

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 07/09/2018.

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química

LETÍCIA DE ALMEIDA

Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano:
atividade biológica *in vitro* e *in vivo* e potenciais
mecanismos de ação

Araraquara
2017

LETÍCIA DE ALMEIDA

Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano:
atividade biológica *in vitro* e *in vivo* e potenciais
mecanismos de ação

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pela Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia A. S. Graminha.

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

A447L Almeida, Letícia de
Leishmanioses e derivados de furoxano e
benzofuroxano: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* e
potenciais mecanismos de ação / Letícia de Almeida. –
Araraquara : [s.n.], 2017
130 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha

1. *Leishmania*. 2. Leishmaniose. 3. Compostos bioativos.
4. Proteinase. 5. Cálcio-Metabolismo. I. Título.

LETÍCIA DE ALMEIDA

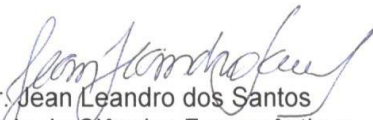
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 07 de março de 2017.

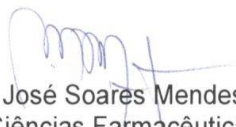
BANCA EXAMINADORA



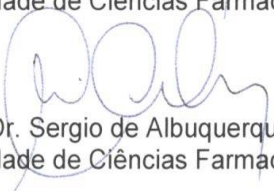
Profª Drª Marcia Aparecida Silva Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



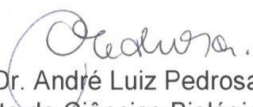
Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria José Soares Mendes Giannini
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Sergio de Albuquerque
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. André Luiz Pedrosa
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais – UFMT, Uberaba

“O talento vence jogos, mas só o trabalho em equipe ganha campeonatos”.

Michael Jordan

AGRADECIMENTOS

*À **Deus** por ser a força condutora de minha vida, por espalhar luz em mim e nos que me cercam, por me fortalecer nos momentos de dificuldade e por ter traçado a mim caminhos que fizeram chegar até aqui;*

*À minha família, em especial aos meus pais **Neusa** e **José Antonio** e irmão **José Ricardo** que sempre me dedicaram muito amor e apoio constante;*

*Ao meu namorado **Rafael Marangoni** que esteve sempre presente e apoiando-me;*

*À **Profª. Drª. Marcia Graminha** pela orientação, pela oportunidade e confiança depositada, e por me encorajar nas apresentações ao longo do doutorado;*

*Aos amigos do **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanosomatídeos-UNESP**, **Thaís, Fábio, Mayara, Camila, Amanda, Leandro, Rhyanne, Kely, Jéssica, Alex e Angela** pelos aprendizados durante esses anos de convívio;*

*A todos do **Laboratório de Parasitologia Básica**, em especial o **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**, **Profª Drª Mara Cristina Pinto** e a aluna **Aline Rimoldi** que nos acolheram em seu laboratório enquanto o prédio do DAC ainda estava em construção;*

*À **Isabel Martinez**, quem se dispôs a me ouvir e me aconselhar quando precisei e quem também me ajudou em diversos experimentos, mesmo aqueles em pleno carnaval;*

*Ao **Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos** e os alunos **Luiz Antonio Dutra** e **Aline Pavan** pela colaboração, momentos de discussão de resultados e por cederem as moléculas que foram testadas;*

*Ao **Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade** pela colaboração e apoio nos ensaios histopatológicos e ainda pelos ensinamentos e conselhos dados;*

Ao Prof. Dr. Jeremy Mottram e Prof. Dr. Graham Coombs e os alunos Elmarie Myburgh e Gareth Westrop que me ajudaram nos ensaios com cisteína proteases e possibilitaram discussões importantes para o trabalho;

A todos da Universidade de Glasgow que me receberam, em especial a Amy, Andrea e Kirsten as quais me acolheram com mais amizade;

À Prof^a Dr^a Angela Kaysel Cruz e aluna Eliza Vanessa C. A. Ferreira que nos nortearam para os ensaios in vivo;

Aos amigos Thaís, Amanda, Leandro, Rhyanne, Aline, Mayara e Fábio os quais a amizade e o companheirismo se estenderam além do convívio do laboratório;

A FAPESP e CNPq (processo: 140452/2013-3) pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida;

A todos que direta ou indiretamente me apoiaram para a conclusão de mais uma etapa de minha vida. Obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário parasito do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada do inseto vetor, o flebotomíneo. As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas, sendo elas leishmaniose cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam diversos efeitos colaterais, além de problemas associados às vias de administração e surgimento de cepas resistentes. Os furoxanos e benzofuroxanos são compostos heterocíclicos contendo a função *N*-óxido com múltiplas atividades, incluindo anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*. Neste trabalho, uma série de derivados de furoxano (compostos **3**, **4a-b**, **13a-b**, e **14a-f**) e benzofuroxano (**7** e **8a-c**) foram avaliados em ensaios *in vitro* frente as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*. Os compostos foram também avaliados quanto à citotoxicidade em macrófagos murinos e quanto à sua capacidade de produção de óxido nítrico *in vitro* e em macrófagos infectados com o parasito. A atividade leishmanicida (EC₅₀) dos derivados em estudo variou de 2,0 a 96,0 µM, enquanto que a citotoxicidade de 5,0 a 250,0 µM. A molécula doadora de óxido nítrico **14e** revelou ser a mais promissora dentre os derivados analisados, exibindo ação pH-dependente. Adicionalmente, o derivado **14e** mostrou ser capaz de inibir a enzima cisteíno protease de *Leishmania*, importante fator de virulência deste parasito. Estes ensaios mostraram que **14e** inibe a isoforma recombinante de cisteíno protease B 2.8 (IC₅₀ = 1,0 µM), com possível envolvimento da cisteíno protease A no mecanismo de ação desse derivado, como revelado em ensaios realizados com linhagens nocautes de *L. (L.) mexicana* para os genes codificadores destas enzimas. Estudos de biologia celular realizados indicaram ainda possível interação do **14e** com outros alvos de ação, como alterações na homeostase do cálcio. Nos estudos *in vivo* realizados com hamsters infectados com *L. (L.) infantum* constatou-se que o tratamento com uma dose de 3,0 mg/Kg/dia do **14e** levou a uma redução significativa da carga parasitária no baço (49,9%) e no fígado (54,2%) também não se verificou efeitos tóxicos pelas análises bioquímicas e histopatológicas conduzidas. Desta forma, este trabalho indica o derivado furoxano **14e** como uma molécula promissora para o desenvolvimento de um agente leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania*. Atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Furoxanos. Benzofuroxanos. Cisteíno proteases. Homeostase de cálcio.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by the protozoan parasite of *Leishmania* genus and transmitted by the bite of insect vector, phlebotomine. Leishmaniasis present different clinical manifestations, including cutaneous, mucocutaneous, diffuse cutaneous and visceral leishmaniasis. The currently available drugs for leishmaniasis treatment show several side effects, besides problems associated with the administration routes and the emergence of resistant strains. Furoxan and benzofuroxan are heterocyclic compounds containing the N-oxide function showing several activities, including anti-*T. cruzi* and anti-*Leishmania*. In this work, a series of furoxan (compounds **3**, **4a-b**, **13a-b**, and **14a-f**) and benzofuroxan (**7** and **8a-c**) derivatives were tested against the species *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*. The compounds were also evaluated for cytotoxicity against murine macrophages and as to its ability to produce nitric oxide *in vitro* and in macrophages infected with the parasite. The antileishmanial activity (EC₅₀) of the derivatives studied ranged from 2.0 to 96.0 µM, whereas the cytotoxicity of 5.0 to 250.0 µM. The nitric oxide donor molecule **14e** revealed to be the most promising of the analyzed derivatives, exhibiting a pH-dependent action. Furthermore, the derivative **14e** was shown to be capable of inhibiting the cysteine protease enzyme of *Leishmania*, an important virulence factor of this parasite. These assays showed that **14e** inhibits the cysteine protease B 2.8 recombinant isoform (IC₅₀ = 1.0 µM), with possible involvement of the cysteine protease A in the mechanism of action of this derivative, as revealed in tests performed with knockouts *L. (L.) mexicana* mutants for the genes encoding these enzymes. Cell biology studies have also indicated possible interaction of **14e** with other action targets, such as changes in calcium homeostasis. In the *in vivo* studies using *L. infantum*-infected hamsters it was found that the treatment with a dose of 3.0 mg/Kg/day of **14e** led to a meaningful reduction of parasite load in spleen (49.9%) and liver (54.2%), moreover no toxic effects were detected by the biochemical and histopathological analyzes conducted. Thus, this work indicates the furoxan derivative **14e** as a promising molecule for the development of an antileishmanial agent.

Keywords: *Leishmania*. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity. Furoxans. Benzofuroxans. Cysteine proteases. Calcium homeostasis.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT.....	Alanina aminotransferase	La14eR.....	<i>L. (L.) amazonensis</i> cultivada na presença do 14e
ALP.....	Fosfatase alcalina	LC.....	Leishmaniose Cutânea
AnfB	Anfotericina B	LCD.....	Leishmaniose Cutânea Difusa
ARG.....	Arginase	LDPC.....	Leishmaniose Dermal Pós-Calazar
ARG1.....	Via da Arginase	LiWT.....	<i>L. (L.) infantum</i> sensível ao 14e
AST.....	Aspartato aminotransferase	Li14eR.....	<i>L. (L.) infantum</i> cultivada na presença do 14e
ATP.....	Adenosina Trifosfato	LM.....	Leishmaniose Mucocutânea
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50% da população	LPG.....	Lipofosfoglicanos
CP.....	Cisteína Protease	LPS.....	Lipopolissacarídeo
CPA.....	Cisteína Protease tipo A	LV.....	Leishmaniose Visceral
CPB.....	Cisteína Protease tipo B	MHC II.....	Complexo de Histocompatibilidade II
CPC.....	Cisteína Protease tipo C	MTT.....	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
DMSO.....	Dimetilsulfóxido	nm.....	nanômetros
DN.....	Doença Negligenciada	NO.....	Óxido Nítrico
DND _i	Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas	NOS2.....	Óxido Nítrico Sintase 2
EC ₅₀ -AMA.....	Concentração Efetiva para 50% de formas amastigotas	OMS.....	Organização Mundial de Saúde
EC ₅₀ -PRO.....	Concentração Efetiva para 50% de formas promastigotas	PMS.....	Metossulfato de fenazina
EROs.....	Espécies Reativas de Oxigênio	rCPB2.8.....	Isoforma Recombinante da CPB 2.8 de <i>L. (L.) mexicana</i>
FcγRs.....	Receptores Gama Fc	RPMI.....	Meio Roswell Park Memorial Institute
FDA.....	Administração de Fármacos e Alimentos	Sb ^{III}	Antimonial Trivalente
GP63.....	Metaloprotease de Superfície	Sb ^V	Antimonial Pentavalente
H&E.....	Hematoxilina/Eosina	SDS.....	Duodecil Sulfato de Sódio
HPLC.....	Cromatografia Líquida de Alta Performance	Th1.....	Célula T helper tipo 1
i.p.....	Via Intraperitoneal	Th2.....	Célula T helper tipo 2
IC ₅₀	Concentração Efetiva para Inibição 50% de Enzima	TGF-β.....	Fator de Transformação do Crescimento β
IFN-γ.....	Interferon γ	TNF-α.....	Fator de Necrose Tumoral α
IgE.....	Imunoglobulina E	Z-FR-pNA.....	Z-Phe-Arg-p-Nitroanilida
IgG.....	Imunoglobulina G	ZM.....	Zona Marginal
IgM.....	Imunoglobulina M	λ.....	Comprimento de onda
IV.....	Índice de Variação	Δψ _m	Potencial de Membrana Mitocondrial
IS.....	Índice de seletividade	Δcpb.....	Mutantes Nulos para <i>cpb</i>
L-Arg.....	L-arginina	Δcpa/Δcpb.....	Mutantes Nulos para <i>cpa</i> e <i>cpb</i>
LaWT.....	<i>L. (L.) amazonensis</i> sensível ao 14e	Δcpb+pXcpb2.8.....	Mutantes Nulos para <i>cpb</i> e suprerexpressora da rCPB2.8
		ΔF.....	Fluorescência Relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial das leishmanioses em 2013.....	18
Figura 2. Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	20
Figura 3. Ciclo da vida do protozoário <i>Leishmania</i>	22
Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar.....	24
Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.....	25
Figura 6. Mapa de distribuição dos casos de leishmanioses e casos de coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV no mundo até 2001.....	26
Figura 7. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	29
Figura 8. Projetos do DNDi.....	35
Figura 9. Clãs e famílias de proteases de <i>L. (L.) major</i> . A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/).....	39
Figura 10. Representação diagramática de interação do substrato peptídico com os bolsões de sítio ativo de uma cisteína protease.....	40
Figura 11. Via L-Arg e determinação do resultado da infecção.....	42
Figura 12. Transporte, biossíntese, interconversão e utilização das poliaminas em <i>Leishmania</i> e via da tripanotona.....	44
Figura 13. Representação esquemática da via de ativação de macrófagos e resultado da infecção.....	45
Figura 14. Estrutura química dos derivados furoxânicos (4a , 4b , 14a-f) e benzofuroxânicos (8a-c) e os compostos precursores (3 , 7 , 13a e 13b).....	48
Figura 15. Representação esquemática da disposição dos compostos e parasitos em placas de 96 poços do ensaio com formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	56
Figura 16. Concentração de NO em mM produzido por macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença de derivados furoxanos ou benzofuroxanos.....	77
Figura 17. Concentração de NO em μ M produzido por macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> na presença de derivados furoxanos ou benzofuroxanos.....	78

Figura 18. Ensaio de estabilidade <i>in vitro</i> de 14a (A) e 14e (B) nos pHs 5,4 e 7,0.....	80
Figura 19. Ação pH-dependente dos derivados furoxânicos 14a e 14e em macrófagos infectados com amastigotas de <i>Leishmania</i>	82
Figura 20. Estrutura química do derivado furoxânico 14e , evidenciando <i>N</i> -acil hidrazona e ataque nucleofílico de um resíduo de aminoácido 14e	83
Figura 21. Ensaio de mecanismo de inibição da rCPB2.8 pelo derivado 14e	87
Figura 22. Curva de crescimento das linhagens selvagem e resistente de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> em meio de cultura.....	90
Figura 23. Ensaio de mobilização de cálcio intracelular.....	92
Figura 24. Tratamento de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> com 14e ou AnfB.....	95
Figura 25. Avaliação da toxicidade em hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com 14e ou AnfB.....	99
Figura 26. Estrutura geral do fígado.....	101
Figura 27. Alterações histopatológicas no fígado de hamster infectado com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.....	103
Figura 28. Fotomicrografia das alterações histopatológicas do fígado de hamster infectado com <i>L. (L.) infantum</i> tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.....	104
Figura 29. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no fígado e baço de hamster infectado com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.....	105
Figura 30. Estrutura geral do baço.....	106
Figura 31. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no baço de hamster infectado com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.....	108
Figura 32. Estrutura geral do rim.....	109
Figura 33. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no rim de hamster infectado com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.....	111
Figura 34. Hipótese do mecanismo de ação do derivado furoxânico 14e	112

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, propriedades, administração e comentários.....	28
Tabela 1. Derivados furoxânicos e benzofuroxânicos, código e estrutura química.....	52
Tabela 2. Determinação da concentração efetiva em formas promastigotas (EC_{50-PRO} , μM) de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> , e citotoxicidade (CC_{50} , μM) em macrófagos peritoneais murinos dos derivados de furoxano, benzofuroxano e seus precursores.....	69
Tabela 3. Determinação da concentração efetiva em formas amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> , e citotoxicidade (CC_{50} , μM) em macrófagos peritoneais murinos dos derivados de furoxano e benzofuroxano.....	73
Tabela 4. Liberação de NO <i>in vitro</i> (%). Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicatas $\pm$ desvio padrão.....	75
Tabela 5. Determinação da concentração efetiva em formas promastigotas (EC_{50-PRO} , μM) e amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) e atividade inibitória de isoforma recombinante de rCPB2.8 (IC_{50} , μM) de <i>L. (L.) mexicana</i> dos derivados de furoxano e benzofuroxano.....	85
Tabela 6. Determinação da concentração efetiva, pelo derivado furoxânico 14e , em formas amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) de <i>L. (L.) mexicana</i> em diferentes linhagens: selvagem, mutante nocaute para CPB (Δcpb), mutante duplo nocaute para CPB e CPA ($\Delta cpa/\Delta cpb$) e mutante nocaute para CPB e superexpressor de CPB 2.8 ($\Delta cpb+pXcpb2.8$) (EC_{50-AMA}).....	88
Tabela 7. Valores de EC_{50-PRO} das linhagens selvagem e resistente de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> frente ao composto 14e	89

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Doenças Negligenciadas	17
2.2 Leishmanioses	19
2.3 Manifestações Clínicas	23
2.4 Tratamento Farmacológico	27
2.4.1 <i>Tratamento de primeira escolha.....</i>	<i>29</i>
2.4.2 <i>Tratamento de segunda escolha.....</i>	<i>31</i>
2.4.3 <i>Novos fármacos e o pipeline do DNDi.....</i>	<i>34</i>
2.5 Derivados de Furoxano e Benzofuroxano.....	36
2.6 Cisteíno Proteases	37
2.7 Leishmania e o Escape do Sistema Imune do Hospedeiro	41
2.8 Resposta Imune à Doença.....	44
2.9 Cálcio, Mitocôndria e EROS.....	46
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivos Gerais.....	49
3.2 Objetivos Específicos	49
3.2.1 <i>Avaliação da atividade in vitro anti-Leishmania.....</i>	<i>49</i>
3.2.2 <i>Estudos de Mecanismos de ação.....</i>	<i>50</i>
3.2.3 <i>Avaliação da eficácia in vivo do derivado 14e em modelo de LV.....</i>	<i>50</i>
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Reagentes	51
4.2 Parasitos e Células de Mamíferos	54
4.3 Animais para Experimentação	55
4.4 Ensaio de atividade leishmanicida in vitro	55
4.4.1 <i>Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida in vitro em formas promastigotas de L. (L.) amazonensis e L. (L.) infantum.....</i>	<i>55</i>
4.4.2 <i>Bioensaio para determinar a citotoxicidade in vitro em macrófagos peritoneais murinos</i>	<i>57</i>
4.4.3 <i>Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida in vitro em formas amastigotas intracelulares de L. (L.) amazonensis e L. (L.) infantum.....</i>	<i>58</i>

4.4.4 Dosagem de óxido nítrico <i>in vitro</i>	58
4.4.5 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células	59
4.5 Ensaio de Estabilidade dos Derivados Furoxânicos e Benzofuroxânicos.....	60
4.6 Ensaios de inibição da enzima Cisteíno Protease de <i>L. (L.) mexicana</i>	60
4.6.1 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas promastigotas de <i>L. (L.) mexicana</i>	60
4.6.2 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) mexicana</i>	61
4.6.3 Ensaio para avaliar a atividade inibitória de cisteíno protease (rCPB 2.8) de <i>L. (L.) mexicana</i> por compostos derivados de furoxano e benzofuroxano.....	61
4.6.4 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida do derivado 14e em diferentes linhagens de <i>L. (L.) mexicana</i>	62
4.7 Ensaios com Leishmania para Desenvolvimento de Cepa Resistente ao Derivado 14e.....	63
4.7.1 Desenvolvimento da cepa de <i>Leishmania</i> resistente ao derivado 14e	63
4.8 Ensaios para Avaliar a Homeostase do Cálcio.....	64
4.8.1 Marcação de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> com Fluo8-AM.....	64
4.8.2 Avaliação dos níveis de cálcio em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	64
4.9 Ensaios <i>in vivo</i>	65
4.9.1 Bioensaio para avaliar a eficácia do composto 14e no tratamento da LV.....	65
4.9.2 Avaliação da carga parasitária por diluição limitante.....	66
4.9.3 Avaliação toxicológica	66
4.9.4 Avaliação histopatológica.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 O Derivado Furoxânico 14e Apresentou Atividade Leishmanicida nos Ensaios <i>in vitro</i>	68
5.1.1 Ensaios de atividade antipromastigota para <i>L. (L.) amazonensis</i> indicam os derivados 8a, 14a, 14b, 14c, 14d e 14e para avaliação antiamastigota	70
5.1.2 Ensaios de atividade antipromastigota para <i>L. (L.) infantum</i> indicam os derivados 4a, 8a, 8b, 8c, 14b, 14c, 14d e 14e para avaliação antiamastigota.....	71
5.1.3 Ensaios de atividade antiamastigota para <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> indicam os derivados 14b, 14d e 14e como promissores candidatos no tratamento da LC ou LV	72

5.1.4 Ensaio de dosagem de óxido nítrico indicam 14e como liberador de NO <i>in vitro</i> e em macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (L.) infantum</i>	73
5.1.5 A estabilidade dos derivados de furoxanos indicam uma atividade pH-dependente da molécula.....	79
5.1.6 Alguns derivados furoxânicos são inibidores de CP e exibem atividade leishmanicida em <i>L. (L.) mexicana</i>	83
5.1.7 O composto 14e é um inibidor não-competitivo	86
5.1.8 O composto 14e pode apresentar outros alvos de ação em <i>Leishmania</i>	87
5.1.9 Ensaio inicial indicam outros possíveis alvos de ação em <i>Leishmania</i> do derivado 14e : alterações nos níveis de cálcio intracelular	92
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	93
5.2.1 O derivado 14e reduziu a carga parasitária <i>in vivo</i> no fígado e baço na dose de 3,0 mg/Kg/dia	93
5.2.2 O tratamento com 14e na dose de 3,0 mg/Kg/dia não exibiu toxicidade de acordo com os marcadores bioquímicos de toxicidade.....	96
5.2.3 O tratamento com 14e na dose de 3,0 mg/Kg/dia não causou efeitos tóxicos no fígado, baço e rim pelas análises histopatológicas	100
7 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão presentes em 98 países, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo (McGWIRE; SATOSKAR, 2014; WHO, 2010). A doença apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo elas leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV) (BARRETT; CROFT, 2012). Cerca de vinte espécies de *Leishmania* são conhecidas como os agentes causadores de leishmanioses em humanos (AKHOUNDI et al., 2016). A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (SHARMA; SINGH, 2008).

As opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses são restritas, tendo como fármacos de primeira escolha os antimoniais pentavalentes, descobertos na década de 20. O tratamento é longo, tóxico e os efeitos colaterais são graves e persistentes e ainda apresenta baixa eficácia devido a circulação de cepas resistentes. Anfotericina B e suas formulações lipossomais, pentamidina, paromomicina e miltefosina vêm sendo empregados em terapias de segunda escolha (ALAVI-NAINI; FAZAEI; O'DEMPSEY, 2012; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009), porém estes também exibem alta toxicidade. Há vários problemas envolvidos com o arsenal terapêutico para as leishmanioses, como a elevada toxicidade dos fármacos, os custos e vias de administração inconvenientes e surgimento de resistência mostrando a necessidade de descoberta de novos fármacos. Sendo assim, a busca por novos compostos mais eficazes e mais seletivos para o parasito são atrativos no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com baixa toxicidade aos pacientes. Compostos derivados de furoxanos e benzofuroxanos vêm sendo descritos por diversas bioatividades, incluindo suas atividades leishmanicida e tripanocida (BENÍTEZ et al., 2014; BOIANI et al., 2008; CASTRO et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2013; PORCAL et al., 2008; SERAFIM et al., 2014). Autores relatam enzimas de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* como os potenciais alvos de ação destes compostos, podendo ser relacionado com sua atividade biológica. (ASCENZI et al., 2004; IFA et al., 2000; ROMEIRO et al., 2009). Ressalta-se ainda, o potencial de furoxanos em atuar como compostos doadores de óxido nítrico, uma

importante molécula efetora na eliminação da *Leishmania* (ZOU et al., 2011). Portanto, este trabalho visa avaliar o potencial leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de novos derivados de furoxano e benzofuroxano, bem como identificar seus possíveis mecanismos de ação.

7 CONCLUSÕES

Foram testados 11 derivados furoxânicos e 4 derivados benzofuroxânicos em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*, bem como a citotoxicidade a macrófagos peritoneais murinos. O composto **14e** mostrou ser o mais promissor ao final dos ensaios *in vitro*, exibindo valores de EC₅₀ e IS promissores (EC_{50-AMA} = 8,2; 5,7 e 3,1 µM; e IS₂ = 25,3; 25,4 e 66,4 em *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*, respectivamente). Os estudos envolvendo os prováveis mecanismos de ação do **14e** foram direcionados baseando-se na estrutura química da molécula. Estes estudos mostraram que este composto inibe a rCPB2.8 de *L. (L.) mexicana* (IC₅₀ = 1,0 µM). Adicionalmente, ensaios com linhagens nocautes de cisteína proteases de *L. (L.) mexicana* mostram ainda o possível envolvimento da CPA de *Leishmania* na atividade do **14e**. De fato, se CPB2.8 fosse o único alvo de ação de **14e**, o aumento na oferta de CPB2.8 da linhagem superexpressora (Δcpb+pXcpb2.8) deveria “diluir” os efeitos de **14e**, o que poderia ser verificado através de um aumento de EC_{50-AMA}; no entanto, verificou-se que esta linhagem se mostrou mais susceptível. Isto pode ser devido ao fato que o **14e** possa ter outros alvos de ação em *Leishmania*. Corroborar-se a isso, o insucesso no desenvolvimento de cepas de diferentes espécies de *Leishmania* resistentes ao **14e**. Os parasitos mesmo após 20 passagens de cultivo *in vitro* na presença do composto não apresentaram alteração significativa em seu padrão de susceptibilidade ao **14e**. Os estudos preliminares adicionais revelaram outras vias de envolvimento no mecanismo de ação do **14e**, sendo assim verificou-se uma provável implicação de seu precursor (**13b**) nas alterações na homeostase do cálcio. Vale ressaltar, que o **14e** exibe atividade pH dependente, sendo hidrolisado ao seu aldeído precursor em pH ácido. Para validarmos o **14e** como um hit a ser explorado e modificado quimicamente, avaliou-se ainda seu potencial leishmanicida *in vivo*. O tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) infantum* com uma dose de 3,0 mg/Kg/dia do **14e** levou a uma redução significativa da carga parasitária no baço (49,9%) e fígado (54,2%), esses dados corroboram com as análises histopatológicas, as quais revelaram uma redução de células inflamatórias no fígado. Adicionalmente, não se verificaram efeitos colaterais tóxicos pelas análises toxicológicas e histopatológicas realizadas. Ao final, constata-se

que o composto **14e** deve ser investigado como uma molécula promissora no tratamento das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague Medical Report**, v. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.
- ALMEIDA, L. de et al. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis-a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 2, p. 117-242, 2017.
- ALSFORD, S. A. M. et al. Genetic dissection of drug resistance in *Trypanosomes*. **Parasitology**, v. 140, p. 1478-1491, 2013.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 223-274, 2006.
- ANTOINE, J. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ASCENZI, P. et al. Inactivation of parasite cysteine proteinases by the NO-donor 4-(phenylsulfonyl)-3-((2-(dimethylamino)ethyl)thio)-furoxan oxalate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, p. 69-77, 2004.
- ASSIS, R. R. de et al. Glycoconjugates in new world species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1354-1365, 2012.
- AWASTHI, A. et al. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BALAÑA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 181, p. 85-93, 2012.
- BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175-196, 2012.

BARROS-ALVAREZ, X. et al. Glycosomal targets for anti-trypanosomatid drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1679-1706, 2014.

BASU, J. M. et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1080-1093, 2008.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659-1667, 2011.

BEAUMONT, K.; SMITH, D. A. Does human pharmacokinetic prediction add significant value to compound selection in drug discovery research? **Current Opinion on Drug Discovery Development**, v. 12, n. 1, p. 61-71, 2009.

BENÍTEZ, D. et al. Initial studies on mechanism of action and cell death of active *N*-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. **Parasitology**, v. 141, n. 5, p. 682-696, 2014.

BENJAMIN, N.; VALLANCE, P. Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production. **Lancet**, v. 344, n. 8927, p. 960, 1994.

BERMAN, J. D.; DWYER, D. M.; WYLER, D. J. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 375-379, 1979.

BERMAN, J. D. et al. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 6, p. 847-851, 1986.

BERNIER, R.; TURCO, S. J.; OLIVIER, M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7282-7285, 1995.

BES, D. F. et al. Deoxycholate amphotericin B and nephrotoxicity in the pediatric setting. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, p. 198-206, 2014.

BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 21-39, 2008.

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

BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 1035-1042, 2010.

BOIANI, L. et al. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: mechanism of action studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7900-7907, 2008.

BONATE, P. L.; REITH, K.; WEIR, S. Drug interactions at the renal level. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 34, n. 5, p. 375-404, 1998.

BOTERO AGUIRRE, J. P.; RESTREPO HAMID, A. M. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2015. doi:10.1002/14651858.CD010481.pub2.

BURCHMORE, R. J.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles-nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1311-1320, 2001.

CALLAHAN, H. L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CALVINO, R. et al. Antimicrobial properties of some furazan and furoxan derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 485-487, 1980.

CALVINO, R. et al. Syntheses, structures and antimicrobial properties of some halogenofuroxans and related furazans. **Archiv der Pharmazie**, v. 317, p. 695-701, 1984.

CAMERON, P. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297-3304, 2004.

CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (*E*)-cinnamic *N*-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512-521, 2012.

CASTRO, D. et al. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 5055-5065, 2009.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.

CELIS, R.; ROMO, D.; ROMERO, E. Blind colour separation of H&E stained histological images by linearly transforming the colour space. **Journal of Microscopy**, v. 260, n. 3, p. 377-388, 2015.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2005.

CESTA, M. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455-465, 2006.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 678-680, 1976.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 175-181, 2011.

CHELUCCI, R. C. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs containing an *N*-acyl hydrazone subunit. **Molecules**, v. 19, p. 2089-2099, 2014.

CHOI, M.; YU, J. Who neglects neglected tropical diseases? - korean perspective. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, p. S122-S130, 2015.

CHUNGE, C. N. et al. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 221-225, 1990.

COELHO, A. C. et al. *Leishmania* is not prone to develop resistance to tamoxifen. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 77-83, 2015.

COLONNA, M.; FACCHETTI, F. TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells): a new player in acute inflammatory responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 397-401, 2003.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 269-285, 2011.

COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitology**, v. 114, p. S61-S80, 1997.

CORRAL, M. J. et al. Allicin induces calcium and mitochondrial dysregulation causing necrotic death in *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004525.

CROFT, S. L. Public-private partnership: from there to here. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 995, p. S9-S14, 2005.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DAS, A.; ALI, N. Combining cationic liposomal delivery with MPL-TDM for cysteine protease cocktail vaccination against *Leishmania donovani*: evidence for antigen synergy and protection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.000309.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1471-1477, 2011.

DENISE, H. et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3190-3195, 2003.

DENNY, P. W.; STEEL, P. G. Yeast as a potential vehicle for neglected tropical disease drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 56-63, 2015.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 3-15, 2003.

DIXON, M.; WEBB, E. **Enzymes**. 2nd ed. London: Longmans, 1964.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108-1119, 2007.

DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, 2014.

EL HAG, I. A. et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, p. 547-551, 1994.

EL-ON, J. et al. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 87, n. 2, p. 284-288, 1986.

EMANUELLI, M. P. et al. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524-530, 2004.

ESPITIA, C. M. et al. Transcriptional profiling of the spleen in progressive visceral leishmaniasis reveals mixed expression of type 1 and type 2 cytokine-responsive genes. **BMC Immunology**, v. 15, n. 1, 2014. doi:10.1186/s12865-014-0038-z.

FENG, B. et al. Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 8, p. 939-952, 2010.

FERREIRA, C. D. S. et al. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **BioMetals**, v. 16, p. 441-446, 2003.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of *N*-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 167-198, 2006.

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

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 224-230, 2004.

GALLI, U. et al. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1335-1340, 2005.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J. et al. Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 7, p. 1879-1889, 2010.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 15, n. 2, 2009. doi:10.1002/14651858.CD004834.pub2.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Reviews**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, p. 919-934, 2013.

HAMILTON, C. J. et al. Time-dependent inhibitors of trypanothione reductase: analogues of the spermidine alkaloid lunarine and related natural products. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2266-2278, 2005.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids**, v. 33, p. 359-366, 2007.

HERNÁNDEZ, P. et al. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 64-74, 2013.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150-166, 2005.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.
doi:10.1155/2012/203818.

HOTEZ, P. J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected tropical diseases of the middle east and north africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
doi:10.1371/journal.pntd.0001475.

IFA, D. R. et al. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 505, p. 11-17, 2000.

ILARI, A. et al. An update on structural insights into the enzymes of the polyamine-trypanothione pathway: targets for new drugs against leishmaniasis. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61-77, 2017.

INGAWALE, D. K.; MANDLIK, S. K.; NAIK, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 118-133, 2014.

KAISER, M. et al. Repurposing of the open access malaria box for kinetoplastid diseases identifies novel active scaffolds against Trypanosomatids. **Journal of Biomolecular Screening**, 2015. doi:10.1177/1087057115569155.

KAPPAGODA, S.; SINGH, U.; BLACKBURN, B. G. Antiparasitic therapy. **Mayo Clinical Proceedings**, v. 86, n. 6, p. 561-583, 2011.

KAR, S.; SHARMA, G.; DAS, P. K. Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and-resistant strains of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage-derived oxidants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 618-625, 2011.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

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

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Landes Bioscience**, v. 7, n. 11, p. 1204-1214, 2011.

KHALILI, H.; BAIRAMI, S.; KARGAR, M. Antibiotics induced acute kidney injury: incidence, risk factors, onset time and outcome. **Acta Medica Iranica**, v. 51, n. 12, p. 871-878, 2013.

KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19/20, p. 1088-1102, 2012.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, p. 37-42, 1990.

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

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 352-357, 2003.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

LEMESRE, J. L. et al. *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 86, p. 58-68, 1997.

LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. Leishmanicidal activity of two naphthoquinones against *L. donovani*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 10, p. 1761-1764, 2012.

LI, R. et al. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 1421-1427, 1996.

LIM, A. Y. L. et al. Histopathology and biochemistry analysis of the interaction between sunitinib and paracetamol in mice. **BMC Pharmacology**, v. 10, n. 14, 2010. doi:10.1186/1471-2210-10-14.

LIMA, A. P.; REIS, F. C.; COSTA, T. F. Cysteine peptidase inhibitors in trypanosomatid parasites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 25, p. 3152-3173, 2013.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80-82, 1997.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003136.

MAEKAWA, Y. et al. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 2120-2127, 1998.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010. doi:10.1155/2010/617521.

MANANDHAR, K. DAS et al. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 376-380, 2008.

MASSARICO SERAFIM, R. A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of *N*-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 418-425, 2014.

MATTOS, D. G. J. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MAUËL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 98-111, 1997.

McCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 543-561, 2011.

McGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

McKERRROW, J. H. et al. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, n. 1, p. 497-536, 2006.

MELBY, P. C. et al. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912-1920, 2001.

MELLO, T. F. P. de et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

MELO, E. C. de; FORTALEZA, C. M. C. B. Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/319234.

MELO, T. R. F. de et al. Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an *N*-acyl hydrazone subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 5821-5837, 2014.

MICHELS, P. A.; AVILÁN, L. The NAD⁺ metabolism of *Leishmania*, notably the enzyme nicotinamidase involved in NAD⁺ salvage, offers prospects for development of anti-parasite chemotherapy. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 4-8, 2011.

MILLET, P. Status of research and development for control of tropical diseases: hypocrisy, indifference or lack of coordination. **Medecine Tropicale**, v. 66, n. 6, p. 542-548, 2006.

MOCK, D. J. et al. Leishmania induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012. doi:10.1371/journal.ppat.1002635.

MOHAMED-AHMED, A. H. A.; BROCCCHINI, S.; CROFT, S. L. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 695-702, 2012.

MOLYNEUX, D. H.; MALECELA, M. N. Neglected tropical diseases and the millennium development goals-why the “other diseases” matter: reality versus rhetoric. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 234, p. 1-13, 2011.

MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 151-158, 2010.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 359-364, 2003.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 892-896, 1995.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 315-322, 1993.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório**: princípios e interpretações. 4. ed. São Paulo: Robe, 2003.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of *Trypanosomes* and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 455-460, 1998.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375-381, 2004.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6008-6013, 1996.

MOTTRAM, J. C. et al. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997.

MOTTRAM, J. C. et al. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 182-187, 2003.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

MULLER, J.; HEMPHILL, A. Drug target identification in intracellular and extracellular protozoan parasites. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2029-2038, 2011.

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 2, p. 919-928, 2003.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 595-602, 2010.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-266, 2004.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10-S18, 2014.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 197, 2011. doi:10.1186/1756-3305-4-197.

PATOLE, S.; BURZA, S.; VARGHESE, G. M. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in a patient with HIV in India: a treatment challenge. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 204-206, 2014.

PÉCOUL, B. New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. **PLoS Medicine**, v. 1, n. 1, p. 19-22, 2004.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, p. 371-379, 2013.

PENDIN, D.; GREOTTI, E.; POZZAN, T. The elusive importance of being a mitochondrial Ca²⁺ uniporter. **Cell Calcium**, v. 55, p. 139-145, 2014.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Functional cloning of the miltefosine transporter: a novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49965-49971, 2003.

- PERSICHINI, T. et al. Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, n. 3, p. 624-627, 1999.
- PIMENTEL, I. A. S. et al. In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048780.
- POLLOCK, K. G. J. et al. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 1746-1753, 2003.
- PORCAL, W. et al. In vivo anti-chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonyl benzofuroxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6004-6015, 2007.
- PORCAL, W. et al. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6995-7004, 2008.
- PRAJAPATI, V. K. et al. In vitro antileishmanial drug susceptibility of clinical isolates from patients with indian visceral leishmaniasis - status of newly introduced drugs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 655-657, 2012.
- RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 270-272, 2006.
- READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147-154, 2014.
- REBELLO, K. M. et al. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 95-104, 2009.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.
- RODRIGUES, C. R. et al. CoMFA and HQSAR of acylhydrazide cruzain inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1537-1541, 2002.
- ROMEIRO, N. C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 641-652, 2009.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.
- SALVATI, L. et al. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1545, p. 357-366, 2001.
- SANDERSON, S. J. et al. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 383-388, 2000.

- SANDERSON, S. J. et al. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. **FEBS Letters**, v. 542, p. 12-16, 2003.
- SANTOS, J. L. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 5811-5819, 2011.
- SANTOS, V. A. F. F. M. et al. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 991-995, 2012.
- SANTOS, V. dos et al. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.
- SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31-39, 2011.
- SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 11015-11022, 1999.
- SERRANO-MARTÍN, X. et al. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5108-5113, 2009.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233-244, 2006.
- SHAKYA, N.; BAJPAI, P.; GUPTA, S. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 2, p. 104-112, 2011.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255-272, 2008.
- SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arborescens*, an Indian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 996-998, 2011.
- SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 411-422, 2006.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.
- SIQUEIRA NETO, J. L. et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 2010. doi:10.1371/journal.pntd.0000675.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 3, p. 711-725, 2015.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 735-751, 2012.

SORBA, G. et al. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 463-469, 1997.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138-147, 2007.

STEERT, K. et al. α -Ketoheterocycles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. **ChemMedChem**, v. 5, n. 10, p. 1734-1748, 2010.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 7, p. 4267-4277, 2010.

SWENERTON, R. K. et al. *Leishmania* subtilisin is a maturase for the trypanothione reductase system and contributes to disease pathology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31120-31129, 2010.

TARRANT, J.; MEYER, D.; KATAVOLOS, P. Use of optimized aminotransferase methods in regulated preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 4, p. 535-538, 2013.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M. de; BERLINK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Medica**, v. 77, p. 572-585, 2011.

TER KUILE, B. H. Membrane-related processes and overall energy metabolism in *Trypanosoma brucei* and other Kinetoplastid species. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 167-172, 1994.

TIRONI, C. et al. Cytotoxic activity of a series of heteroaryl-ONN-azoxy-sulphones and aryl sulphonylhydrazones. **Anticancer Research**, v. 9, n. 3, p. 609-610, 1989.

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

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 851, p. 51-70, 2007.

TUON, F. F. et al. Are there risk factors for acute renal failure in adult patients using deoxycholate amphotericin B? **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 1, p. 21-24, 2013.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, p. 1-17, 2017. doi:10.1017/S0031182016002523.

UTZINGER, J. et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. 19-22, 2012.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VANAERSCHOT, M. et al. Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2014.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VARMA, M. V. S. et al. Physicochemical determinants of human renal clearance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 4844-4852, 2009.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, p. 605-610, 1977.

VIANNA, V. L. P.; TAKIYA, C.; BRITO-GITIRANA, L. de. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 9, p. 829-836, 2002.

WADE, R. L. et al. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 361-367, 2013.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196-206, 1993.

WALTERS, L. L. et al. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 699-718, 1993.

WASHINGTON, I. M.; VAN HOOSIER, G. **The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents**. London: Academic Press/Elsevier, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The leishmaniasis**. Geneva, 1984. (WHO technical reports series, 701).

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of leishmaniasis**. Geneva, 2010. (WHO technical reports series, 949).

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**: epidemiological situation of leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical disease**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 22 mar. 2017.

WILSON, S.; DUNNE, D. W. A pressing need for parasite immunologists to contribute to our understanding of human-neglected tropical diseases. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 325-327, 2014.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028-1033, 2010.

XIONG, Z. H. et al. Selective transfer of calcium from an acidic compartment to the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. Measurements with targeted aequorins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 31022-31028, 1997.

ZIJLSTRA, E. E. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003258.

ZOU, Z. et al. Synthesis and evaluation of furoxan-based nitric oxide-releasing derivatives of tetrahydroisoquinoline as anticancer and multidrug resistance reversal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5934-5938, 2011.