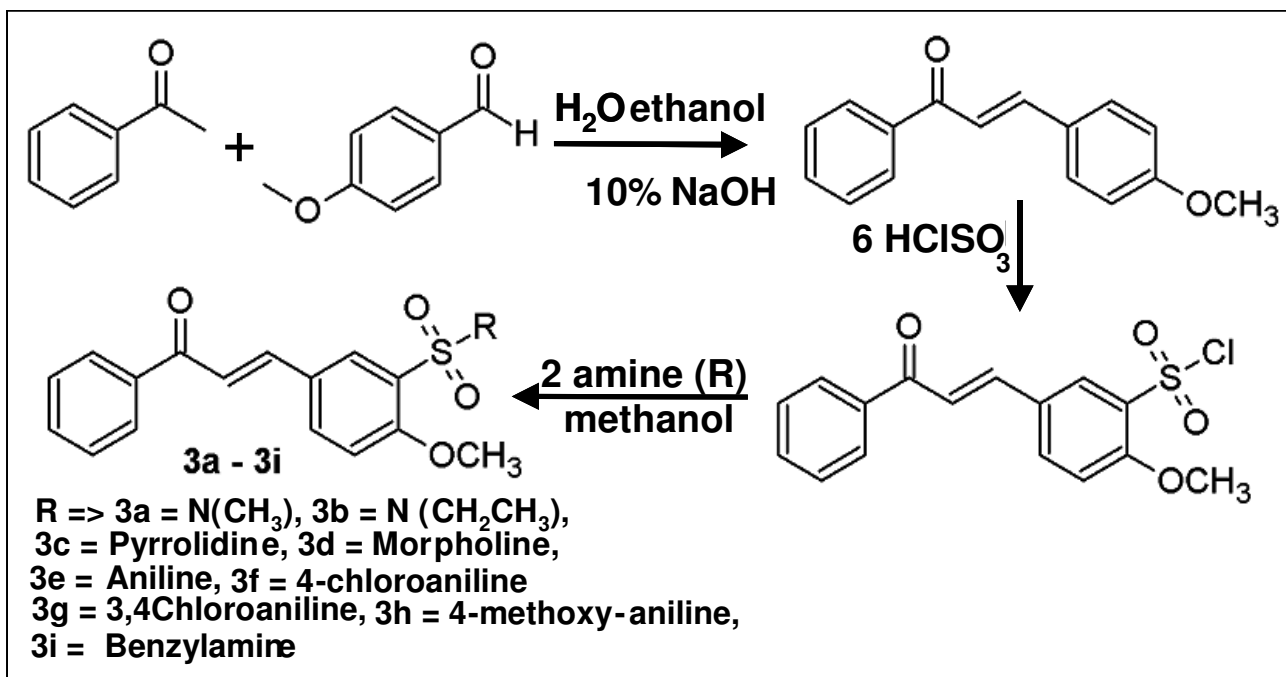


Figure 3



Scheme 1



Scheme 2