

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

**Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus
mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose
visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-
UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
da Organização das Nações Unidas**

ARARAQUARA

2022

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia A. S. Graminha
Co-orientador: Prof^o Dr^o Jean Leandro dos Santos

Araraquara
2022

C626i

Clementino, Leandro da Costa

Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária : uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos objetivos de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas / Leandro da Costa Clementino. -- Araraquara, 2022
131 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha

Coorientador: Jean Leandro dos Santos

1. Doenças negligenciadas. 2. Óxido nítrico. 3. Mecanismo de ação (Bioquímica). 4. Malária. 5. Cálcio - Metabolismo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

"Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas"

AUTOR: LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO**ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA****COORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE CARDOSO (Participação Virtual)
Centro de Parasitologia e Micologia / Instituto Adolfo Lutz - IAL - São Paulo



Prof. Dr. RICARDO SCHER (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia / Universidade Federal de Sergipe - UFS - São Cristóvão



Prof. Dr. OTAVIO HENRIQUE THIEMANN (Participação Virtual)
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física de São Carlos - USP - São Carlos



Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES

Nome: Leandro da Costa Clementino

Filiação: Maria de Lourdes da Costa Clementino e Severino Alves Clementino

Nascimento: 20/03/1992 - Campina Grande - PB

Endereço Profissional:

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip), Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP.

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campus Ville, S/N, Araraquara SP.

CEP: 14800-903

email: leandrocostabiotec@gmail.com

Formação Acadêmica:

2009 - 2014

Graduação: Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Instituição: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Sumé - PB.

TCC: Bioprospecção de Antibióticos produzidos por fungos da Caatinga.

Orientador: Profº Drº Jean César Farias de Queiroz.

Bolsa: REUNI

2015 - 2017

Mestrado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Dissertação: Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de origem marinha: uma abordagem química e biológica.

Orientadora: Profª Drª Marcia A. S. Graminha.

Bolsa: CAPES

2017- 2022

Doutorado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Tese: Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para

a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas

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

Co-orientador: Prof^o Dr^o Jean Leandro dos Santos.

Bolsa: CNPq

Período sanduíche: (2021-2022) 6 meses na Rutgers Medical School – The State University of New Jersey, Newark – Nova Jersey, Estados Unidos.

Orientador: Prof^o Dr^o Andrew Philip Thomas.

Co-orientador: Prof^a Dr^a Paula J. Barlett.

Bolsa: CAPES-PrInt

Produção bibliográfica:

Trabalhos publicados no período

1. KUNII, GABRIELA KINUE WATASE; FALCONE, ROSSANA; **CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA**; ROSA, JOÃO ARISTEU DA; NASCIMENTO, JULIANA DAMIELI; BELINTANI, TIAGO; OLIVEIRA, JADER DE; RIBEIRO, ALINE RIMOLDI. Growth Curve, Morphological and Molecular Characterization of Two Strains of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, p. 1-5, 2022.
2. **CLEMENTINO, L. C.**; FERNANDES, G. F. S. ; PROKOPCZYK, I. M.; LAURINDO, W. C.; TOYAMA, D.; MOTA, B. P.; BAVIERA, A. M.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. A. S. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. *PLoS One*, v. 14, p. x, 2021.
3. SAHID, E. D. N; CLAUDINO, J. C.; ODA, F. B.; CARVALHO, F. A.; SANTOS, A. G.; GRAMINHA, MARCIA A.S.; **CLEMENTINO, L. C.** *Baccharis trimera* (Less.) DC leaf derivatives and eupatorin activities against *Leishmania amazonensis*. *NATURAL PRODUCT RESEARCH*, v. xx, p. xx, 2021.
4. COSTA, NATALIA C. S.; PICCOLI, JULIA P.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; CLEMENTINO, **LEANDRO C.**; FUSCO-ALMEIDA, ANA M. ; DE ANNUNZIO, SARAH R. ; FONTANA, CARLA R. ; VERGA, JULIANE B. M. ; ETO, SILAS F. ; PIZAURÓ-JUNIOR, JOÃO M.; GRAMINHA, MARCIA A. S.; CILLI, EDUARDO M. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. *PLoS One*, v. 15, p. e0228740, 2020.

5. **CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA**; ODA, FERNANDO BOMBARDA; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES; TAVARES, RENATA SPAGOLLA NAPOLEÃO; COLEPICOLO, PIO; SANTOS, ANDRÉ GONZAGA DOS; DEBONSI, HOSANA MARIA; GRAMINHA, MÁRCIA A. S. The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. NATURAL PRODUCT RESEARCH, v. 34, p. 1-5, 2020.
6. DOS SANTOS, GUSTAVO SOUZA; DEBONSI, HOSANA MARIA; COLEPICOLO-NETO, PIO; RANGEL, KAREN CRISTINA; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES; GASPAR, LORENA RIGO; ABREU-FILHO, PÉRICLES GAMA; PEREIRA, LUÍZ MIGUEL; YATSUDA, ANA PATRÍCIA ; GALLON, MARÍLIA ELIAS; GOBBO-NETO, LEONARDO; **DA COSTA CLEMENTINO, LEANDRO**; GRAMINHA, MÁRCIA APARECIDA SILVA; JORDÃO, LAÍS GARCIA; POHLIT, ADRIAN MARTIN . GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. Planta Medica International Open, v. 07, p. e122-e132, 2020.
7. **LEANDRO COSTA, CLEMENTINO**; FABIO AURELIO ESTEVES, TORRES; ANGELA MARIA ARENAS, VELASQUEZ; LEONARDO, VILLELA; TOYOTA FUJII, MUTUE; PIO, COLEPICOLO; MARCIA A. S., GRAMINHA. Bioguided study of the Antarctic alga *Himantothallus grandifolius* (A. Geep & E.S.Geep) indicates 13E-Docosenamide as potential antileishmanial agent. JOURNAL OF APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCE, v. 10, p. 98-103, 2020.
8. DO ESPÍRITO SANTO, RAFAEL DIAS; VELÁSQUEZ, ÁNGELA MARÍA ARENAS; PASSIANOTO, LUANA VITORINO GUSHIKEN; SEPULVEDA, ALEX ARBEY LOPERA; **DA COSTA CLEMENTINO, LEANDRO**; ASSIS, RENATA PIRES; BAVIERA, AMANDA MARTINS; KALABA, PREDRAG; DOS SANTOS, FÁBIO NEVES ; ÉBERLIN, MARCOS NOGUEIRA; DA SILVA, GIL VALDO JOSÉ; ZEHL, MARTIN; LUBEC, GERT; GRAMINHA, MÁRCIA APARECIDA SILVA; GONZÁLEZ, EDUARDO RENÉ PÉREZ. N, N-, N--trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, v. 171, p. 116-128, 2019.
9. LOPERA, A.A.; VELÁSQUEZ, A.M.A.; **CLEMENTINO, L.C.**; ROBLEDO, S.; MONTOYA, A.; DE FREITAS, L.M.; BEZZON, V.D.N.; FONTANA, C.R.; GARCIA, C.; GRAMINHA, M.A.S. Solution-combustion synthesis of doped TiO₂ compounds and

its potential antileishmanial activity mediated by photodynamic therapy. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY, v. 183, p. 64-74, 2018.

10. CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA; VÉLASQUEZ, ANGELA MARIA ARENAS; PASSALACQUA, THAIS GABAN; DE ALMEIDA, LETICIA; GRAMINHA, MARCIA A.S.; MARTINS, GILMARCIO Z.; SALGUEIRO, LÍGIA; CAVALEIRO, CARLOS; SOUSA, MARIA DO CÉU; MOREIRA, RAQUEL R.D. In vitro activities of glycoalkaloids from the *Solanum lycocarpum* against *Leishmania infantum*. Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 28, p. 673-677, 2018.

11. RANGEL, KAREN C.; DEBONSI, HOSANA M.; **CLEMENTINO, LEANDRO C.;** GRAMINHA, MÁRCIA A. S.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO, PIO; GASPAR, LORENA R. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinales; Rhodophyta). JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, v. 31, p. 825-834, 2018.

Trabalhos publicados em eventos

1. CLEMENTINO, L. C.; FERNANDES, G. F. S.; MARTINS, J. W. L.; PAVAN, A. R.; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. A. S. Avaliação de novos derivados furoxanos contra *Leishmania infantum*. In: 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2019, Belo Horizonte. Anais do Medtrop 2019, 2019.

2. AMBROZINI, L. M.; FALCONE, R.; KUNII, G. K. W.; OLIVEIRA, J.; BELINTANI, T.; **CLEMENTINO, L. C.;** GRAMINHA, M. A. S.; ROSA, J. A. Estudo de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). In: XIX Congresso Farmacêutico da UNESP e V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019, Araraquara. Anais da XIX CFU e V JEBB, 2019.

3. TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; RANGEL, KAREN C.; CORDEIRO, L. R. G.; ABREU FILHO, P.; PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P.; **CLEMENTINO, L. C.;** GRAMINHA, M. A. S.; JORDAO, L. G.; POHLIT, A. M.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO NETO, P.; DEBONSI, H. M.. *Desmarestia antarctica* (Desmarestiales, Phaeophyceae): An antarctic derived source of bioactive compounds against protozoan diseases. In: XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI

European Conference on Marine Natural Products, 2019, Peniche. Anais do XVI MANAPRO and XI ECNMP, 2019.

4. DEBONSI, H. M.; TEIXEIRA, T. R.; ABREU FILHO, P.; YATSUDA, A. P.; **CLEMENTINO, L. C.**; GRAMINHA, M. A. S.; JORDAO, L. G.; POHLIT, A. M.; COLEPICOLO NETO, P.. Antiparasitic Metabolites Isolated from the Antarctic Algae-Associated Fungus: *Penicillium echinulatum*. In: XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI European Conference on Marine Natural Products, 2019, Peniche. Anais do XVI MANAPRO and XI ECNMP, 2019.

5. **CLEMENTINO, L. C.**; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; LAURINDO, W. C.; DEBONSI, H. M.; COLEPICOLO NETO, P.; GRAMINHA, M. A. S. Endophytic fungi of brown Antarctic macroalgae: Identification of antileishmanial metabolites and its possible molecular target. In: VII REDEALGAS Workshop, Biotechnology for Wellness, 2019, Arraial do Cabo. Anais do VII REDEALGAS, 2019.

6. MARTINS, J. W. L.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; PROKOPCZYK, I. M.; FERNANDES, G. F. S.; **CLEMENTINO, L. C.**; GRAMINHA, M. A. S.; SANTOS, J. L. Avaliação de novos compostos N-óxidos inibidores de cisteíno proteases planejados contra leishmaniose. In: VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada, 2018. v. 39.

7. GRAMINHA, MARCIA A.S.; CLEMENTINO, L. C.; DEBONSI, HOSANA M.; ODA, F. B.; SANTOS, A. G.; FUJII, M. T.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO NETO, P.. From the Antarctic pole to the tropics: exploring secondary metabolites from the macroalgae *Himantothallus grandifolius* and *Ascoseira mirabilis* as alternative to treat the neglected disease leishmaniasis. In: XVII Congresso Brasileiro de Ficologia - CBFIC, 2018, Natal. Anais do XVII CBFIC, 2018.

Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração

- Oficinas Virtuais CHAGASLEISH 2021 – Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmaniose. (Carga horária: 12 horas). Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2021.
- Membro da Comissão Avaliadora do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2020.

- Membro da comissão julgadora de trabalhos no Biotecfarma, oferecido pela 67ª Jornada Farmacêutica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2020.
- Formação de Professores Mediadores para EaD. (Carga horária: 30h). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil. 2020.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2020.
- Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2019.
- III Curso de Inverno em Biotecnologia do LBM-LBV, DGE-UFSCar. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. 2019.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XIX Congresso Farmacêutico da UNESP e V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2019.
- 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG. 2019.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XXX Congresso de Iniciação Científica da UNESP - 1ª Fase. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2018.

Participação em bancas

1. QUEIROZ, J.C.F.; COELHO, G. D.; **CLEMENTINO, L.C.** Participação em banca de PAULO ITAGINO LOPES THEODORO. Análise da produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos de *Aloe vera*. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande.
2. GRAMINHA, M. A. S.; IMAMURA, K. B.; **CLEMENTINO, L. C.** Participação em banca de Jéssica Naiara Varonez da Fonseca. Aspectos Mecanísticos do antileishmanial 14e em *Leishmania amazonensis*. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Outras atividades acadêmicas relevantes

- Membro Titular da Congregação do Instituto de Química – UNESP - Araquara, no período de 01/02/2021 a 31/01/2022.
- Apresentação de Palestra Intitulada: A natureza nos inspira: Produtos naturais antárticos e tropicais como promissores antileishmaniais, durante o I Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line, realizado no período de 08 a 11 de março de 2021.
- Membro Suplente da Comissão Permanente de Pesquisa (CPP) do Instituto de Química – UNESP - Araraquara, no período de 01/02/2019 a 31/01/2020.
- Ganhador do Prêmio científico para Jovens Talentos Yocie Yoneshigue-Valentim, no VII REDEALGAS Workshop.
- Promoveu a palestra Intitulada "Do Cangaço ao Iglu: Uma experiência nos Extremos" na Escola de Ensino Fundamental e Médio Antonio Galdino Filho - Pocinhos/Paraíba, como ação extensionista do Projeto Macroalgas Marítimas da Antártica. 2019.
- Participou da OPERANTAR XXXVI no período de Janeiro a Fevereiro de 2018, tendo acampado durante 10 dias na Ilha Snow, Região da Península Antártica, para fins de estudos de ecotoxicologia de Macroalgas da Ilha.
- Revisor desde 2019, dos Periódicos: Journal of Applied Pharmaceutical Sciences e NATURAL PRODUCT RESEARCH.

Patente

DEBONSI, H. M.; DEBONSI, HOSANA M.; YATSUDA, ANA PATRÍCIA; KAWAKAMI, C. M.; MARZOCCH-MACHADO, C. M.; BROCHI, J. C. V.; RANGEL, K. C.; **CLEMENTINO, L. C.**; CORDEIRO, L. R. G.; TONANI, L.; PEREIRA, L. M.; GRAMINHA, M. A. S.; KRESS, M. R. V. Z.; CANICOBÁ, N. C.; ABREU-FILHO, PÉRICLES GAMA; TAVARES, R. N. S.; ENGLER, S. S. M.; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES . Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e doenças parasitárias. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200178997, título: "Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de

doenças inflamatórias e doenças parasitárias", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/09/2020.

Dedicatória

Dedico esta Tese ao meu amor maior, minha mãe Dona Lourdes, que com seu jeito único de ser e sua força, esteve sempre ao meu lado, por mais difícil que fosse em alguns momentos. À senhora, dedico este trabalho como agradecimento por tanto. Te amo, mãe!

Dedico também ao meu pai, Severino (*in memoriam*) que partiu há 28 anos. Espero que esteja orgulhoso da pessoa que me tornei, pois me orgulho de ser seu filho.

Epígrafe

*“Morte e vida das hipóteses. Da equação eu parte do Cosmos ao axioma Cosmos parte do eu.
Subsistência. Conhecimento. Antropofagia.”*

Manifesto Antropofágico - Oswald de Andrade

*“Prepare o seu coração
Pras coisas que eu vou contar
Eu venho lá do sertão
Eu venho lá do sertão
Eu venho lá do sertão
E posso não lhe agradar*

*Na boiada já fui boi, mas um dia me montei
Não por um motivo meu
Ou de quem comigo houvesse
Que qualquer querer tivesse
Porém por necessidade
Do dono de uma boiada
Cujo vaqueiro morreu”*

Disparada - Geraldo Vandré e Theo de Barros

Agradecimentos

Ao criador e a espiritualidade amiga por tudo que foi conduzido ao meu favor, por trilhar os melhores caminhos, regados de muito aprendizado e pessoas excepcionais, e por me fazer superar todas as dificuldades impostas durante este ciclo;

Aos meus irmãos, Lourildo, Luciene, Luciano, Luciana Nazareno, Hélio e Maria Aparecida (Cida), por todo o carinho e incentivo que sempre depositaram em mim. Obrigado por serem meu alicerce. Amo vocês;

À minha família, tios, primos e avós (*in memoriam*) por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, sem vocês tudo seria mais difícil;

À Professora Dr^a Marcia Graminha por ser essa pessoa tão especial em minha vida. Obrigado pela empatia desde o dia da seleção do Mestrado (quase 7 anos atrás, o tempo passa muito rápido!), por ter me mostrado o quanto é difícil ser “chefe” e o quanto é necessário fazer o justo e correto sempre que necessário, por mais difícil que seja às vezes. Com certeza, saio uma nova pessoa desse ciclo e você teve papel fundamental nesse processo, por vezes, acreditando mais em mim do que eu mesmo. Nunca esquecerei disso! Obrigado por cada “puxão de orelha” e por cada pequena comemoração que culminou na conclusão desta Tese. Sou grato por todas as oportunidades que me proporcionou, tenha certeza que as aproveitei ao máximo. Continue fazendo esse trabalho incrível que fez comigo, com certeza fará a diferença na vida de outras pessoas também! Por fim, perco uma grande orientadora e ganho uma grande amiga pra vida;

Ao meu co-orientador Professor Dr^o Jean Santos e sua equipe: Guilherme Fernandes, Johnny Martins e Igor Prokopczyk pela síntese dos compostos, estudos de docking, delineamento dos ensaios enzimáticos e discussão acerca dos resultados obtidos. Vocês são parte fundamental do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr^o Pio Colepicolo por todo o apoio prestado na execução deste projeto, pela oportunidade de continuar trabalhando dentro do projeto das macroalgas e por todo o apoio oferecido sempre que preciso;

Ao Professor Dr^o Flávio Henrique-Silva do LBM-UFSCar e sua equipe: Danyele Toyama, Priscila Shibao e Anderson por todo o auxílio e trabalho compartilhado durante a expressão e ensaios com a CPB2.8. Foram ótimos dias em São Carlos na companhia de ótimas pessoas. Um agradecimento especial também ao Renato e Kayki que me auxiliaram durante minha estadia em São Carlos nos estudos de expressão da CPB2.8, obrigado por todo o apoio e amizade;

Ao Professor Dr^o Andrew Thomas, Dr^a Paula Barlett, funcionários e sua equipe da Escola de Medicina da Rutgers University: Dr^o Larry Gaspers, Oleta, Stefani, Victor, Juliana e Rute; muito obrigado por todo o aprendizado compartilhado e pelos bons momentos vividos durante o intercâmbio. Foi uma experiência que mudou minha vida científica e pessoal. Obrigado por fazerem esta experiência mais leve e por todo o auxílio prestado durante os seis meses que vivi em Newark;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP, Izabel Martinez (Bel, *in memorian*), Letícia, Aline, Mayara, Amanda, Thaís, Luiz, Angela, Natália, Wilquer (Zé), Juliane, Michele, Mariceli, Eduarda (Duda), Alessandra e Gabriel por todo o apoio, momentos de descontração e convívio. Esta caminhada foi mais leve por ter sido compartilhada com vocês;

Ao Pedro, meu irmão número 8, que tive a felicidade de conhecer no dia da seleção do Mestrado, desde então já são 7 anos regados com momentos de alegria, tristeza e estresse, mas com muito bom humor e apoio mútuo. Obrigado por ser tão importante em minha vida, especialmente nesta reta final do Doutorado, espero um dia poder retribuir por tanto. À sua “namorada” e minha amiga, Claudia, por ser este ser tão incrível, que me apaixonei desde o primeiro dia que conheci, obrigado por tanto carinho e acolhimento que tiveram comigo. Agradeço também às suas famílias, por terem sido a minha em tantos momentos.

À Rayza pela amizade e por tudo que vivemos durante este ciclo, espero que continuemos com essa sintonia em bons e maus momentos sempre contando um com o outro, obrigado por tudo morena!;

Aos funcionários da FCFar-UNESP Araraquara, em especial à Cris, Rô, Marisinha, Celso e sua equipe do biotério, às meninas da faxina Rose e Andrea pelo auxílio, momentos de distração e carinho ao longo destes anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, assim como, aos funcionários deste Instituto e da STPG;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado (Processo 143334/2017-4) à CAPES pela bolsa concedida para intercâmbio por meio do Programa CAPES-PrInt-UNESP (Processo 88887.582126/2020-00), CNPQ, MCT-Proantar e FAPESP pelo auxílio financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As doenças negligenciadas representam um grande desafio para políticas em saúde pública, sendo as leishmanioses e a malária duas importantes doenças parasitárias, por acometerem um mesmo perfil populacional e necessitarem de novos agentes terapêuticos para somarem ao portfólio de quimioterápicos atualmente em uso. Considerando os objetivos de Desenvolvimento Sustentável proposto pela ONU, o qual estabelece uma agenda global que propicie o desenvolvimento sustentável como uma perspectiva de construção de um futuro comum, pautado nas Pessoas, Prosperidade, Planeta, Paz e Parcerias. Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa vem estudando novas moléculas promissoras para o tratamento de doenças parasitárias, contribuindo para o tema Saúde e Bem-Estar que visa o desenvolvimento de pesquisas direcionadas ao entendimento e ações de prevenção, terapia e controle de doenças transmissíveis e não transmissíveis, desenvolvimento e avaliação de novos fármacos e medicamentos. Assim, ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, furoxanos (**4a-o**) e benzofuroxanos (**4p-x**) foram caracterizados quanto ao potencial anti-amastigota para *Leishmania infantum*, identificando os furoxanos doadores de NO (**4a-h**, **4l-m**) e o benzofuroxano **4r** como os mais potentes ($EC_{50} < 10 \mu M$) e seletivos ($SI > 10$). Após clonagem do gene e expressão da correspondente enzima cisteíno protease de *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 Δ CTE (CPB 2.8) em *Pichia pastoris*, verificou-se que os furoxanos (**4a-n**), benzofuroxanos (**4q-r** e **4t-u**) e N-acil-hidrazonas (**14a-g**) apresentam boa capacidade de inibir a protease parasitária ($0,8 < IC_{50} < 14 \mu M$). Como prova de conceito, destaca-se que a atividade leishmanicida dos compostos pode estar relacionada a um efeito dual provocado pela atividade microbicida do NO, associada à inibição da enzima, visto que (**14a-g**) inibem CPB2.8 ($2 < IC_{50} < 12 \mu M$), mas não apresentam atividade anti-amastigota na máxima concentração testada ($10 \mu M$). A análise *in silico* de parâmetros farmacocinéticos indicou **4f** para avaliação quanto ao seu potencial terapêutico frente a camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*. Verificou-se que a administração oral duas vezes ao dia com uma dose de 7.7 mg/kg/dia, foi capaz de reduzir em 90% a carga parasitária no fígado e baço, sem causar danos hepáticos ou renais, finalizando assim o trabalho desenvolvido para *L. infantum*. Todas as moléculas foram posteriormente avaliadas frente a formas intra-eritrocitárias de *Plasmodium falciparum* geneticamente modificados para expressar o indicador de Ca^{2+} GCaMP3, mediante estágio sanduíche na New Jersey Medical School, Rutgers, Newark – EUA. Dentre os furoxanos, **4m** (EC_{50} 2,8 μM) foi o mais promissor, enquanto **4r** foi o benzofuroxano mais ativo, apresentando inibição em torno de 40% do crescimento parasitário. Estudos de mecanismos de ação mostraram que **4m** não é capaz de alterar a morfologia do vacúolo digestivo, onde está localizada a cisteíno protease de plasmódio, como pode ser observado para o controle inibidor de proteases **E64**. Análise do extrato proteico de eritrócitos infectados e tratados por 10 horas com **4m** ou **E64** mostrou acúmulo de proteínas não degradadas apenas no tratamento com **E64**, indicando que a cisteíno protease de *P. falciparum*, potencialmente, não é o alvo de **4m**. Foi analisada também a capacidade dos compostos interferir na homeostase do Ca^{2+} intracelular, sendo **4m** capaz de alterar os níveis deste íon no parasita, não apresentando o mesmo efeito em hepatócitos murinos, após liberação do cátion a partir do retículo endoplasmático, sendo, portanto, este efeito seletivo para o parasita. A influência do NO liberado pela molécula **4m** neste desbalanço foi descartada, visto que o composto doador de NO utilizado como controle não promoveu nenhuma

alteração nos níveis de cálcio. Estes dados mostram que os furoxanos possuem grande potencial para o desenvolvimento de anti-leishmaniais e anti-maláricos.

Palavras chave: Anti-leishmaniais. Anti-maláricos. Cisteíno protease. Homeostase do Cálcio. Furoxanos. *Leishmania infantum*. Óxido nítrico. *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

Neglected diseases represent a major challenge for public health policies. Among these diseases, we highlight leishmaniasis and malaria: two important parasitic diseases that affect poor people with no political voice and heavily affected by the etiologic agents *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp. There are few available therapeutic drugs, which present high toxicity and low efficacy; thus, new therapeutic agents are urgently needed. Considering the Sustainable Development goals proposed by The United Nations, which establishes a global agenda to promote, among other goals, Health and wellness for the human population until 2030, our research group has been involved contributing to this theme in order to develop new therapy to control leishmaniasis and more recently, malaria on the context of this research project. Therefore, furoxan (**4a-o**) and benzofuroxan (**4p-x**) compounds were characterized regarding the anti-*Leishmania infantum* effect, which identified the furoxan NO donors (**4a-h**, **4l-m**) and benzofuroxan **4r** as the most potent and selective compounds ($EC_{50} < 10 \mu M$; $SI > 10$). Due to the presence of a *N*-acyl-hydrazone group that seems to target proteases, we cloned and expressed the corresponding *Leishmania mexicana* cysteine protease enzyme LMCPB2.8 Δ CTE (CPB2.8) in *Pichia pastoris* in order to evaluate the inhibitory effect of these compounds against the purified enzyme. The furoxans (**4a-n**), benzofuroxan (**4q-r** and **4t-u**) and *N*-acyl-hydrazone compounds (**14a-g**) show good ability to inhibit the parasite protease ($0.8 \mu M < IC_{50} < 14 \mu M$). It is also important to highlight that the leishmanicidal activity of these compounds might be related to a dual effect caused by the microbicidal activity of NO and associated to the enzyme inhibition, since **14a-g**, which are not able to release NO, thus not present any anti-amastigote activity at the maximum tested concentration ($10 \mu M$), although causing protease inhibition ($2 \mu M < IC_{50} < 12 \mu M$). *In silico*, pharmacokinetic analysis shows the therapeutic potential of **4f** a *L. infantum*-infected Balb/c mice model. After oral administration, twice daily at a 7.7 mg/kg/day dose, **4f** reduced the parasite burden by 90% in the liver and spleen, with no observed toxicity to the liver or kidney, finishing the studies involving *L. infantum*. All molecules were subsequently evaluated against intra-erythrocyte forms of *Plasmodium falciparum* genetically modified to express the GCaMP3 Ca^{2+} indicator through a sandwich stage at Rutgers New Jersey Medical School in Newark – USA. Among the furoxan, **4m** (EC_{50} 2.8 μM) while **4r** was the most active benzofuroxan, showing inhibition around 40% of parasite growth inhibition. Studies regarding the mechanism of action suggests that **4m** probably is not targeting the *P. falciparum* proteases falcipains through the analyses of morphological modifications of the parasite digestive vacuole, or hemoglobin degradation. In the meantime, the ability of the compounds to interfere in intracellular calcium homeostasis was also analyzed. The compound **4m** is selectively capable to preferentially alter the levels of this ion in the parasite rather than in murine hepatocytes through the release of calcium from the endoplasmic reticulum not related to an indirect effect due to NO release. This data shows that the furoxan compounds have potential to develop antileishmanial and antimalarial drugs.

Keywords: Antileishmanial. Antimalarial. Cysteine protease. Calcium homeostasis. Furoxan. *Leishmania infantum*. Nitric oxide. *Plasmodium falciparum*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Doenças Negligenciadas	22
2.2 Leishmanioses	23
2.2.1 Tratamento	28
2.3 Malária.....	31
2.3.1 Tratamento	34
2.4 Cisteíno proteases como alvo terapêutico para leishmanioses e malária.....	38
2.5 Compostos furoxanos e derivados.....	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivos específicos	46
CAPÍTULO 1	48
1 INTRODUÇÃO.....	48
Design, synthesis and biological evaluation of <i>N</i> -oxide derivatives with potent <i>in vivo</i> antileishmanial activity	48
CAPÍTULO 2	97
1 INTRODUÇÃO.....	97
2 METODOLOGIA	97
2.1 Cultivo, sincronização e obtenção de <i>P. falciparum</i>	97
2.2 <i>Screening</i> via ensaio da lactato-desidrogenase (LDH).....	98
2.3 Avaliação de alterações morfológicas em PfGCaMP3 frente a compostos furoxanos com atividade anti-plasmódio	99
2.4 Efeito dos compostos anti- <i>Plasmodium</i> na hidrólise de hemoglobina	99
2.5 Ensaios de homeostase do cálcio em PfGCaMP3	100
2.6 Ensaios de homeostase do cálcio em hepatócitos murinos	101
2.7 Análise Estatística.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1 O furoxano 4m apresentou atividade antiparasitária frente à cepa PfGCaMP3.....	102
3.1 4m não altera a morfologia do vacúolo digestivo e não causa acúmulo de hemoglobina não degradada em PfGCaMP3.....	106
3.2 4m é capaz de mobilizar cálcio proveniente do retículo endoplasmático e também acidificação do citosol em <i>P. falciparum</i>	109
4 DISCUSSÃO	116
5 CONCLUSÃO.....	118
6 REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas compreendem um conjunto de doenças infecciosas causadas por uma série de patógenos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas; também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas por ocorrerem com maior frequência nos trópicos (HOTEZ et al., 2020). As leishmanioses são um conjunto de doenças que afetam milhares de pessoas no mundo e apresentam sérios problemas relacionados à terapêutica, necessitando, assim, de esforços para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento destas doenças (FEASEY et al., 2010). A malária por sua vez embora não seja classificada como negligenciada pela Organização Mundial da Saúde, é um importante problema de saúde pública uma vez que acomete o mesmo perfil populacional das leishmanioses e apresenta também problemas relacionados à sua terapêutica (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

As leishmanioses ocorrem em 98 países da América Latina, África, Europa e Ásia, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas e colocando em risco aproximadamente outros 350 milhões (ALVAR et al., 2012; LOHARIKAR et al., 2016). O agente etiológico pertence ao gênero *Leishmania*, com pelo menos 20 espécies descritas causadoras da doença, e transmitidos ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo) (VAN ASSCHE et al., 2011; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). As manifestações clínicas variam desde apresentação de úlceras na pele ou mucosas, até o desenvolvimento de infecção sistêmica, sendo estas classificadas como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) ou visceral (LV), respectivamente (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

A malária é recorrente em cerca de 90 países, ocorrendo na América do Sul, África sub-Saariana e sul da Ásia, atingindo 200 milhões de pessoas, com 3,4 milhões de indivíduos sob risco de infecção (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018). Esta doença é causada pelos parasitas do gênero *Plasmodium* transmitidos pelas fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo. Apesar de haver mais de 120 espécies descritas, apenas as espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium ovale* causam infecção humana (KOTEPUI et al., 2020). A principal manifestação clínica da malária é a ocorrência de febre intervalada nos casos leves, que pode evoluir para

um quadro clínico mais grave, levando a óbito se não houver o diagnóstico e identificação correta da espécie causadora da infecção, geralmente o *P. falciparum*, seguido de terapêutica adequada para eliminação da espécie causadora da infecção (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

As leishmanioses são consideradas extremamente negligenciadas pela OMS, possuindo baixo investimento em desenvolvimento de drogas, com fármacos disponíveis há mais de 70 anos, os quais apresentam baixa eficácia e elevada toxicidade; problemas associados com o tempo e via de administração, além casos de resistência (NWAKA; RIDLEY, 2003; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Para a malária, o cenário é um pouco diferente por possuir mais investimento em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, entretanto, a terapêutica atual encontra uma série de desafios a serem superados, como casos de resistência, a necessidade de tratamentos mais curtos, prevenção da recaída de pacientes em infecções por *P. vivax* e bloqueio da transmissão da doença (DE RYCKER et al., 2018). Desta forma é mais que urgente e necessária a busca por compostos candidatos a novos fármacos anti-leishmanais e anti-maláricos.

Compostos furoxanos e derivados, principalmente os benzofuroxanos, são descritos por apresentarem diferentes atividades biológicas, incluindo ação leishmanicida e malaricida (VICENTE et al., 2008; DUTRA et al., 2014). Em 2014, Dutra e colaboradores, caracterizou o derivado furoxano **14e** (recentemente renomeado **Lapdesf14e**) como um agente leishmanicida, descrito como promissor antileishmanial, com eficácia *in vivo* para leishmaniose visceral, potente doador de óxido nítrico, além de ser inibidor de cisteína protease (CPB2.8 Δ CTE) de *Leishmania*, importante enzima envolvida no escape do sistema imune do hospedeiro. Contudo, este composto apresentou problemas relacionados à sua solubilidade, o que influencia diretamente na sua administração, dificultando assim o avanço no processo de desenvolvimento de fármacos. Para os benzofuroxanos, é sugerido que estes compostos atuam em *Leishmania* por estarem envolvidos na produção de estresse oxidativo, podendo interferir na mitocôndria do parasito, e recentemente, De Almeida (2017) os descreveu como inibidores de cisteína protease deste parasito, efeito associado ao grupo *N*-acil-hidrazona que compõem estruturalmente estes derivados (CASTRO et al., 2009; DE ALMEIDA, 2017).

Já para *Plasmodium* é relatada a bioatividade de furoxanos e benzofuroxanos de forma bastante pontual, sendo descrito que furoxanos híbridos com amodiaquina

possuem efeitos associados a acumulação no vacúolo digestivo do parasito, apresentando melhor potência em atividade que derivados benzofuroxanos, os quais estão associados a elevada citotoxicidade para células de mamífero e menor bioatividade para o parasita (VICENTE et al., 2008; MOTT et al., 2012).

Dentro deste contexto esta linha de pesquisa relacionada ao desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas está alinhada ao tema Saúde e Bem-estar, um dos objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) do Milênio lançado em 2000 pela Organização das Nações Unidas (ONU) (BURALLI et al., 2018). De fato, a UNESP, por meio de iniciativa da pró-reitoria de Pós-Graduação, tem contribuído de forma sistemática e efetiva para o cumprimento destas metas. Portanto, o Tema 4: Saúde e Bem-Estar está alinhado com a ODS 3 – Saúde, Bem-estar e Vida Saudável. Neste contexto, esta tese contribuiu com a identificação de agentes anti-leishmaniais também de origem natural, produzindo artigos científicos publicados (CLEMENTINO et al., 2018, 2020; LOPERA et al., 2018; RANGEL et al., 2018; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019; COSTA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020; SAHID et al., 2022) e patente ("Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e doenças parasitárias" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/09/2020 - BR 1020200178997), em adição à avaliação do potencial terapêutico de uma série de novos derivados furoxanos, incluindo fenil-, amida-furoxanos e benzofuroxanos aqui relatados.

Estas moléculas apresentam diferentes níveis de solubilidade e foram planejadas a partir do protótipo **Lapdesf14e** para leishmaniose visceral (DUTRA et al., 2014). Adicionalmente, no âmbito do programa CAPES-PrInt, estendemos nossos estudos, investigando o potencial antimalárico destes compostos. Sendo assim, esta tese está estruturada em revisão de Literatura e capítulos 1, 2: sendo o capítulo 1 referente ao trabalho desenvolvido para leishmaniose visceral causada por *L. infantum* e o capítulo 2 acerca do trabalho desenvolvido para malária causada por *P. falciparum*.

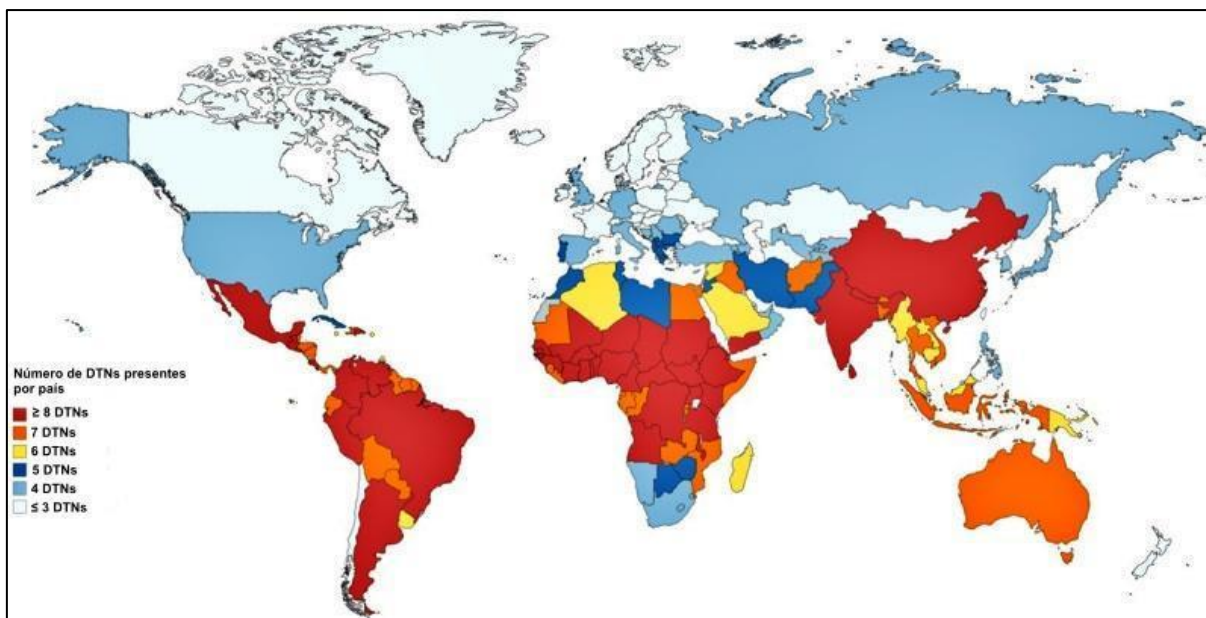
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas

As Doenças Negligenciadas (DNs) correspondem a um conjunto de 17 doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas e de maior prevalência nos países tropicais e subtropicais, podendo ser também denominadas como Doenças Tropicais Negligenciadas. Ao longo da apresentação deste trabalho, será adotada a denominação DNs, uma vez que estas doenças podem ocorrer em outras regiões do planeta, além dos trópicos, como a Europa (Figura 1) (BURGOS et al., 2020; HOTEZ et al., 2020).

Estas doenças ocorrem em regiões caracterizadas pela pobreza da população com acesso inadequado ao saneamento básico e contato próximo de insetos vetores, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil e afetam aproximadamente 2 bilhões de pessoas no mundo, causando 350 000 mortes anuais segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016; MITRA; MAWSON, 2017; ENGELS; ZHOU, 2020).

Figura 1. Distribuição mundial das DTNs.



Número de DTNs por país de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Fonte: Adaptado de BURGOS et al., 2020.

Entre as DNs existentes, a doença de chagas, doença do sono e leishmanioses são responsáveis pelas maiores taxas de morte e que despertam pouco interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos, com pouco retorno em

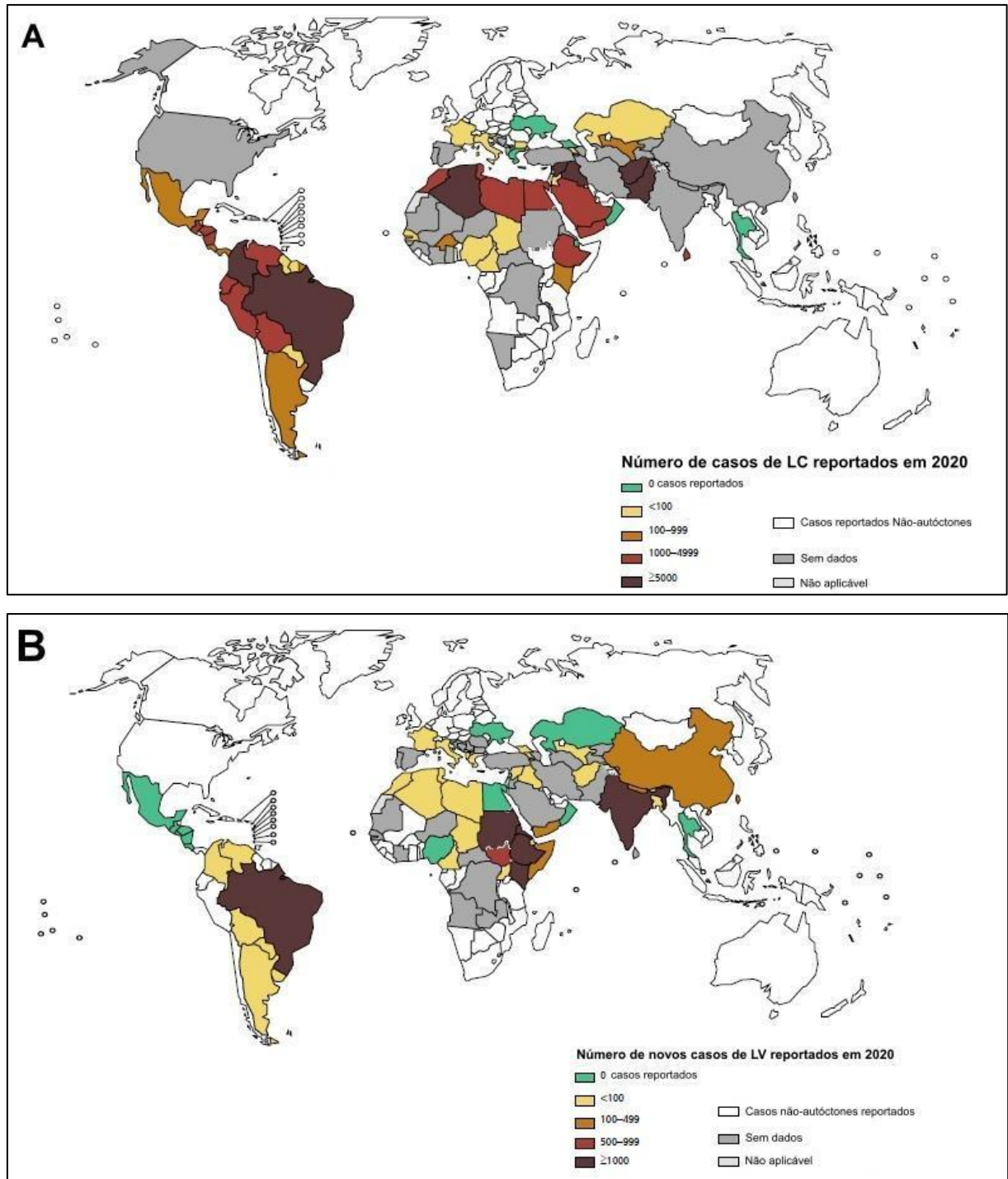
dividendos (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). A malária por sua vez, em termos de morbidade, é considerada um importante problema de saúde pública pela OMS, afetando o mesmo perfil populacional descrito (HOTEZ et al., 2020).

2.2 Leishmanioses

As leishmanioses estão entre as DNs mais negligenciadas pela OMS, ficando em segundo lugar em mortalidade e em sétimo em termos de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYS); além disso, estima-se que devido às consequências da pandemia causada pela COVID-19 a incidência de LC pode aumentar substancialmente devido a movimentos migratórios e ao cenário de agravamento da pobreza, facilitando a transmissão dos parasitas em vetores permissivos, assim como, a LV pode ser agravada em áreas endêmicas devido a ineficácia do controle imunológico em infecções virais para pacientes com a doença (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; MIGUEL et al., 2021).

De acordo com a OMS, este conjunto de doenças que compõem as leishmanioses são endêmicas em todos os continentes, podendo ser dividida em dois grandes grupos LC e LV, com 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença e mais de 2 milhões de novos casos estimados anualmente, além de casos reportados em 200 países para o ano de 2020 (Figura 2) (WHO, 2021; BHOR; RAFATI; PAI, 2021)

Figura 2. Distribuição mundial das leishmanioses em 2020.



Distribuição Mundial da LC e LV para do ano de 2020 de acordo com a Organização Mundial da Saúde, baseada no número de novos casos reportados. A – Distribuição mundial da leishmaniose cutânea. B – Distribuição da leishmaniose visceral. Fonte: Adaptado de WHO, 2021.

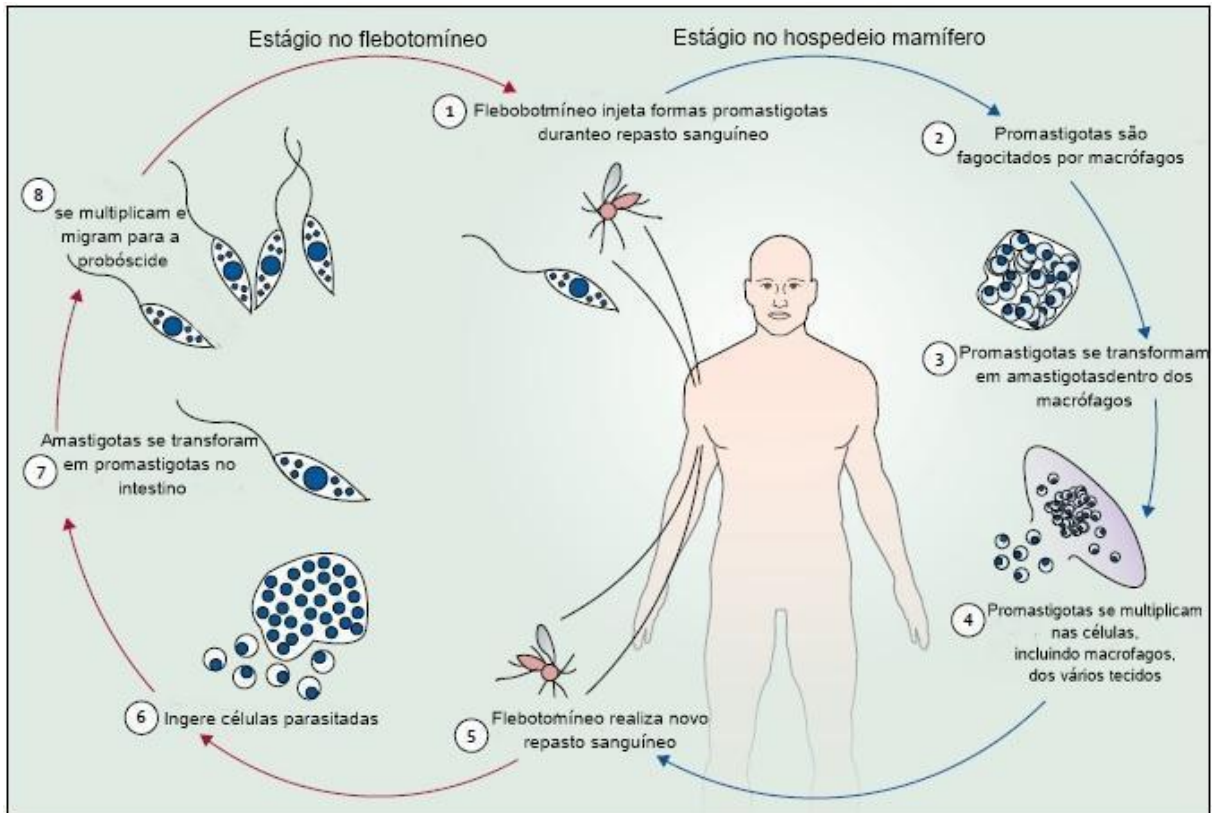
A LC é a forma mais comum da doença, incluindo dentro desta classificação a forma mucocutânea que acomete regiões de mucosa, porém a LV é a forma mais severa e na maioria das vezes fatal se não tratada (WHO, 2021). Estas parasitoses são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que são encontrados nas formas promastigotas, no inseto vetor; e na forma amastigota, internalizada em células do

sistema fagocítico mononuclear, especialmente macrófagos, nos hospedeiros mamíferos (SUNTER; GULL, 2017). A *Leishmania* possui ainda características estruturais e bioquímicas particulares, como a presença de uma mitocôndria única, com DNA concatenado, denominado de cinetoplasto, glicossomos que realizam parte da via glicolítica, além de metabolismo único de tióis (SINGH; GARG; ALI, 2016; SUNTER; GULL, 2017).

O principal transmissor de *Leishmania* spp. na natureza é o inseto do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo – Europa, África e Ásia) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo – América e Oceania), família Psychodidae, com pelo menos 70 espécies transmissoras conhecidas, que podem infectar hospedeiros mamíferos incluindo o ser humano, possuindo assim um ciclo de vida digenético (BATES, 2007; DÍAZ; PONTE-SUCRE, 2018). O ciclo biológico do parasita dura em torno de 72 horas e inicia quando a fêmea do inseto flebotomíneo injeta as formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) no hospedeiro mamífero que são reconhecidos por receptores de superfície de células do sistema fagocítico mononuclear, preferencialmente macrófagos, que fagocitam as formas promastigotas formando o fagossomo, onde essa estrutura sofre maturação ao se fundir com o lisossomo do macrófago formando assim o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo, completando a diferenciação para amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011).

Uma vez dentro das células, o parasita consegue subverter o sistema imune do hospedeiro e se multiplicar através de sucessivas divisões binárias simples até o rompimento celular, que irá promover a infecção de novas células (MULLER; BAKER; ROLLINSON, 2000). Durante o repasto sanguíneo o inseto é contaminado com macrófagos infectados, que se rompem no trajeto pelo trato digestório do mesmo; então os amastigotas são diferenciados a promastigotas procíclicas (forma não infectiva), as quais se multiplicam e colonizam a faringe e esôfago do vetor, até atingir o estágio final infectivo denominado promastigotas metacíclicas (KILLICK-KENDRICK, 1990) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida do parasito *Leishmania* no inseto flebotomíneo e no hospedeiro mamífero.



Formas promastigotas de *Leishmania* diferenciam-se no inseto flebotomíneo em promastigotas metacíclicas infecciosas. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas metacíclicas, que são fagocitadas principalmente por macrófagos. Os promastigotas diferenciam-se em amastigotas aflagelados, que se replicam dentro das células hospedeiras, e se rompem quando há amastigotas em excesso, infectando novas células fagocitárias. O ciclo de transmissão é completo quando as células infectadas são capturadas por outro flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de BURZA, et al., 2018.

As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, estado imunológico do hospedeiro e presença de comorbidades (PELISSARI et al., 2011). Na manifestação cutânea há tropismo por regiões de pele e mucosa, com feridas ulcerativas ou não, únicas ou múltiplas, além de causar destruição de regiões de mucosa quando mucocutânea (Figura 4). No Brasil, é mais comum a manifestação cutânea da doença causada pelas espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; SINGH; SUNDAR, 2014).

Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea.



Manifestações clínicas da LC e LMC. A foto da esquerda mostra lesão ulcerosa única, enquanto a imagem da direita mostra lesões múltiplas ulcerosas ou não.

Fonte: FARAHMAND et al., 2011.

A LV é a forma mais grave da doença e o foco da primeira etapa deste trabalho. A forma visceral das leishmanioses pode ser fatal em mais de 90% dos casos se não tratada; em 2020 34% dos novos casos de LV foram reportados na região Africana, enquanto que os outros 66%, na Europa, Américas, Região leste do Mediterrâneo e Sul da Ásia (WHO, 2021). Esta forma da doença é causada principalmente por *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania donovani*, apresentando amplo espectro clínico que pode variar de manifestações leves a moderadas e graves com período de incubação de 10 a 24 meses (média de 2 a 6 meses) e os casos de óbito se devem à anemia severa instalada e infecção bacteriana associada (MANN et al., 2021).

Os sintomas mais comuns são febre persistente, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), pancitopenia, hipergamaglobulinemia (IgG e IgM) e acentuada perda de peso (Figura 5 A) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No continente africano e na Índia ainda é relatada uma complicação da LV, conhecida como Pós-Calazar ou popularmente como febre negra, que consiste em erupções nodulares na pele, frequentemente observada após o tratamento (SANGENIS et al., 2014) (Figura 5 B).

Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.



Manifestações clínicas da LV. **A** – Quadro clínico de hepatoesplenomegalia causada pela LV. **B** – Quadro clínico de LV Pós-Calazar com erupções nodulares.
Fonte: SANGENIS et al., 2014 e BURZA et al., 2018.

É importante destacar que associado ao quadro clínico crítico das leishmanioses, especialmente da LV, é relatado na literatura casos de coinfeção com doenças autoimunes como pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o que torna as leishmanioses um problema ainda mais grave (LINDOSO et al., 2016).

2.2.1 Tratamento

Os fármacos utilizados como primeira escolha para as leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, já os de segunda escolha, compreendem a anfotericina B (AnfB) e suas formulações (lipossomal ou dispersão coloidal), miltefosina, paromomicina e pentamidina (Quadro 1) (DAVIES et al., 2003; CROFT; OLLIARO, 2011; BARRETT; CROFT, 2012).

Quadro 1. Fármacos atualmente empregados no tratamento da Leishmaniose Visceral (LV), Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), via de administração e ano de introdução no mercado.

Fármaco	Administração	LV	LC	LMC	LDPC	Introdução
Antimoniais pentavalentes	Parenteral	X	X	X	X	1937-1945
Anfotericina B deoxicolato e formulações lipossomais	Intravenosa	X			X	1959
Paromomicina	Tópica para LC e parenteral para LV	X	X			2006
Miltefosina	Oral	X	X	X		2002
Pentamidina	Intramuscular	X	X	X		1973

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) estão disponíveis desde 1920 quando foi observada sua eficácia para as leishmanioses, porém, entraram no mercado em 1937, e a partir de 1945, na forma de estibogluconato, sendo empregados tanto para o tratamento da LC quanto da LV e administrados por via parenteral (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Embora o mecanismo de ação destes compostos não seja completamente compreendido, sabe-se que os antimoniais sofrem oxidação de Sb^V para a forma ativa Sb^{III} no interior das células parasitadas e afetam a bioenergética do parasita; sendo relatado como mecanismo predominante desta classe de compostos a acumulação intracelular seletiva de Sb^{III} através da disfunção do transportador do tipo aquaporina AQP1, aumento nos níveis de tióis e superexpressão de transportadores do tipo ABC (MATOS et al., 2020; OLÍAS-MOLERO et al., 2021). Os efeitos colaterais mais frequentes relatados pelo uso de antimoniais são mialgia, artralgia, leucopenia e anorexia, podendo ainda ser cardio, nefro e hepatotóxicos, com restrições ao uso por grávidas e pessoas idosas (GOTO, H., LINDOSO, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011).

A AnfB é um antibiótico poliênico, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, introduzida para o tratamento da LV em 1960, sendo utilizada como opção terapêutica nos países onde há casos de resistência aos antimoniais pentavalentes (WORTMANN et al., 2010; BALASEGARAM et al., 2012). Além de sua forma convencional, existem as formulações de AnfB: a lipossomal que é menos tóxica, porém com meia-vida mais curta e mais cara que a convencional; a complexo lipídico de AnfB e AnfB coloidal que são menos circulantes que a convencional, possuindo parâmetros cinéticos distintos que implicam diretamente em reajustes no tratamento quando comparada a AnfB convencional (HAMILL, 2013). Este fármaco possui

afinidade por ergosterol, principal esteroide de membrana do parasito, o que impede a ligação da *Leishmania* ao macrófago, uma vez que este fármaco se liga na membrana do parasito, pode atuar também formando canais transmembranas, aumentando o influxo de íons, causando sua morte (VAN ASSCHE et al., 2011).

A pentamidina é uma diamina aromática introduzida em 1930 inicialmente contra *Trypanosoma* spp., administrada via intravenosa ou intramuscular, com uso cada vez menor uma vez que pode causar diabetes mellitus insulina dependente, além de causar nefrotoxicidade, hipoglicemia e hipotensão (NO, 2016). Seu mecanismo de ação está associado a diminuição do potencial de membrana mitocondrial devido ao acúmulo na mitocôndria do parasito, causando alterações na síntese de DNA e alterações na morfologia do cinetoplasto (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico, descoberto nos anos 1960, produzido pela fermentação de *Streptomyces rimosus* com alta eficácia contra um grande espectro de bactérias e protozoários, incluindo *Leishmania*, com mecanismo de ação ainda não completamente elucidado; contudo, a inibição da síntese proteica através da inibição da translocação e reciclagem de subunidades ribossômicas, assim como a modificações no potencial de membrana possam ser seu modo de ação em *Leishmania* (GOTO, H., LINDOSO, 2010; LINDOSO et al., 2012). Os efeitos colaterais incluem ototoxicidade, nefro e hepatotoxicidade (MATOS et al., 2020).

A miltefosina por sua vez é um derivado da alquilfosfocolina, descoberta por volta de 1980, com atividade antineoplásica, porém atribuída a atividade anti-*Leishmania in vivo* em 1990, sendo uma alternativa à quimioterapia para as leishmanioses, com eficácia clínica comparada a AnfB, além de administrada via oral (SINGH; SUNDAR, 2014). Acredita-se que atua interagindo com a membrana celular do parasito por modulação de receptores da superfície celular, metabolismo de inositol e ativação de fosfolipases, causando a morte celular do tipo apoptose (SEIFERT; CROFT, 2006). Os efeitos colaterais incluem teratogenicidade, o que restringe o uso em grávidas, e efeitos relacionados ao longo tempo de meia vida no organismo (> 120h), como casos de cepas resistentes (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). No Brasil, seu uso foi recomendado recentemente, no ano de 2020, para o tratamento da leishmaniose tegumentar (cutânea) a partir de nota informativa pelo Ministério da Saúde (<https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/17/nota-informativa-miltefosina.pdf>).

Ainda não existe uma vacina para a prevenção das leishmanioses em humanos, enquanto que para cães, principal reservatório da LV mais próximo ao ser humano, há algumas opções disponíveis, porém com ressalvas quanto à sua padronização, deficiências metodológicas e diferenças substanciais nas características das populações estudadas (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). A eutanásia dos animais infectados ainda é a principal recomendação para controle da doença em áreas endêmicas, entretanto há divergências sobre a eficácia do método, além de questões éticas envolvidas (COSTA et al., 2013).

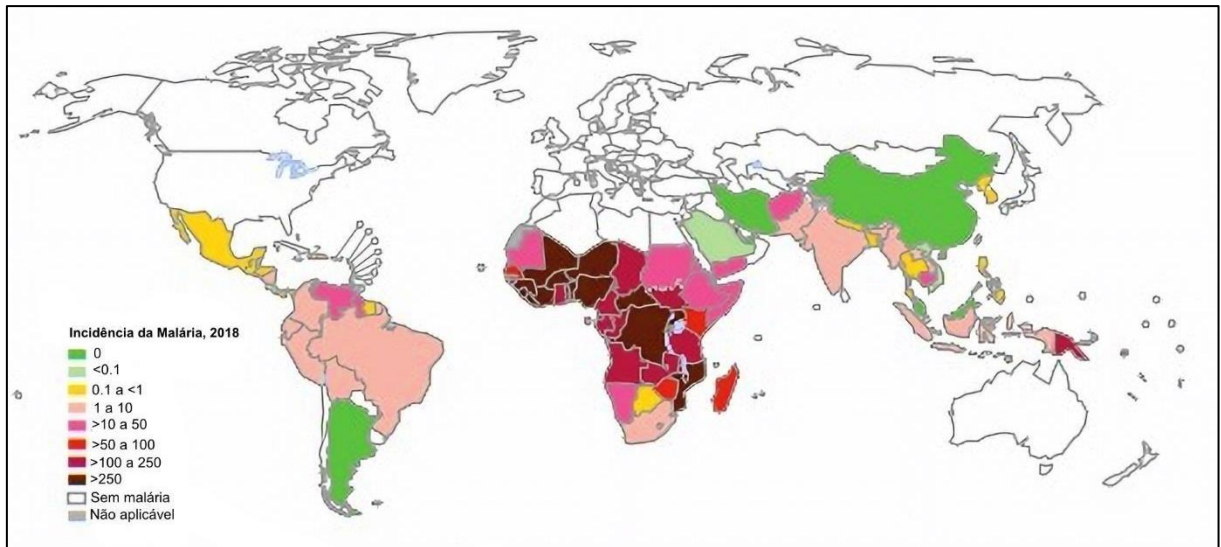
Portanto, sem o controle da infecção nos reservatórios domésticos, em pouco tempo surgem os casos humanos. Assim, após o diagnóstico da doença em humanos, deve ser empregada a quimioterapia com os fármacos disponíveis, de acordo com a orientação dos gestores de saúde pública local. Como observado, todos os fármacos atualmente empregados possuem alta toxicidade associada ao seu uso, além de restrições em determinadas regiões, devido à baixa eficácia geralmente associada à resistência desenvolvida pelo parasita (OLIVEIRA et al., 2011).

Sendo assim, observada a limitada disponibilidade de fármacos leishmanicidas, dificuldade de administração (com exceção da miltefosina), como também casos de cepas resistentes, torna a pesquisa de novos anti-leishmaniais necessária e importante para contornar estes problemas.

2.3 Malária

A malária é considerada pela OMS um importante problema em saúde pública com 241 milhões de casos registrados e 627 mil mortes nos países endêmicos para o ano de 2020, entretanto, acredita-se que este número de mortes seja influenciado pela pandemia da COVID-19, devido a interrupção dos serviços de assistência pela OMS, especialmente no continente Africano (WHO, 2021). Ocorre em mais de 90 países, com maior concentração de casos no continente africano, com mais de 93% das mortes ocorridas no mundo (Figura 6). No Brasil, a transmissão se concentra na região da Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) com cerca de 99% dos casos registrados (BRASIL, 2021).

Figura 6. Distribuição mundial da malária.



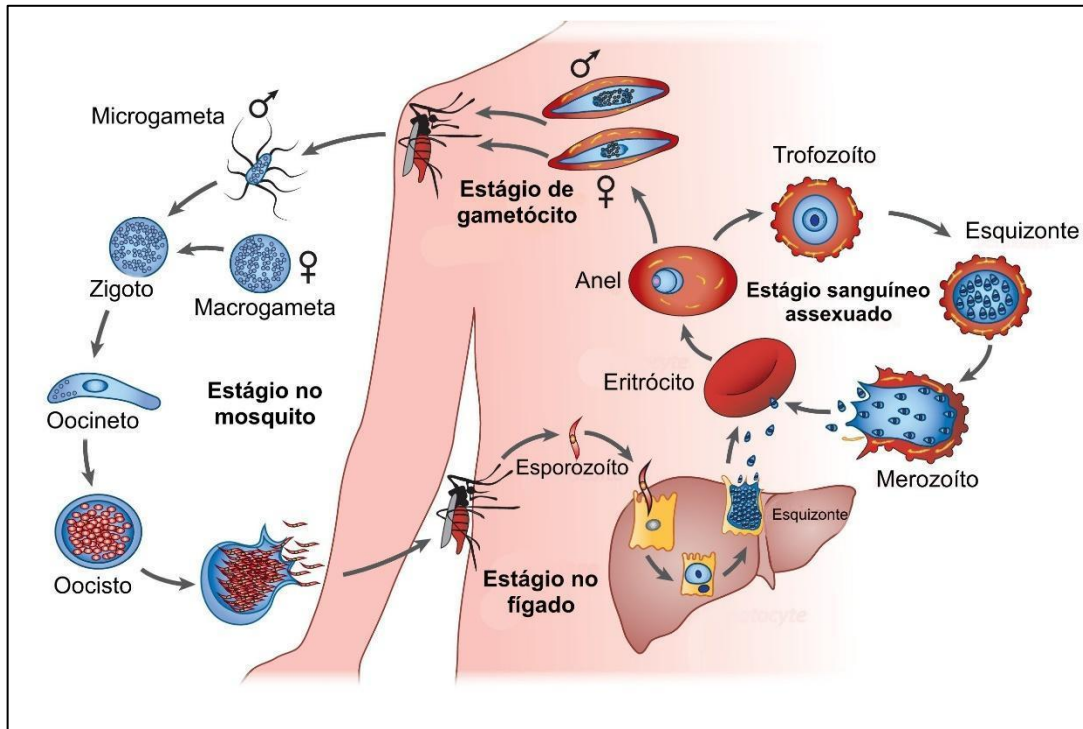
Distribuição mundial da malária de acordo com a Organização Mundial da Saúde, baseado na incidência de casos (número de casos por 1000 habitantes). Fonte: Adaptado de WHO, 2019.

O principal transmissor da malária em humanos é o mosquito do gênero *Anopheles*, família *Culicidae*, popularmente conhecido como pernilongo, com mais de 430 espécies conhecidas, sendo aproximadamente 70 espécies que podem transmitir a doença de fato (PIMENTA et al., 2015). Até o momento, mais de 200 espécies de *Plasmodium* foram descritas, entretanto, apenas cinco capazes de infectar seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo este último naturalmente mantido em macacos causando malária zoonótica no Sudeste de Ásia (SATO, 2021).

A infecção inicia-se quando os indivíduos são picados pela fêmea do inseto vetor *Anopheles* resultando na liberação dos esporozoítos na corrente sanguínea, os quais irão infectar os hepatócitos (Figura 7). Uma vez nestas células, ocorre multiplicação dos parasitas dando origem aos merozoítas que irão romper os hepatócitos, caindo na circulação sanguínea infectando as hemácias, dando início a segunda fase do ciclo, a esquizogonia sanguínea (BRASIL, 2021). É neste estágio intraeritrocitário que ocorre a proliferação em massa dos parasitos por reprodução assexuada cíclica e que aparecem os sintomas da doença. Os ciclos eritrocíticos repetem-se a cada 48 horas em infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*, e a cada 72 horas para *P. malariae*. Após algumas gerações nos eritrócitos, os merozoítas se diferenciam a gametócitos feminino (macrogameta) e masculino (microgameta), cuja fecundação ocorrerá no trato digestório do inseto, formando primeiramente o oocineto

e, posteriormente os esporozoítas, forma que será transmitida ao homem no momento da picada do inseto, encerrando assim o ciclo (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; MAIER et al., 2019).

Figura 7. Ciclo biológico do parasito *Plasmodium* spp. causador da malária.



Formas esporozoítas de *Plasmodium* spp. são injetadas no ser humano e migram para o fígado, aonde irão se diferenciar a esquizontes que irão romper os hepatócitos dando origem aos merozoítos, que caem na circulação sanguínea infectando as hemácias dando início ao ciclo assexuado, em que a cada 48 ou 72 horas estes parasitas completam um ciclo de multiplicação evoluindo do estágio imaturo de anel até o estágio maduro de merozoíto. É nesta fase que se iniciam os sintomas clínicos da doença. Após algumas gerações, os merozoítos podem se diferenciar para gametas feminino (macrogameta) e masculino (microgameta) que são ingeridos pelo mosquito em um novo repasto sanguíneo. É iniciado então o estágio esporogônico, em que no estômago do mosquito o microgameta penetra o macrogameta dando origem ao zigoto, que se torna alongado e com motilidade (oocineto) migrando para o intestino médio gerando o oocisto. Estes oocistos irão crescer, se multiplicar dando origem aos esporozoítos, que irão migrar para as glândulas salivares, tornando assim o mosquito infectivo novamente fechando o ciclo.

Fonte: Adaptado de MAIER et al., 2019.

É importante destacar que durante o estágio hepático, nas infecções por *P. vivax* e *P. malariae*, alguns parasitas podem entrar em estado de latência, sendo denominados de hipnozoítas, responsáveis por recaídas da doença, geralmente seis meses após o tratamento (BRASIL, 2021). O período de incubação da doença dura tipicamente de 10-14 dias para *P. falciparum* e *P. knowlesi*, 2-3 semanas para *P. vivax* e *P. ovale* e 18 dias ou mais para *P. malariae*; porém pode haver variações, *P. vivax*,

por exemplo, pode ter de 3-6 meses de incubação primária (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

Os sintomas da malária podem iniciar de 6-8 dias após a picada do mosquito, ou meses depois de estar em áreas de contágio, podendo variar de acordo com a espécie. Os sintomas clássicos de malária não-complicada são caracterizados por episódios de febre, calafrio e sudorese intervalados (48 horas para *P. vivax* e *ovale* e 72 para *P. malariae*) acompanhados de dor abdominal, náusea, vômitos, diarreia, dor nas costas, mialgia, palidez e icterícia que correspondem a liberação dos merozoítas pelos eritrócitos rompidos (BASU; SAHI, 2017).

A periodicidade de sintomas é menos comum para *P. falciparum* que apresenta manifestações multiformes, podendo apresentar-se como gastroenterite aguda, infecções do trato respiratório superior ou raramente pode apresentar icterícia simulando hepatite viral (TUTEJA, 2007). O quadro clínico pode variar dependendo da cepa envolvida, parasitemia, tempo de doença e nível de imunidade adquirida, com destaque para primoinfectados que estão sujeitos a maior gravidade necessitando de acompanhamento médico, especialmente em infecções por *P. falciparum*, responsável pela maioria dos casos letais (BRASIL, 2021). Nos casos mais graves, denominados de malária-complicada, é relatado dor abdominal intensa, redução do volume de urina, vômito persistente, sangramento, cianose, convulsão e hepatoesplenomegalia, podendo ser letal (TUTEJA, 2007; BASU; SAHI, 2017).

Por assemelhar-se com outras doenças e não haver um quadro clínico específico, é recomendável a busca de orientação médica e solicitação de exame laboratorial para diagnóstico específico da malária, que pode ser por esfregaço sanguíneo e análise microscópica, kits imunocromatográficos com anticorpos mono e policlonais, ou ainda por diagnóstico molecular (TORRES et al., 2006).

2.3.1 Tratamento

Algumas classes de fármacos são empregadas no tratamento da malária, dependendo do caso clínico e da cepa de *Plasmodium* envolvida. Dentro da classe das 4-Aminoquinonas estão a cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina (análogo da cloroquina) sendo a cloroquina extensivamente o antimalárico mais usado em todo o mundo, efetiva para *P. ovale*, *P. malariae*, na maioria dos casos de infecção por *P. vivax*, como também em casos de malária não-complicada por *P. falciparum* (WINSTANLEY; WARD, 2006). Esta classe de compostos, possui como mecanismo

de ação a inibição da formação de hemozoína dentro do vacúolo digestivo do parasita. Em um curso normal de infecção, o parasita metaboliza a hemoglobina transformando-a no metabólito intermediário hematina, o qual é tóxico, em um complexo inerte chamado hemozoína. A cloroquina aumenta o pH do vacúolo digestivo, prejudicando o metabolismo da hemoglobina, e formando um complexo tóxico hematina/cloroquina (BRAY et al., 1998).

Entre os efeitos colaterais associados ao uso da cloroquina estão dor de cabeça, tontura, náusea e problemas gastrointestinais. Em casos de overdose pode causar hipotensão, convulsões e problemas respiratórios; já a amodiaquina pode causar hepatite e agranulocitose (BRAGA et al., 2015).

Os antifolatos são utilizados em combinações fixas, geralmente sulfadoxina-pirimetamina, utilizada em áreas de resistência à cloroquina por *P. falciparum*. Cloroproguanil vem sendo utilizado com dapsona; outros “sulfa” medicamentos como sulfadoxina, sulfalena e dapsona apresentam efeito sinérgico com pirimetamina ou cloroproguanil (WINSTANLEY; WARD, 2006). Este grupo de fármacos interfere na síntese de DNA, inibindo a tetraidrofolato-redutase do parasita, esgotando o tetraidrofolato, um cofator da síntese de DNA. Casos de alergias e febre são relatados associados ao uso dos antifolatos e combinações (GREGSON; PLOWE, 2005).

O grupo das artemisininas inclui o artemeter, artesunato e a própria artemisina utilizados no tratamento da malária complicada, ou em combinação com outros fármacos para malária não-complicada causada por *P. falciparum* (O'NEILL; BARTON; WARD, 2010). As artemisininas parecem ser metabolizadas em dihidroartemisina, um sesquiterpeno de lactona endoperóxido, que media a morte do parasita através da produção de radicais livres após sua clivagem; por serem dependentes de Fe^{2+} para sua ativação, acredita-se que atuem no vacúolo digestivo, e por esta razão são ativas contra formas sanguíneas e não contra gametócitos (FENG et al., 2019). No geral, esta classe de fármacos é bem tolerada, porém há efeitos tóxicos à embriões, não sendo recomendado para grávidas.

Mefloquina é um fármaco de ação semelhante a cloroquina, utilizado no tratamento de malária não-complicada multirresistente causada por *P. falciparum*, mas pode atuar em formas assexuadas para todas as espécies de *Plasmodium* que acometem humanos. Não recomendado para grávidas, este fármaco pode causar

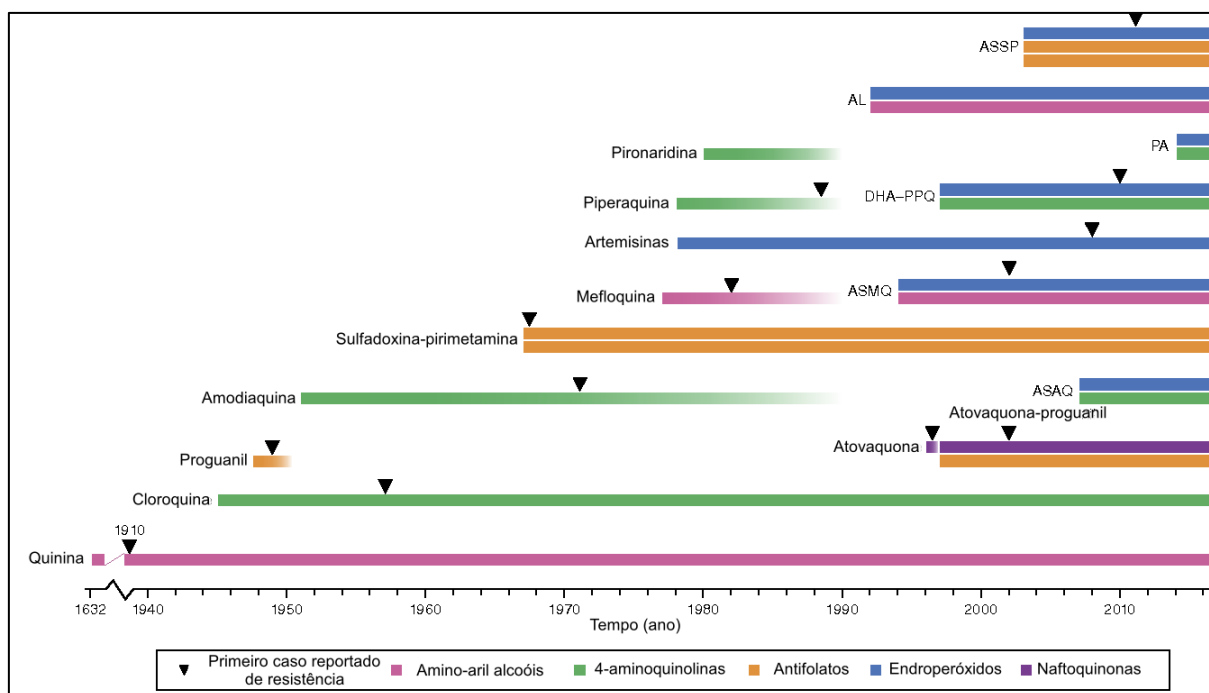
natimorte, podendo ainda causar dores de cabeça, ou efeitos gastrointestinais moderados como efeitos colaterais gerais (MARTINS et al., 2021).

A atovaquona-proguanil atua de forma sinérgica, inibindo a respiração mitocondrial, sendo utilizada no tratamento de malária multirresistente causada por *P. falciparum*; entretanto, por ser de alto custo, com recomendação indicada como quimioprevenção para viajantes. Halofantrina inibe a polimerização de moléculas heme do parasita resultado na intoxicação do mesmo, por metabólitos provenientes da degradação da hemoglobina; é utilizada para tratar malária não-complicada por *P. falciparum* e tem como principal efeito colateral arritmia ventricular (WINSTANLEY; WARD, 2006; DE VILLIERS; MARQUES; EGAN, 2008).

A primaquina é conhecida por ser ativa contra formas hipnozoítas de *P. vivax* e *P. ovale*, sendo ainda o único fármaco disponível contra este estágio do parasita; porém a primaquina causa hemólise em pacientes deficientes em glicose-6-fosfato desidrogenase, devendo então ser solicitado avaliação antes de seu uso (BRAGA et al., 2015; CAMARDA et al., 2019).

Com o passar dos anos os parasitas foram adquirindo resistência aos fármacos disponíveis (Figura 8), especialmente à cloroquina; portanto, por volta dos anos 2000 a OMS adotou como estratégia global o uso da terapia baseada em combinações com artemisina no sentido de reverter a resistência adquirida por *Plasmodium* (EKLAND; FIDOCK, 2008). Porém, mesmo após a combinação de fármacos como estratégia para reverter a resistência, ainda são registrados no Sudeste da Ásia e África casos de resistência à até mesmo a artemisina como também à suas associações (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

Figura 8. História da introdução dos principais antimaláricos e do primeiro surgimento de resistência em campo.



As barras simples são monoterapias, duplas e triplas, terapia combinada. As cores referem-se às classes químicas a que pertencem os antimaláricos. A quinina, importada pela primeira vez para a Europa na década de 1630, encontrou resistência parcial no início do século XX e, mais tarde, foi substituída pela cloroquina (CQ), um antigo padrão-ouro usado massivamente até a resistência aparecer uma década depois. A resistência ao proguanil foi detectada dentro de um ano de uso clínico, quando foi substituído pelo sulfadoxina-pirimetamina (SP) que encontrou resistência rapidamente e hoje é usado principalmente para tratamento preventivo intermitente durante a gravidez e para quimioprevenção da malária sazonal em combinação com AQ (SPAQ, não mostrado) e como tratamento de primeira linha em combinação com artesunato (ASSP) em algumas áreas sensíveis a SP155. Artemisininas (ARTs) foram usadas pela primeira vez em monoterapia (artesanato injetável ainda é usado para malária grave), embora sua curta meia-vida no plasma e problemas de resistência tenham levado ao desenvolvimento de terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) para malária não-complicada. Vários medicamentos parceiros do ACT (como amodiaquina e mefloquina) foram usados como monoterapias e permaneceram em uso como agentes únicos muito tempo depois que a resistência foi encontrada pela primeira vez. A piperaquina e a pironaridina foram introduzidas na China como substitutos da CQ há cerca de 40 anos. A resistência à monoterapia com piperaquina foi relatada no final da década de 1980. A resistência à ART foi relatada pela primeira vez em 2008, mas já estava presente vários anos antes no oeste do Camboja. A falha do tratamento devido à resistência a um ou ambos os componentes de um ACT, foi documentada primeiro para ASMQ e, mais recentemente, para DHA-PPQ. A OMS relatou recentemente falhas no tratamento da AL no Laos. Atovaquona-proguanil (Malarone) é atualmente prescrito como agente profilático à viajantes para áreas endêmicas de malária. AL, arteter + lumefantrina; ASMQ, artesunato + mefloquina; ASAQ, artesunato + amodiaquina; DHA-PPQ, di-hidroartemisinina + piperaquina; PA, artesunato + pironaridina; ASSP, artesunato + SP. Fonte: Adaptado de BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017.

Embora existam opções terapêuticas para o tratamento da malária, ainda há muitos problemas associados ao tratamento, sejam pelos casos de resistência à cloroquina que ainda é o principal fármaco utilizado, ou ao tratamento com artemisina e associações; como também, pelos inúmeros efeitos colaterais associados aos fármacos disponíveis (BLASCO; LEROY; FIDOK, 2017).

No final de 2021, a OMS iniciou a aplicação da primeira vacina contra a malária desenvolvida no mundo, a RTS,S (Mosquirix®) uma vacina pré-eritrocítica, baseada em componentes antigênicos da proteína de superfície de esporozoítos de *P. falciparum*, a circunsporozoíta (CSP), que levou 34 anos desde o início dos estudos até sua finalização com os ensaios clínicos de fase III (LAURENS, 2019). O antígeno recombinante desta vacina inclui: a região central repetitiva (R) da CSP, a região terminal carboxilada da CSP, que contém epítomos T, fundido com o antígeno de superfície (S) do vírus da hepatite B (HBsAg). Para melhorar a reatividade celular, a proteína é formulada em AS01 – uma emulsão em água e óleo (sistema adjuvante lipossomal) (LEVI; BALLALAI; ANDRADE, 2015).

A vacina RTS,S é recomendada para crianças, aplicada em quatro doses, sendo as primeiras três na idade de cinco, seis e sete meses de vida, e a última dose por volta dos 18 meses, com eficácia em torno de 40% na redução do número de mortes e 30% nos casos graves; contudo, ainda é necessário os esforços para vacinas contra outras espécies, bem como vacinas mais eficazes (LAURENS, 2019; TAKASHIMA et al., 2021).

2.4 Cisteíno proteases como alvo terapêutico para leishmanioses e malária

Proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e são importantes em várias atividades biológicas incluindo digestão de peptídeos, ativação de outras enzimas, modulação do sistema imunológico, participação no ciclo celular, diferenciação e autofagia (SIQUEIRA-NETO et al., 2018). Estas enzimas podem ser divididas em seis classes que variam de acordo com o mecanismo de ação e os aminoácidos presentes no sítio ativo: Aspartico-, Cisteíno-, Serino-, Metallo-, Treonino-, Glutamico- e Asparagino- proteases, podendo ainda dentro da mesma classe, serem divididas em famílias por características como similaridade de sequências, especificidade bioquímica de substratos e inserção de *loops* peptídicos (SAJID; MCKERROW, 2002).

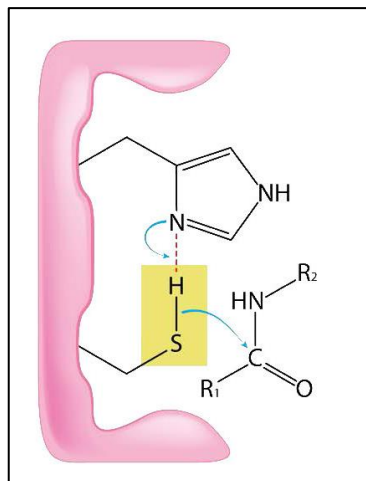
Estas enzimas são importantes em diversos organismos, especialmente em protozoários, desempenhando papel fundamental na virulência, patogênese, modulação do sistema imune, proliferação celular, dentre outras funções que as tornam atrativas como alvo terapêutico (MCKERROW et al., 2009; RAWAT et al., 2021). As CPs também estão presentes nos humanos, aonde estudos de bioinformática revelaram a presença de 11 catepsinas, incluindo B, C, F, F, H, K, L,

O, S, V, X, e W envolvidas em distintos processos, incluindo doenças como o câncer (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

A primeira cisteína protease descrita e caracterizada foi a papaína de *Carica papaya*, em 1983. Entre as cisteína proteases de protozoários (CPs), estão as CPs do clã CA entre as mais descritas e caracterizadas, conhecidas também como papaína-like, por sua semelhança com a papaína (VARUGHESE et al., 1989). Os sítios ativos das CPs abrigam resíduos catalíticos, possuindo essencialmente um resíduo de cisteína e um de histidina, seja como díade ou tríade catalítica por acomodação de resíduos como treonina, asparagina, ácido glutâmico e ácido aspártico (RAWAT et al., 2021).

Estas enzimas catalisam a quebra de proteínas clivando ligações peptídicas usando um grupo tiol nucleofílico de uma cisteína. A ligação do substrato adequado resulta na ativação do tiol (remoção do próton pelo grupo histidina), atuando agora como nucleófilo, atacando e rompendo a ligação peptídica, então um peptídeo é liberado e outro liga-se covalentemente ao enxofre. A hidrólise pela água liberando um segundo peptídeo completa o ciclo de clivagem destas enzimas (Figura 9) (SAJID; MCKERROW, 2002).

Figura 9. Mecanismo de ação das cisteína proteases.



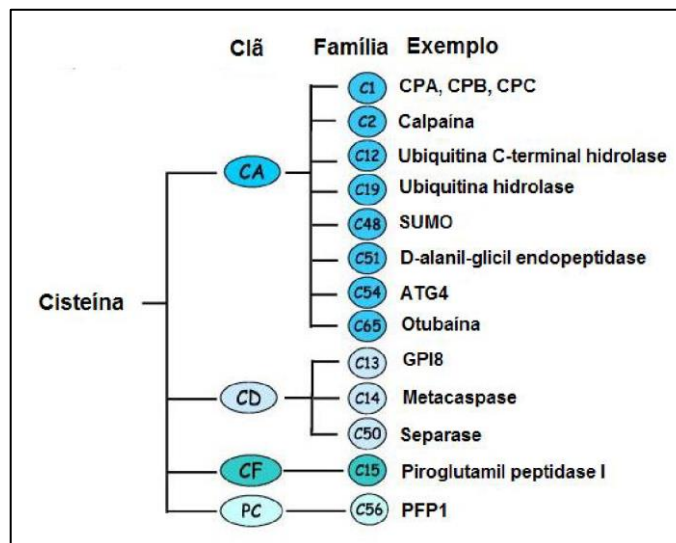
Esquema do mecanismo de ação das cisteína proteases apontando a formação do nucleófilo sulfidril do sítio ativo é representado na área amarela e a ligação peptídica que é atacada antes da hidrólise está indicada pela seta azul apontando para o carbono.

Fonte: <https://bio.libretexts.org/>.

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam três famílias de CPs (Figura 10), denominadas CPA, CPB e CPC, que por sua vez, são expressas em diferentes estágios do ciclo de vida. É descrito para *L. mexicana* que as CPs são apontadas como fatores de virulência, devido a possível participação de CPs no processo de

diferenciação de promastigotas metacíclicas a amastigotas, bem como em seu papel no balanço da resposta Th1/Th2 (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; CAMERON et al., 2004). A CPB é descrita como um importante fator de virulência estando envolvida na evasão das defesas microbidas dos macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasita no interior da célula (MOTTRAM et al., 1996).

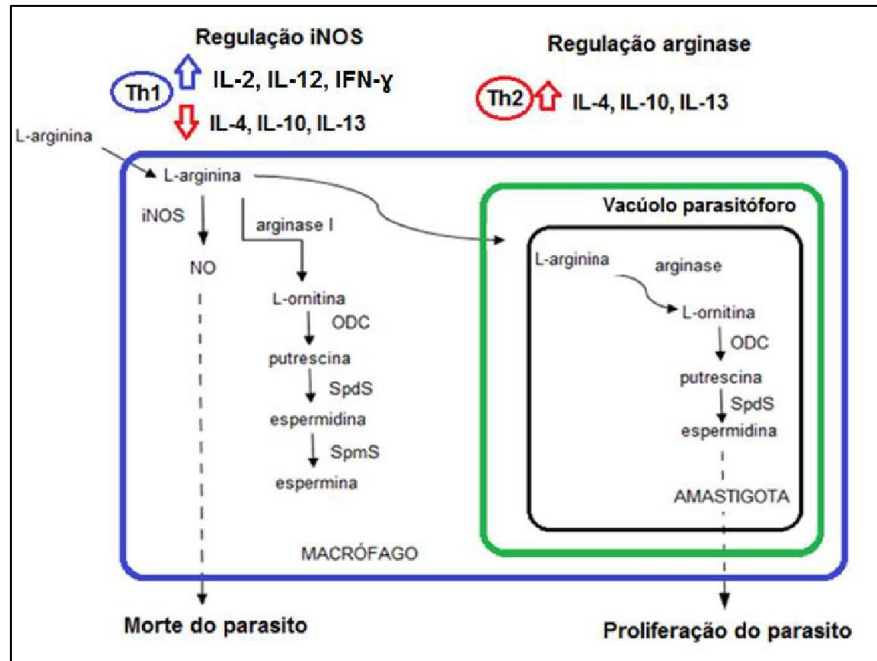
Figura 10. Clãs e famílias de proteases de *L. (L.) major*. A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).



Fonte: DE ALMEIDA, 2017.

A CPB é codificada por genes que ocorrem em cópias múltiplas arranjadas em tandem e pode modular a resposta imune do hospedeiro para a formação de células T *helper* 2 (Th2) em detrimento daquelas T *helper* 1 (Th1), tornando o hospedeiro susceptível para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (Figura 11) (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Em *L. mexicana* foi observado que tal fenômeno acontece pela regulação negativa da produção de INF- γ , via degradação do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$, com subsequente inibição da produção de IL-12 (MOTTRAM; COOMBS, 1998; SIQUEIRA-NETO, et al., 2018).

Figura 11. Representação esquemática da via de ativação de macrófagos e resultado da infecção.



O metabolismo da arginina no hospedeiro e no parasito possui papel chave na ativação de macrófagos e sobrevivência do parasito durante o processo infeccioso. Como resultado de uma ativação clássica, macrófagos respondem às citocinas Th1, que contribuem para eliminação do parasito, contudo, uma ativação alternativa, estimulada por citocinas Th2, proporcionam a sobrevivência do parasito.

ARG: arginase; ODC: ornitina descarboxilase; SpdS: espermidina sintase; SpmS: espermina sintase; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NO: óxido nítrico.

Fonte: DE ALMEIDA, 2017.

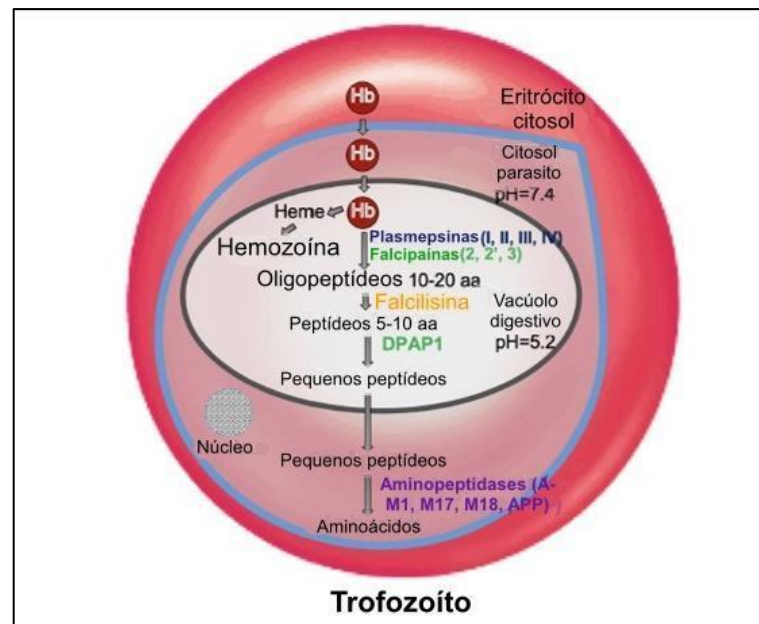
Mottram e colaboradores (1996) demonstraram que cepas mutantes nulas para CPB2.8 perdem capacidade infectiva, recuperando infectividade semelhante à cepa selvagem quando "curadas" com a transfecção de plasmídeos que albergam o gene que codifica a CPB, mostrando o papel crucial desta enzima na infecção por *Leishmania*.

Assim como em *Leishmania*, os parasitas causadores da malária, *Plasmodium* spp. também possuem uma série de cisteíno proteases que tem papel central durante o ciclo celular no parasita, seja na invasão ou degradação de eritrócitos, degradação de tecidos ou invasão celular (MUSYOKA; NJUGUNA; BISHOP, 2019). Em *Plasmodium*, as cisteíno proteases melhor caracterizadas são as da família da papaína (clã CA, família C1), caracterizadas pela presença da tríade catalítica Cis-His-Asn conservada (MISHRA; SINGH; SINGH, 2019). O sequenciamento do genoma de *P. falciparum* revelou a presença de quatro falcipaínas (FPs-1, 2, 2' e 3), três dipeptidil peptidases (DPAP-1, -2, -3), nove proteínas SERA e um homólogo da calpaína (ROSENTHAL, 2011).

Durante o estágio eritrocítico, especialmente na fase de trofozoíta, é especialmente observado acentuada atividade das falcipaínas FP-2 e FP-3 presentes

em abundância em *P. falciparum*. Estas enzimas são encontradas no vacúolo digestivo (VD) possuindo como principal função a rápida clivagem da hemoglobina em múltiplos sítios, levando à sua degradação, em conjunto com outras classes de enzimas catalíticas (Figura 12). FP-2 também está envolvida na degradação de proteínas esqueléticas da membrana eritrocitária, incluindo a anquirina e a proteína da banda 4.1 (ROSENTHAL, 2011; MISHRA; SINGH; SINGH, 2019).

Figura 12. Papel das proteases na degradação da hemoglobina.



Trofozoítos “ingerem” o citoplasma dos eritrócitos e o transportam para o grande e central vacúolo digestivo, análogo aos lisossomos. Nesta via, várias enzimas proteolíticas conhecidas são envolvidas: aspártico proteases (Plasmepsinas I, II, III e IV), três cisteíno proteases da família da papaína (Falcipainas-2, 2' e 3), metaloprotease (Falcilisina) e a dipeptidil aminopeptidase 1 (DPAP1). O produto final são aminoácidos que irão suprir a demanda nutricional da metamorfose desde o estágio de anel, até os esquizontes multinucleados do estágio assexuado.

Fonte: Adaptado de MISHRA; SINGH; SINGH, 2019.

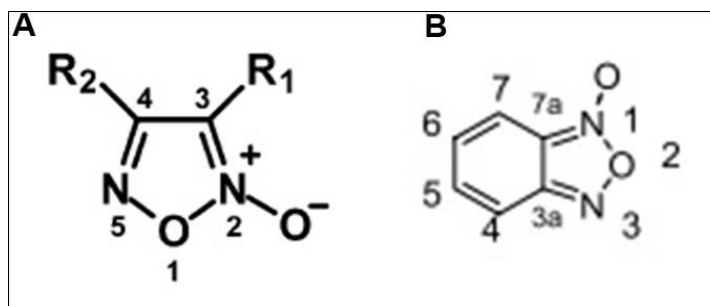
Pode-se ainda dizer que as falcipainas são um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que desenvolvem papel crucial no estágio de maturação e multiplicação nos eritrócitos. Sijwali e colaboradores (2003) mostraram que a FP-2 é essencial no processo de degradação de hemoglobina, uma vez que uma cepa *knockout* do gene da FP-2 teve diminuição do processo de clivagem de hemoglobina quando comparada à cepa selvagem em estágio trofozoíta, além de ser três vezes mais sensível a inibidores de cisteíno protease. Já para FP-1, o mesmo não ocorreu, a cepa *knockout* apresentou o mesmo perfil fenotípico da cepa selvagem (SIJWALI; ROSENTHAL, 2004).

Vários inibidores de cisteína proteases são descritos na literatura para as falciparinas, como peptídeos, peptídeo-miméticos e não peptídicos, uma vez que há a estrutura resolvida da FP-2 e FP-3 o que facilita a etapa de desenho racional de inibidores (RAWAT et al., 2021). Alguns destes compostos chegam a etapa de ensaios *in vivo*, mas não progridem (ROSENTHAL, 2004). Portanto, a busca por inibidores específicos e seletivos para falciparinas, que possam evoluir nas etapas de desenvolvimento de fármacos ainda é um desafio. No que diz respeito a fármacos que possuem como alvo cisteína proteases de protozoários, há na literatura apenas um registro referente ao fármaco K11777 que avançou em estágio pré-clínico contra a doença de Chagas, porém foi interrompido devido a problemas de segurança (MCKERROW, 2018).

2.5 Compostos furoxanos e derivados

Os furoxanos (1,2,5-oxadiazol-2*N*-óxido) e benzofuroxanos (benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-1*N*-óxido) (Figura 13), são moléculas bastante conhecidas na literatura, possuindo várias bioatividades descritas. Estas moléculas foram sintetizadas pela primeira vez há mais de 100 anos, com promissora atividade antiparasitária descrita, dentre elas anti-*Leishmania*, anti-*Plasmodium*, anti-*Trypanosoma*, anti-*Schistosoma* (GASCO et al., 2004; CASTRO et al., 2009; MOTT et al., 2012; DUTRA et al., 2014; GIL et al., 2014). Esta classe de moléculas apresentam em sua estrutura um grupamento *N*-óxido que age como grupo biorreduzível no parasito, gerando espécies reativas de nitrogênio, dentre elas o óxido nítrico (NO), além de causar S-nitrosilação de proteínas, o que é associado como principal mecanismo de ação do efeito antiparasitário do NO (GASCO et al., 2004; BOIANI et al., 2008).

Figura 13. Estrutura geral dos furoxanos e benzofuroxanos.



Estrutura geral dos furoxanos (A) e benzofuroxanos (B). A posição do grupamento N-óxido é indicada como 1-, N- ou N1-óxido para os furoxanos, enquanto que para os benzofuroxanos é indicado como 2-, N- ou N2-óxido. Fonte: GASCO et al., 2004; CERECETTO; GONZALES, 2007.

O NO ao ser metabolizado em células de mamíferos e microrganismos, pode causar formação excessiva de oxidantes e novos produtos que levam ao comprometimento da estrutura e função celular, levando a degeneração e morte da célula (RADI, 2018). Uma das organelas celulares mais atingidas por este processo é a mitocôndria, onde dados na literatura sustentam que o aumento de NO causa disfunção mitocondrial através de uma série de eventos como alteração dos gradientes eletroquímicos, redox mitocondrial e homeostase da bioenergia (RADI et al., 2002).

Um dos subprodutos gerados pela metabolização do NO nas células é o peroxinitrito que pode levar a alterações na bioenergética mitocondrial e na homeostase do cálcio, como também promover a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (RADI et al., 2002). Em células de mamíferos, danos causados por NO e mudanças na homeostase do cálcio juntos iniciam morte celular programada ou necrose em uma variedade de tipos celulares (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999). Parasitas do gênero *Leishmania* possuem alguns reservatórios de cálcio como acidocalcisomas, retículo endoplasmático e apenas uma mitocôndria (DOCAMPO; HUANG, 2015); portanto, alterações que estejam sendo causadas pelo efeito deletério dos subprodutos gerados pelo NO são importantes para o entendimento desta via.

Em parasitas do gênero *Plasmodium* sabe-se que o cálcio está envolvido na bioenergética do parasita, sendo um segundo mensageiro crucial ligado ao egresso e invasão de células hospedeiras, secreção de proteínas, motilidade e regulação do ciclo celular (BROCHET; BILLKER, 2016). Estes parasitas possuem como principais reservatórios de cálcio o vacúolo digestivo, retículo endoplasmático, mitocôndria e acidocalcisomo que podem ser prejudicados pelo desbalanço de cálcio intracelular (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Alguns trabalhos caracterizaram componentes importantes responsáveis pela sinalização de cálcio em *P. falciparum*, sendo os mais descritos: bombas SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum* CA^{2+} -ATPase) responsáveis pelo bombeamento deste íon para dentro do retículo endoplasmático; pirofosfatases (VP1) e V-ATPases presentes no vacúolo digestivo que regulam o pH ácido desta organela pela

manutenção de cálcio; e as proteínas quinases dependentes de cálcio (CPDKs) descritas por estarem envolvidas na regulação da motilidade dos gametas no inseto vetor, e egresso do ciclo biológico na fase eritrocitária (VIDADALA et al., 2014; DOCAMPO; HUANG, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2021). Na fase intraeritrocítica, na qual há bastante investimento no desenvolvimento de drogas anti-maláricas, o parasita é desafiado ao usar o cálcio para sinalização, uma vez que a concentração desse íon na corrente sanguínea é na ordem de milimolar, enquanto que intracelular pode variar de 100 nM a 480 nM (GARCIA et al., 1996; ROHRBACH et al., 2005).

Autores relatam que a homeostase do cálcio intracelular é importante para *Plasmodium* uma vez que está conectado a sinais intracelulares críticos ligados ao ciclo celular do parasita, estando envolvido em uma rede de vias reguladoras, o que torna este fenômeno um importante alvo para o desenvolvimento de drogas anti-maláricas (GAZARINI et al., 2007; LOURIDO; MORENO, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2021). Vidadala e colaboradores (2014) descreveram uma série de compostos baseados em pirazolopirimidina e imidazopirazina como potentes inibidores de quinase dependente de cálcio-4 em *P. falciparum* (PfCDPK4), sem toxicidade para células de mamífero (VIDADALA et al., 2014). Enomoto e colaboradores (2012) mostraram que o composto 2-aminoetil difenilborinato bloqueia a oscilação espontânea de cálcio, via receptor IP3/cálcio dependente, causando o bloqueio da progressão do ciclo celular de *P. falciparum* no estágio eritrocítico (ENOMOTO et al., 2012).

Portanto, tendo em vista o potencial anti-parasitário dos derivados furoxanos, nosso grupo de pesquisa estudou uma série de compostos desta classe, identificando o composto **Lapdesf14e**, que apresentou potencial terapêutico por administração intraperitoneal para tratamento da LV, com mecanismo de ação associado a inibição da CPB2.8 de *Leishmania* e produção de NO (DE ALMEIDA, 2017; DE ALMEIDA et al., 2017). Entretanto, sabe-se que esta via de administração não é a ideal, logo melhorar este protótipo, desenvolvendo moléculas com atividade semelhante ou superior e que possam ser utilizadas por administração via oral, foi um dos objetivos deste trabalho, estando de acordo com a iniciativa do *Drugs for Neglected Diseases* (DNDi) para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas (KATSUNO et al., 2015). Portanto, modificações estruturais foram realizadas utilizando **Lapdesf14e** como protótipo.

Foram desenvolvidos 24 derivados furoxanos, sendo 14 amida- e fenil-furoxanos, dez benzofuroxanos e adicionalmente sete compostos contendo apenas *N*-acil-hidrazona para verificar a influência deste grupo químico na atividade anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium*. A *N*-acil-hidrazona é descrita por atuar na inibição de cisteína proteases de *Leishmania* e *Plasmodium*, sendo explorada também no desenho de novos compostos bioativos para outras doenças parasitárias como Doença de Chagas (CARVALHO et al., 2012; KUMAR et al., 2017).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta Tese foi avaliar o potencial antiparasitário contra *Leishmania infantum* e *Plasmodium falciparum* dos derivados furoxanos desenvolvidos a partir de **Lapdesf14e**, e investigar possíveis mecanismos de ação.

3.1 Objetivos específicos

Para Leishmaniose visceral causada por Leishmania infantum:

- Clonagem e expressão da enzima *LmCPB2.8ΔCTE* no sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* para *screening* dos potenciais inibidores;
- Avaliação dos novos furoxanos quanto ao potencial leishmanicida em modelo visceral contra *Leishmania infantum* (atividade anti-amastigota EC_{50-AMA} e citotóxica CC_{50}) e determinação do índice de seletividade ($SI=CC_{50}/IC_{50}$);
- Os protótipos com atividade leishmanicida que apresentaram parâmetros de $CI_{50-AMA} < 10\mu M$ e $SI > 10$, foram investigados quanto a:
 - Inibição da *LmCPB2.8ΔCTE*;
 - Investigação do mecanismo de inibição;
 - Análise por *docking* molecular dos melhores candidatos;
 - Níveis de produção de NO.
- Avaliação *in silico* do ADMET do melhor candidato;
- Análise da eficácia do tratamento do melhor derivado em camundongos infectados com *L. (L.) infantum* através de:
 - Quantificação da carga parasitária no baço e fígado dos animais infectados;
 - Marcadores bioquímicos.

Para malária causada por Plasmodium falciparum:

- Avaliação de novas moléculas quanto ao potencial anti-plasmódio em culturas sincronizadas de *Plasmodium falciparum* 3D7 – GCaAMP3 através do ensaio da lactado desidrogenase (PfLDH);
- Avaliação quanto ao potencial inibitório das falcipainas de *P. falciparum* através de:
 - Ensaio fenotípico para verificação da morfologia do vacúolo digestivo;
 - Análise de acumulação de hemoglobina não degradada;
- Avaliação dos mecanismos de ação através de ensaios de mobilização do cálcio intracelular.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as DNs mais negligenciadas, com fármacos obsoletos e terapêutica associada a uma série de efeitos colaterais e abandono por parte do paciente, o que necessita de uma atenção especial para o desenvolvimento de fármacos. Este capítulo, traz o trabalho publicado na revista PLOs ONE (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008>), referente à avaliação *in vitro* e *in vivo* dos derivados furoxanos contra a leishmaniose visceral causada por *L. infantum* e expressão da enzima CPB2.8 de *L. mexicana* utilizando um novo sistema de expressão, como parte dos estudos de mecanismo de ação destes compostos. Por se tratar de um artigo *Open access* a revista autoriza a total reprodução do artigo nesta Tese, ou em qualquer outro meio, desde que citado (<https://journals.plos.org/plosone/s/licenses-and-copyright>).

Esta parte da Tese foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, sob orientação da Dr^a. Marcia Graminha, em colaboração com o grupo do Dr^o. Jean Santos FCFar - UNESP, o qual sintetizou as moléculas e realizou os estudos de docking molecular; e com colaboração também com o grupo do Dr^o. Flávio Silva da UFSCar – São Carlos, onde foi realizada a expressão da enzima recombinante CPB2.8.

Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity

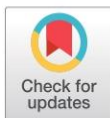
RESEARCH ARTICLE

Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity

Leandro da Costa Clementino^{1,2}, Guilherme Felipe Santos Fernandes^{1,2}, Igor Muccillo Prokopczyk², Wilquer Castro Laurindo^{1,2}, Danyelle Toyama³, Bruno Pereira Motta², Amanda Martins Baviera², Flávio Henrique-Silva³, Jean Leandro dos Santos^{2*}, Marcia A. S. Graminha^{2*}

1 São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil, **2** São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Brazil, **3** Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

* jean.santos@unesp.br (JLS); marcia.graminha@unesp.br (MASG)



OPEN ACCESS

Citation: Clementino LdC, Fernandes GFS, Prokopczyk IM, Laurindo WC, Toyama D, Motta BP, et al. (2021) Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. PLoS ONE 16(11): e0259008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008>

Editor: Bhaskar Saha, National Centre For Cell Science, INDIA

Received: July 15, 2021

Accepted: October 9, 2021

Published: November 1, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008>

Copyright: © 2021 Clementino et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease that affects 12 million people living mainly in developing countries. Herein, 24 new *N*-oxide-containing compounds were synthesized followed by *in vitro* and *in vivo* evaluation of their antileishmanial activity. Compound **4f**, a furoxan derivative, was particularly remarkable in this regard, with EC₅₀ value of 3.6 μM against *L. infantum* amastigote forms and CC₅₀ value superior to 500 μM against murine peritoneal macrophages. *In vitro* studies suggested that **4f** may act by a dual effect, by releasing nitric oxide after biotransformation and by inhibiting cysteine protease CPB (IC₅₀: 4.5 μM). *In vivo* studies using an acute model of infection showed that compound **4f** at 7.7 mg/Kg reduced ~90% of parasite burden in the liver and spleen of *L. infantum*-infected BALB/c mice. Altogether, these outcomes highlight furoxan **4f** as a promising compound for further evaluation as an antileishmanial agent.

Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease caused by more than 20 species of the genus *Leishmania* and affects 12 million individuals living mainly in developing countries [1–3]. The current treatment still relies on a small number of old and toxic drugs, administered through the parenteral route, except for the oral drug miltefosine. The drug discovery pipeline for leishmaniasis has been affected by the severe scarcity of new drug candidates achieving clinical trials stages [4]. Therefore, efforts to discover new therapeutic alternatives are urgent.

Leishmaniasis is transmitted through the inoculation of promastigotes during the phlebotomine blood meal, followed by their entry and differentiation to amastigotes into mammalian hosts cells, primarily “professional phagocytes” such as macrophages [5]. The parasite has developed different strategies to inactivate the macrophages functions, including the expression and secretion of cysteine protease (CPB) [6]. CPB, as well as the *Trypanosoma cruzi*

Funding: We are grateful to The São Paulo Research Foundation, FAPESP, <https://fapesp.br/en>, (2017/03552-5, 2016/06931-4 and 2018/11079-0) and National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, <https://www.gov.br/cnpq/pt-br>, (305174/2020-7, 304731-2017-0 and 311746/2017-9) for financial support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, under finance code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

enzyme cruzain, is a cathepsin L-like protease important for parasite immune evasion [6, 7]. For *Leishmania*, CPB also allows modulation of the host Th1/Th2 immune response [8, 9] and degradation of MHC class I [10]. The importance of CPB for parasite infection and the lack of redundancy into the mammalian host genome, make it an attractive target for antileishmanial drug development [7, 11]. Several protease inhibitors exhibit electrophilic warheads that undergo nucleophilic attack from thiolate residue of cysteines of the active site of the enzymes [12–19]. Among them, the warhead *N*-acylhydrazone present protease inhibitory properties and has been previously explored in the synthesis of both antileishmanial and antitrypanocidal compounds [17, 18, 20]. Therefore, in a continuing effort to develop new candidate drugs to treat leishmaniasis, we have first reported a series of furoxan and benzofuroxan derivatives containing the *N*-acylhydrazone subunit as antileishmanial agents [21].

Among them, the compound **Lapdesf14e** (*E*)-4-(4-((2-(3-hydroxybenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)-3-(phenylsulfonyl)-1,2,5-oxadiazole 2-oxide, previously known as **14e** (Fig 1), showed remarkable antileishmanial efficacy in *L. infantum*-infected hamsters by reducing the parasite load in the spleen (49.9%) and liver (54.2%), without toxic effects [14]. It was suggested that the antileishmanial activity of this furoxan derivative (**Lapdesf14e**) was related to its ability to release nitric oxide (NO) after biotransformation, which ultimately leads to parasite death mainly through DNA damage [22]. Further investigations have revealed that **Lapdesf14e** is also targeting the parasite enzyme CPB at micromolar range [20]. Therefore, based on these promising results, we designed a novel series of *N*-oxide compounds containing *N*-acylhydrazone subunit, represented by phenyl-furoxan (**4a–4g**), amide-furoxan (**4h–4o**), and benzofuroxan (**4p–4x**) based on **Lapdesf14e** (Fig 1).

Moreover, to evaluate the contribution of *N*-oxide subunit, an additional series of analogs containing only the *N*-acylhydrazone subunit (**14a–14g**) was also synthesized, excluding the furoxan and benzofuroxan moieties. Thus, based on the attempt to optimize **Lapdesf14e**, the present study reports the design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of *N*-oxide derivatives (**4a–x**) and *N*-acylhydrazones (**14a–g**), followed by their antileishmanial and inhibitory effect against the recombinant *Leishmania* cysteine protease LmCPB2.8ΔCTE (CPB), expressed in the yeast *Pichia pastoris*.

Materials and methods

Chemistry

Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used as received. Thin-layer chromatography (TLC), precoated with silica gel 60 (HF-254; Merck) to a thickness of 0.25 mm, was used for monitoring all reactions. The plates were revealed under UV light (254 nm) and, when necessary, treated with iodine vapor. All compounds were purified on a chromatography column with silica gel (60 Å pore size, 35–75-μM particle size) and the following solvents were used as mobile phase: dichloromethane, hexane, ethyl acetate, and petroleum ether. The purity was analyzed by HPLC using a Shimadzu LC-10AD chromatograph equipped with a model SPD-10A UV-vis detector (Shimadzu). The purity was superior to 98%. Melting points (mp) were determined in open capillary tubes using an electrothermal melting point apparatus (SMP3; Bibby Stuart Scientific). Infrared (IR) spectroscopy (KBr disc) was performed on an FTIR-8300 Shimadzu spectrometer, and the frequencies are expressed per cm⁻¹. The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra for ¹H and ¹³C of all compounds were obtained on a Bruker DRX-600 (600 MHz) NMR spectrometer using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) or chloroform (CDCl₃) as a solvent for sample preparation. Chemical shifts were expressed in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane. The coupling constants are reported in hertz (Hz) and the signal multiplicities are reported as

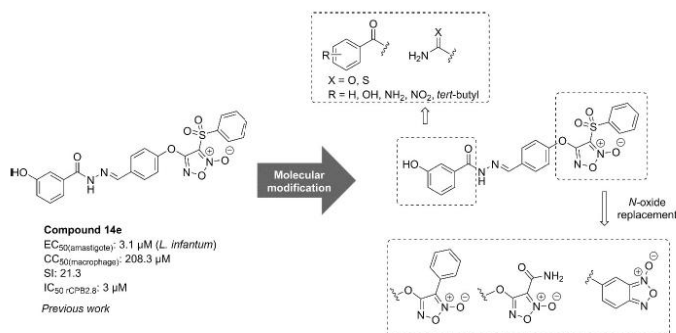


Fig 1. Drug design of the new compounds.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g001>

singlet (s), doublet (d), doublet of doublet (dd), doublet of doublet doublets (ddd), triplet (t), and multiplet (m). Elemental analyses (C, H, and N) were performed on a Perkin-Elmer model 240C analyzer. All data were expressed within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. Compounds **3**, **9**, **12**, **14b**, and **14e** were prepared according to previously described methodologies [23–27]. Compounds **4p–x** were synthesized according to previously described methods and the characterization data are not shown here [24].

General procedures for the synthesis of compounds (4a–o). The coupling reaction for preparation of compounds (**4a–o**) involved the treatment of aldehyde group (**3**, **9**, **12**) (1.5 mmol) with previously selected hydrazides (**5a–e**; **6a–b**) (1.5 mmol) in 15 mL of ethanol, catalyzed by hydrochloric acid 37% (0.2 mL). The reactions were stirred at room temperature up to 24h and monitored by TLC until the reactive consumption. After, the solvent was partially removed under reduced pressure, followed by the addition of iced water (~15 mL) to precipitate the final *N*-acylhydrazones (**4a–o**). The precipitate was collected by filtration and washed with cold water to provide the compounds with yields ranging from 82–96%. When necessary, further purification was performed using column chromatography (flash silica, eluent: 50% ethyl acetate; 50% hexane).

(*E*)-4-(4-((2-benzoylhydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (**4a**). Off-white solid; yield 91%; mp: 210–213°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.94 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.90 (dd, *J* = 31.5, 7.2 Hz, 4H), 7.63 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.2, 161.9, 153.8, 146.8, 133.3, 132.6, 131.8, 130.9, 129.1, 128.8, 128.5, 127.6, 126.7, 121.7, 120.6, 108.4. Anal. Calcd (%) for C₂₂H₁₆N₄O₄: C: 66.00; H: 4.03; N: 15.98. Found: C: 66.03; H: 4.02; N: 15.98.

(*E*)-4-(4-((2-(4-hydroxybenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (**4b**). Off-white solid; yield 90%; mp: 223–225°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.73 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.84 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.66–7.57 (m, 5H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.0, 162.2, 161.0, 153.9, 145.8, 133.0, 131.2, 130.0, 129.4, 128.9, 127.0, 124.0, 121.9, 120.8, 115.3, 108.6. Anal. Calcd (%) for C₂₂H₁₆N₄O₅: C: 63.46; H: 3.87; N: 19.21. Found: C: 63.46; H: 3.87; N: 19.23.

(*E*)-4-(4-((2-(4-aminobenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (**4c**). Off-white solid; yield 93%; mp: 219–222°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.53 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz,

2H), 7.65–7.57 (m, 5H), 6.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.81 (s, $J = 8.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.9, 153.4, 152.4, 144.6, 133.0, 131.7, 130.9, 129.4, 129.1, 128.4, 126.7, 121.7, 120.5, 119.3, 112.6, 108.4. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$: C: 63.61; H: 4.13; N: 15.41. Found: C: 63.60; H: 4.13; N: 15.41.

(*E*)-4-((2-(4-nitrobenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4d). Off-white solid; yield 82%; mp: 226–228°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.23 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.66–7.59 (m, 5H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.8, 154.0, 149.3, 147.7, 139.0, 132.3, 130.9, 129.2, 129.1, 129.0, 126.7, 123.7, 121.7, 120.6, 108.4. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6$: C: 59.33; H: 3.39; N: 21.55. Found: C: 59.35; H: 3.41; N: 21.55.

(*E*)-4-((2-(*tert*-butylbenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4e). Off-white solid; yield 95%; mp: 223–227°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.87 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.65–7.59 (m, 5H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.32 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.2, 162.0, 154.8, 153.8, 146.4, 132.8, 131.1, 130.7, 129.3, 128.9, 127.7, 126.8, 126.8, 125.4, 121.8, 120.7, 108.5, 31.1. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$: C: 68.41; H: 5.30; N: 14.02. Found: C: 68.40; H: 5.32; N: 14.04.

(*E*)-4-((2-(*tert*-carbamoylhydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4f). Off-white solid; yield 96%; mp: 196–198°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.51 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.11–8.05 (m, 4H), 7.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.65–7.59 (m, 3H), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.9, 153.6, 140.9, 132.5, 130.9, 129.1, 129.0, 126.7, 121.7, 120.4, 108.4. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$: C: 56.64; H: 3.86; N: 18.86. Found: C: 56.64; H: 3.89; N: 18.86.

(*E*)-4-((2-(*tert*-carbamothioylhydrazono)methyl)phenoxy)-3-phenyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4g). Off-white solid; yield 89%; mp: 193–195°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.33 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 7.65–7.58 (m, 3H), 7.53 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.56 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.0, 156.7, 152.9, 137.8, 133.1, 130.9, 129.1, 128.1, 126.7, 121.7, 120.3, 108.3. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: C: 54.08; H: 3.69; N: 13.51. Found: C: 54.11; H: 3.71; N: 13.51.

(*E*)-4-((2-(benzoylhydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-3-carbamoyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4h). Off-white solid; yield 93%; mp: 221–225°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.77 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 59.2$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.48 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.0, 159.1, 155.7, 155.1, 147.4, 133.5, 131.7, 128.7, 128.5, 127.6, 115.2, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$: C: 56.69; H: 3.96; N: 20.98. Found: C: 56.70; H: 3.98; N: 20.99.

(*E*)-3-carbamoyl-4-((2-(4-hydroxybenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4i). Off-white solid; yield 90%; mp: 201–203°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.56 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 76.8$ Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.47 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.6, 160.6, 160.0, 158.9, 146.5, 129.6, 128.8, 128.5, 128.1, 124.0, 115.2, 115.0, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6$: C: 54.41; H: 3.81; N: 24.16. Found: C: 54.39; H: 3.81; N: 24.16.

(*E*)-4-((2-(4-aminobenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-3-carbamoyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4j). Off-white solid; yield 91%; mp: 209–214°C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.36 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.77 (s, 2H), 5.47 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 158.7, 155.7, 155.2, 152.2, 145.6, 129.3, 128.4, 128.3, 119.6, 115.1, 112.6, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_5$: C: 54.55; H: 4.07; N: 20.18. Found: C: 54.56; H: 4.06; N: 20.19.

(*E*)-3-carbamoyl-4-((4-((2-(4-nitrobenzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4l). Off-white solid; yield 84%; mp: 229–233°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.07 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.49 (s, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.3, 159.3, 155.7, 148.6, 139.2, 131.8, 129.1, 128.9, 128.4, 123.7, 123.6, 115.2, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for C₁₈H₁₄N₆O₇: C: 50.71; H: 3.31; N: 26.27. Found: C: 50.73; H: 3.31; N: 26.28.

(*E*)-4-((4-((2-(4-*tert*-butyl)benzoyl)hydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-3-carbamoyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4m). Off-white solid; yield 89%; mp: 189–192°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.70 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.48 (s, 2H), 1.31 (s, 9H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.9, 159.0, 155.7, 155.1, 154.5, 147.1, 130.7, 128.7, 127.9, 127.4, 125.3, 115.2, 110.5, 61.2, 34.7, 30.9. Anal. Calcd (%) for C₂₂H₂₃N₅O₅: C: 60.40; H: 5.30; N: 18.29. Found: C: 60.40; H: 5.33; N: 18.31.

(*E*)-4-((4-((2-carbamoylhydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4n). Off-white solid; yield 96%; mp: 228–230°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.36 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 24.2 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.46 (s, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.9, 155.7, 155.1, 141.9, 131.8, 128.9, 127.8, 115.0, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for C₁₂H₁₂N₆O₅: C: 45.00; H: 3.78; N: 24.98. Found: C: 45.03; H: 3.80; N: 24.99.

(*E*)-4-((4-((2-carbamothioylhydrazono)methyl)phenoxy)methyl)-3-carbamoyl-1,2,5-oxadiazole 2-oxide (4o). Off-white solid; yield 90%; mp: 232–234°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.15 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 37.5 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.45 (s, 2H), 5.44 (s, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.2, 156.8, 155.7, 155.2, 138.8, 128.4, 128.0, 114.9, 110.5, 61.2. Anal. Calcd (%) for C₁₂H₁₂N₆O₄S: C: 42.85; H: 3.60; N: 19.03. Found: C: 42.86; H: 3.63; N: 19.04.

General procedures for the synthesis of compounds (14a–g). The compounds **14b** and **14e** were prepared according to the methodology previously described [21]. The compounds **14a**, **14c**, **14d**, **14f**, and **14g** were prepared according to the following general procedure: 1.61 mmol of 4-hydroxybenzaldehyde (**13**) was treated with previously selected hydrazides (**5a–e**; **6a–b**) (1.61 mmol) in 20 mL of ethanol, catalyzed by acetic acid (0.2 mL). The reactions were stirred at room temperature up to 24h and monitored by TLC until the reactive consumption. After, the solvent was partially removed under reduced pressure, followed by the addition of iced water (~ 15 mL) to precipitate the final *N*-acylhydrazones (**14a**, **14c**, **14d**, **14f**, and **14g**). The precipitate was collected by filtration and washed with cold water to provide the compounds with yields ranging from 34–81.4%. When necessary, further purification was performed using column chromatography (flash silica, eluent: 50% ethyl acetate; 50% hexane).

(*E*)-2-(4-hydroxybenzylidene)hydrazine-1-carboxamide (**14a**). Off-white solid; yield 34%; mp: 224–226°C. IR max (cm⁻¹; KBr pellets): 3474 (O-H), 3258 (N-H), 1697 (C = O amide), 1604 (NH₂), 1580 (C = N imine), 1508 and 1451 (C = C), 1255 (C-O), 1169 (C-N). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.02 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.37 (s, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 158.4, 156.9, 139.6, 128.1, 125.8, 115.4. Anal. Calcd (%) for C₈H₉N₃O₂: C: 53.63; H: 5.06; N: 23.45. Found: C: 53.65; H: 5.08; N: 23.45.

(*E*)-2-(4-hydroxybenzylidene)hydrazine-1-carbothioamide (**14b**). Off-white solid; yield 65%; mp: 227–229°C. IR max (cm⁻¹; KBr pellets): 3522 (O-H), 3198 (N-H), 1613 (C = O amide), 1587 (NH₂), 1549 (C = N imine), 1509 and 1451 (C = C), 1383 and 1281 (C = S), 1269 (C-O), 1165 (C-N). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.25 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.06–7.83 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆)

δ : 177.4, 159.2, 142.6, 129.0, 125.1, 115.5. Anal. Calcd (%) for $C_8H_9N_3OS$: C: 49.22; H: 4.65; N: 21.52. Found: C: 49.21; H: 4.65; N: 21.52.

(*E*)-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)benzohydrazide (**14c**). Off-white solid; yield 81%; mp: 244–245°C. IR max (cm^{-1} ; KBr pellets): 3194 (O-H), 3065 (N-H), 1608 (C = O amide), 1580 (C = N imine), 1564 and 1520 (C = C). 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.65 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.90 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.60–7.55 (m, 3H), 7.52 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 159.4, 148.1, 133.6, 131.5, 128.8, 128.4, 127.5, 125.3, 115.7. Anal. Calcd (%) for $C_{14}H_{12}N_2O_2$: C: 69.99; H: 5.03; N: 11.66. Found: C: 69.97; H: 5.02; N: 11.66.

(*E*)-4-hydroxy-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)benzohydrazide (**14d**). Off-white solid; yield 34%; mp: 224–226°C. IR max (cm^{-1} ; KBr pellets): 3522 (O-H), 3248 (N-H), 1632 (C = O amide), 1604 (C = N imine), 1508 and 1451 (C = C), 1290 (C-O). 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.44 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 5.1 Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.6, 160.6, 159.3, 147.2, 129.6, 128.8, 125.5, 124.1, 115.7, 115.0. Anal. Calcd (%) for $C_{14}H_{12}N_2O_3$: C: 65.62; H: 4.72; N: 10.93. Found: C: 65.62; H: 4.74; N: 10.94.

(*E*)-4-amino-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)benzohydrazide (**14e**). Off-yellow solid; yield 65%; mp: 275–276°C. IR max (cm^{-1} ; KBr pellets): 3522 (O-H), 3248 (N-H), 1632 (C = O amide), 1604 (C = N imine), 1508 and 1451 (C = C). 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.25 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 2.19 (s, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 159.0, 152.1, 146.3, 129.2, 128.5, 125.7, 119.7, 115.6, 112.5. Anal. Calcd (%) for $C_{14}H_{13}N_3O_2$: C: 65.87; H: 5.13; N: 16.46. Found: C: 65.87; H: 5.15; N: 16.46.

(*E*)-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)-4-nitrobenzohydrazide (**14f**). Off-yellow solid; yield 75%; mp: 266–268°C. IR max (cm^{-1} ; KBr pellets): 3331 (O-H), 3191 (N-H), 1665 (C = O amide), 1594 (C = N imine), 1549 and 1440 (C = C), 1514 and 1340 (NO $_2$) 1267 (C-O). 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.94 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.36 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.1, 159.7, 149.2, 149.1, 139.3, 129.1, 125.0, 123.6, 115.7. Anal. Calcd (%) for $C_{14}H_{11}N_3O_4$: C: 58.95; H: 3.89; N: 14.73. Found: C: 58.95; H: 3.89; N: 14.74.

(*E*)-4-(*tert*-butyl)-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)benzohydrazide (**14g**). Off-white solid; yield 34%; mp: 224–226°C. IR max (cm^{-1} ; KBr pellets): 3522 (O-H), 3248 (N-H), 2961 (C-H, sp 3), 1606 (C = O amide), 1577 (C = N imine), 1554 and 1511 (C = C), 1366 and 1305 (CH $_3$), 1278 (C-O), 1165 (C-N). 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.59 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 1.31 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 159.4, 154.5, 147.8, 130.9, 128.8, 127.4, 125.4, 125.2, 115.7, 34.7, 30.9. Anal. Calcd (%) for $C_{18}H_{20}N_2O_2$: C: 72.95; H: 6.80; N: 9.45. Found: C: 72.97; H: 6.83; N: 9.45.

Quantification of nitrite by the Griess reaction

The levels of nitrite resulting from the oxidation of NO in the aqueous medium were quantified through the Griess reaction after incubation with an excess of *L*-cysteine (1:50) according to previously published methods [23, 27, 28]. The experiments were performed in triplicate and repeated three times on different days. No production of nitrite was observed in the absence of *L*-cysteine. The results were expressed as a percentage of nitrite (% NO $_2^-$; mol/mol). Statistical analysis was carried out using ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test at a significance level of $p < 0.05$.

Cloning and expression of CPB in the yeast *Pichia pastoris*

Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen) was used as a host for gene cloning experiments, whilst the yeast *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen), for the expression of CPB2.8 (CPB). The ORF that codes for the *Leishmania mexicana* CPB, lacking the C terminal extension (CPB2.8ΔCTE) [29], was PCR amplified using the *Taq* polymerase HiFi (Cellco Biotecnologia, São Carlos, SP) and the pair of primers (5′-AAAGAAATTCGCCTGCGCACCTGCGCG-3′) forward and (5′-AAAGTCGACCCGCACATGCGCGGACACGG-3′) reverse, which contains the restriction sites *EcoRI* and *Sall*, respectively. The PCR product was purified from 1% agarose gel and cloned into pGEM-T easy vector (Promega), following the manufacturer's instructions and used to transform TOP10 *Escherichia coli* (Invitrogen). After identification and production of the recombinant plasmid, it was double digested with *EcoRI* and *Sall*, the band of ~1 kbp was isolated from 1% agarose gel and ligated to the *EcoRI/Sall* digested pPICZαA vector (Invitrogen) to produce a recombinant protein bearing a C-terminal histidine tag. The obtained recombinant vector was confirmed by sequencing using the primers forward α factor (TAC TATTGCCAGCATTTGCTGC) and reverse 3′AOX1 (GCAAATGGCATCTCGACATCC) and hereafter, linearized with *PmeI* for the transformation of *P. pastoris* X-33 (Invitrogen) by electroporation in a Gene-Pulser (Bio-Rad, US) at Gene Pulse X-Cell (Bio Rad), 1.5 KV, 25 μ F e 200 Ω , as described [30]. The cells were plated onto YPDS-agar medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 2% agar) containing 100, 250 and 500 μ g.mL⁻¹ of Zeocin™, and incubated at 30°C for 3–5 days for selection of zeocin resistant colonies, which were analyzed by PCR to confirm the presence of the *EcoRI/Sall* fragment into the yeast genomic DNA. Twenty-four transformants were screened for recombinant protease production after methanol induction in 24-well plates (Whatman) as previously described [31] with modifications in the cultivation and induction [30], and the protease production monitored in 15% (w/v) SDS-PAGE [32]. The clone that better produced rCPB2.8ΔCTE, observed by SDS-PAGE, was induced again in 100 mL of medium, for 96 h for purification. The recombinant enzyme was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using Ni-NTA agarose resin Superflow (Qiagen®) and eluted using a buffer containing different concentrations of imidazole (25 mM to 250 mM) 10 mM Tris, 50 mM Na₂HPO₄ monohydrate, and 100 mM CaCl₂. After elution, dialysis of the fractions containing the recombinant protein was carried out in SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO (Thermo Scientific) against 100 mM sodium acetate buffer pH 5.0 (2L), 2X, and the protein quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Enzymatic assays

The concentration of the active recombinant CPB expressed in *Pichia pastoris* supernatant was determined by active site titration with *N*-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide E-64 (CalBiochem) [33] that was found 1 μ M. The active enzyme represented about 80% of the total recombinant enzyme.

Compounds were dissolved in DMSO to a final concentration of 20 μ M. The assays were performed in dark 96 well-plates, containing 200 μ L of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 200 mM NaCl, 0.01% Triton-X100, 2 nM enzyme, various concentrations of inhibitor, and 5 μ M of the substrate Z-FR-AMC (Calbiochem). The final concentration of DMSO was 1% (v/v). The enzyme was pre-incubated at 30°C for 2 minutes before the inhibitor was added, waited 2 minutes and after this incubation, the reaction was started by the addition of the substrate, Z-FR-AMC. The fluorescence was monitored at 380 nm excitation and 460 nm emission filters for 2 minutes at 30°C in an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The residual activity was measured by the ratio between enzyme + substrate and enzyme

+ inhibitor + substrate. All compounds were evaluated at 20 μM , and the compounds able to inhibit the enzyme at 20 μM (inhibition $< 20 \mu\text{M}$) were selected and tested again at 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 1.25 μM , 0.62 μM , and 0.3 μM to determine IC_{50} values [16]. Results were expressed in mean $\pm$ standard deviation of two independent replicates using Bioestat Software.

Biological assays

Parasites and cells. Promastigotes of *L. infantum* strains MHOM/BR/1972/LD and MHOM/MA/67/ITMAP-263 were maintained at 27°C in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 100 mL of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), streptomycin, and penicillin (100 mg mL^{-1} ; 100 $\mu\text{M mL}^{-1}$) (LGC Biotecnologia) and 10% of sterile masculine human urine, in 25 cm^2 culture bottles (TPP). Peritoneal macrophages were obtained as previously described [34]. Briefly, cells were collected from the peritoneal cavity of six to eight weeks old male Swiss mice, previously stimulated with thioglycolate 3%. For this, PBS (pH 7.4) was injected into the peritoneal cavity, followed by a slight massage, and the content was collected using a syringe (5 mL). These cells were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and incubated at 37°C in a 5% CO_2 -air mixture in 96 well-plates or 24 well-plates.

Evaluation of cytotoxicity on peritoneal macrophages. In summary, cells (5×10^5 cells mL^{-1}) were incubated in RPMI 1640 medium, containing decreasing concentrations of compounds (500 to 7.8 μM), at a final volume of 100 μL per well, for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 -air. Their viability was measured by the MTT colorimetric assay according to Velasquez et al. (2016) [34] with some modifications. Briefly, after the incubation above described, the supernatant was removed and it was added 100 μL of ethanol and 100 μL of PBS: isopropanol (v/v). The absorbance was read on a spectrophotometer at 570 nm. The cytotoxic concentration of compounds that resulted in 50% of cell growth inhibition (CC_{50}) was determined using non-linear regression on Bioestat[®] software. The assays were performed in experimental triplicate and two independent replicates. Results expressed in mean $\pm$ standard deviation.

Anti-amastigote activity. The antileishmanial activity against *L. infantum* intracellular amastigotes, according to the following methodology [34]. Murine peritoneal macrophages in RPMI 1640 were seeded at a density of 5×10^5 cells mL^{-1} (500 μL final volume) containing coverslips of 13 mm diameter arranged in a 24-well plate. After 6 h of incubation at 37°C and 5% CO_2 -air mixture for macrophage adhesion, promastigote forms of *L. infantum* at the stationary growth phase (6–7 days) were added to the wells in a ratio of 10:1 (promastigotes: macrophages) and incubated for another 18 h to allow parasites internalization. After incubation, the medium was replaced, non-internalized parasites were removed by PBS washing and added a new medium containing 10 μM to 0.25 μM of compounds and plates were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 -air mixture. Were used infected macrophages as negative control and amphotericin B as the positive control.

After incubation, cells were fixed with methanol and Giemsa stained. The effective concentration to 50% amastigotes death (EC) was obtained by counting 100 macrophages in duplicate, in two independent experiments. The values were obtained by non-linear regression on Bioestat[®] software, and results were expressed in mean $\pm$ standard deviation. Additionally, was determined the Selective Index ($\text{SI} = \text{CC}_{50\text{macrophages}}/\text{EC}_{50\text{leishmania}}$) indicating how many times the sample is more selective to parasites.

In vivo analysis. To evaluate the *in vivo* antileishmanial efficacy of compound 4f, male BALB/c mice, 20 ± 4 g, 6 weeks-old (CEMIB-UNICAMP) were intraperitoneally inoculated with 100 μL (1×10^8 parasites) of infective promastigotes of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) at the stationary phase. After nine days post-infection, the animals were

treated by oral gavage (100 μ L per dose) twice daily for 5 days with a 12h interval between doses according to the dosages described below, and euthanized [35, 36]. The adopted doses, obtained through extrapolation based on EC_{50} and mice blood volume/ body weight [37]; supplementary material were: (0.28 mg/kg/day, 0.85 mg/kg/ day); 2.56 mg/kg/ day; 7.7 mg/Kg/ day, the same used for the reference drug, miltefosine (Cayman chemical) previously reported (7.7 mg/kg/day) [38]. Work solutions were daily prepared in PBS. Negative controls correspond to infected and non-treated mice. As a positive control, a group of mice received 7.7 mg/kg/day of miltefosine, and a group of uninfected and untreated mice (healthy animals) was used for the analysis. The compound and miltefosine were orally administered twice a day for five days. After treatment, the animals were euthanized and the treatment efficacy was assessed by measuring the parasite burden of the infected animals using the LDU index [38, 39].

LDU index. After the euthanasia, mice's liver and spleen were collected for parasite quantification. Tissues impression onto microscopy slides were made, followed by Giemsa-staining and examining under optical microscopy. The corresponding number of amastigotes per 1,000 nucleated cells/organ weight was expressed as LDU index according to Stauber (1958), Sousa-Batista (2018), and Kwofie (2019) [38–40].

Toxicity for mice assays. The blood was collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 700 $\times$ g for 10 min at 25°C to obtain plasma. Plasma levels of aspartate (AST), and alanine (ALT) transferases, alkaline phosphatase (ALP), creatinine, urea, and total bilirubin were determined at the end of treatment using commercial kits (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil). The assays were performed according to Velasquez et al. (2017) [37] and the data are expressed as average $\pm$ SEM. The statistical differences between groups were evaluated using a one-way analysis of variance, followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test using GraphPad Prism software. Differences were considered significant when P values were 0.05.

Ethics statement. All experiments involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (CEUA-FCF-UNESP), under the number (CEUA/FCF/CAR:17/2020), in agreement with the guidelines of the Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) and the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Euthanasia was performed using xylazine/ketamine anesthesia, followed by cervical dislocation. All necessary efforts were taken in order to minimize animals discomfort and pain.

Computational methods

***In silico* prediction of ADME properties.** Determination of the potential of oral absorption, drug-likeness, and water solubility of the furoxan derivatives was performed using the Swiss ADME software [41].

Molecular docking. All *in silico* studies were performed on the Maestro molecular modeling environment. The 3D structures were generated applying the *LigPrep* procedure. It was used *Epik* [42] to generate the protonation state in pH 5.5 $\pm$ 1.0 (the same used on CPB enzymatic assays) and OPLS03 as a field force. The coordinate for the target (PDB ID: 6P4E), resolution: 1.35 Å [43] was retrieved from Protein Data Bank. The *.pdb* structure was prepared using *ProteinPreparationWizard*. The hydrogens were removed and reincluded. The missing residues were corrected. All residues were optimized based on pH 5.5 $\pm$ 1.0. The minimization steps run until the converge threshold RMSD equals 0.15 Å. The grid generation was prepared with volume appropriated to cover all investigational sites. The catalytic amino acids CYS26 and HIS164 were considered as deprotonated and protonated, respectively. Before grid

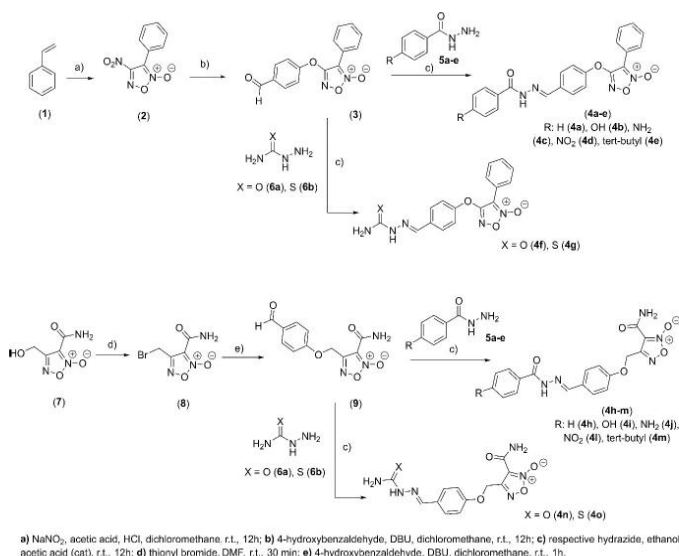
generation, it was performed as default Protein Preparation Wizard. It generated a grid box of 15 Å centered on catalytic cysteine. All docking calculations were performed using *Glide* on *Extra-precision* mode (XP) [44]. For all docking simulations were generated 20 poses and post-docking minimization. Other parameters were kept as default.

Results

Chemistry

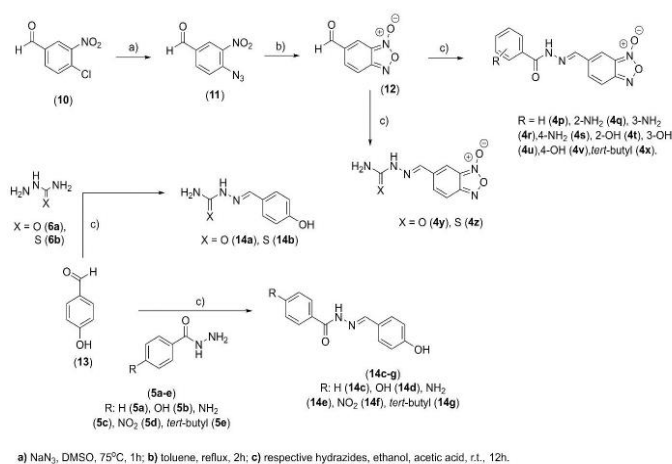
The phenyl-furoxan (**3**) was obtained in two steps, with an overall yield of 84% (Scheme 1). First, the styrene (**1**) was treated with sodium nitrite and acetic acid at room temperature in the medium containing dichloromethane as solvent to obtain the furoxan derivative (**2**) at 87%, as previously described [23]. Then, compound (**2**) was treated with 4-hydroxybenzaldehyde and 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU) in a dichloromethane medium to provide compound (**3**) at a yield of 90% [21]. The amide-furoxan derivative (**9**) and benzofuroxan derivative (**12**) were obtained according to the previously described procedures [24, 25]. Finally, the last step involved the coupling reaction of the aldehyde group in phenyl-furoxan (**2**), amide-furoxan (**9**), or benzofuroxan (**12**) within the appropriate hydrazides (**5a-e**; **6a-b**) in medium containing ethanol and acetic acid at yields ranging from 82 to 96%, providing the *N*-oxide compounds (**4a-x**) (Schemes 1 and 2).

In order to evaluate the contribution of *N*-oxide subunit, the *N*-acylhydrazone analogs (**14a-g**) were prepared through condensation reaction involving 4-hydroxybenzaldehyde and distinct hydrazides (**5a-e**; **6a-b**) in a medium containing ethanol and acetic acid with yields ranging from 82 to 96% (Scheme 2). The structure and the purity (>98.5%) of all final compounds were determined, as well as their ¹H NMR spectra (S1 Appendix), which revealed a single signal corresponding to ylidenic hydrogen of the *E*-diastereomers.



Scheme 1. Synthesis of the furoxan derivatives (4a-o).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g002>



Scheme 2. Synthesis of benzofuroxan (4p-x) and N-acyl-hydrazones (14a-g) derivatives.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g003>

Nitrite measurement

The ability of all synthesized compounds (**4a-x**) and (**14a-g**) to release NO was evaluated by indirect determination of NO_2^- production. The compounds at 10^{-4} M were incubated for 1 h at 37°C in the presence of L-cysteine (1:50) and the produced NO_2^- was determined through Griess reaction (Table 1) [23].

The furoxan derivative (**Lapdesf14e**), which contains a phenylsulfonyl moiety attached to C-3 was more prone to release NO (26%) [21], whilst those containing phenyl (**4a-g**) (9%), or amide (**4h-o**) (12%) groups at the same position exhibited a similar pattern of nitrite formation when compared to DNS, used as reference NO donor (10.5%). On the other hand, both benzofuroxan (**4p-x**) and N-acylhydrazones (**14a-g**) were not able to release NO.

Recombinant expression of CPB

The recombinant cysteine protease CPB was, for the first time, successfully expressed in *P. pastoris*, circumventing the problem of solubility and yield when expressed in *Escherichia coli* [29]. The CPB coding sequence was PCR amplified from *Leishmania mexicana* genomic DNA, excluding the C-terminal extension region, which is not necessary for its activity against Trypanosomatids, as previously described [45, 46] and later confirmed by Sanderson and colleagues [29]. After sequence confirmation (S1 Fig), the plasmid containing the CPB coding region, named pPIC-CPB2.8 Δ CTE, was used to transform the *P. pastoris* X-33 strain. Among the positive clones, the pPIC-CPB2.8#25 was selected for production of CPB in medium containing methanol. The culture supernatants from 0h to 144 h were collected and visualized in 15% SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to verify the expression levels (Fig 2A).

Protein production started at 24 h and increased until 144 h after methanol induction. At 24 h and 48 h, it is observed bands above 30 kDa that disappear after 72 hours, probably due to medium acidification, leading to the loss of the pro-peptide and conversion of the enzyme to its active form around 26 kDa [29]. Therefore, this clone was chosen for scaling-up production (100 mL) at 96 h, followed by protein purification.

Table 1. NO-released data for compounds (4a-x) and (14a-e).

Compounds (10 ⁻⁴ M)	% NO ₂ ⁻ (mol/mol)
	5 mM of L-Cys
DNS	10.5 ± 0.9 ^a
Lapdesf14e	26.0 ± 1.6 [†]
4a	9.0 ± 0.7 ^a
4b	8.8 ± 0.6 ^a
4c	9.3 ± 0.8 ^a
4d	8.6 ± 0.8 ^a
4e	8.8 ± 0.7 ^a
4f	9.1 ± 0.7 ^a
4g	9.0 ± 0.6 ^a
4h	12.1 ± 1.2 [*]
4i	12.3 ± 0.9 ^a
4j	12.7 ± 0.8 ^a
4l	11.8 ± 1.1 [*]
4m	12.5 ± 1.3 [*]
4n	12.0 ± 1.4 [*]
4o	11.8 ± 1.2 [*]
4p-4x	0
14a-14g	0
AmpB	0

^aDNS: isosorbide dinitrate (DNS possesses two ONO₂ groups that may release NO). The data are expressed as the means ± standard errors of the means. Significant differences between the experimental and control groups were evaluated by analysis of variance followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

^{*} $p < 0.05$ vs. ampB.

[†] $p < 0.05$ vs. DNS.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.t001>

The clone pPICZαA#25 was cultivated for 96 h, and the purification of CPB was performed according to the EasySelect *Pichia* Expression kit (Invitrogen) and further analyzed by 15% SDS-PAGE. The protein was eluted at imidazole 75 mM, presenting a major band around 26 kDa, although low levels of protein were also detected in all concentrations of imidazole (Fig 2B). After quantification, a total of 40 mg L⁻¹ of protein was obtained.

The expected size for the fully active form of the protein, approximately 26 kDa (without the pro-peptide) was observed after dialysis. The additional bands might be the result of auto-proteolysis leading to the auto-cleavage of the N-terminus, i.e., the proteolysis products that are fused to the His-tag were purified in the column. Thus, to circumvent the auto-proteolysis process and to determine the percentage of active enzyme present in the purified sample, an active site titration was performed using the cysteine protease inhibitor, E-64 (Fig 2C), according to Barrett et al. (1981) [33], showing that the percentage of the active enzyme was 80%, corresponding to 32 mg L⁻¹ of purified recombinant and active enzyme.

Antileishmanial activity and inhibition of CPB by N-oxide derivatives

Furoxan (4a-4o) and benzofuroxan (4p-4x) antileishmanial activities against *L. infantum* intracellular amastigotes as well as their inhibitory effect against CPB were investigated.

The furoxan derivatives (4a-4h, 4l and 4m) and the benzofuroxan (4r), exhibited anti-amastigote potency (EC₅₀) lower than < 10 μM. These molecules were also able to target the CPB at different levels ranging from 0.8 to 8.8 μM (Table 2). Moreover, except for 4c and 4r,

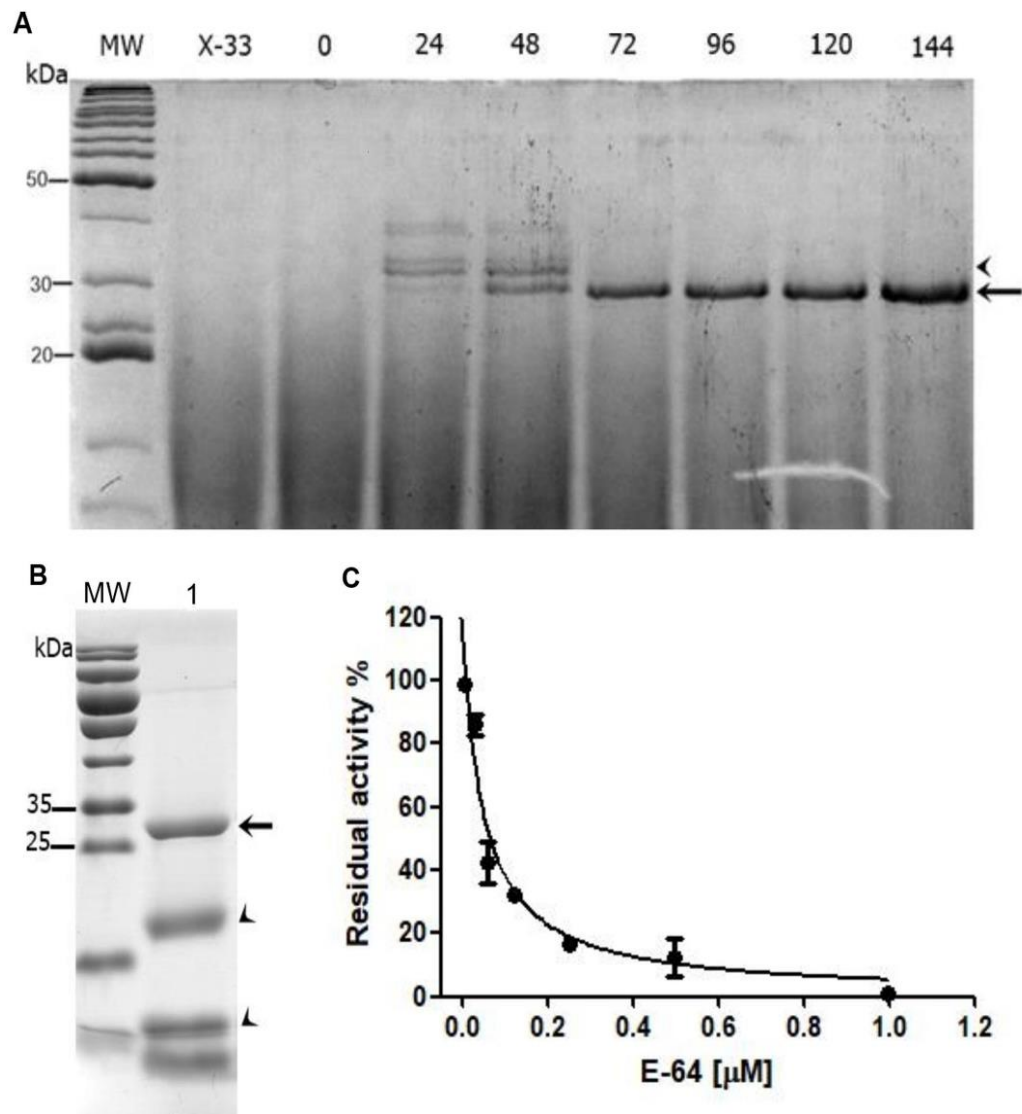


Fig 2. Analysis of CPB expression in *P. pastoris*. (A) SDS-PAGE showing the supernatants of non-transformed *Pichia pastoris* X-33, and aliquots from 0 to 144 hours of the transformed clone pPIC-CPB2.8#25 induced with methanol. The arrow indicates the expected size for active (processed) CPB. The arrowhead indicates the unprocessed protein after 24 and 48 h induction. MW: molecular weight Bench Mark (Invitrogen). (B) Analysis of *L. mexicana* CPB after purification and dialysis. Coomassie-stained SDS-PAGE 15% showing in MW: molecular weight Page Ruler (Thermo Scientific); 1, the purified and dialyzed recombinant CPB. The arrow indicates the recombinant protein (about 26 kDa) and the arrowheads, the products of proteolysis. (C) Active site titration of the recombinant CPB using the irreversible protease inhibitor E-64. Residual activity % (Relative Fluorescence Units) was measured by the ratio between the enzyme activity in absence or presence of increasing concentrations of E-64.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g004>

the cytotoxicity of the aforementioned compounds was at least 50 times more selective to the parasite rather than to the macrophages, considering the SI values (Table 2). Interestingly, although the furoxan (4j–4n) and benzofuroxan (4q, 4u, 4t) inhibited the recombinant enzyme, they did not affect the parasite viability.

To provide comprehensive proof of concept regarding the effect of the *N*-acylhydrazone on CPB, a series of hydrazone derivatives (14a–14e) was also evaluated. Although none of them exhibited antileishmanial activity ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$), they were able to inhibit CPB at different IC_{50} levels, ranging from 1.2 to 11.7 μM .

Molecular docking analyses

Molecular docking was carried out to comprehend the pose of synthesized furoxan (4a–o), benzofuroxan (4p–x) and hydrazone derivatives (14a–g) into the CPB active site. The docking results of the *N*-acylhydrazones series (14a–g) suggested an interaction between the N-H of the compounds and the CYS26 residue of the catalytic site (Fig 3A). Except for hydrazone 14e, which contains a bulky group, similar poses were observed for all other *N*-acylhydrazones. The contribution of the *N*-oxide group of the furoxans and benzofuroxans (4a–x) was orientated on the S1' pocket, performing an interaction between a cation- π and the TRP186 residue (Fig 3B and 3C). Additionally, the imine carbon ($C=N$) of the *N*-acylhydrazone moiety (4a–x) has been positioned near the CYS26 at an average distance of 3.56 Å and the N-H of their scaffolds interacts with ASN163 residue through an H-bond (Fig 3B and 3C).

Superposition of 14a, 4a, and 4e revealed an occupancy of the S2 pocket by the phenyl ring of the phenylfuroxan derivatives (4a–g) (Fig 3). Besides, a hydrophobic interaction between the furoxan 4e and the S2 pocket, not observed for the hydrazone 14a, might explain the two-fold higher inhibitory enzyme activity exhibited by the furoxan. The improvement on the occupancy by phenylfuroxan derivatives (4a–g) in the CPB can also explain the better inhibitory effect of this series compared with its respective hydrazones (14a–g) (Fig 3).

In silico ADME studies

In an attempt to select the best hit among the most potent and selective compounds (4a–h, l, and m), we performed *in silico* analyses using the SwissADME tool [41] to investigate physico-chemical properties, pharmacokinetic parameters, and drug-likeness (S1 Table). Amide compounds exhibiting moderate to high solubility, 4a–c and 4f displayed better drug likeness by complying with Lipinski rule of five and the filters Ghose, Veber, Egan, and Muegge in contrast to 4d, 4e, 4g, 4h, 4l, and 4m, which violates some of the properties/descriptors. The analysis of potential binding to main cytochrome CYP450, a superfamily of liver isoenzymes responsible for the metabolism of xenobiotics, suggests a non-promiscuous behavior of compounds 4f, 4h, and 4l since they show potential to inhibit only one isoenzyme (CYP1A2 or CYP2C19).

Hence, considering that 4f combines both relevant bioactivity properties and the most favorable ADME parameters, highlighting its potential gastrointestinal absorption potential, this compound was selected for further *in vivo* studies to evaluate its potential efficacy and toxicity in *L. infantum* infected mice after oral delivery.

In vivo studies

Parasite load. The compound 4f was investigated concerning its capacity to reduce parasite load in both liver and spleen of *L. infantum*-infected Balb/C mice. Therefore, nine days post-infection, 4f at four different doses (0.28, 0.85, 2.56, and 7.7 mg/kg/day) or the reference drug miltefosine (7.7 mg/kg/day) were orally administered twice a day for five days. Parasite

Table 2. Inhibition of CPB, biological activities, and safety by furoxan and benzofuroxan derivatives (μM).

	Compound	IC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	SI
Furoxan	Lapdesf14e	3.1 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.1	208.3 $\pm$ 0.2	66.4
	4a	1.5 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	> 500	357
	4b	3.2 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.2	166.0 $\pm$ 0.5	54
	4c	2.0 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.2	122.0 $\pm$ 20.0	17
	4d	1.8 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.4	> 500	128
	4e	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	> 500	833
	4f	4.5 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1	> 500	139
	4g	6.5 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 0.3	> 500	227
	4h	8.8 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	> 500	161
	4i	5.7 $\pm$ 0.4	> 10	> 500	-
	4j	11.1 $\pm$ 0.1	> 10	> 500	-
	4l	10.8 $\pm$ 2.3	7.7 $\pm$ 2.1	> 500	65
	4m	6.0 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 1.1	> 500	78
	4n	13.7 $\pm$ 1.8	> 10	> 500	-
	4o	> 20	> 10	> 500	-
Benzofuroxan	8a*	> 80	18.2 $\pm$ 0.1	63.2	3.5
	4p	> 20	> 10	> 500	-
	4q	14.0 $\pm$ 2.0	> 10	> 500	-
	4r	3.4 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.6	103.2 $\pm$ 2.7	11
	4s	> 20	> 10	152.0 $\pm$ 18.0	-
	4t	4.2 $\pm$ 0.2	> 10	17.2 $\pm$ 0.7	-
	4u	11.7 $\pm$ 0.5	> 10	265.0 $\pm$ 5.0	-
	4v	> 20	> 10	> 500	-
	4x	> 20	> 10	246.2 $\pm$ 0.2	-
N-acylhydrazone	14a	2.0 $\pm$ 0.1	> 10	> 500	-
	14b	11.7 $\pm$ 1.0	> 10	> 500	-
	14c	2.0 $\pm$ 0.3	> 10	> 500	-
	14d	2.0 $\pm$ 0.1	> 10	> 500	-
	14e	1.2 $\pm$ 0.1	> 10	> 500	-
	14f	4.0 $\pm$ 0.1	> 10	> 500	-
Control	Amphotericin B	-	1.0 $\pm$ 0.1	12.1 $\pm$ 1.8	12

IC₅₀—Inhibition of CPB. EC₅₀—Effective Concentration that kills 50% of *L. infantum* amastigote forms. CC₅₀—Cytotoxic Concentration to kill 50% of murine peritoneal macrophages, all compounds were evaluated from 7.5 to 500 μM . SI—Selective Index (CC₅₀/EC₅₀) [20, 21].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.t002>

load evaluation showed that **4f** (0.28 mg/kg/day) was able to reduce the number of amastigotes in both organs by 67–68% (Fig 4A and 4B), whilst the highest **4f** dose (7.7 mg/kg/day) induced a reduction similar to that obtained for the reference drug, i.e., ~90% in both spleen and liver.

In vivo quantification of biomarkers. The plasma levels of AST, ALP, ALT, total bilirubin, and creatinine were monitored to investigate liver and renal functions in healthy and *L. infantum*-infected mice treated (different doses of **4f** or miltefosine) and control. Total bilirubin levels in *L. infantum*-infected mice increased in contrast to the healthy ones (S2 Fig), whereas no significant alterations were observed for both **4f** and miltefosine treatment in comparison to the infected animals. Besides, no alterations were observed for any group to creatinine (S2 Fig). The levels of AST, ALP, ALT, and creatinine were similar in both treated and healthy groups (S2 Fig).

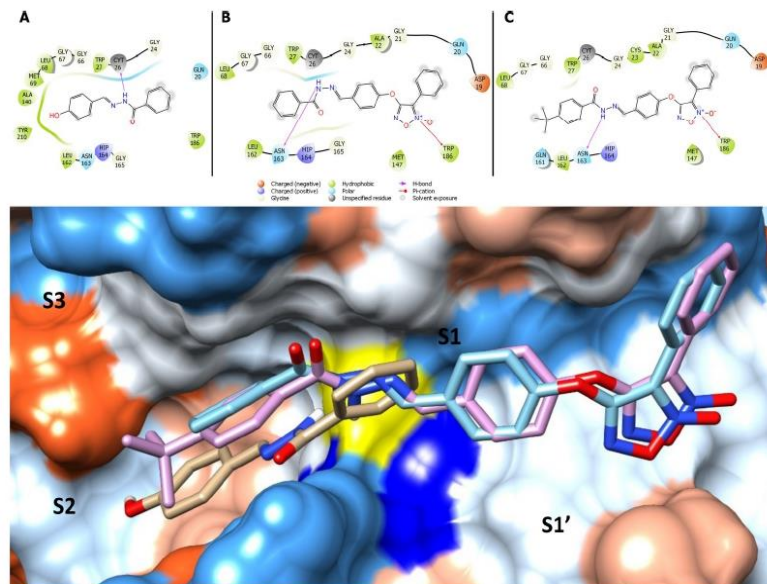


Fig 3. Ligand-CPB complex predicted by molecular docking. Possible poses and interactions performed by compounds **14a** (A), **4a** (B) and **4e** (C) against CPB. Superposition of **4a** (beige), **14a** (cyan) and **14e** (pink). The yellow surface represents CYS26 and dark blue is HIS164.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g005>

Discussion

The current antileishmanial therapy exhibits several drawbacks, including long-term treatment, adverse side effects, low efficacy, and difficult route of administration, making urgent the need for more effective and safer treatments. Herein, we described the synthesis and antileishmanial properties of new *N*-oxide derivatives, developed based on the prototype **Lap-desf14e** focusing on a dual effect: CPB inhibition and NO-release [20, 47]. The herein explored CPB is mainly expressed in amastigotes and has been assigned as a validated target for *Leishmania* drug discovery due to its important role in parasite escape from the host immune system, thus favoring parasite establishment and proliferation [8, 48, 49].

The CPB consists of active sites comprising pockets or subsites known as S1, S2, S3 (along with the catalytic cysteine to the C-terminal region), and S1' (along with the catalytic cysteine to the N-terminal region), interacting with the substrates P1, P2, P3 and P1' [50, 51]. Indeed, several CPB inhibitors have been described, including both natural products [52–55] and synthetic compounds [12, 16, 56, 57]; however, none of them are *N*-oxide derivatives. The performed molecular docking analyses suggested that the furoxan *N*-oxide subunit interacts with the S1' pocket through a cation- π interaction with the TRP186 residue. Noteworthy, for the phenyl furoxan derivatives (**4a-g**), the S2 pocket is occupied by a phenyl ring attached to C-3, which in association to the hydrophobic nature, might be positively contributing to the observed levels of enzyme inhibition ranging from 0.8 to 6.5 μ M in contrast to the lower inhibition activity (6 to >20 μ M) related to the amide furoxans (**4h-o**). Indeed, Fey et al. (2018) also reported the binding nature of the aziridine-containing phenylpropyl ester groups to the S2 pocket in association with studies of mechanisms of enzyme inhibition [13]. Furthermore,

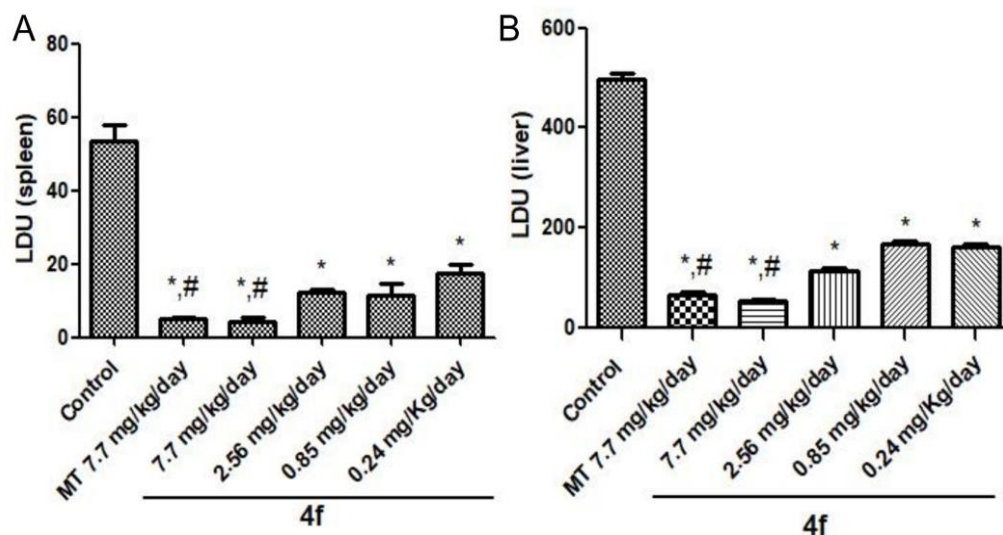


Fig 4. Parasite load evaluation. The LDU index (number of *Leishmania* amastigotes in 1,000 nucleated cells per organ weight) was determined in the spleen (A) and liver (B) of *L. infantum* infected BALB/c mice using. The data are expressed as average $\pm$ SD. Control: Infected and non-treated animals. MT: miltefosine. *: Statistically significant difference in all groups compared to the Infected and non-treated animals ($p < 0.0001$). #: Not statistically significant ($p > 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259008.g006>

the benzofuroxans (**4q**, **4r**, **4t**, **4u**) also interact with the S1 and S1' pocket, contributing to the enzyme inhibition at different levels (3.4 to 14 μ M).

Hereafter, the enzymatic inhibitory properties of the N-oxide derivatives were assessed using the recombinant enzyme CPB, which was alternatively expressed in *P. pastoris*, overcoming solubility issues commonly associated with the purified enzyme obtained in bacteria [29].

Although other studies suggested that protease inhibition might be caused by nitrosylation of cysteine residues of CPB [58–60], the NO-releasers phenyl and amide furoxans (**4a–o**) derivatives herein evaluated displayed corresponding levels of CPB inhibition (IC_{50} ranging from 0.8–13 μ M) to those N-acylhydrazones derivatives (**14b–g**) that do not present NO-release capacity (IC_{50} ranging from 1.2 μ M–7.6 μ M). Thus, besides the pharmacodynamics improvements based on **Lapdesf14e** allied to the inhibition of the targeted protease, we cannot exclude a contribution of the NO to the antileishmanial activity due to a pleiotropic effect caused by nitrosylation of other parasite proteins/enzymes rather than the cysteine CPB, which might be inducing metabolic/ signaling pathway disruption, ultimately contributing to parasite death [21, 47, 61]. Indeed, all the furoxans derivatives, except **4i**, **4j**, and **4n**, presented anti-*L. infantum* amastigote activity lower than 10 μ M.

Although there are several natural and synthetic CPB inhibitors reported [12, 16, 43–48], none of them have been further preclinical evaluated in visceral leishmaniasis models, except for compound K11777, which entered the clinical trials for Chagas disease and was later abandoned due to safety issues [11]. On the other hand, there are few oral antileishmanial compounds active against visceral leishmaniasis at phase I of clinical studies, and at this moment, none of them have their mechanisms of action described [62], which turns difficult further improvements based on medicinal chemical approaches.

Thus far, infected mice treated with **4f** at 7.7mg/kg/day was able to decrease the parasite load by 90%, consistent with miltefosine in the experimental conditions of this work and accordance with the hit-to-lead criteria established to the drug discovery field of neglected diseases [63]. Furthermore, even at a dose three times lower (2.56 mg/kg/day), the parasite reduction was 77% (0.28 mg/kg/day), successfully indicating a robust reduction of the parasite burden at the target organs in mice, without causing any evident side effect, even at the highest dose, following the biochemical markers evaluated in this study. Noteworthy such significant parasite load reduction was achieved in a short-term treatment (five days).

Altogether, these data, in contrast to the long-term (15 days) intraperitoneal administered **Lapdesf14e**, which decreased by 50% the parasite load in *L. infantum*-infected hamsters [14], revealed the success of the adopted strategy of hit optimization herein adopted and pinpoints **4f** as a new oral antileishmanial compound ready to further advance to the next steps towards the clinical phase of evaluation.

Supporting information

S1 Appendix. Additional ¹H and ¹³C NMR information.
(DOCX)

S1 Table. Theoretical ADME properties of furoxan and benzofuroxan derivatives.
(DOCX)

S1 Fig. Clone pPICZαA-CPB2.8 #2 sequence. The clone was sequenced using α factor (TAC-TATTGCCAGCATTGCTGC) and reverse 3'AOX1(GCAAATGGCATTCTGACATCC), and the elements inserted on plasmid (EcoRI—blue and Sal I—grey, sites) were identified upstream and downstream of CPB2.8 gene, respectively.
(TIF)

S2 Fig. Evaluation of biochemical toxicity markers for healthy mice, infected and untreated with *L. infantum* and treated with **4f or miltefosine.** Levels of (A) AST—aspartate aminotransferase; (B) ALP—alkaline phosphatase levels; (C) ALT—alanine aminotransferase; (D) Urea; (E) Total bilirubin levels and (F) Creatinine. The data are expressed as average $\pm$ SEM. #: Statistically significant compared to the Infected and Untreated animals ($p < 0.05$). *: Statistically significant compared to the healthy animals ($p < 0.05$). †: Statistically significant compared to the animals treated with the reference drug miltefosine ($p < 0.05$). No statistical significance was observed for creatinine compared to healthy and Untreated animals.
(TIF)

S1 Raw images.
(PDF)

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr° André Tempone and Dr° Felipe Torres for *Leishmania infantum* (MHOM/MA67IMA263) donation.

Author Contributions

Conceptualization: Flávio Henrique-Silva, Jean Leandro dos Santos, Marcia A. S. Graminha.

Data curation: Leandro da Costa Clementino, Guilherme Felipe Santos Fernandes, Igor Mucilo Prokopczyk, Wilquer Castro Laurindo, Danyelle Toyama, Bruno Pereira Motta, Amanda Martins Baviera.

Formal analysis: Leandro da Costa Clementino, Guilherme Felipe Santos Fernandes, Igor Mucilo Prokopczyk, Danyelle Toyama, Bruno Pereira Motta, Amanda Martins Baviera, Flávio Henrique-Silva, Jean Leandro dos Santos, Marcia A. S. Graminha.

Funding acquisition: Marcia A. S. Graminha.

Investigation: Wilquer Castro Laurindo.

Project administration: Marcia A. S. Graminha.

Supervision: Marcia A. S. Graminha.

Writing – original draft: Leandro da Costa Clementino, Guilherme Felipe Santos Fernandes, Igor Mucilo Prokopczyk, Flávio Henrique-Silva, Jean Leandro dos Santos, Marcia A. S. Graminha.

Writing – review & editing: Leandro da Costa Clementino, Guilherme Felipe Santos Fernandes, Amanda Martins Baviera, Flávio Henrique-Silva, Jean Leandro dos Santos, Marcia A. S. Graminha.

References

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548
2. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018; 392: 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2) PMID: 30126638
3. Sundar S, Chakravarty J. An update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2015; 16: 237–252. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.973850> PMID: 25346016
4. Altamura F, Rajesh R, Catta-Preta CMC, Moretti NS, Cestari I. The current drug discovery landscape for trypanosomiasis and leishmaniasis: Challenges and strategies to identify drug targets. *Drug Dev Res*. 2020. <https://doi.org/10.1002/ddr.21664> PMID: 32249457
5. Batista MF, Nájera CA, Meneghelli I, Bahia D. The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 396. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00396> PMID: 32587854
6. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012; 14: 1377–1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014> PMID: 22683718
7. McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem*. 1999; 7: 639–644. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00008-5) PMID: 10353643
8. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, 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. *J Immunol*. 2004; 173: 3297–3304. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3297> PMID: 15322192
9. Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*. 1992; 6: 1925–1932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01365.x> PMID: 1508041
10. Leao SDS, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci*. 1995; 108: 3219–3231. PMID: 7593283
11. McKerrow JH. Update on drug development targeting parasite cysteine proteases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12: e0005850. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005850> PMID: 30138309
12. Schröder J, Noack S, Marhöfer RJ, Mottram JC, Coombs GH, Selzer PM. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. *PLoS One*. 2013; 8: e77460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077460> PMID: 24146999

13. Fey P, Chartomatsidou R, Kiefer W, Mottram JC, Kersten C, Schirmeiste T. New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the *Leishmania* cysteine protease LmCPB2.8. *Eur J Med Chem*. 2018; 156: 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.012> PMID: 30029081
14. de Almeida L, Passalacqua TG, Dutra LA, Fonseca JNV da, Nascimento RFQ, Imamura KB, et al. In vivo antileishmanial activity and histopathological evaluation in *Leishmania infantum* infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. *Biomed Pharmacother*. 2017; 95: 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.096> PMID: 28866421
15. Luca L De, Ferro S, Buemi MR, Monforte A-M, Gitto R, Schirmeister T, et al. Discovery of benzimidazole-based *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB2.8ΔCTE inhibitors as potential therapeutics for leishmaniasis. *Chem Biol Drug Des*. 2018; 92: 1585–1596. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13326> PMID: 29729080
16. Steert K, Berg M, Mottram JC, Westrop GD, Coombs GH, Cos P, et al. α -ketoheterocycles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *ChemMedChem*. 2010. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000265> PMID: 20799311
17. Romeiro NC, Aguirre G, Hernández P, González M, Cerecetto H, Aldana I, et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17: 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.11.065> PMID: 19110434
18. Hernández P, Rojas R, Gilman RH, Sauvain M, Lima LM, Barreiro EJ, et al. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazones derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *Eur J Med Chem*. 2013; 59: 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.047> PMID: 23202852
19. Almeida L de, Alves KF, Maciel-Rezende CM, Jesus L de OP, Pires FR, Junior CV, et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania* (L.) amazonensis amastigotes. *Biomed Pharmacother*. 2015; 75: 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.030> PMID: 26463637
20. de Almeida L. Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano: atividade biológica in vitro e in vivo e potenciais mecanismos de ação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” [Doctoral Thesis]. Araraquara; 2017.
21. Dutra LA, De Almeida L, Passalacqua TG, Reis JS, Torres FAE, Martinez I, et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 4837–4847. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-14> PMID: 24913171
22. Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011. pp. 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011> PMID: 21620959
23. Bosquesi PL, Melchiora ACB, Pavana AR, Lanaro C, Souza CM de, Rusinova R, et al. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. *Bioorg Chem*. 2020; 100: 103948. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103948> PMID: 32450391
24. Fernandes GFS, Souza PC, Moreno-Viguri E, Santivañez-Veliz M, Paucar R, Pérez-Silanes S, et al. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. *J Med Chem*. 2017; 60: 8647–8660. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01332> PMID: 28968083
25. Melo TRF de, Kumkhaek C, Fernandes GFDS, Pires MEL, Chelucci RC, Barbieri KP, et al. Discovery of phenylsulfonylfuroxan derivatives as gamma globin inducers by histone acetylation. *Eur J Med Chem*. 2018; 154: 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.008> PMID: 29852459
26. Fernandes GF, Souza PC, Marino LB, Chegaev K, Gugliemo S, Lazzarato, et al. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem*. 2016; 123: 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.039> PMID: 27508879
27. Santos JL Dos, Lanaro C, Chelucci RC, Gambero S, Bosquesi PL, Reis JS, et al. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds to Treat Sickle Cell Disease Symptoms. Part II: Furoxan Derivatives. *J Med Chem*. 2012; 55: 7583–7592. <https://doi.org/10.1021/jm300602n> PMID: 22889416
28. Santos JL, Lanaro C, Lima LM, Gambero S, Franco-Penteado CF, Alexandre-Moreira MS, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. *J Med Chem*. 2011; 54: 5811–5819. <https://doi.org/10.1021/jm200531f> PMID: 21766854
29. Sanderson SJ, Pollock KG, Hilley JD, Meldal M, Hilaire PS, Juliano MA, et al. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *Biochem J*. 2000; 347: 383–388. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470383> PMID: 10749667
30. Isabel TF, Costa GNM, Pacheco IB, Barbosa LG, Santos-Junior CD, Fonseca FPP, et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.002> PMID: 26965926

31. Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. J Biotechnol. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00157-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00157-8) PMID: 12204557
32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0> PMID: 5432063
33. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzym. 1981; 80: 535–561.
34. Velásquez AMA, De Souza RA, Passalacqua TG, Ribeiro AR, Scontri M, Chin CM, et al. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. J Braz Chem Soc. 2016. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150360>
35. Romanelli MM, Costa-Silva TA da, Cunha-Junior E, Ferreira DD, Guerra JM, Jr AJG, et al. Sertraline Delivered in Phosphatidylserine Liposomes Is Effective in an Experimental Model of Visceral Leishmaniasis. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9: 353. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00353> PMID: 31373574
36. Rebello KM, Andrade-Neto V V, Gomes CRB, Souza MVN de, Branquinha MH, Santos ALS, et al. Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy Against *Leishmania infantum* Infection: In vitro and in vivo Approaches. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9: 229. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00229> PMID: 31316919
37. Velásquez AMA. Do screening ao mecanismo de ação, uma contribuição para a descoberta de ciclopalladados bioativos: a atividade leishmanicida de CP2 e seu efeito inibitório frente à DNA topoisomerase 1B de *Leishmania*. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” [Doctoral Thesis]. Araraquara; 2017.
38. Stauber LA. Host Resistance to the Khartoum Strain of *Leishmania donovani*. Rice Inst Pam—Rice Univ Stud. 1958; 45: 80–96. <https://hdl.handle.net/1911/62792>.
39. Sousa-Batista AJ, Escrivani-Oliveira D, Falcão CAB, Philippon CIM da S, Rossi-Bergmann B. Broad Spectrum and Safety of Oral Treatment with a Promising Nitrosylated Chalcone in Murine Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 62: e00792–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00792-18> PMID: 30012761
40. Kwofie KD, Sato K, Sanjoba C, Hino A, Shimogawara R, Amoa-Bosompem M, et al. Oral activity of the antimalarial endoperoxide 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol (N-251) against *Leishmania donovani* complex. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13: e0007235. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007235> PMID: 30908481
41. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017; 7: 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717> PMID: 28256516
42. Greenwood JR, Calkins D, Sullivan AP, Shelley JC. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. J Comput Aided Mol Des. 2010; 4: 591–604.
43. Ribeiro JFR, Cianni L, Li C, Warwick TG, Vita D de, Rosini F, et al. Crystal structure of *Leishmania mexicana* cysteine protease B in complex with a high-affinity azadipeptide nitrile inhibitor. Bioorg Med Chem. 2020; 28: 115743. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115743> PMID: 33038787
44. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. J Med Chem. 2004; 47: 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s> PMID: 15027866
45. Eakin AE, McGrath ME, McKerrow JH, Fletterick RJ, Craik CS. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1993. PMID: 8454586
46. Pamer EG, Davis CE, So M. Expression and deletion analysis of the *Trypanosoma brucei* rhodesiense cysteine protease in *Escherichia coli*. Infect Immun. 1991. <https://doi.org/10.1128/iai.59.3.1074-1078.1991> PMID: 1997411
47. Boiani L, Aguirre G, González M, Cerecetto H, Chidichimo A, Cazzulo JJ, et al. Furoxan-, alkyl nitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: mechanism of action studies. Bioorg Med Chem. 2008; 16: 7900–7907. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.077> PMID: 18706821
48. Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93: 6008–6013. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6008> PMID: 8650210
49. Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. J Parasit Dis. 2010; 34: 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12639-010-0006-3> PMID: 21526026
50. Durrant JD, Keränen H, Wilson BA, McCammon JA. Computational Identification of Uncharacterized Cruzain Binding Sites. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4: e676. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000676> PMID: 20485483

51. Lalmanach G, Lecaille F, Chagas JR, Authié E, Scharfstein J, Juliano MA, et al. Inhibition of Trypanosomal Cysteine Proteinases by Their Propeptides. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25112–25116. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25112> PMID: 9737969
52. Mukherjee S, Ukil A, Das PK. Immunomodulatory peptide from cystatin, a natural cysteine protease inhibitor, against leishmaniasis as a model macrophage disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 1700–1707. <https://doi.org/10.1128/AAC.01555-06> PMID: 17339373
53. Assis DM, Gontijo VS, Pereira I de O, Santos JAN, Camps I, Nagem TJ, et al. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. *J Enzym Inhib Med Chem*. 2013; 8: 661–670. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.668539> PMID: 22468751
54. Pereira BAS, Souza-Silva F, Silva-Almeida M, Santos-de-Souza R, Oliveira LFG de, Ribeiro-Gui-marães ML, et al. Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis. *Curr Drug Targets*. 2014; 15: 1121–1131. <https://doi.org/10.2174/1389450115666141016150007> PMID: 25323706
55. Sousa LRF de, Wu H, Nebo L, Fernandes JB, Silva MF das GF Da, Kiefer W, et al. Natural products as inhibitors of recombinant cathepsin L of *Leishmania mexicana*. *Exp Parasitol*. 2015; 156: 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.016> PMID: 26044356
56. Gontijo VS, Judice WAS, Codonho B, Pereira IO, Assis DM, Januário JP, et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. *Eur J Med Chem*. 2012; 58: 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.021> PMID: 23178961
57. Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall L-I, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12: e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512> PMID: 30138453
58. Salvati L, Mattu M, Colasanti M, Scalone A, Venturini G, Gradoni L, et al. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim Biophys Acta—Protein Struct Mol Enzymol*. 2001; 1545: 357–366. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00297-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00297-1) PMID: 11342060
59. Ascenzi P, Bocedi A, Gentile M, Visca P, Gradoni L. Inactivation of parasite cysteine proteinases by the NO-donor 4-(phenylsulfonyl)-3-((2-(dimethylamino)ethyl)thio)-furoxan oxalate. *Biochim Biophys Acta—Proteins Proteomics*. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.027> PMID: 15588704
60. Ascenzi P, Salvati L, Bolognesi M, Colasanti M, Polticelli F, Venturini G. Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr Protein Pept Sci*. 2001; 2: 137–153. <https://doi.org/10.2174/1389203013381170> PMID: 12370021
61. Castro D, Bolani L, Benítez D, Hernández P, Merlino A, Gil C, et al. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *Eur J Med Chem*. 2009; 44: 5055–5065. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.009> PMID: 19837489
62. Alves F, Bilbe G, Blesson S, Goyal V, Monnerat S, Mowbray C, et al. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31: e00048–18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00048-18> PMID: 30158301
63. Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Van Huijsduijnen RH, Kaneko T, Kita K, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14: 751–758. <https://doi.org/10.1038/nrd4683> PMID: 26435527

Appendix

	Figure	Page
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4a	Figs 1-2	2
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4b	Figs 3-4	3
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4c	Figs 5-6	4
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4d	Figs 7-8	5
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4e	Figs 9-10	6
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4f	Figs 11-12	7
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4g	Figs 13-14	8
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4h	Figs 15-16	9
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4i	Figs 17-18	10
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4j	Figs 19-20	11
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4l	Figs 21-22	12
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4m	Figs 23-24	13
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4n	Figs 25-26	14
¹ H, ¹³ C NMR Compound 4o	Figs 27-28	15
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14a	Figs 29-30	16
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14b	Figs 31-32	17
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14c	Figs 33-34	18
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14d	Figs 35-36	19
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14e	Figs 37-38	20
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14f	Figs 39-40	21
¹ H, ¹³ C NMR Compound 14g	Figs 41-42	22

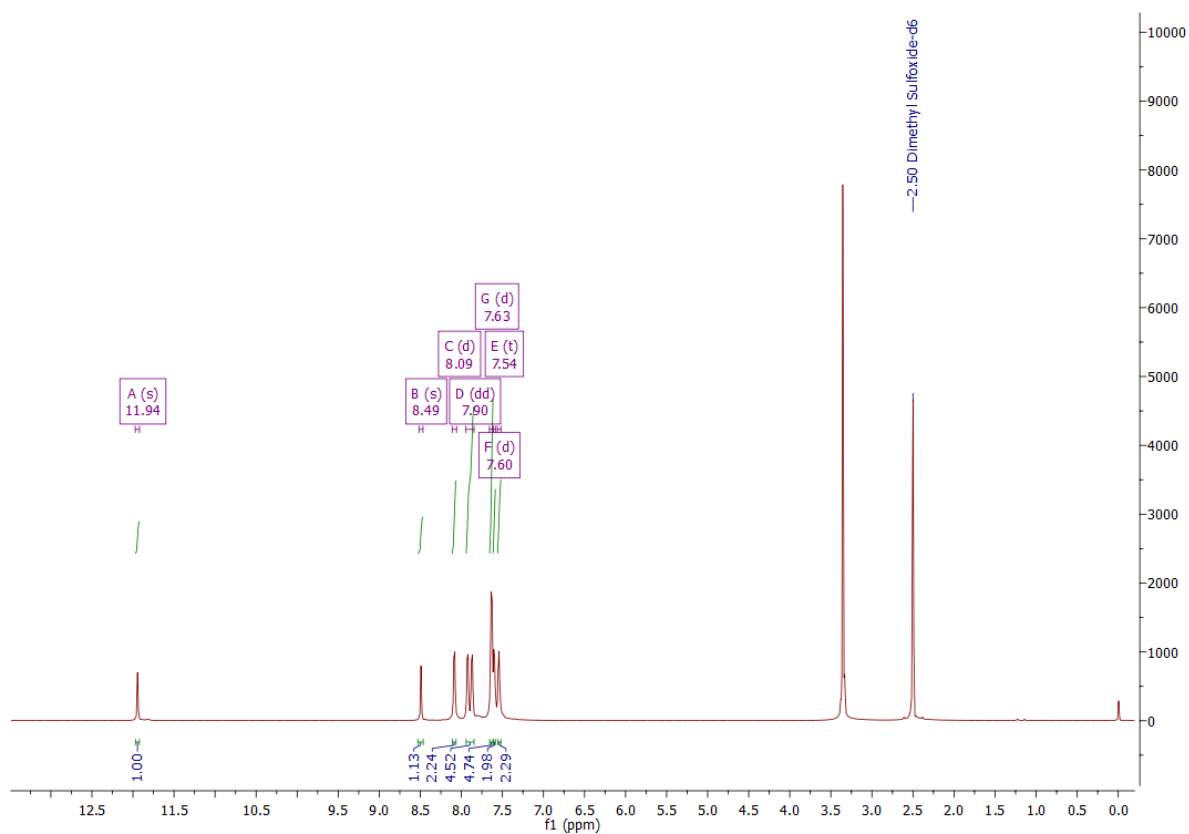
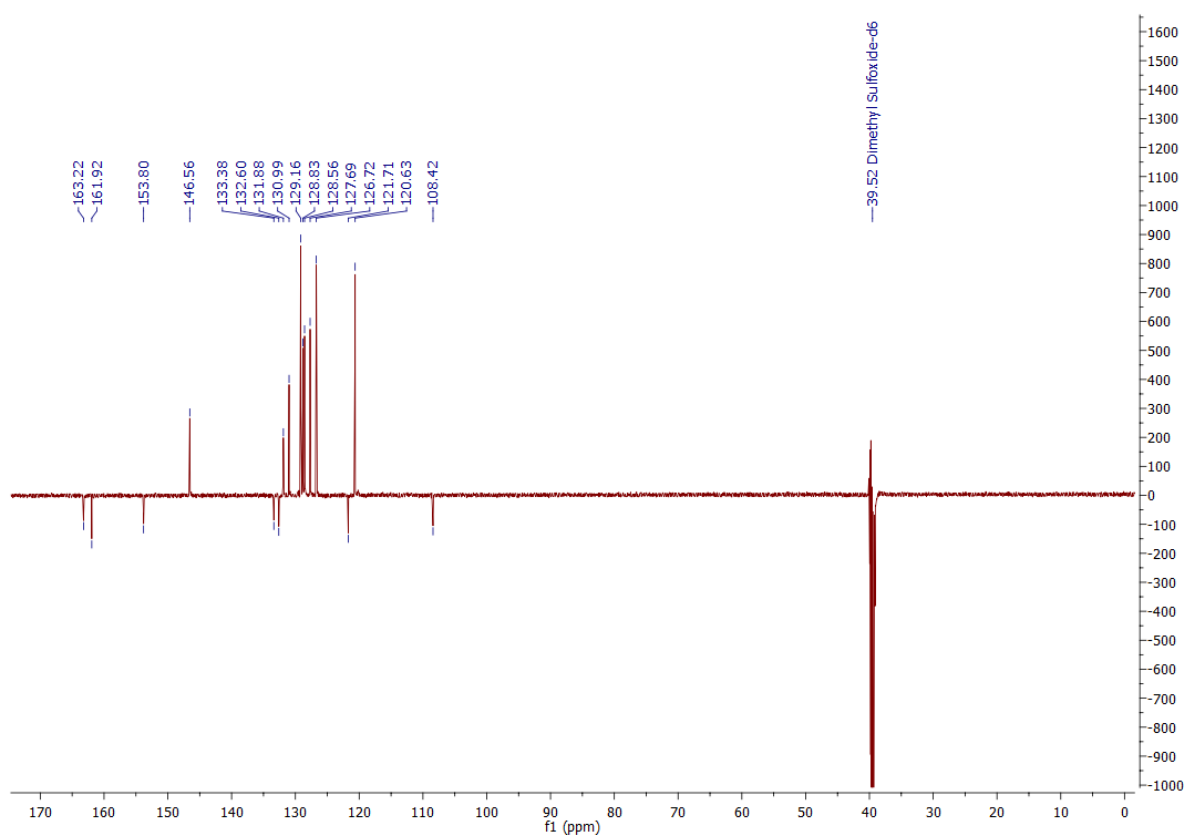
Fig 1. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4a****Fig 2.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4a**

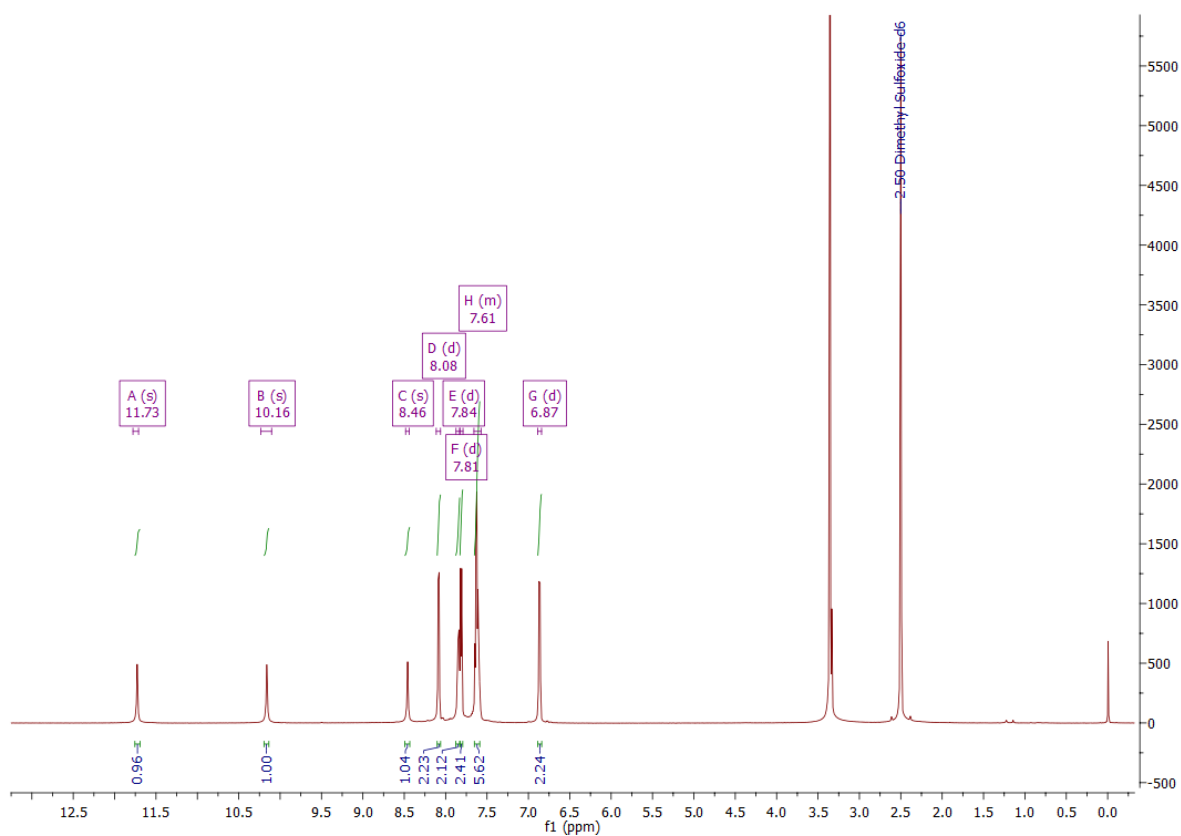
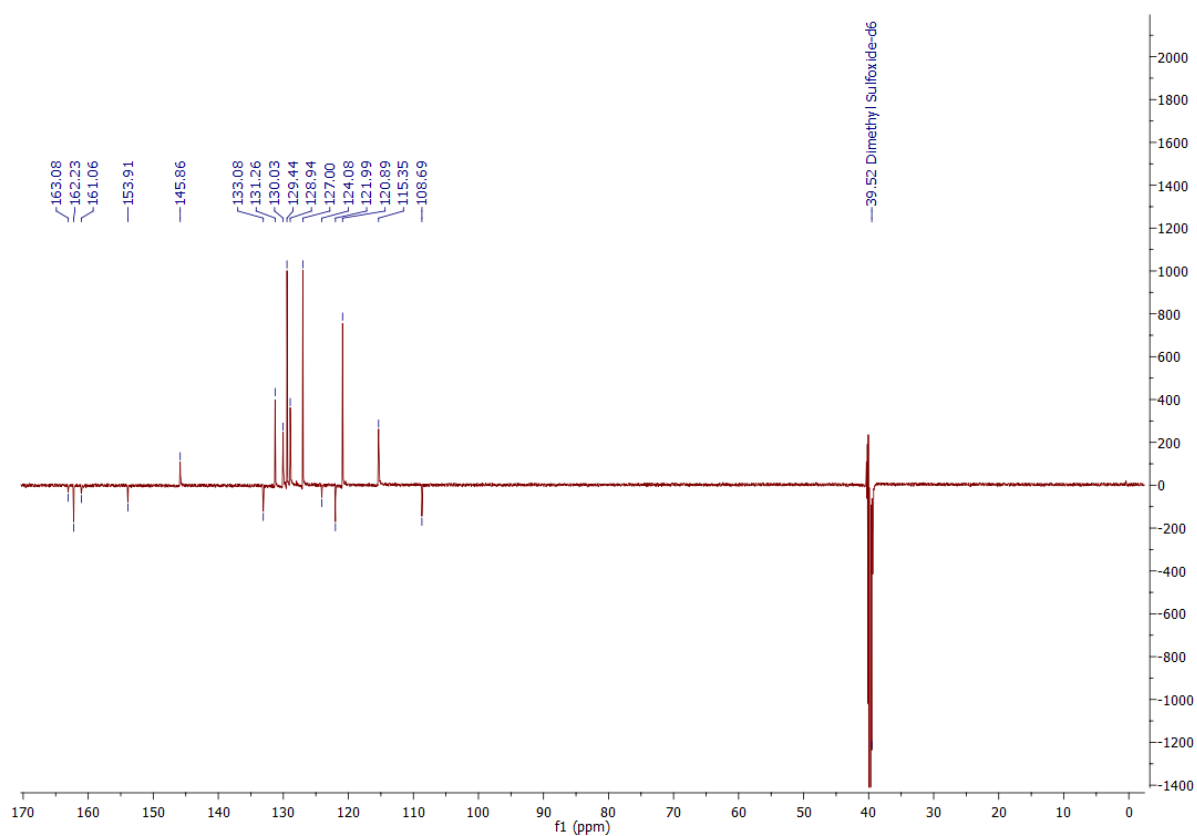
Fig 3. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4b****Fig 4.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4b**

Fig 5. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4c**

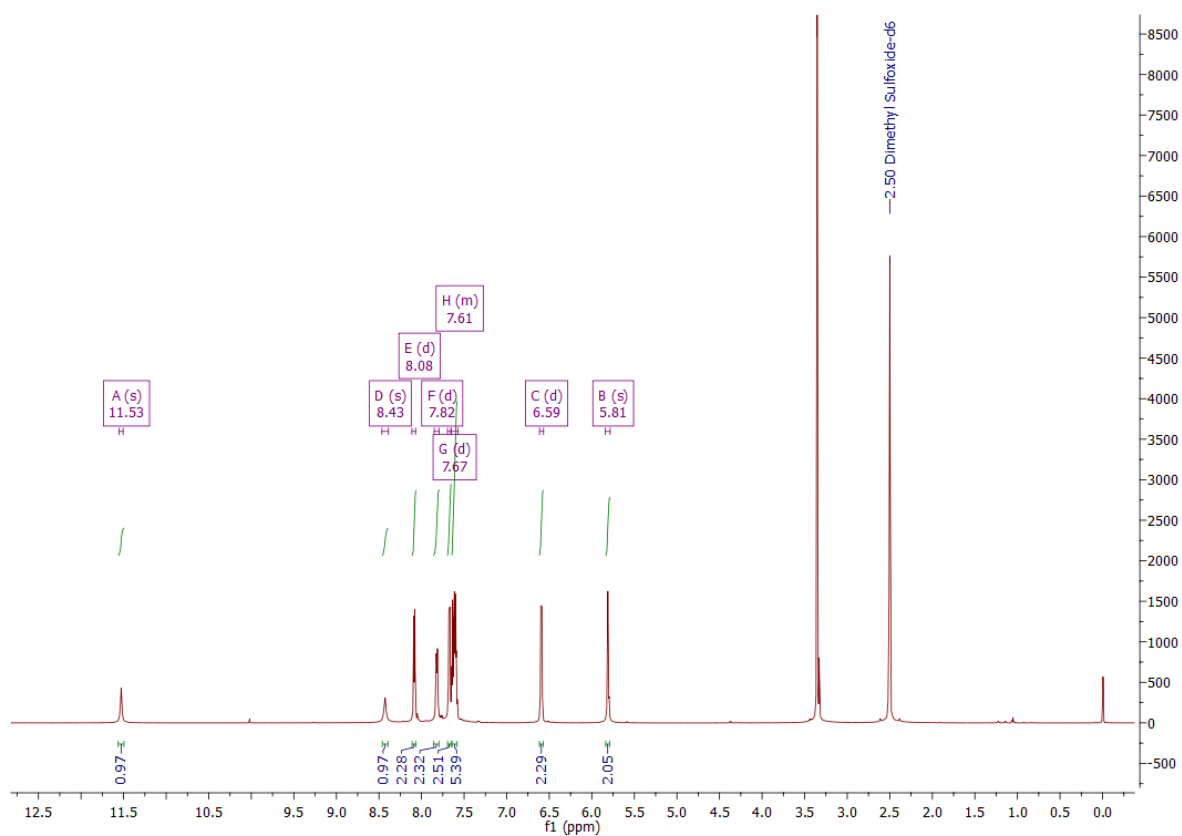


Fig 6. ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4c**

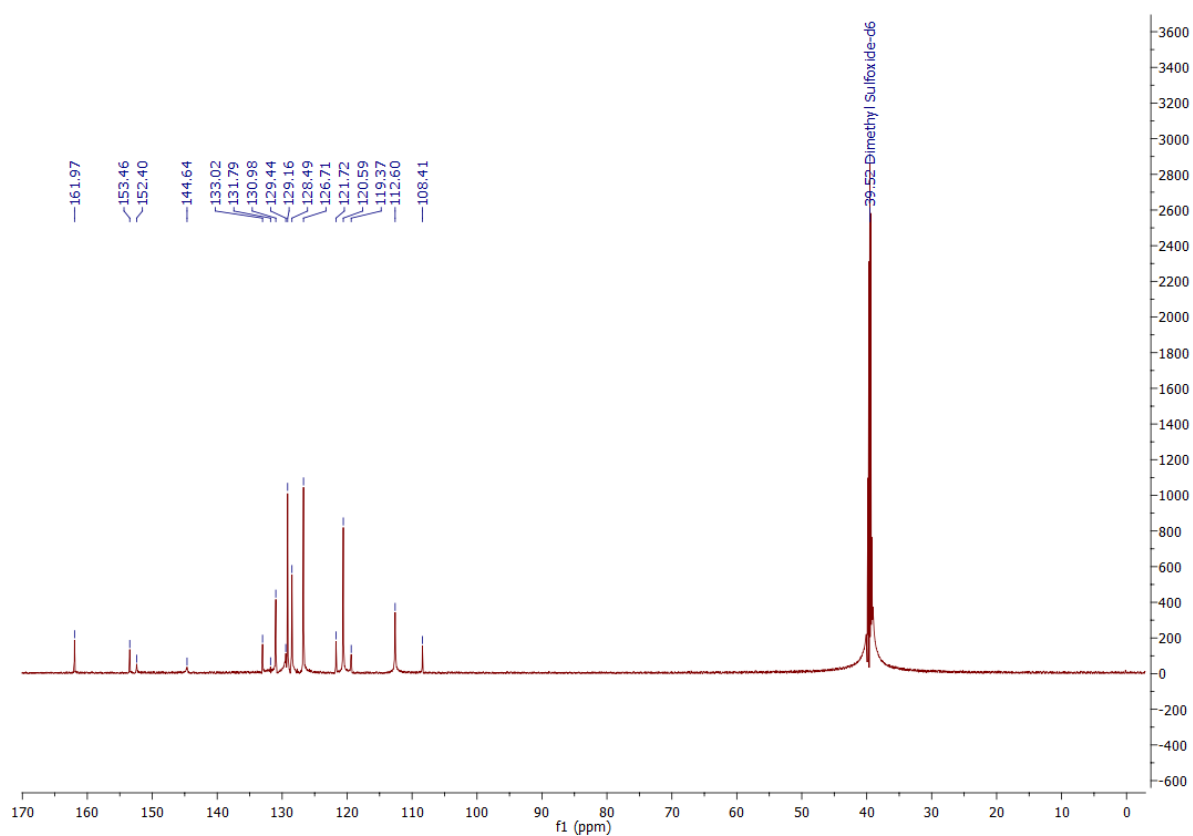


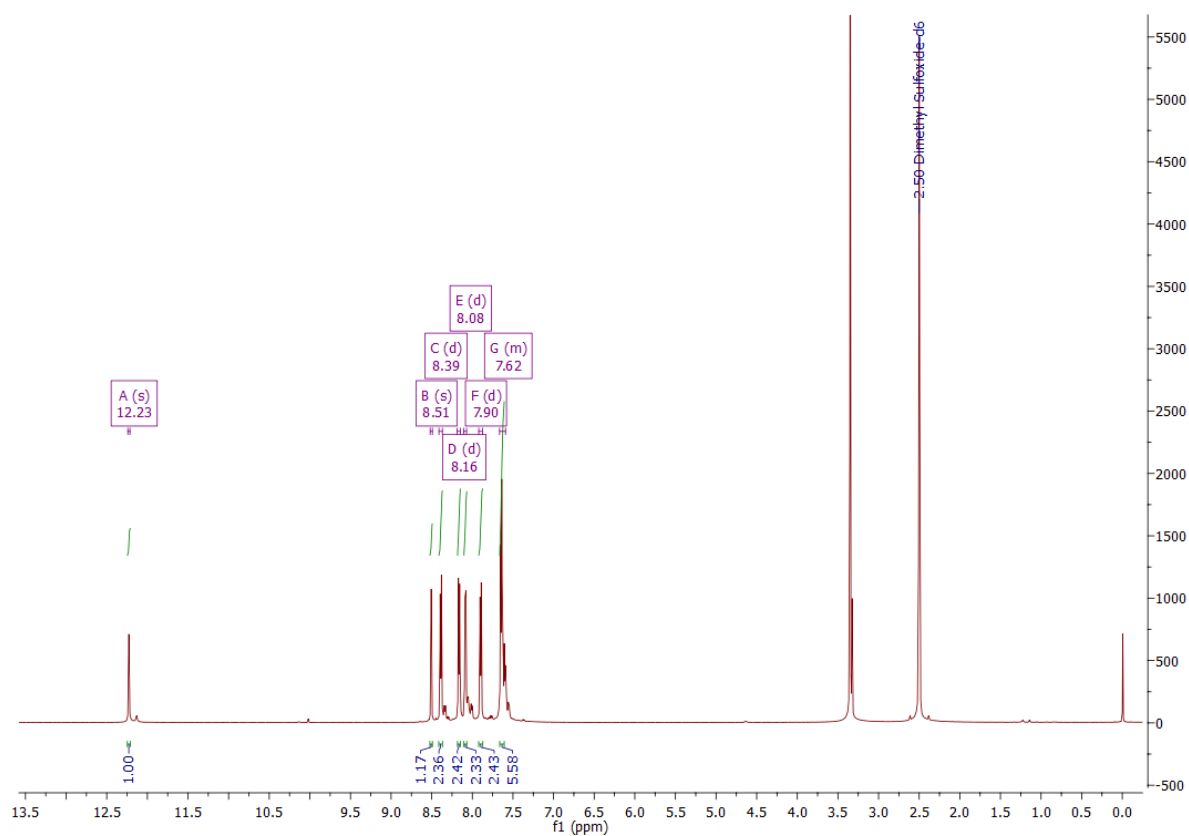
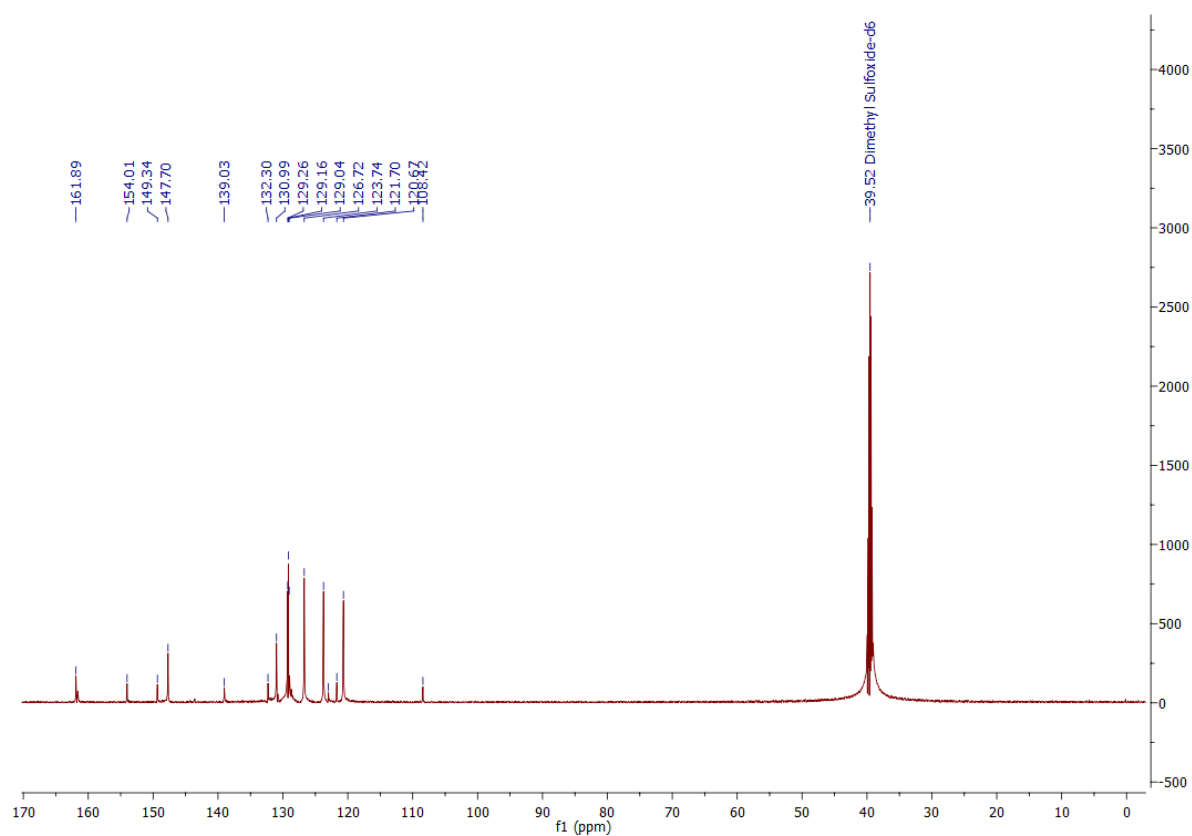
Fig 7. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4d****Fig 8.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4d**

Fig 9. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4e**

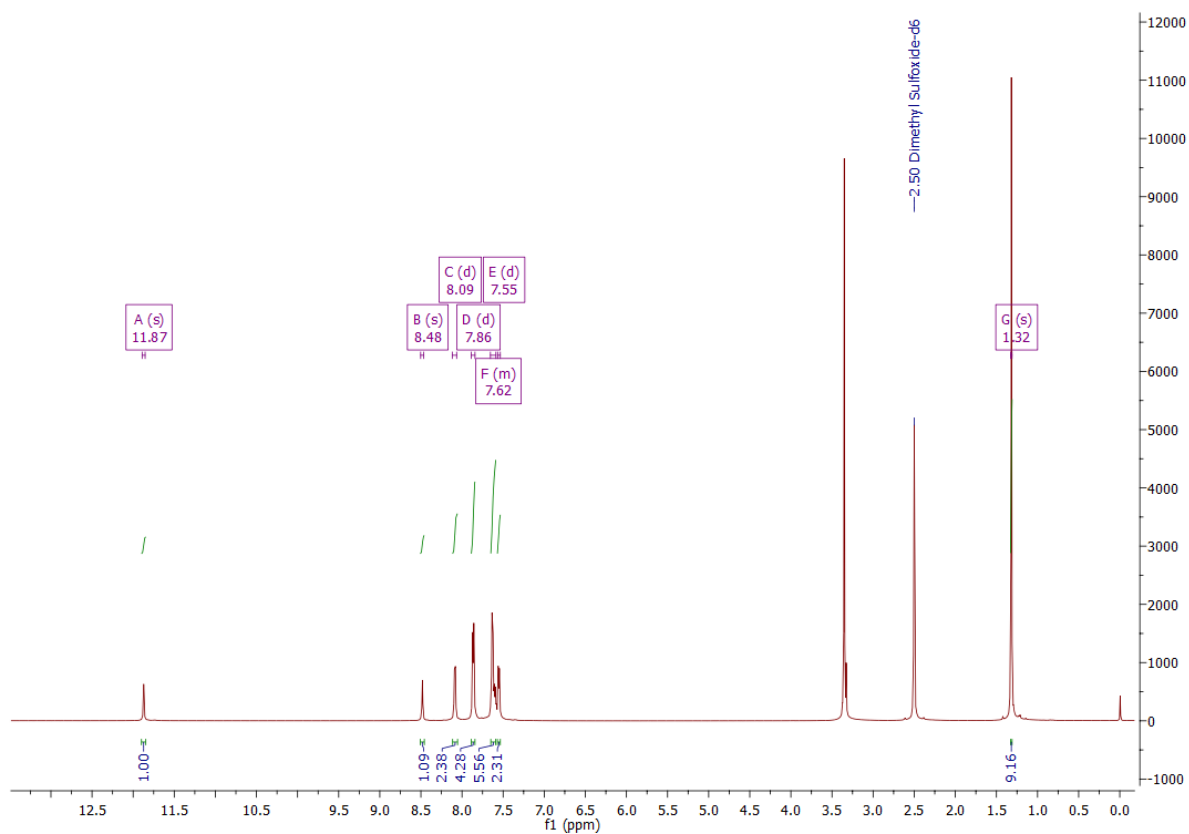


Fig 10. ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4e**

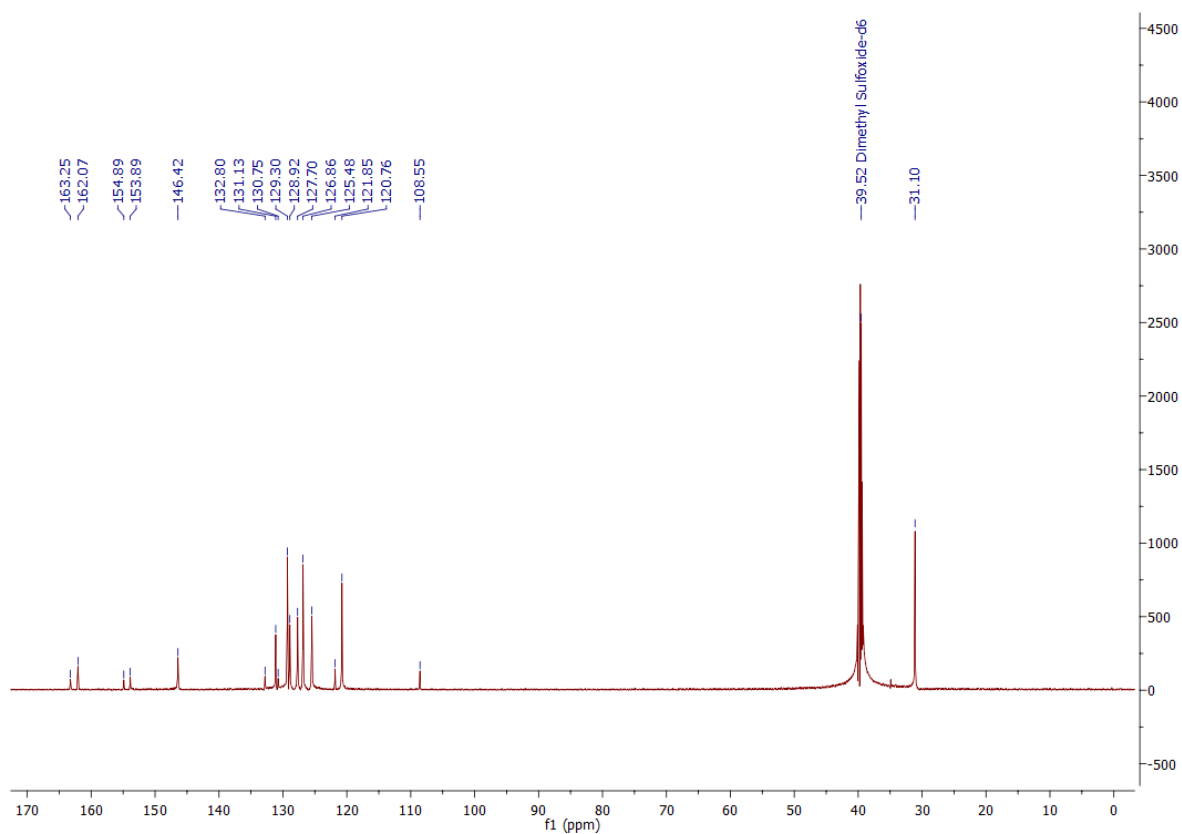


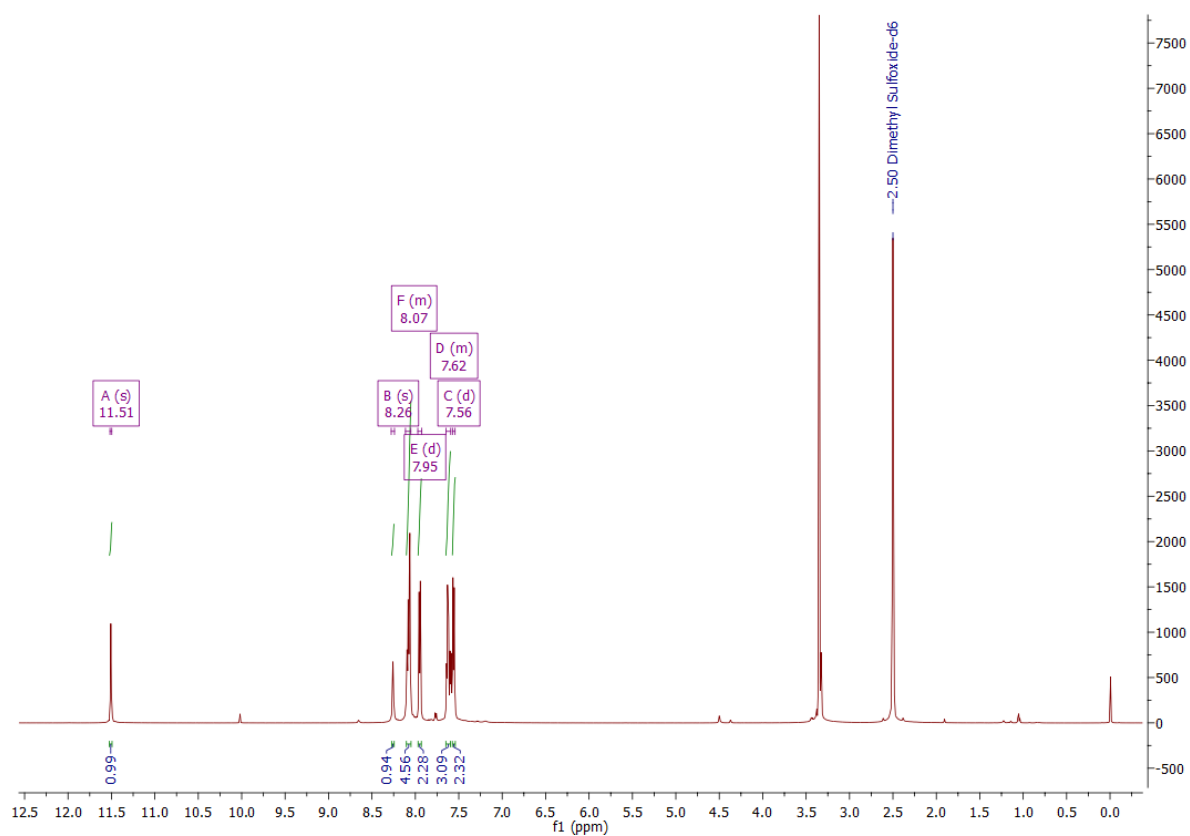
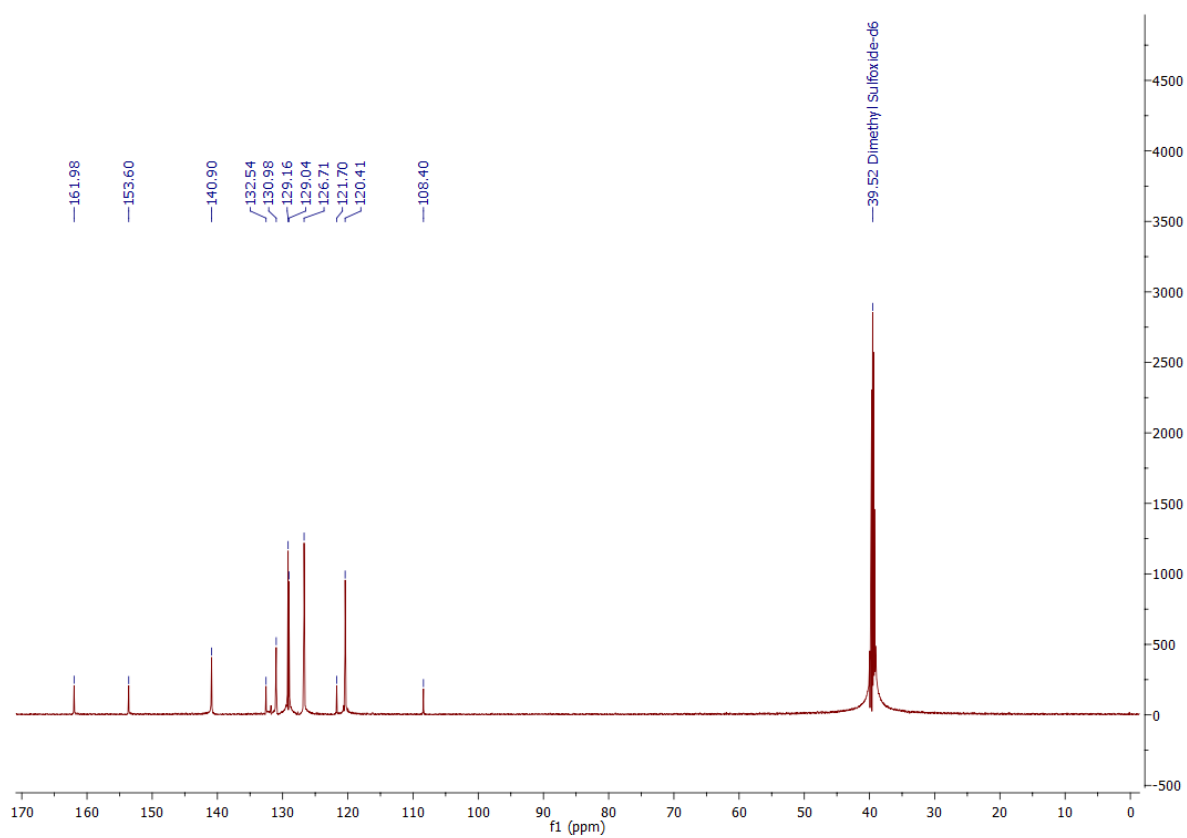
Fig 11. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4f****Fig 12.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4f**

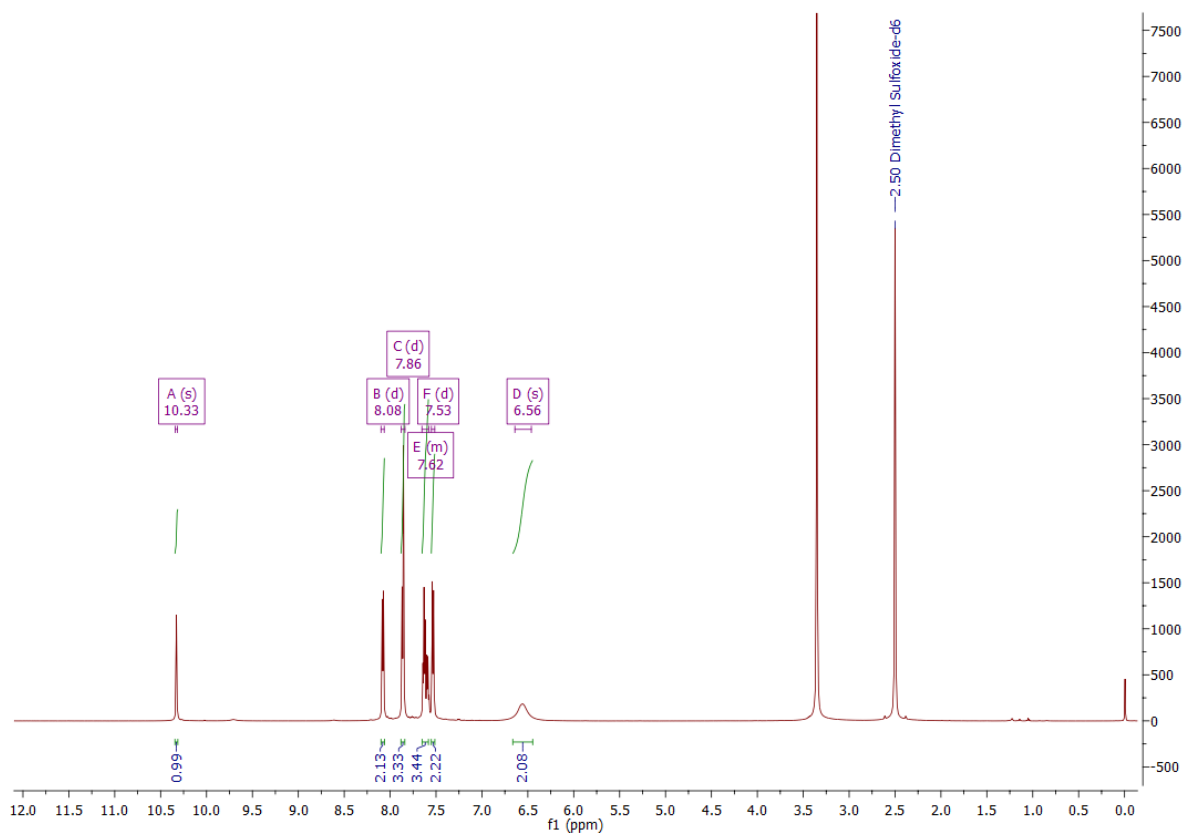
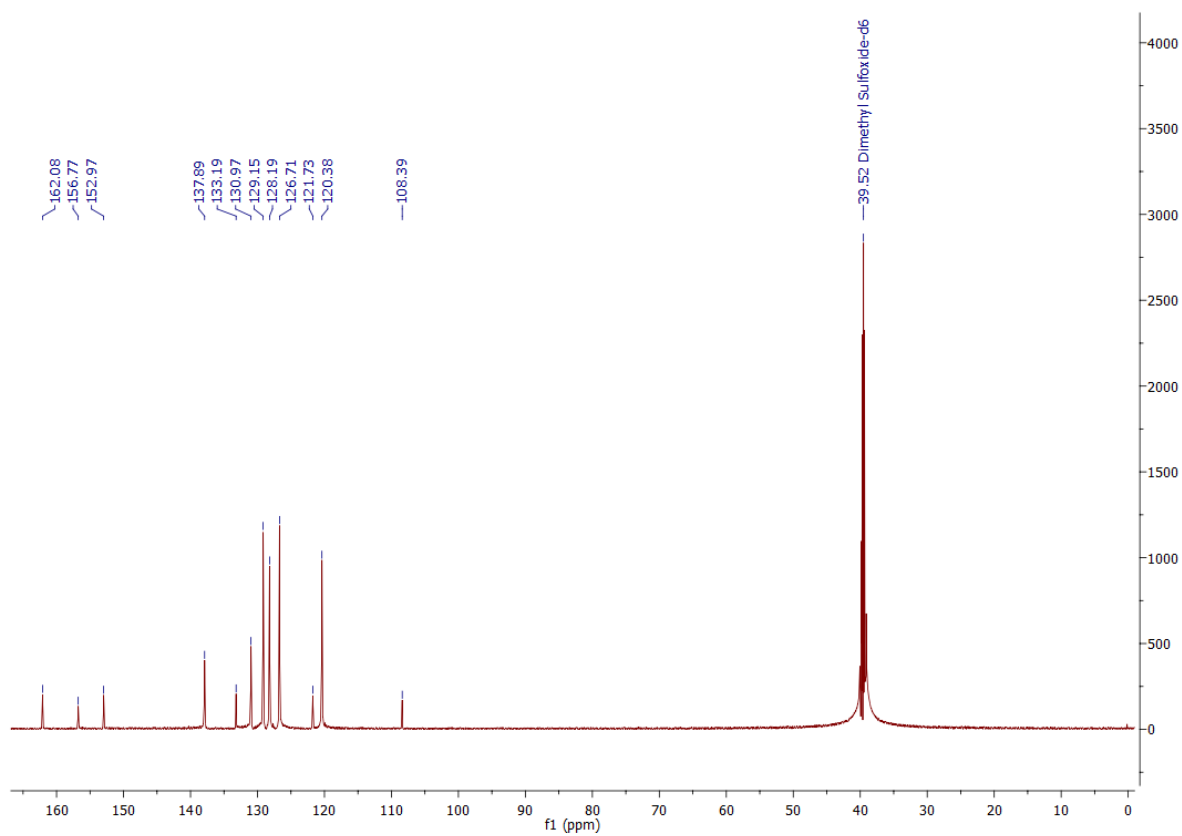
Fig 13. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4g****Fig 14.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4g**

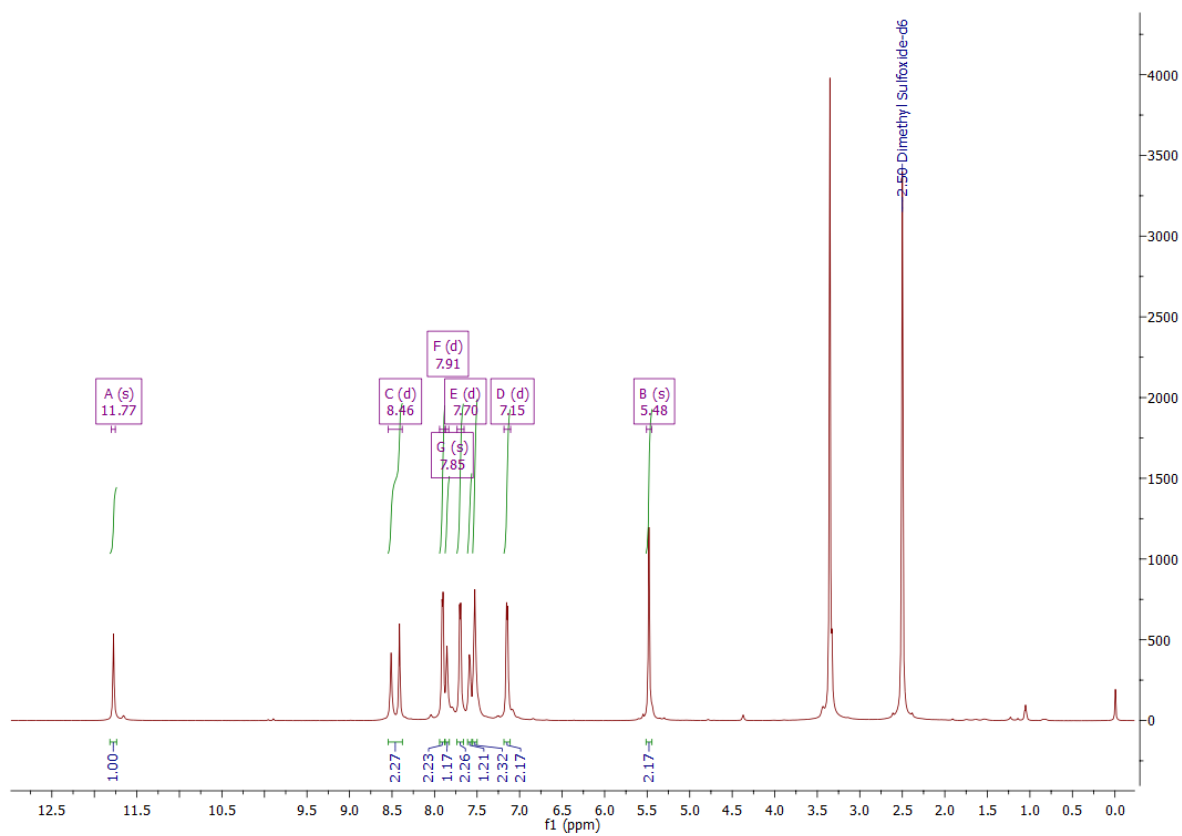
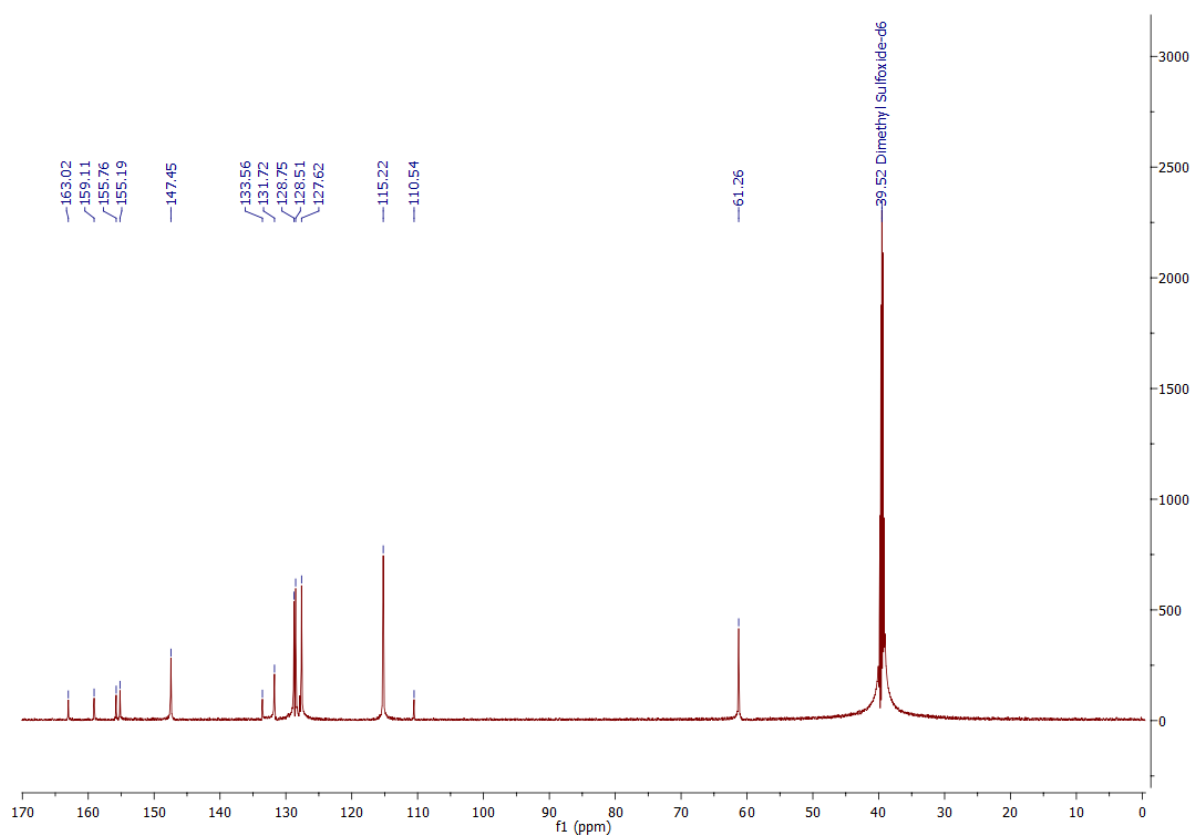
Fig 15. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4h****Fig 16.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4h**

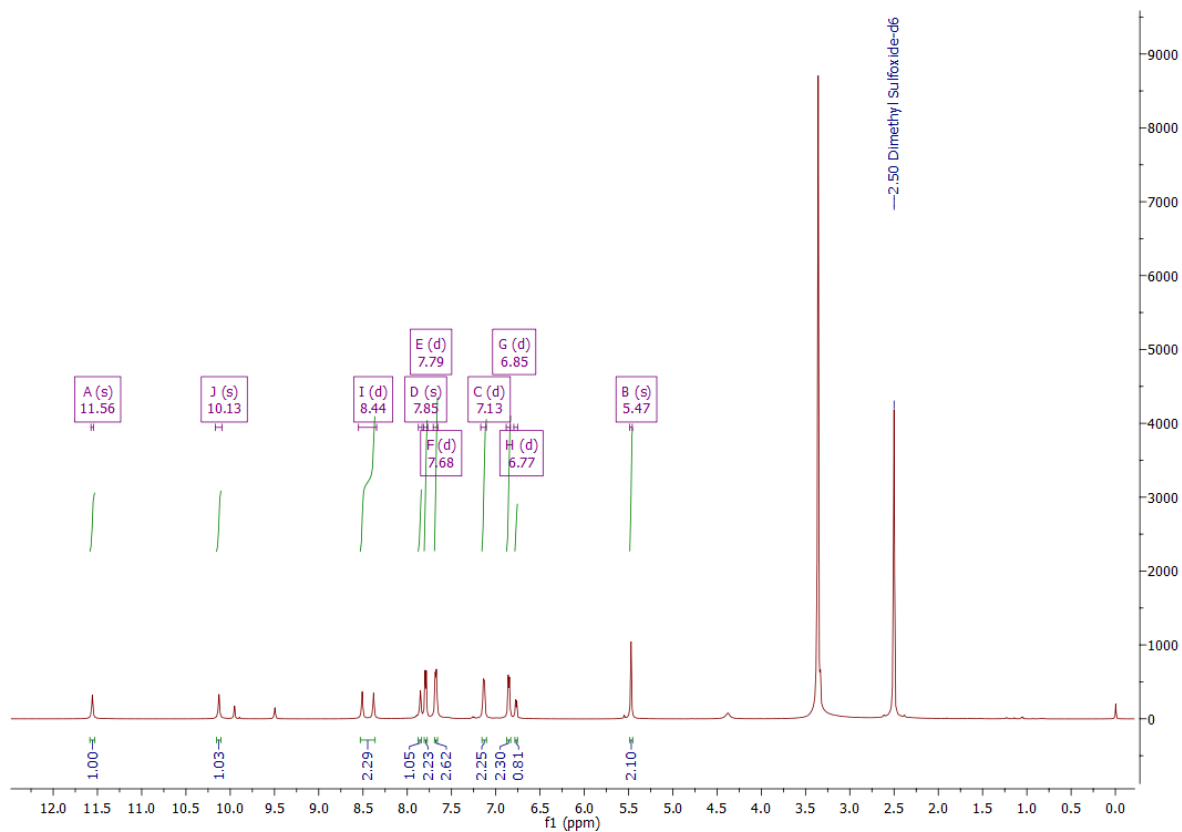
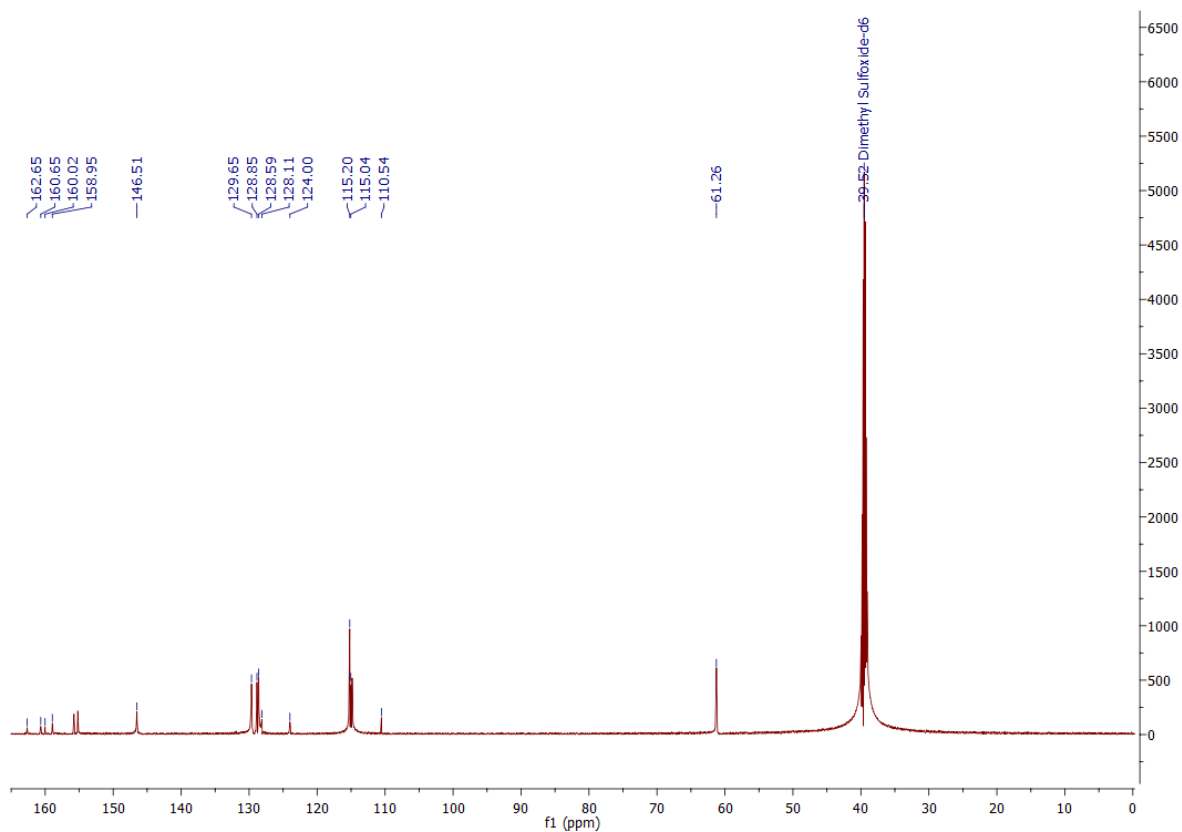
Fig 17. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4i****Fig 18.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4i**

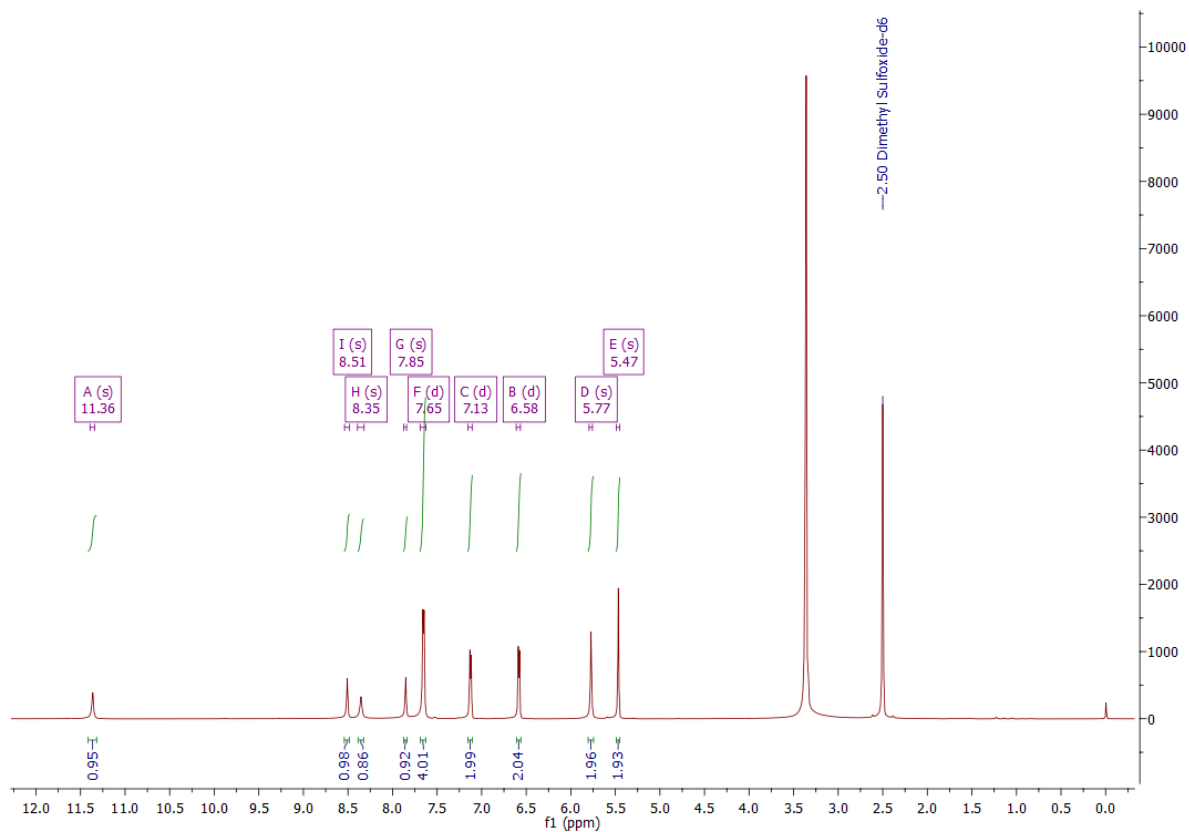
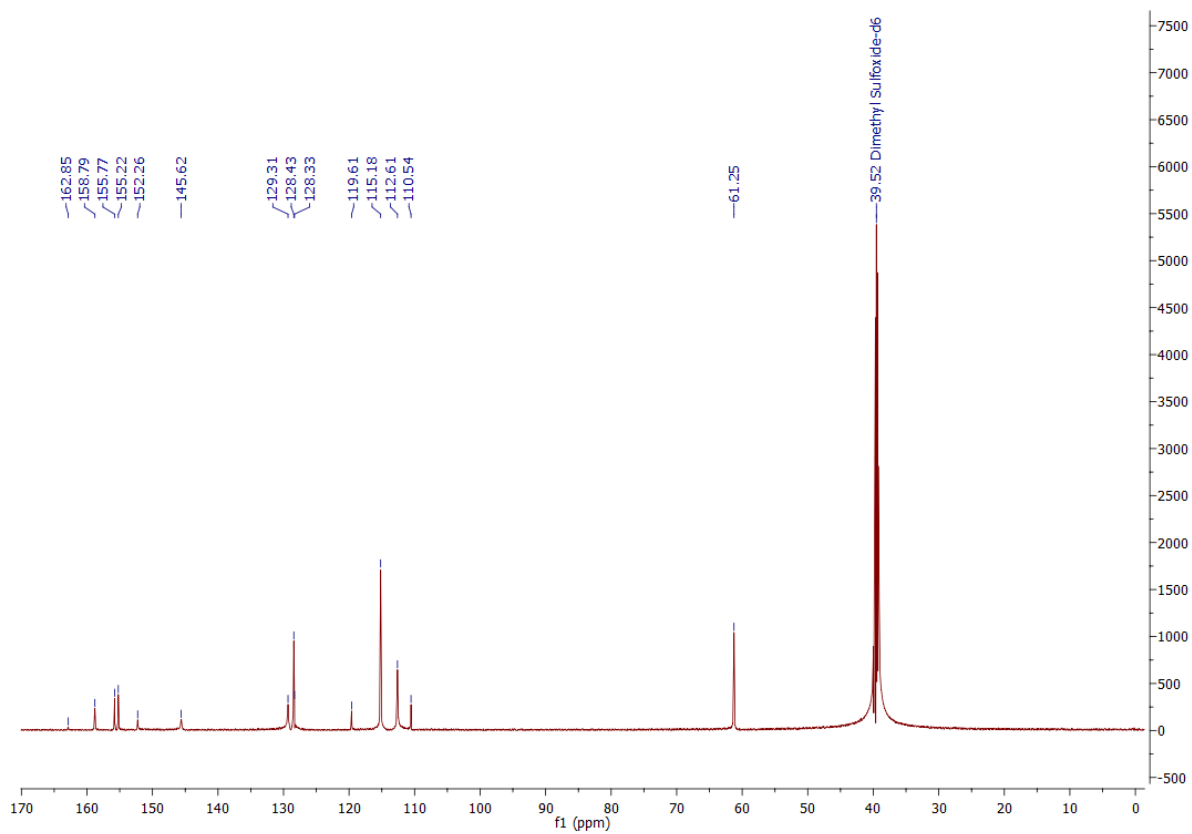
Fig 19. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4j****Fig 20.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4j**

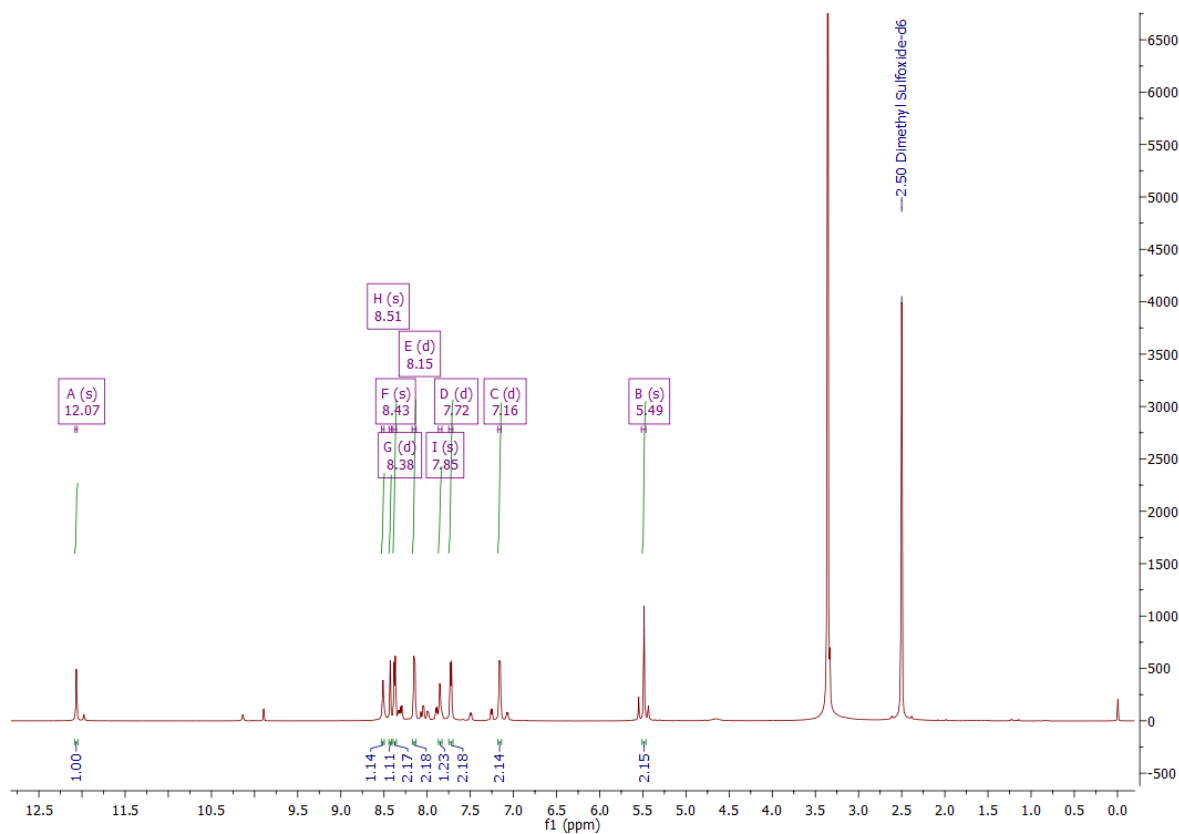
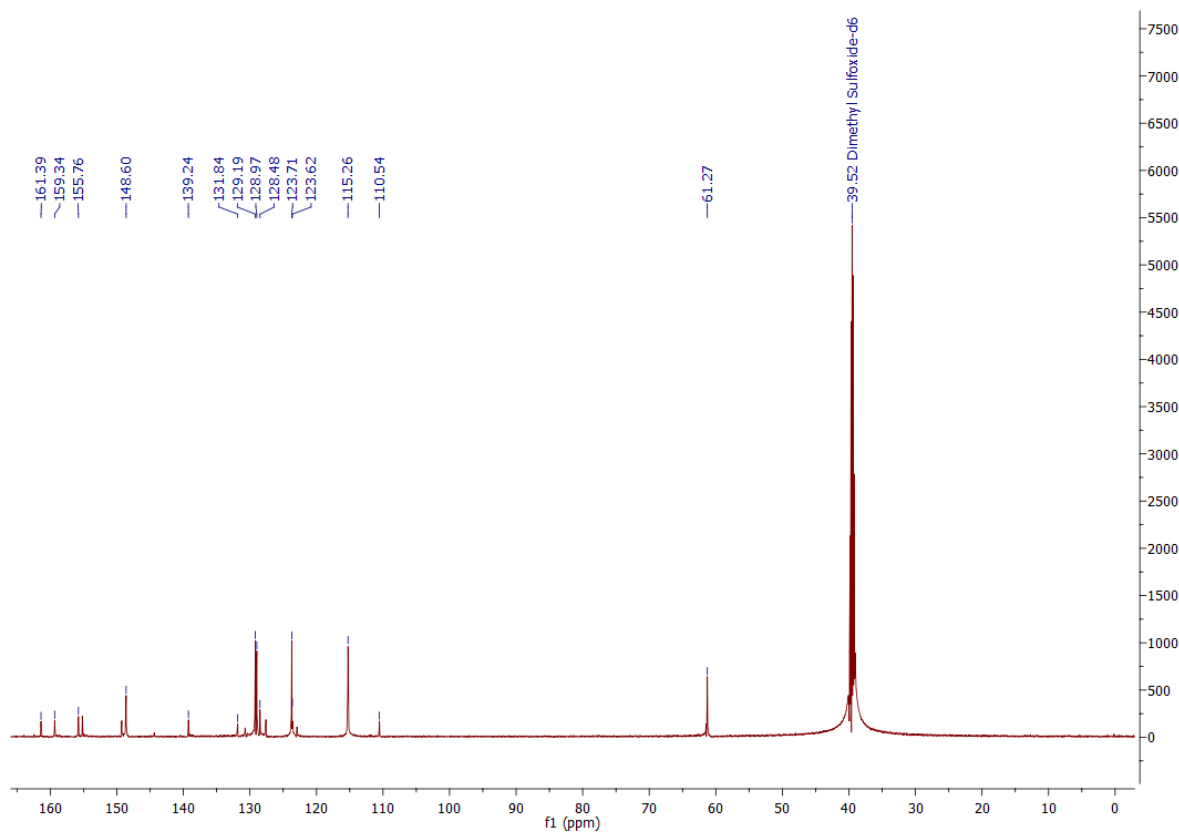
Fig 21. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4I****Fig 22.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4I**

Fig 23. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4m**

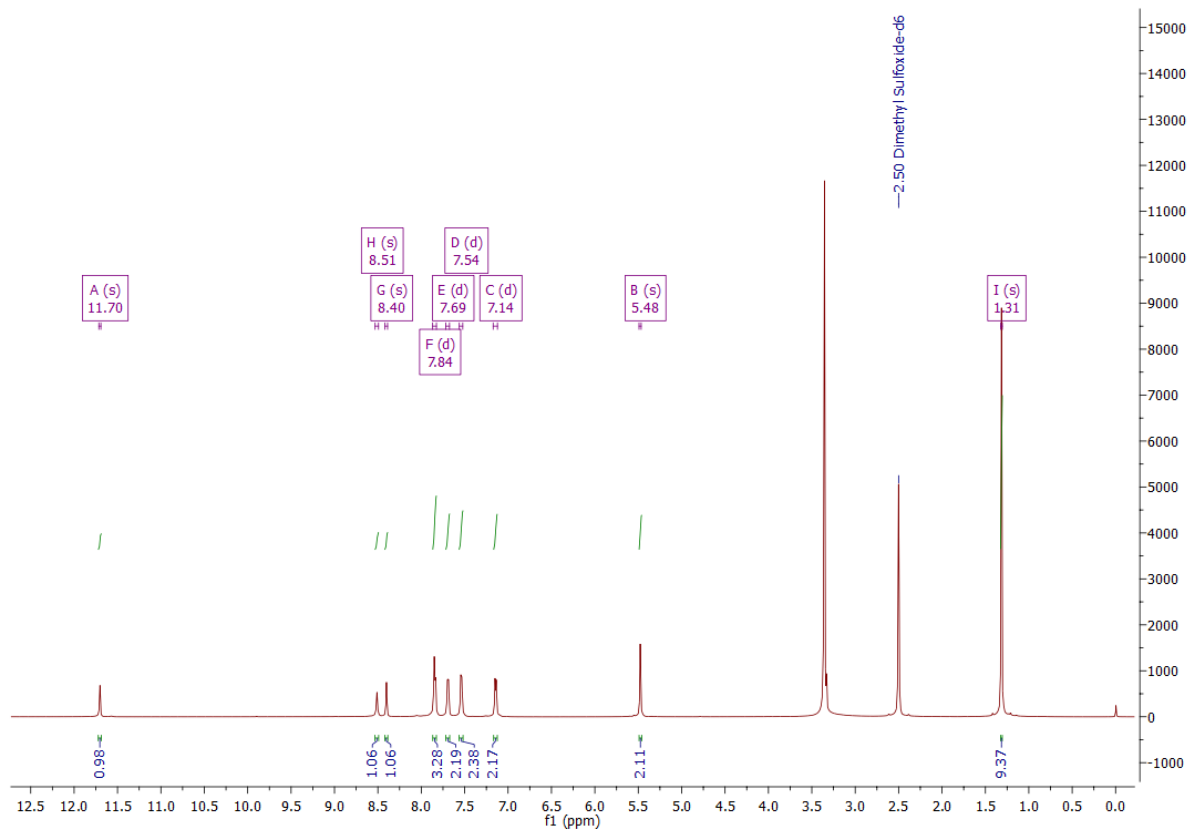


Fig 24. ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4m**

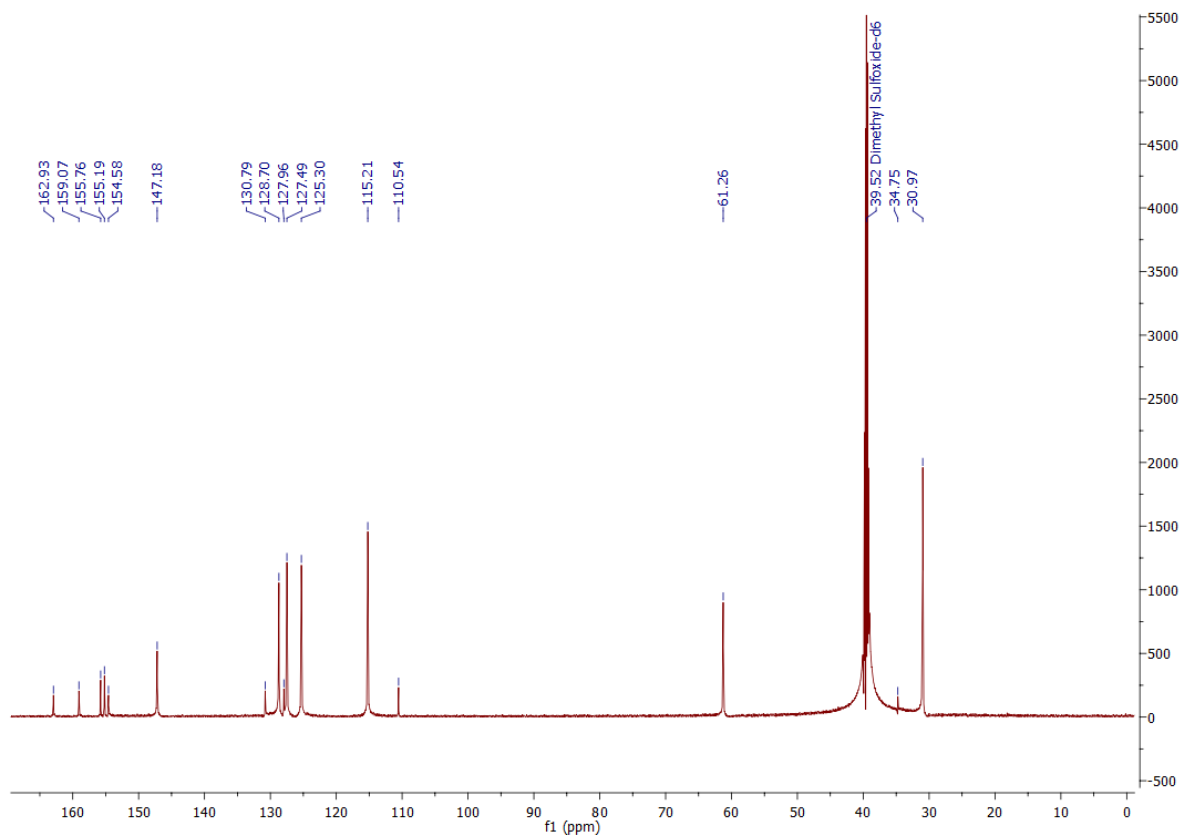


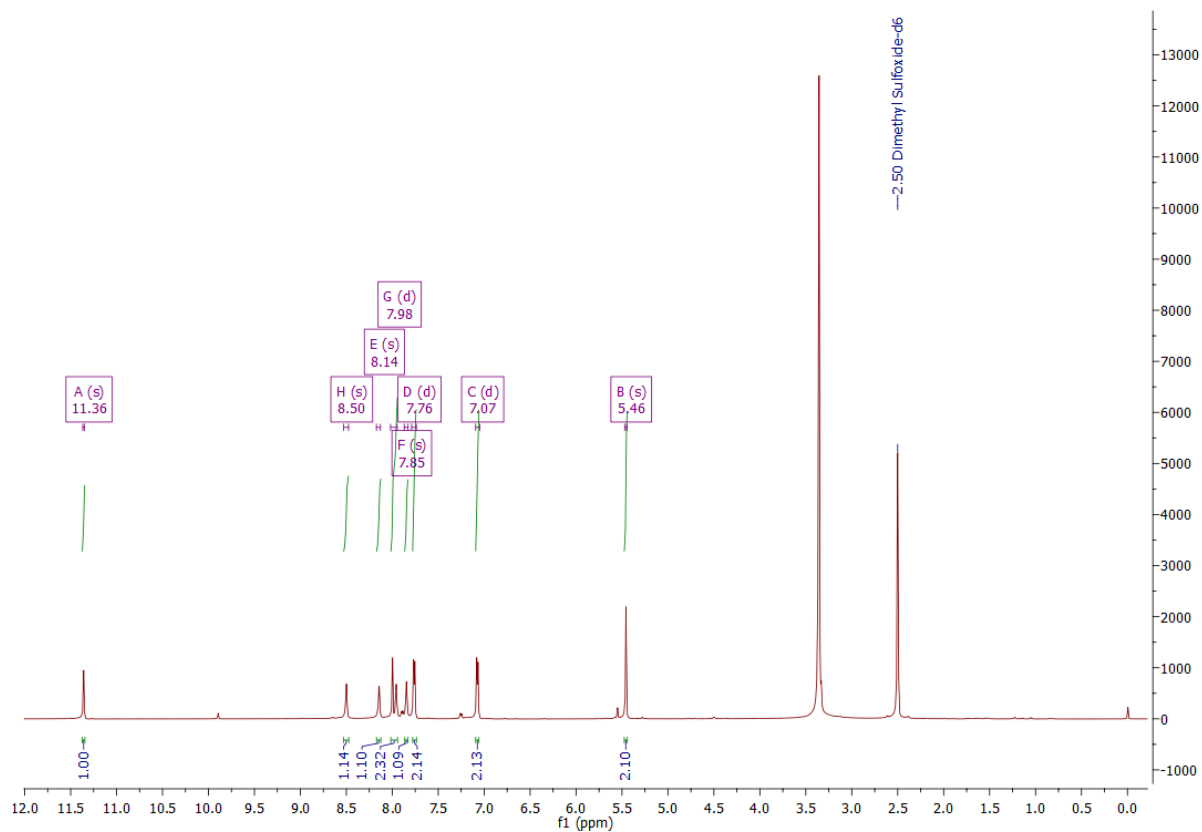
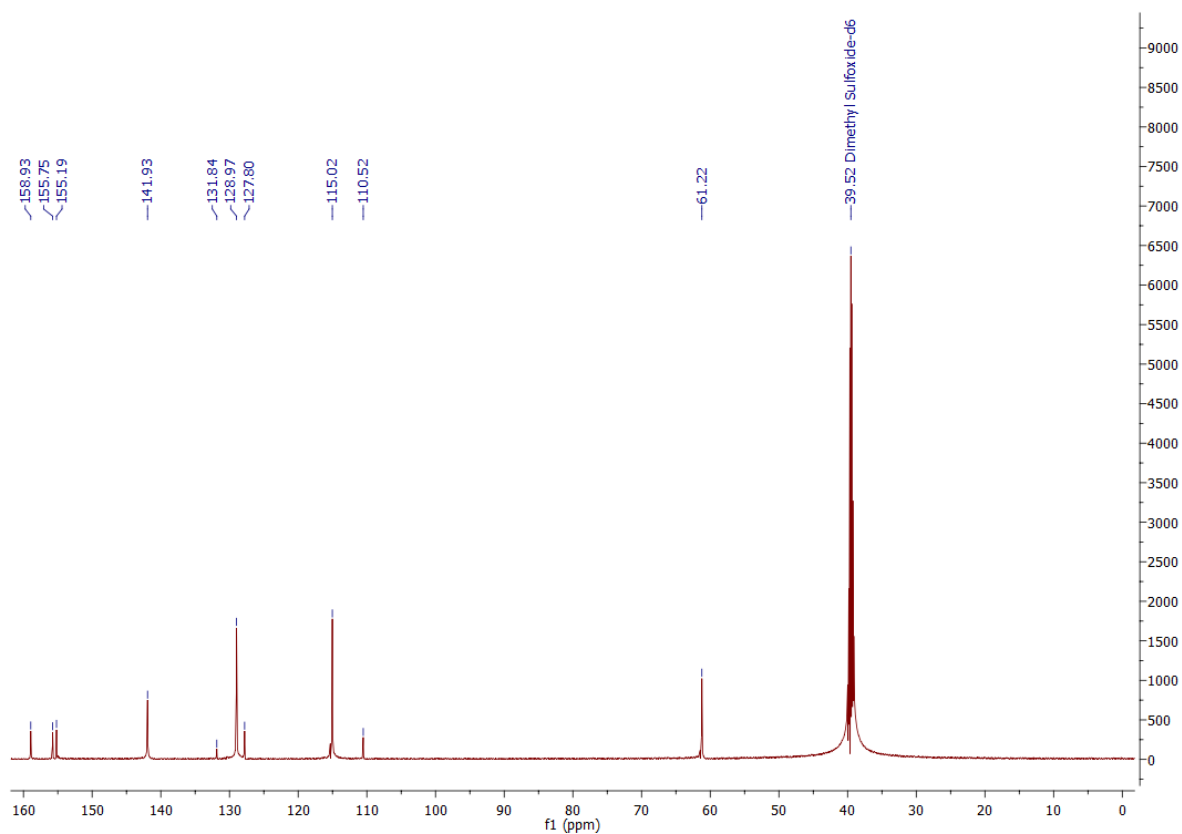
Fig 25. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4n****Fig 26.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4n**

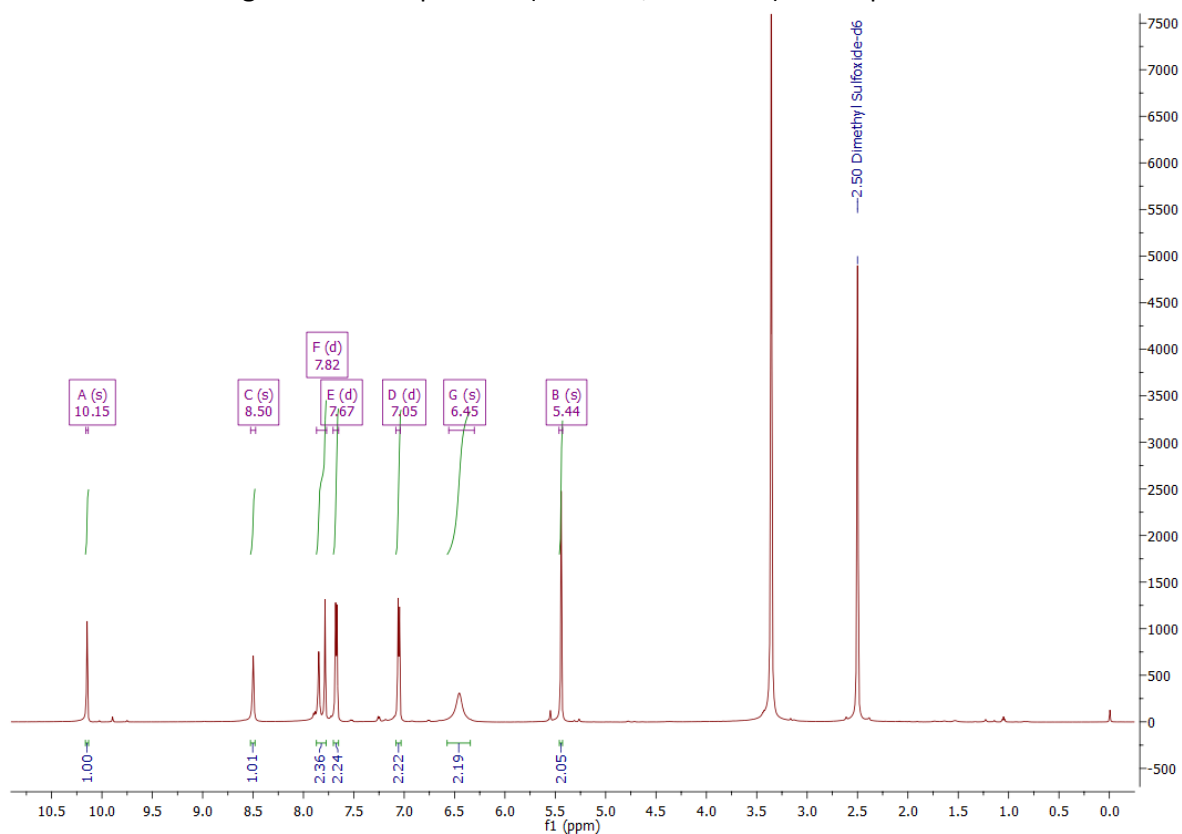
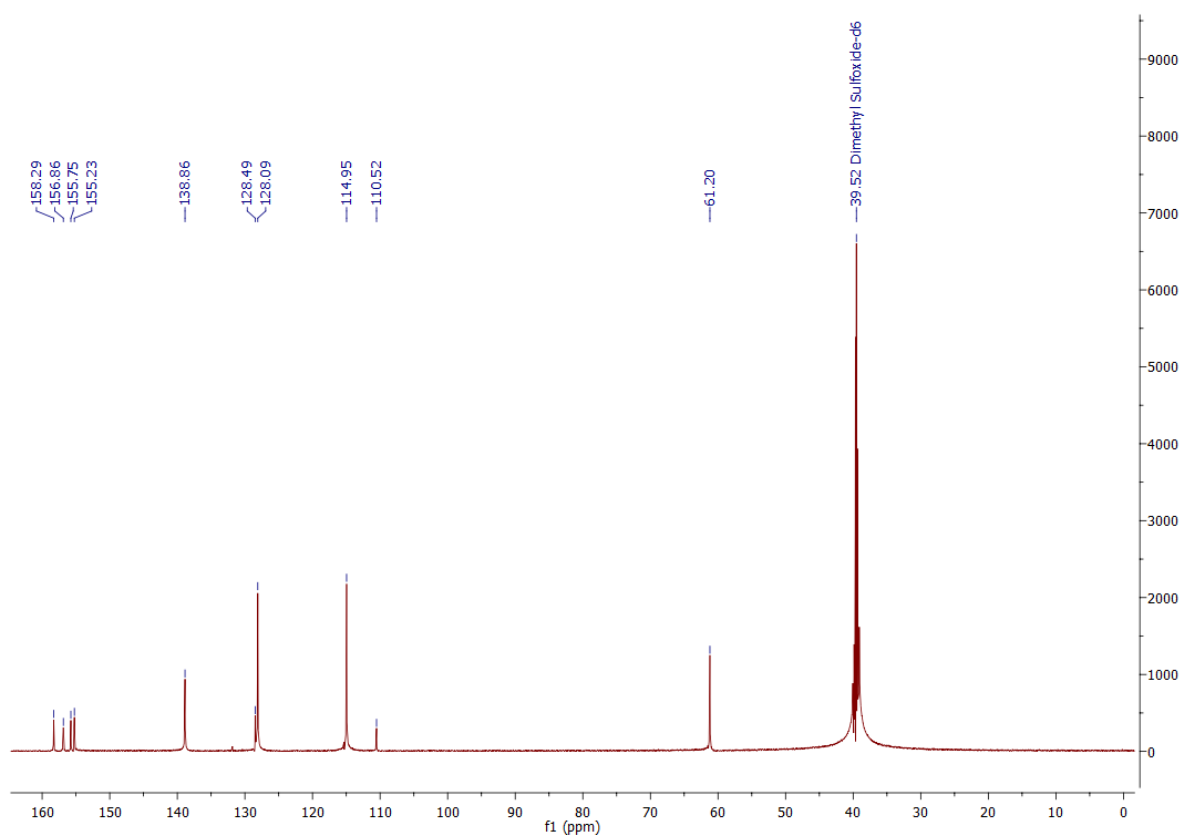
Fig 27. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **4o****Fig 28.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **4o**

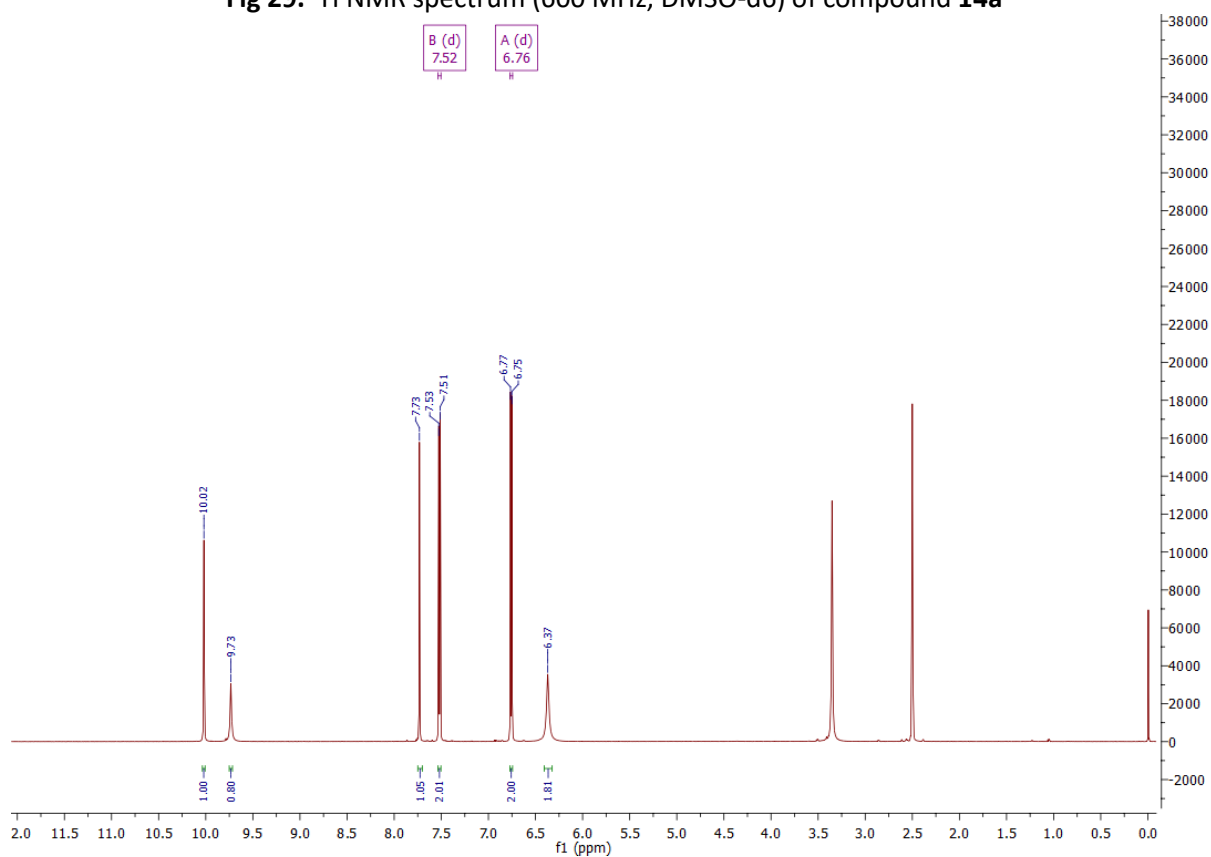
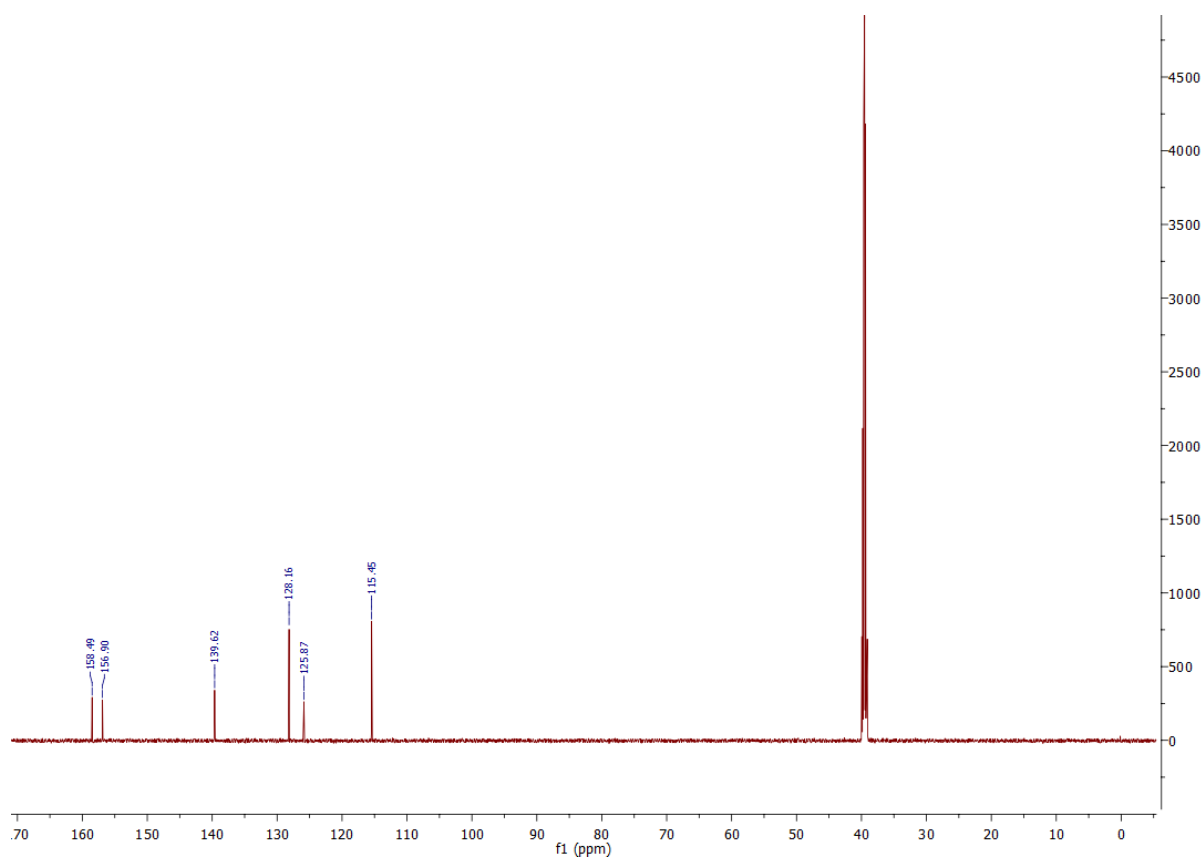
Fig 29. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14a****Fig 30.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14a**

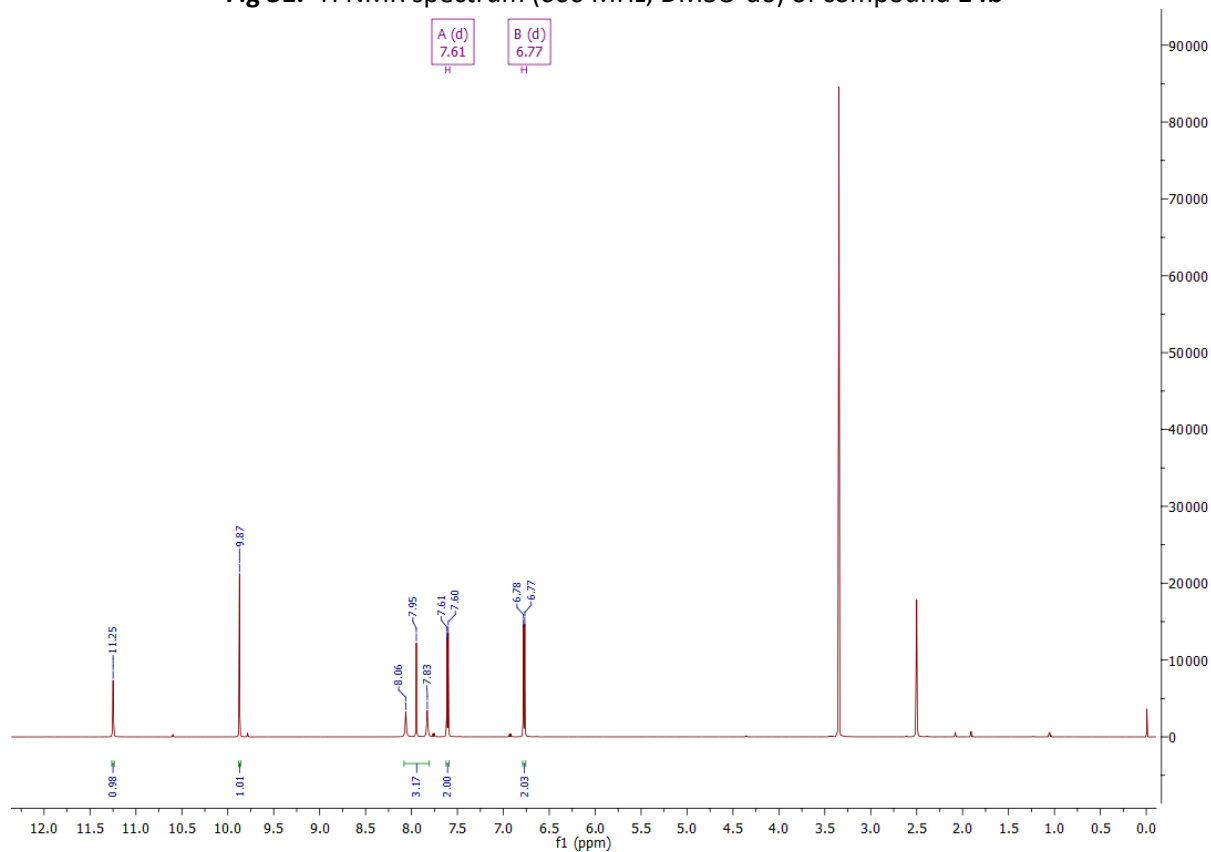
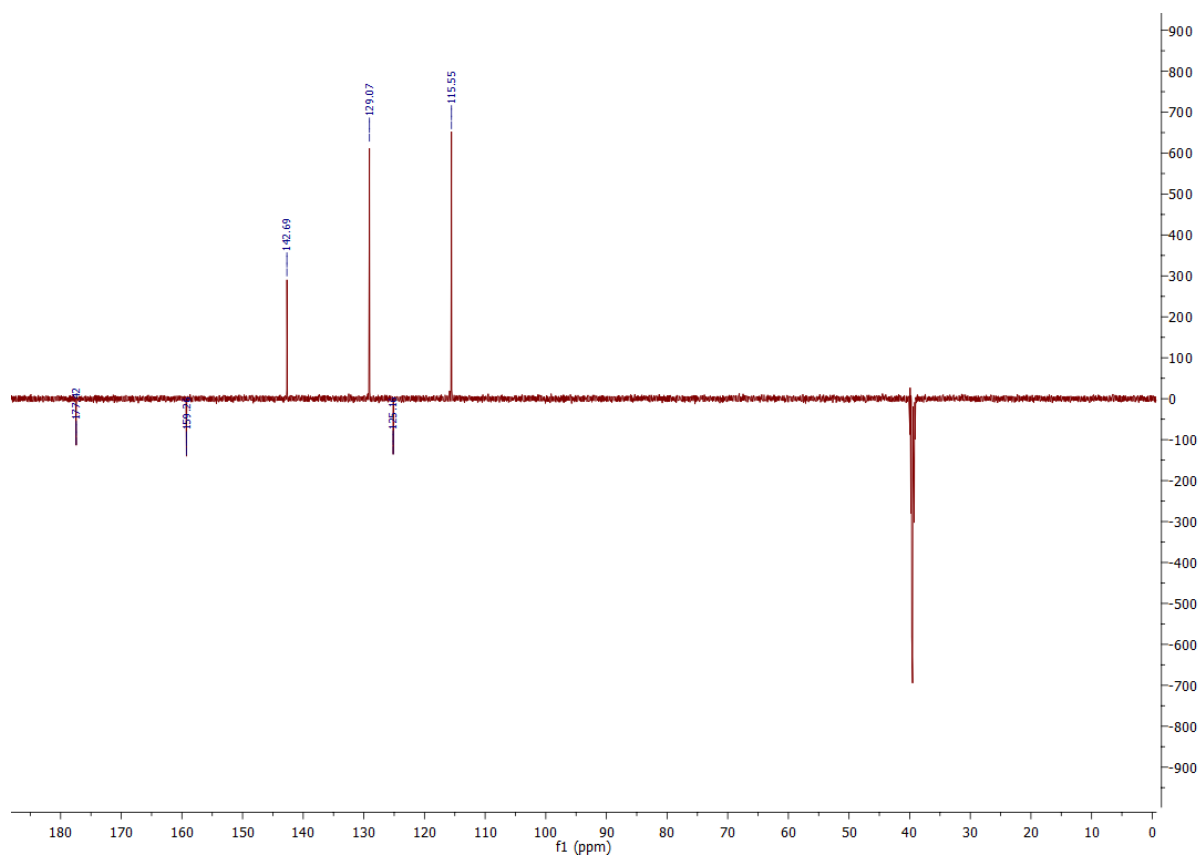
Fig 31. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14b****Fig 32.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14b**

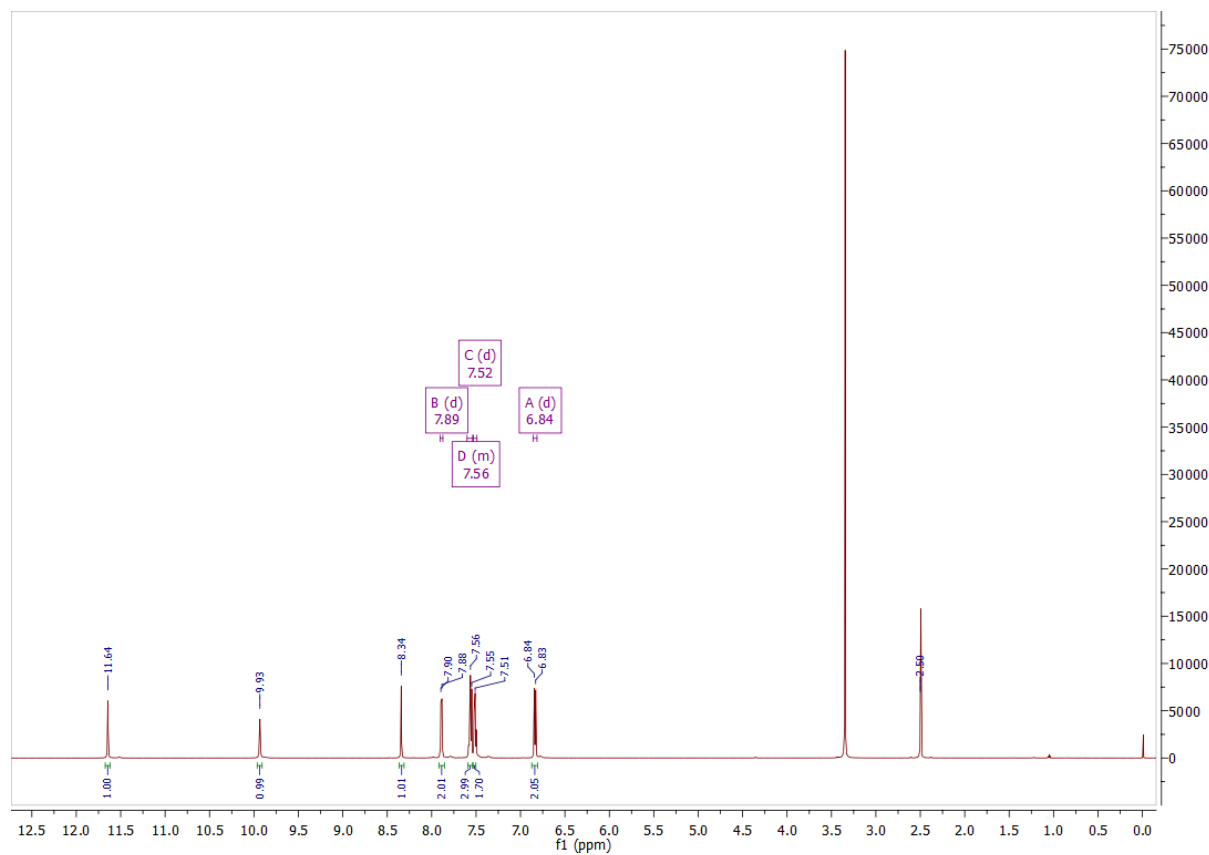
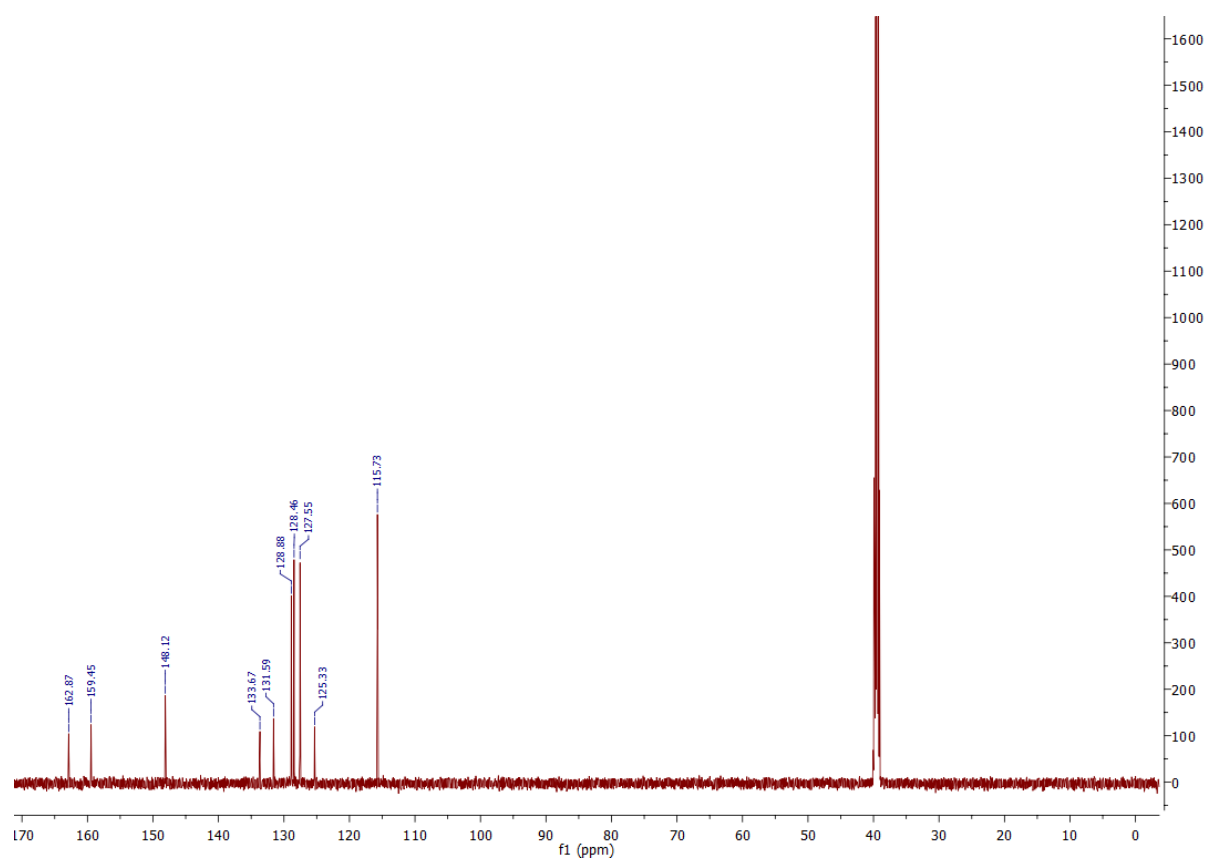
Fig 33. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14c****Fig 34.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14c**

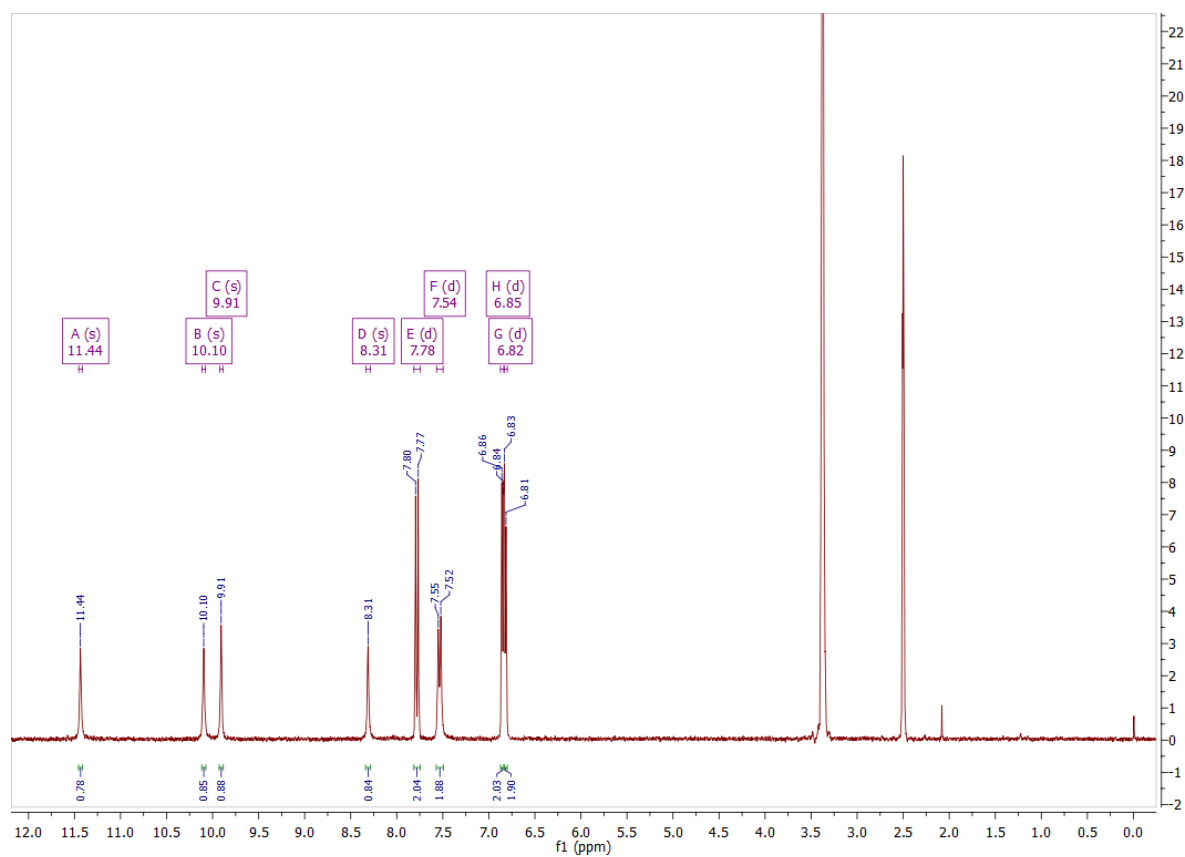
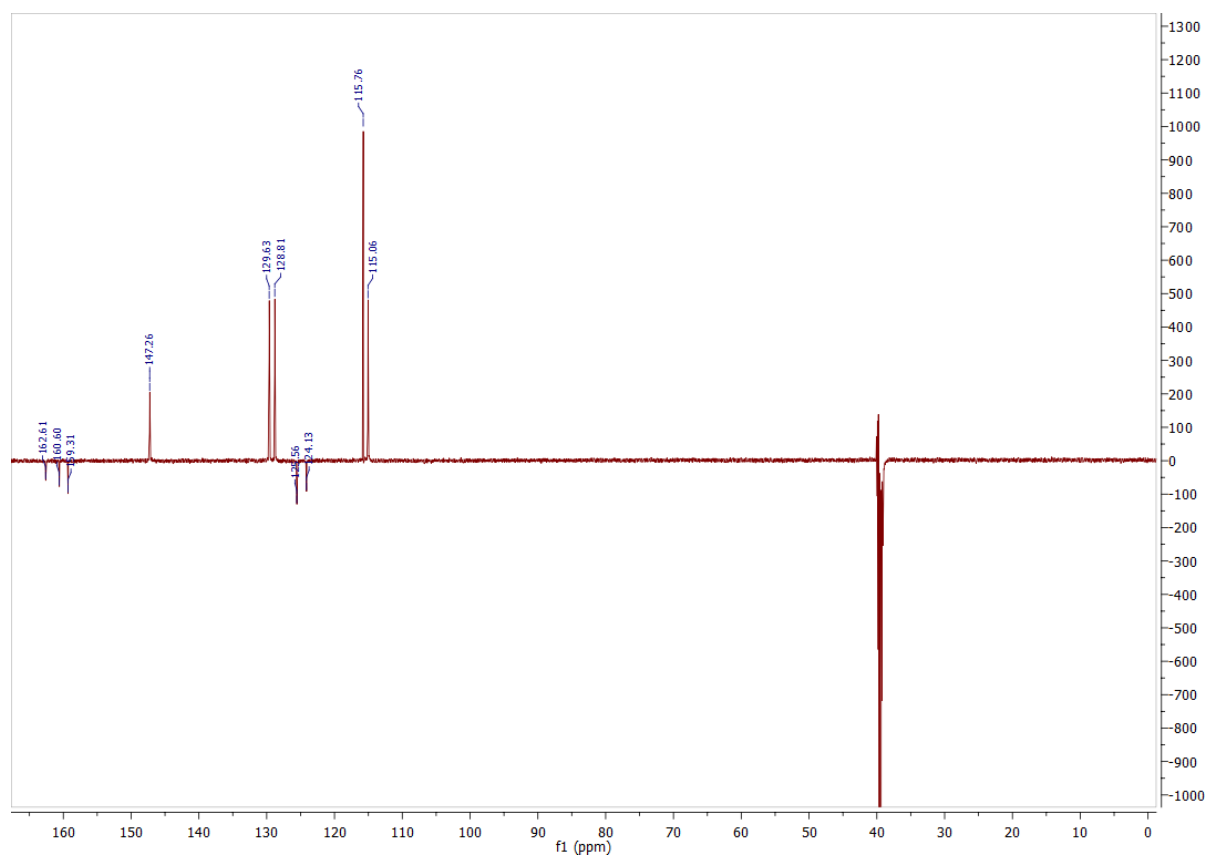
Fig 35. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14d****Fig 36.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14d**

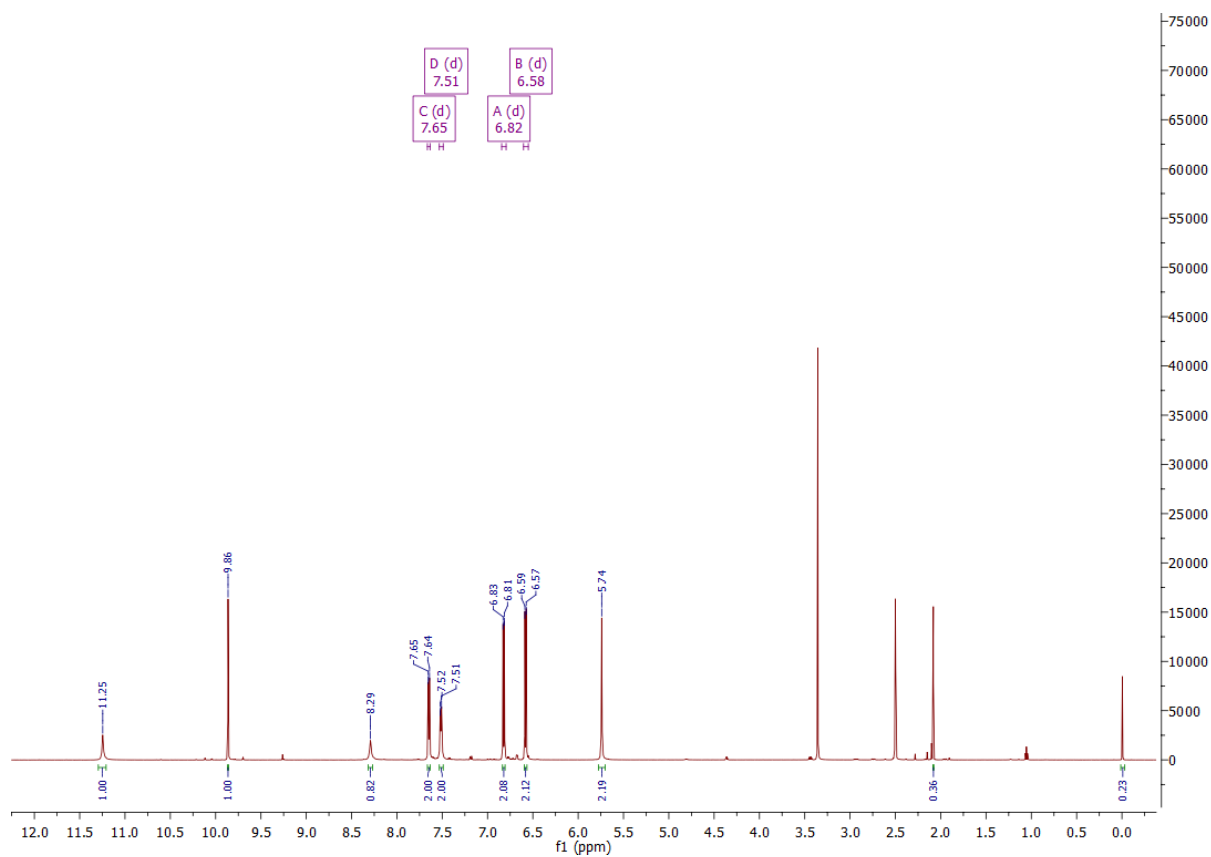
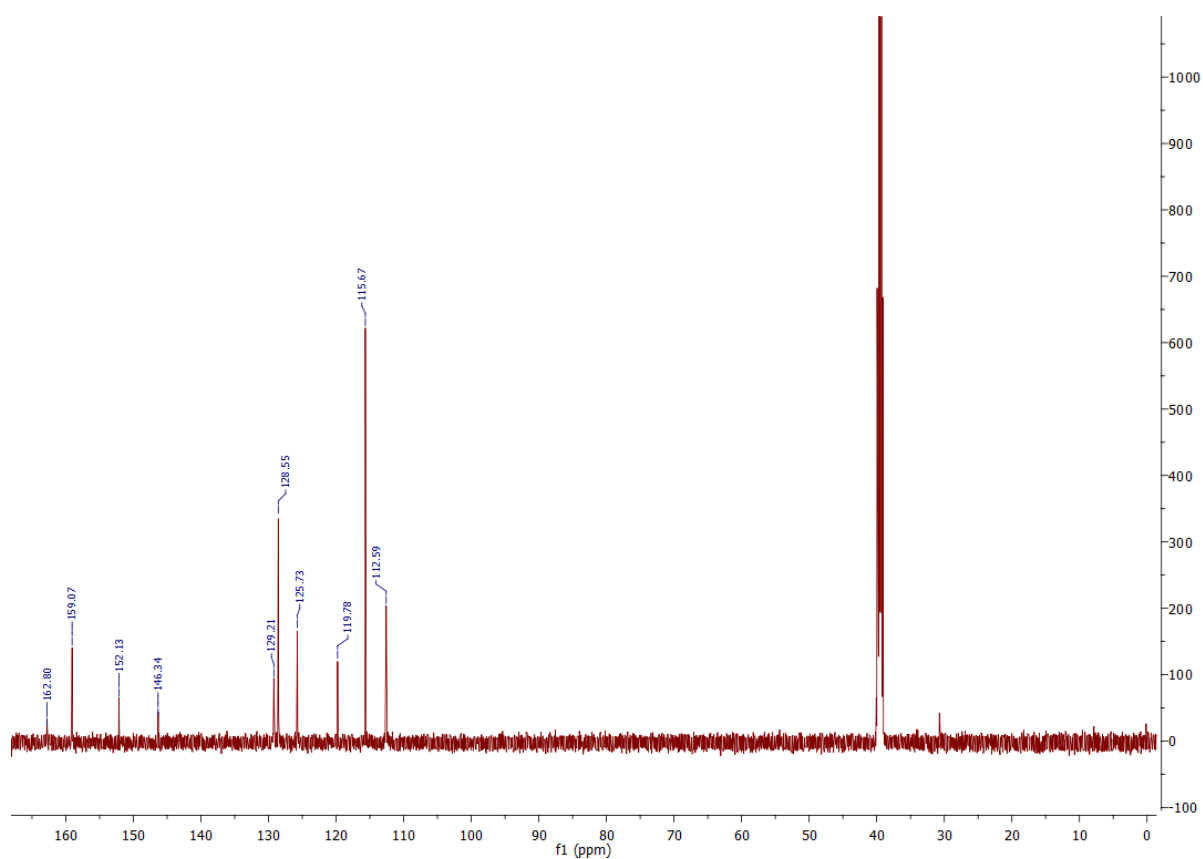
Fig 37. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14e****Fig 38.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14e**

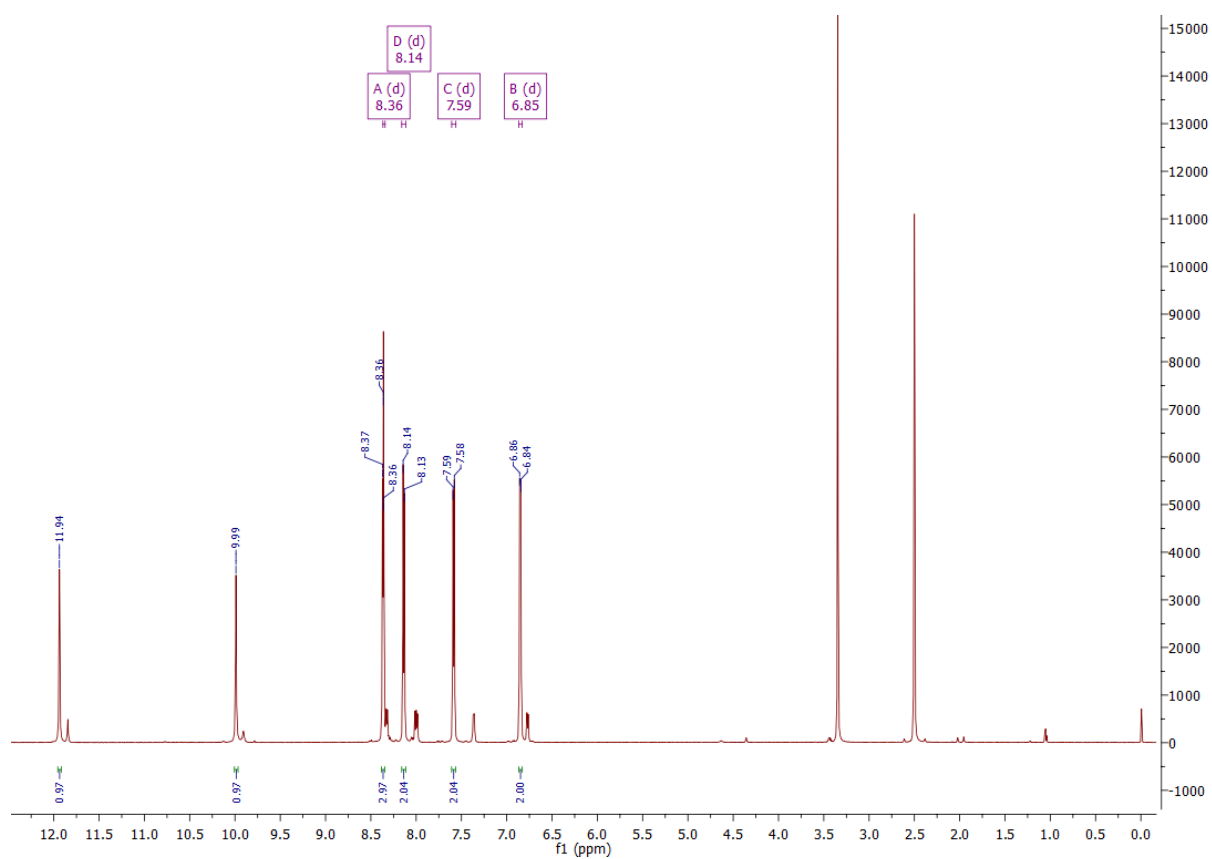
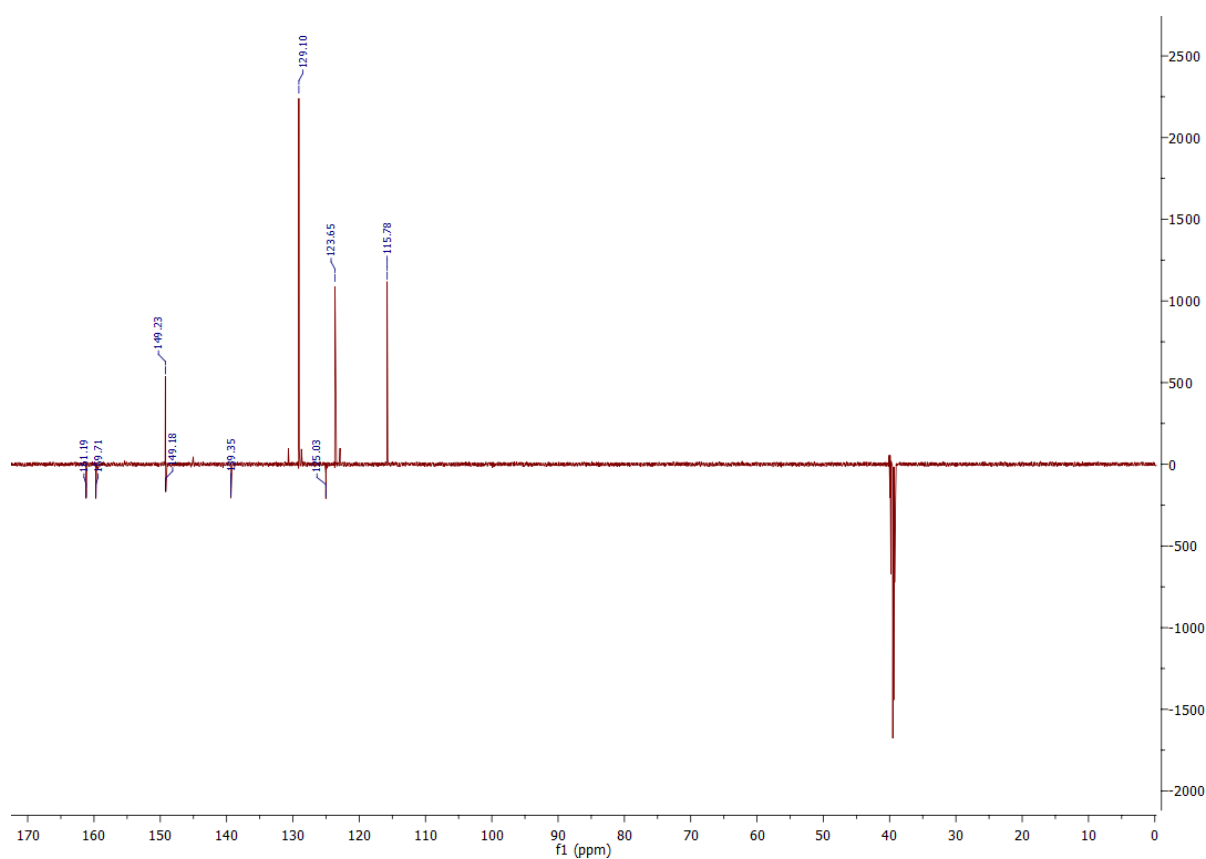
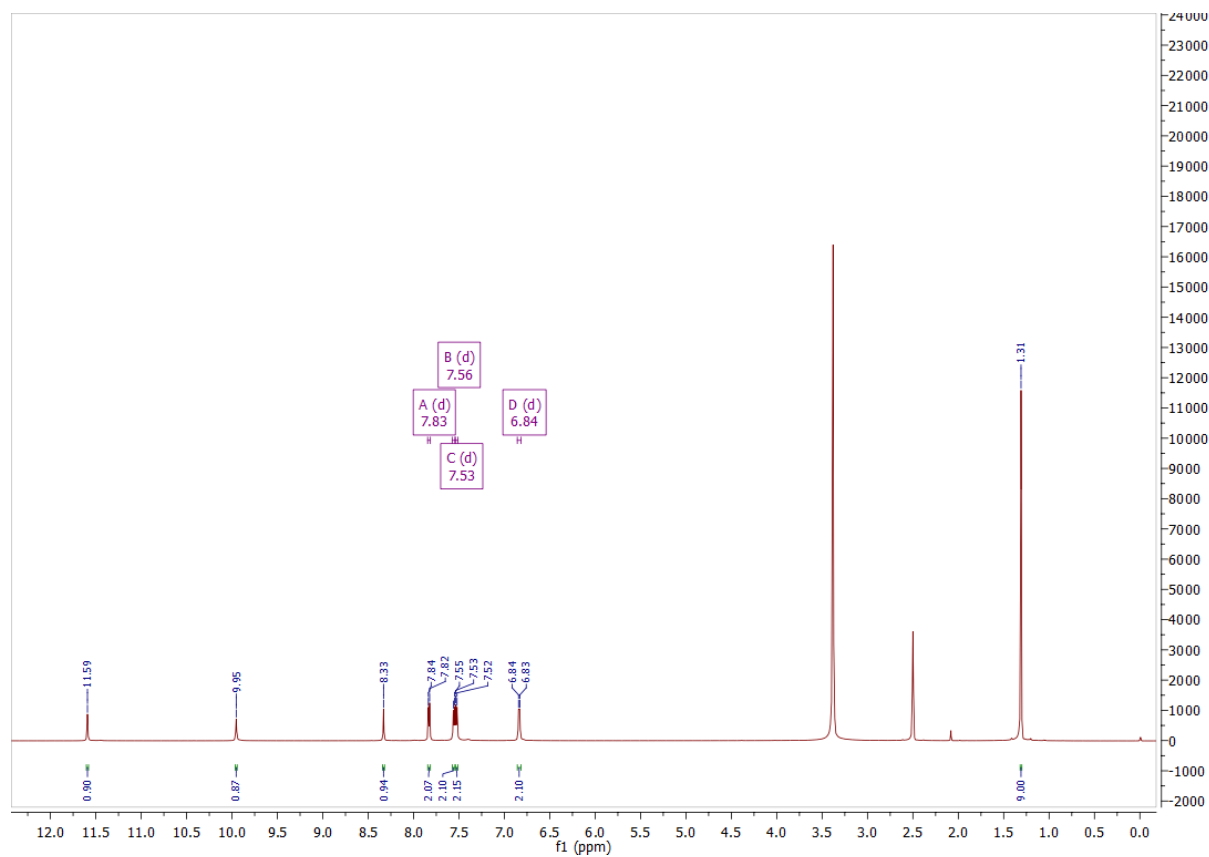
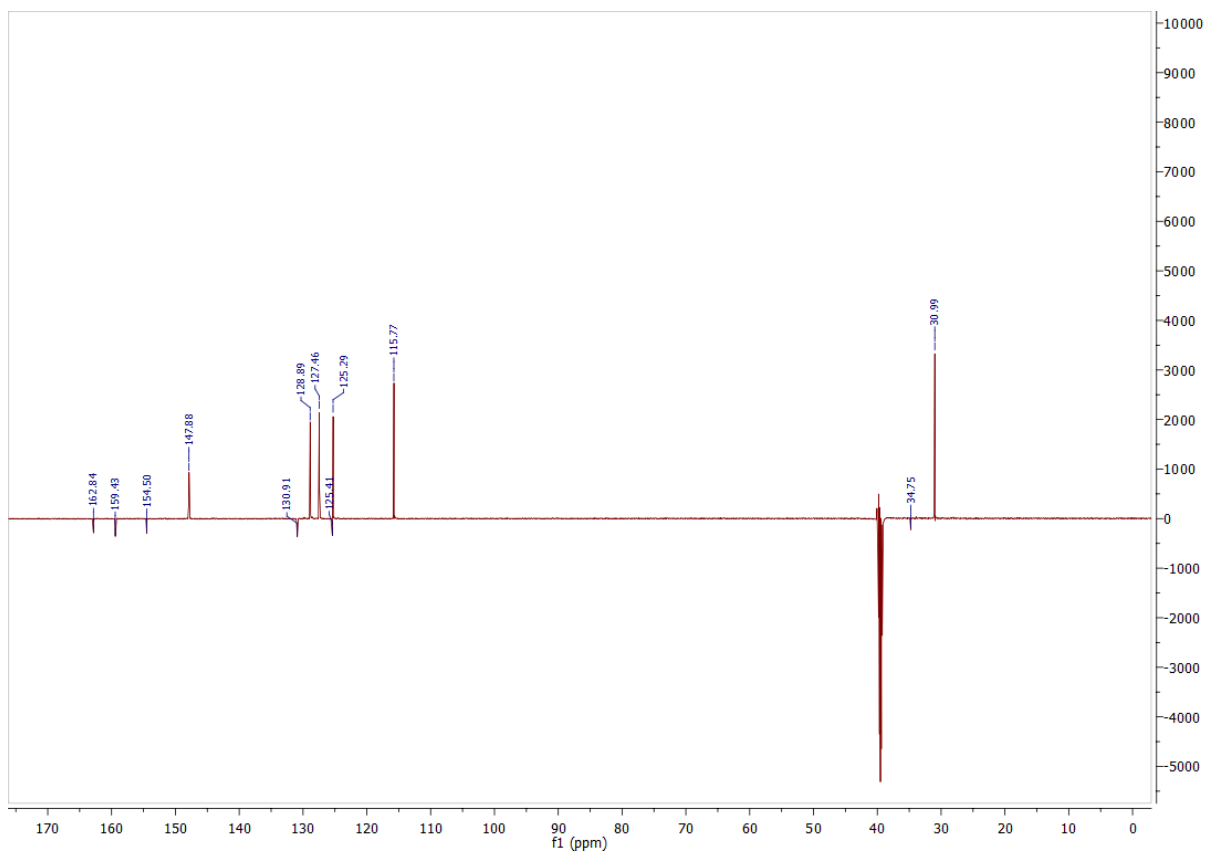
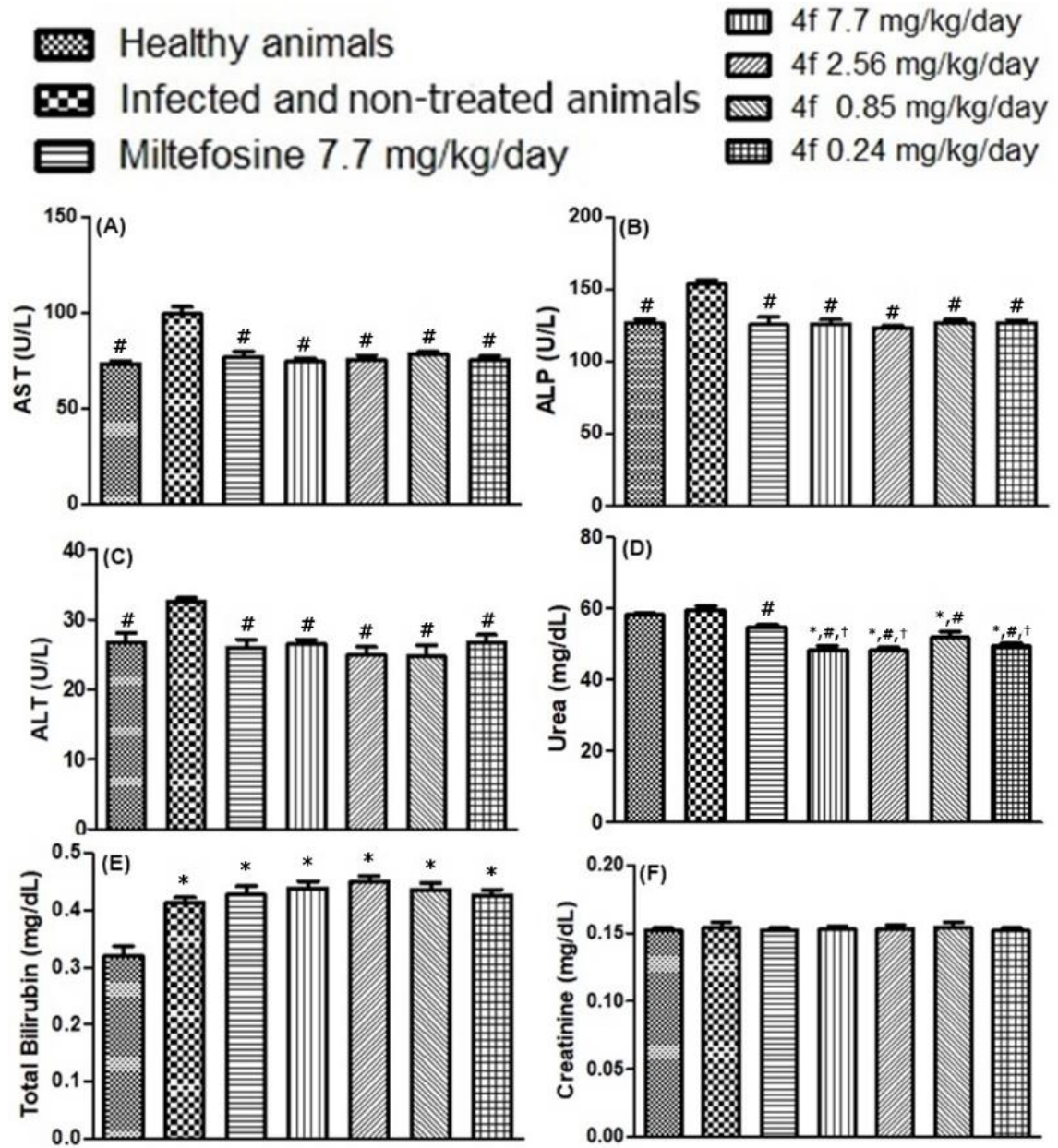
Fig 39. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14f****Fig 40.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14f**

Fig 41. ^1H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of compound **14g****Fig 42.** ^{13}C NMR spectrum (151 MHz, DMSO- d_6) of compound **14g**

S1 Fig. Clone pPICZαA_CPB2.8 #2 sequence. The clone was sequenced using α factor (TACTATTGCCAGCATTGCTGC) and reverse 3'AOX1(GCAAATGGCATTCTGACATCC), and the elements inserted on plasmid (EcoRI - blue and Sal I – grey, sites) were identified upstream and downstream of CPB2.8 gene, respectively



Physicochemical properties	Calculated values										
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4l	4m	4r
Num. heavy atoms	30	31	31	33	34	25	25	28	31	32	25
Num. arom. heavy atoms	23	23	23	23	23	17	17	17	17	17	15
Fraction Csp ³	0	0	0	0	0.15	0	0	0.06	0.06	0.23	0.22
Num. rotatable bonds	7	7	7	8	8	6	6	8	9	9	5
Num. H bond receptors	6	7	6	8	6	6	5	7	9	7	5
Num. H bond donors	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
Lipophilicity											
Log P _{ow} (iLOGP)	2.87	2.54	2.4	2.21	3.91	1.33	1.77	0.81	0.01	2.03	2.29
Solubility											
Water solubility (mg/mL)(ESOL)	1.11 e-3	1.59 e-3	2.59 e-3	2.95 e-3	4.74e-5	3.41 e-1	1.98 e-2	5.60 e-2	1.48 e-1	3.93 e-3	4.41 e-3
class	Moderately soluble	Moderately soluble	Moderately soluble	Moderately soluble	Poorly soluble	Soluble	Moderately soluble	Soluble	Soluble	Moderately soluble	Moderately soluble
Pharmacokinetics											
GI absorption	High	High	Low	Low	Low	High	Low	Low	Low	Low	High
BBB permeant	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
P-gp substrate	No	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No
CYP1A2 inhibitor	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Log <i>k_p</i> (skin permeation)	-5.21 cm/s	-5.56 cm/s	-5.79 cm/s	-6.10 cm/s	-4.37 cm/s	-6.42 cm/s	-6.10 cm/s	-6.10 cm/s	-7.59 cm/s	-5.86 cm/s	-5.14 cm/s
Druglikeness											
Lipinski	Yes;	Yes	Yes	Yes; 1 violation	Yes, 1 violation	Yes	Yes	Yes;	Yes; 1 violation	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation
Ghose	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Veber	Yes	Yes	Yes	No; 1 violation	Yes	Yes	No; 1 violation	No; 1 violation	No; 1 violation	No; 1 violation	Yes

Egan	Yes	Yes	Yes	No; 1 violation	Yes	Yes	No; 1 violation	No; 1 violation	No; 1 violation	No; 1 violation	Yes
Muegge	Yes	Yes	Yes	No; 1 violation	No	Yes	Yes	Yes	No; 1 violation	Yes	Yes
Bioavailability Score	0.56	0.56	0.56	0.11	0.56	0.56	0.56	0.56	0.11	0.56	0.56
<i>Medicinal chemistry</i>											
PAINS alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Synthetic accessibility	3.83	3.87	3.83	3.87	4.22	3.65	3.66	3.55	3.64	3.95	3.42

Table S1. ADME parameters. Pharmacokinetics: High and Low indicates gastrointestinal absorption; Yes and No indicates BBB (Blood Brain Barrier) permeation or P-gp (glycoprotein P). **Druglikeness:** Yes and No indicates that the molecule is according to all Lipinski, Ghose, Veber, Egan or Muegge descriptors. **Bioavailability Score:** Predict the probability of a compound to have at least 10% oral bioavailability in rat or measurable Caco-2 permeability, calculating the probabilities of 11%, 17%, 56% or 85%.

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, implicando em milhares de mortes anuais, sendo *P. falciparum* o agente etiológico da forma grave da doença, a qual pode levar os pacientes a óbito. Nesta etapa do trabalho, realizada dentro do programa CAPES-PrInt-UNESP, buscou-se ampliar a aplicação dos derivados furoxanos para este modelo experimental. Desta forma, realizou-se o *screening* dos compostos furoxanos frente a cepa de *P. falciparum* 3D7, geneticamente modificada (PfGCaMP3), a qual alberga o gene indicador de cálcio GCaMP3 (BORGES-PEREIRA; CAMPOS; GARCIA, 2014). O gene GCaMP3 compreende a proteína fluorescente verde GFP, de Green Fluorescent Protein, fusionada à calmodulina (CaM) e ao peptídeo M13, uma sequência peptídica da quinase de cadeia leve da miosina o qual estabiliza a forma protonada da calmodulina na presença de cálcio (CHEN et al., 2013).

Este capítulo mostra estes resultados obtidos durante o estágio sanduíche na Rutgers, New Jersey Medical School, Estados Unidos, sob orientação do Drº Andrew Thomas (<https://njms-web.njms.rutgers.edu/profile/myProfile.php?mbmid=thomasap>) e co-orientação da Drª Paula Barlett (<https://njms-web.njms.rutgers.edu/profile/myProfile.php?mbmid=bartlepj>).

2 METODOLOGIA

2.1 Cultivo, sincronização e obtenção de *P. falciparum*

A cepa de *P. falciparum* 3D7 (PfGCaMP3) foi cultivada em frascos de cultura (175 cm²) com meio RPMI1640 (Sigma) suplementado com AlbuMAX II (Thermo Fisher) 0,5%, hipoxantina (Sigma) 0,1 mM, bicarbonato de sódio (Sigma) 0,2%, WR 99210 (Sigma) 5 mmol L⁻¹, gentamicina 500 mcg mL⁻¹ e HEPES 1M, pH 7.4, com 5% de hematócrito em atmosfera de 90% N₂; 5% O₂, 5% CO₂ à 37°C. O sangue do tipo O⁻ utilizado foi doado pelo banco de sangue do Hospital Universitário da Escola de Medicina, Rutgers University e lavado com meio RPMI1640 incompleto (sem AlbuMAX II). Os parasitas foram sincronizados pelo tratamento com sorbitol (5%); para isso, o

meio de cultura foi removido de culturas de parasitas não-sincronizados, adicionando-se sorbitol seguido por incubação por 10 minutos. A cultura foi centrifugada (1000 xg , 3 minutos), lavada com o mesmo volume de meio de cultura, seguido de nova centrifugação. O *pellet* contendo os parasitas sincronizados foi ressuspensionado em meio completo, sendo adicionado gás (90% N_2 ; 5% O_2 , 5% CO_2) e incubado por 12-16 h para obtenção de uma população homogênea de trofozoítas. A análise das formas parasitárias presentes na cultura é avaliada realizando um esfregaço delgado, seguido por coloração de Giemsa.

Os parasitas isolados foram obtidos pela adição de saponina 0.01%, seguida da agitação por inversão do tubo (40 segundos), centrifugação (970 xg , 3 min.), descarte do sobrenadante e lavagem com tampão salino-fosfato (PBS - Bio Rad) 1X para eliminação do eritrócito e do vacúolo parasitóforo, sem danificar a integridade da membrana plasmática do parasito (ANSORGE et al., 1996).

2.2 Screening via ensaio da lactato-desidrogenase (LDH)

A inibição do crescimento parasitário pelos derivados furoxanos foi avaliada utilizando uma cultura de parasitas sincronizados no estágio trofozoíta, contendo 2% de hematócrito e 0.25% de parasitemia. Os compostos foram adicionados em placas de 96 poços de poliestireno, transparente, inicialmente a 10 μM (volume final de 100 μL por poço), em seguida os que apresentaram inibição maior que 50%, foram adicionados na concentração de 10 – 0.07 μM (diluição 1:2) e incubados por 72 h em atmosfera contendo 90% N_2 ; 5% O_2 , 5% CO_2 à 37°C. Após a incubação, as placas foram congeladas em freezer - 80°C por 24 h, seguido de descongelamento por no mínimo 3 h para leitura. Eritrócitos não-infectados ou infectados e não-tratados foram adicionados em triplicata ao experimento como controles experimentais. Cloroquina (Sigma) foi utilizada como fármaco de referência.

Para avaliar a atividade da enzima lactato-dehidrogenase (LDH), 100 μL de uma mistura reacional contendo 1M de lactato, 10 mM de APAD (3-acetil piridina adenina dinucleotídeo), 5 mM de azul de nitrotetrazólio (NBT), 200 $\mu g mL^{-1}$ (1U mL^{-1}) de diaforase, 0,5% de Tween 20 e 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0), foi previamente adicionada na placa do experimento. A absorbância (650 nm) foi lida no leitor de placas FlexStation[®] 3 (Molecular devices), por 1h com 30 segundos de intervalo entre

cada leitura. Devido à correlação entre a viabilidade do parasita e a atividade enzimática da LDH, a velocidade máxima de fluorescência detectada no leitor diminuiu como resultado da toxicidade do composto.

Os dados de absorvância foram normalizados pela cultura infectada e não-tratada e representados como porcentagem de inibição do crescimento. A linha de base obtida dos poços referente aos eritrócitos não-infectados foi subtraída para normalização das culturas infectadas não-tratadas. Os valores correspondentes ao pico de absorvância observados após a leitura das placas foram obtidos e a concentração efetiva para inibir 50% do crescimento parasitário (EC₅₀) foi calculada por regressão não-linear utilizando o Software Graphpad Prism. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

2.3 Avaliação de alterações morfológicas em PfGCaMP3 frente a compostos furoxanos com atividade anti-plasmódio

Para investigar potenciais efeitos de compostos furoxanos com atividade anti-*Plasmodium* no desenvolvimento do ciclo intra-eritrocítico, parasitas sincronizados (1% de anéis) foram cultivados por 48h na presença do veículo (DMSO 0,1%) ou dos controles experimentais **E64** (*N*-[*N*-(*L*-3-*trans*-carboxyirane-2-carbonyl)-*L*-leucyl]-agmatine), ou cloroquina, nas concentrações correspondentes a 3X o IC₅₀. As amostras foram coletadas a cada 12 horas e avaliadas pela confecção de esfregaços delgados corados por Giemsa, seguido de observação sob microscópio óptico comum utilizando-se objetivas de imersão (PRASAD et al., 2013).

2.4 Efeito dos compostos anti-*Plasmodium* na hidrólise de hemoglobina

Para verificar o potencial efeito dos compostos furoxanos anti-*Plasmodium* na hidrólise da hemoglobina, seguiu-se a metodologia de Prasad e colaboradores (2013) com modificações. Brevemente, 100 mL de cultura sincronizada para formas trofozoítas de *P. falciparum* (9% parasitemia) foi dividida em quatro partes iguais; DMSO (0,2%) foi adicionado em uma parte e os compostos furoxanos, bem como as drogas controles **E64**, e cloroquina, nas concentrações correspondentes a 3X o IC₅₀ foram adicionados nas três partes restantes.

Os parasitas foram cultivados por dez horas e, após este período, isolados nas mesmas condições descritas anteriormente no tópico "Cultivo, sincronização e

obtenção de *P. falciparum*.” Ao *pellet* resultante, foi adicionado 1 mL de tampão de lise contendo SDS 10%, DTT 1 mM, inibidor de fosfatases *Phosphatase Arrest III* 1X, inibidor de proteases *Protease Inhibitor Cocktail V* 1X, pepstatina A 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e benzamidina 1mM. Em seguida, foi realizada lise mecânica com seringa e agulha (20 G) e uma alíquota retirada para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (WATERBORG; MATTHEWS, 1994). À amostra restante, foi adicionado 20 μL de tampão de amostra Laemmli 5X (SDS 10%, beta mercapto-etanol 25%, glicerol 50%, Tris-HCl pH 6.8 312 mM, 0,0125% azul de bromofenol), em seguida a amostra foi fervida por 10 min, centrifugada a 27000 xg por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado em gel de SDS-PAGE (15%). O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) por 1 hora e descorado com água por 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicatas independentes.

2.5 Ensaios de homeostase do cálcio em PfGCaMP3

Para os ensaios de verificação da homeostase do cálcio celular, os parasitas foram sincronizados 12-16 h antes do experimento, para obtenção de uma cultura homogênea de trofozoítas. A cultura foi centrifugada e enriquecida para células infectadas por parasitas utilizando um sistema magnético manual (VarioMacs®) para separação das células parasitadas baseada na presença da hemozoína, a qual se liga fortemente à coluna magnética do sistema. Em seguida, os eritrócitos parasitados foram eluídos, centrifugados, ressuspensos em 3 mL de meio de cultura e incubados sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Lamínulas circulares de 25 cm^2 , foram dispostas em placas de 6 poços, e adicionadas Cell-Tak (Corning) por 90 minutos. Após este período, 100 μL da cultura enriquecida foi centrifugada e ressuspensa em tampão Hank's contendo HEPES: NaCl 138 mM, NaHCO_3 4,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, HEPES 10 mM, glicose 5 mM, 1x sal de Hank's (KCl 0,4 mg mL^{-1} , MgSO_4 98 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e 1x Tampão fosfato de Hank's (NaH_2PO_4 48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, KH_2PO_4 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pH 7.4, mantido a 37°C, aplicadas sobre o Cell-Tak e incubadas por 30 min a temperatura ambiente para adesão das células. Em seguida, as lamínulas recobertas com as células foram inseridas nas câmaras de leitura e lavadas 2X, como o mesmo tampão contendo 0,25% de albumina soro-bovina

(BSA) e ressuspendidas em 3 mL do mesmo tampão para as análises em microscópio de fluorescência.

Os experimentos de homeostase do cálcio foram realizados em microscópio invertido de epifluorescência Nikon Eclipse TE300. As imagens foram obtidas em 1 Hz com o software NIS Elements (Nikon), utilizando objetiva de 40X aquecida (37°C), com óleo de imersão através de uma câmera EM-CCD (Hamamatsu Photonix Image EM), com excitação de 488 nm e emissão de 510 nm, correspondentes ao sinal do GCaMP3. O sinal foi captado a cada 3 segundos e os valores correspondentes de fluorescência foram exportados em planilhas do Microsoft Office Excel, e as análises realizadas no software MATLAB®, através de um *script* próprio do laboratório (BORGES-PEREIRA et al., 2020).

Além dos furoxanos, foram utilizados nas análises o ácido ciclopiazônico (CPA) 10 μ M (Cayman Chemical), ionomicina 10 μ M (Alomone Labs), nigericina 10 μ M (Sigma), dietilamina-NONOato (Sigma) 10 μ M. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

2.6 Ensaios de homeostase do cálcio em hepatócitos murinos

Os estudos em animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Rutgers, New Jersey Medical School Camundongos machos C57BL/6N (pesando 20-25 g; Taconic Biosciences, Rensselaer, NY, USA) expressando o marcador de cálcio GCaMP6 foram alojados em gaiolas ventiladas sob ciclo claro/escuro de 12:12 h. Os animais receberam acesso *ad libitum* à ração e água até o dia do experimento. Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital (60 mg/kg) diluído 1:1 com PBS 1X e os sinais vitais foram monitorados durante todo o procedimento. A profundidade da anestesia foi avaliada pelo relaxamento do tônus muscular e pela perda de respostas reflexas ao estímulo externo.

Os hepatócitos foram isolados por perfusão de collagenase de fígado em duas etapas, como descrito por Thomas e colaboradores (1991) e Rooney e colaboradores (1989) (ROONEY; SASS; THOMAS, 1989; THOMAS; RENARD; ROONEY, 1991). Hepatócitos (7×10^5) foram plaqueados em lamínulas de vidro (25 cm²) contendo William's E Medium (Thermo Fisher Scientific) suplementado com glutamina 2 mM,

penicilina 10 U mL⁻¹ (Lonza), estreptomicina 10 mg mL⁻¹ (Lonza) e gentamicina 50 mg mL⁻¹ (Sigma). Em seguida, foram cultivados *overnight* para aderência e suplementados com soro fetal bovino 5% (v/v) (Gemini Bio-Products) e insulina 140 nM (Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% O₂ a 37°C, até o momento do uso.

O meio foi então removido, seguido de adição de 3 mL tampão Hank's contendo BSA (conforme descrito no tópico anterior) para análise da homeostase do cálcio no microscópio invertido de epifluorescência Nikon Eclipse TE300. As imagens foram obtidas em 1 Hz com o software NIS Elements (Nikon), utilizando objetiva de 20X, através de câmera EM-CCD (Hamamatsu Photonix Image EM), com excitação de 488 nm e emissão de 510 nm, correspondentes ao sinal do GCaMP3. Os valores correspondentes de fluorescência foram exportados para planilhas (Microsoft Office Excel), e as análises realizadas no software MATLAB®, através de um *script* próprio desenvolvido no laboratório (BORGES-PEREIRA et al., 2020).

2.7 Análise Estatística

A significância estatística entre as médias dos diferentes grupos experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas entre os grupos foi quantificada usando o teste de Bonferroni (BORGES-PEREIRA et al., 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

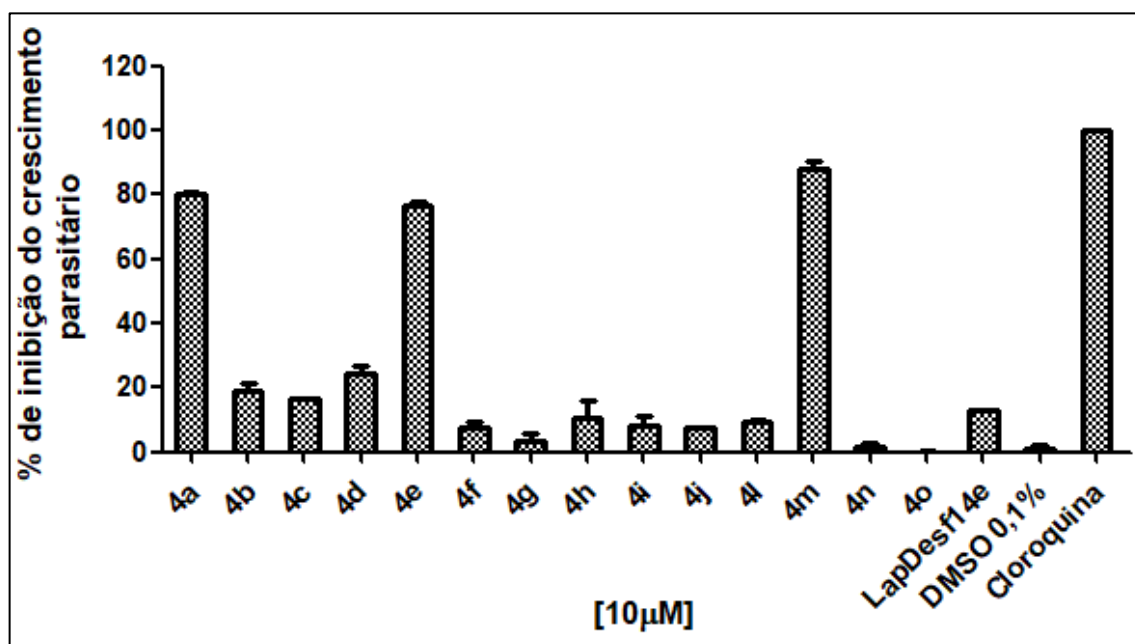
3.1 O furoxano 4m apresentou atividade antiparasitária frente à cepa PfGCaMP3

O *screening* da atividade antiparasitária na presença de 10 µM de 12 furoxanos (**4a-o**) e oito benzofuroxanos (**4p-z**) foi realizado pelo ensaio de inibição da LDH. A LDH é uma enzima citosólica envolvida na glicólise para a produção de ATP e distingue-se da LDH humana por sua capacidade aumentada de converter L-lactato em piruvato através da coenzima 3-acetil piridina adenina dinucleotídeo a uma taxa cerca de 200 vezes mais rápida em comparação com as isoformas humanas (SANZ et al., 2012). O ensaio de atividade da LDH de *P. falciparum* (PfLDH) tem sido usado para substituir os ensaios *in vitro* que requerem hipoxantina radiomarcada na medição

da toxicidade do composto em análise, como também é realizado como uma alternativa eficaz à microscopia de luz no estudo do crescimento do parasita, apresentando maior especificidade e menos subjetividade (MAKLER; PIPER; MILHOUS, 1998; DELHAES et al., 1999).

A Figura 1 mostra que os furoxanos **4a**, **4e** e **4m** apresentaram capacidade de inibir em 80% o crescimento parasitário similar à cloroquina, enquanto o protótipo **Lapdesf14e** não apresentou atividade significativa nesta inibição.

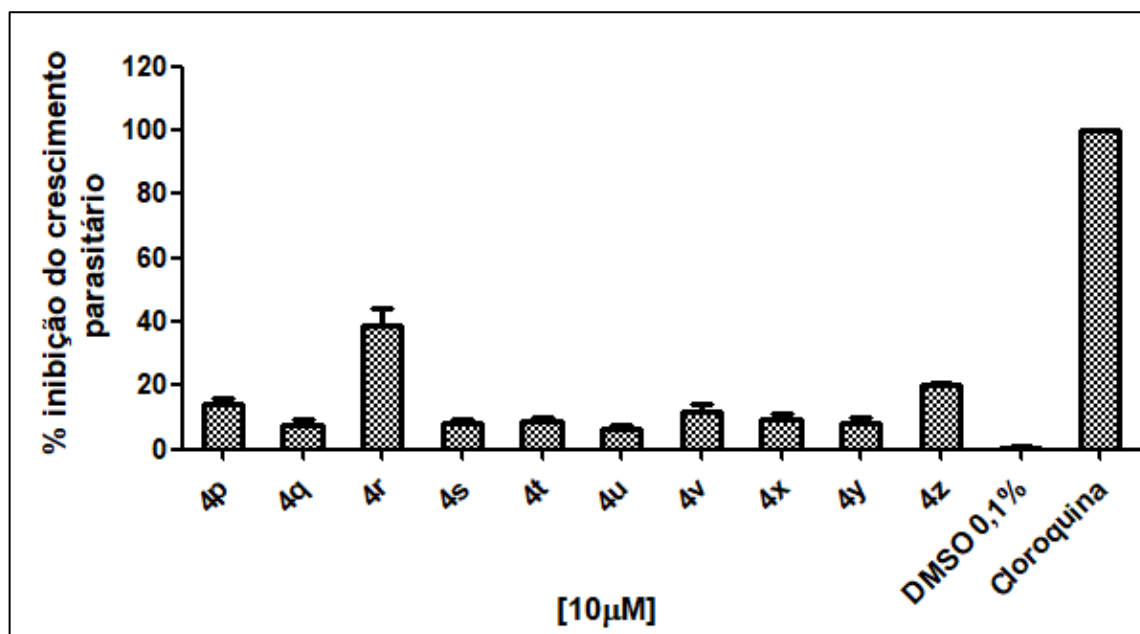
Figura 1. Inibição do crescimento da cepa PfGCAMP3 pelos derivados furoxanos.



Parasitas PfGCAMP3 sincronizados, em estágio trofozoíta, foram tratados com 10 μ M dos furoxanos (**4a-o**); incubados por 72h em 90% N₂; 5% O₂, 5% CO₂ à 37°C, seguido de congelamento à - 80°C por 24 h, descongelamento por 3h e leitura pelo ensaio da PfLDH. O pico de fluorescência correspondente a atividade máxima da PfLDH foi obtida e subtraída da linha de base correspondente aos eritrócitos não infectados. Dados expressos em % de inibição $\pm$ desvio padrão, em triplicata, normalizado pelos eritrócitos infectados e não tratados (100% de parasitas vivos). Cloroquina foi usada como fármaco controle e DMSO 0,1% como controle negativo e veículo.

Para os benzofuroxanos, apenas o composto **4r** apresentou inibição significativa, em torno de 40% do crescimento parasitário (Figura 2).

Figura 2. Inibição do crescimento de *P. falciparum* pelos derivados benzofuroxanos.



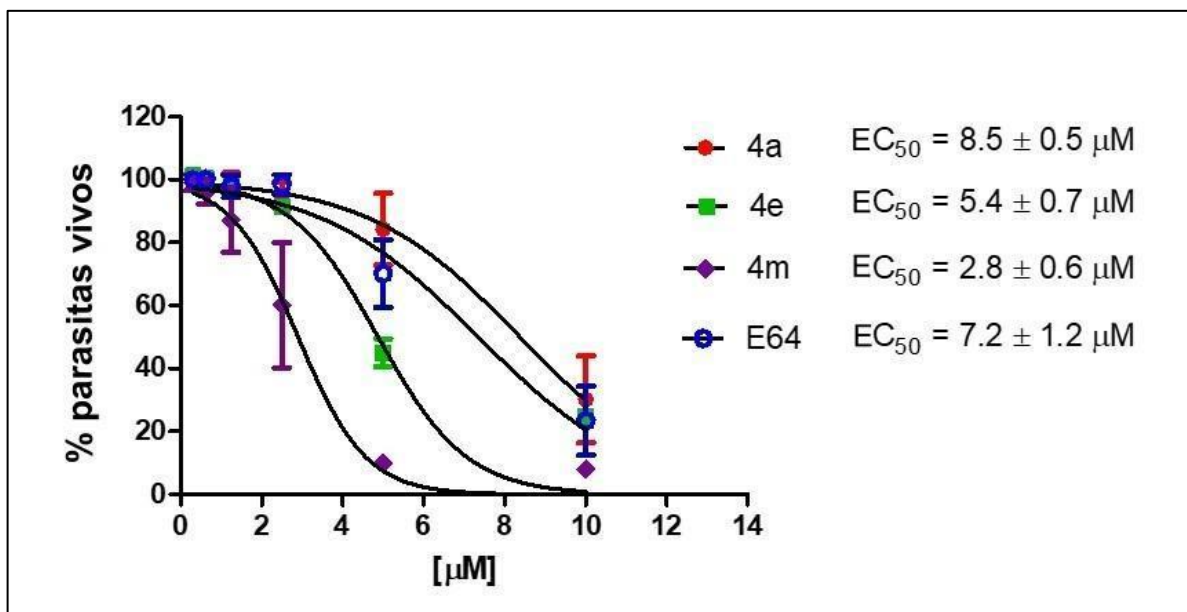
Parasitas PfGCAMP3 sincronizados, em estágio trofozoíta, foram tratados com 10 μ M dos benzofuroxanos (**4p-z**); incubados por 72 h em 90% N₂; 5% O₂, 5% CO₂ à 37°C, seguido de congelamento à - 80°C por 24h, descongelamento por 3h e leitura pelo ensaio da PfLDH. O pico de fluorescência correspondente a atividade máxima da PfLDH foi obtida e subtraída da linha de base correspondente aos eritrócitos não infectados. Dados expressos em % de inibição $\pm$ desvio padrão, em triplicata, normalizado pelos eritrócitos infectados e não tratados (100% de parasitas vivos). Cloroquina foi usada como fármaco controle e DMSO 0,1% como controle negativo e veículo.

Desta forma, selecionou-se os furoxanos **4a**, **4e** e **4m** para dar continuidade aos estudos de mecanismos de ação antiparasitária destas moléculas. Embora **4a**, **4e** e **4m** tenham apresentado níveis de inibição semelhante a 10 μ M, os valores de EC₅₀ destes compostos são distintos, sendo o composto **4m** (EC₅₀ = 2,8 $\pm$ 0,6 μ M) o mais potente, seguido por **4e** (EC₅₀ = 5,4 $\pm$ 0,7 μ M) e **4a** (EC₅₀ = 8,5 $\pm$ 0,5 μ M) (Figura 3).

Considerando que estes compostos possuem atividade inibitória frente a cisteína protease de *Leishmania* (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021); decidiu-se investigar se estas moléculas também são capazes de inibir proteases de *P. falciparum*. Importante destacar que as cisteína proteases deste parasita, as falcipainas, são da família da papaína, assim como a CPB de *Leishmania*, possuindo papel fundamental na degradação de hemoglobina dentro do vacúolo parasitóforo, sendo FP-2 e FP-3 as principais enzimas envolvidas neste processo, compartilhando os mesmos substratos e possuindo elevada similaridade estrutural (ROSENTHAL, 2011).

O composto **E64** foi incluído no ensaio de dose resposta, uma vez que este composto é sabidamente inibidor competitivo de proteases, incluindo as falcipainas (PRASAD et al., 2013).

Figura 3. Curva de dose resposta para os furoxanos 4a, 4e, 4m e para o inibidor de proteases E64.



Parasitas PfGCAMP3 sincronizados, em estágio trofozoíta, foram tratados com **4a**, **4e**, **4m** e **E64**, nas concentrações de 10 – 0.07 μM (diluição 1:2), incubados por 72 h em 90% N₂; 5% O₂, 5% CO₂ à 37°C, seguido de congelamento à - 80°C por 24 h, descongelamento por 3 h e leitura pelo ensaio da PfLDH. O pico de fluorescência correspondente a atividade máxima da PfLDH foi obtida e subtraída da linha de base correspondente aos eritrócitos não infectados. Dados expressos em % de inibição ± desvio padrão, de três experimentos independentes, realizados em triplicata, normalizado pelos eritrócitos infectados e não tratados (100% de parasitas vivos). EC₅₀-cloroquina = 11.9 ± 2.5 nM.

Os compostos furoxanos e derivados são conhecidos por apresentarem diferentes atividades biológicas descritas na literatura, como anti-*Trypanosoma* (BOIANI, et al. 2008); anti-*Schistosoma* e anti-*Ancylostoma* (MOTT, et al., 2012); anti-câncer e anti-bacteriana (CERECETTO; PORCAL, 2005); como também anti-*Plasmodium spp.* (GALLI et al., 2005; VICENTE et al., 2008; GIL et al., 2014). Para a cepa de *P. falciparum* aqui estudada, observamos que os compostos fenil- e amida-furoxanos (**4a**, **4e** e **4m**) apresentaram melhor atividade que os benzofuroxanos (**4p-z**), similar ao perfil de anti-*Leishmania* previamente observado para estes compostos (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021). Embora para *Leishmania* **4e** (EC₅₀ = 0,6 ± 0,1 μM) tenha sido identificado como o composto mais potente, verificou-se aqui que **4m** (EC₅₀ = 2,8 ± 0,6 μM) é o mais potente frente à *P. falciparum*, mas apresentando

também atividade anti-*Leishmania* ($EC_{50} = 6,4 \pm 1,1 \mu M$). Os compostos **4m** e **4e** são estruturalmente similares, exceto pela ligação de uma amida ou de um grupamento fenil, respectivamente ligadas ao *N*-óxido destas moléculas, o que pode estar favorecendo a atividade anti-*Plasmodium* aqui observada.

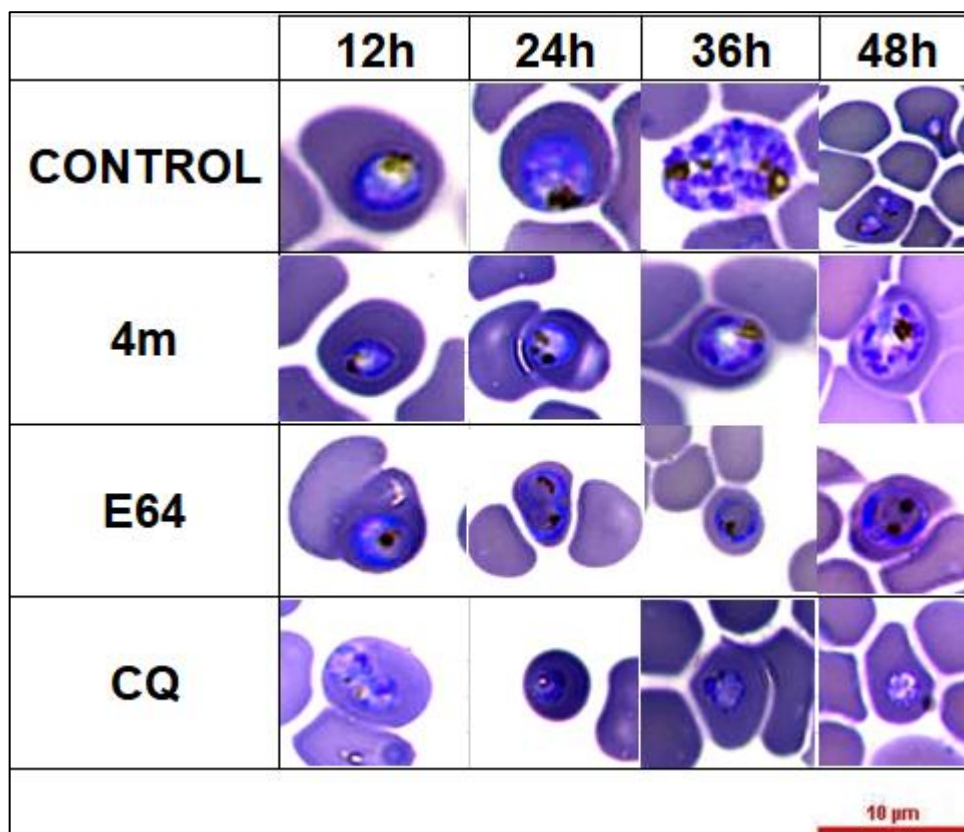
Os compostos estudados neste trabalho possuem em sua estrutura o grupo *N*-acil-hidrazona, conhecido por sua capacidade de inibição de cisteíno proteases em *Leishmania* (DE ALMEIDA, 2017; MORAES et al., 2018; UPEGUI ZAPATA et al., 2020; DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021); assim, para contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação deste amida-furoxano **4m**, avaliou-se seu potencial em inibir as falcipainas de *P. falciparum*.

3.1 4m não altera a morfologia do vacúolo digestivo e não causa acúmulo de hemoglobina não degradada em PfGCaMP3

Como dito anteriormente, as falcipainas de *P. falciparum* desempenham papel crucial na hidrólise da hemoglobina (MISHRA; SINGH; SINGH, 2019). De acordo com Prasad e colaboradores (2013), a inibição de enzimas que hidrolisam hemoglobina no vacúolo parasitóforo, levam a alteração morfológica do parasita, associada à produção de entumescimento do vacúolo digestivo em decorrência do acúmulo de hemoglobina não degradada, passível de visualização por esfregaço delgado corado por Giemsa.

Na Figura 4, observa-se o efeito do composto **4m**, assim como dos controles **E64**, cloroquina e DMSO (controle). Para **E64** é nítido que a morfologia do parasita é alterada, sendo possível observar de forma mais clara após 36h um entumescimento correspondente a acumulação de hemoglobina não degradada devido a inibição das proteases, enquanto que para **4m** não é possível observar o mesmo efeito. Da mesma forma, o tratamento com cloroquina não apresenta morfologia semelhante à de **E64**, uma vez que embora atue no vacúolo digestivo, age no parasita por inibição da formação de hemozoína.

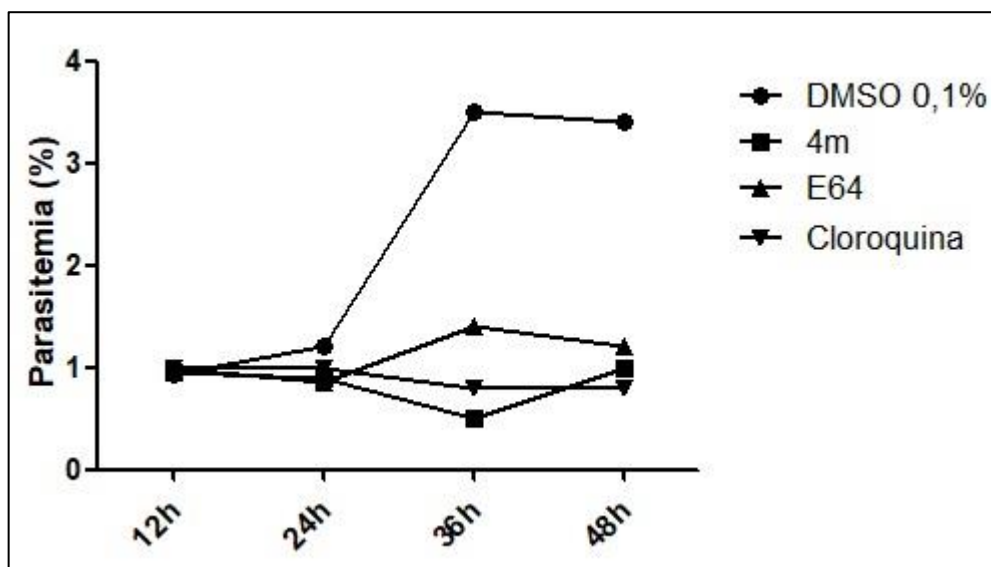
Figura 4. Morfologia dos parasitas tratados com 4m, E64, CQ (cloroquina) e DMSO (controle).



Uma cultura de parasitas (1% de parasitemia, concentração inicial) sincronizados para estágio de anel, foram tratados com 27 μ M E64, 6 μ M 4m, 0.624 μ M cloroquina ou DMSO 0,1% (controle). A morfologia dos parasitas foi analisada através de esfregaços corados com Giemsa em diferentes pontos após o início do tratamento. É possível observar um alargamento do vacúolo digestivo para o tratamento com **E64**, ocupando quase o parasita inteiro especialmente em 24h. Para **4m** não é possível observar o mesmo efeito, assim como para a cloroquina que atua no vacúolo digestivo, porém com outro mecanismo de ação.

O efeito do inibidor competitivo de proteases **E64** foi observado por outros pesquisadores, sendo descrito uma anormalidade do vacúolo digestivo associado ao entumescimento conforme observado neste trabalho, com efeito evidente após 24h de tratamento dos parasitas com o composto (MOURA et al., 2009; SIJWALI; ROSENTHAL, 2004; PRASAD et al., 2013). A parasitemia foi calculada, ficando em torno de 1% indicando que **4m** causou retardo na progressão do ciclo celular ao final do tratamento em 48h, fato observado também para **E64** e cloroquina (Figura 5A).

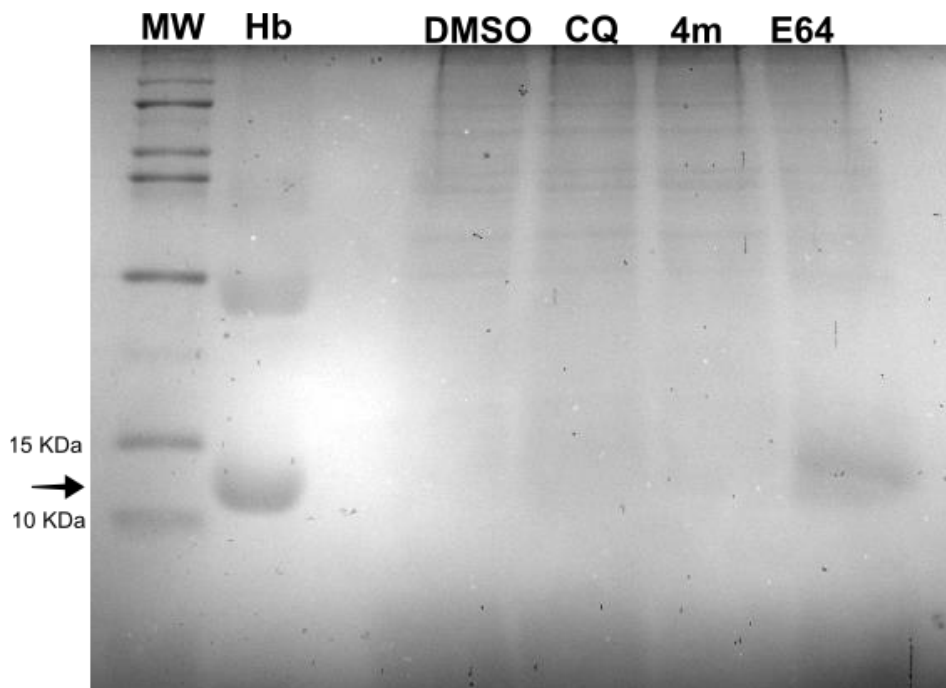
Figura 5. Análise da parasitemia e estágio parasitário em diferentes pontos do tratamento com 4m, E64, CQ e DMSO.



Uma cultura de parasitos (1% de parasitemia, concentração inicial) sincronizados, foram tratados com 27 μ M E64, 6 μ M 4m, 0.624 μ M cloroquina ou DMSO 0,1% (controle). **A** - Parasitemia ([número de eritrócitos infectados/número de eritrócitos totais] x100). Experimento realizado uma vez, com contagem de seis campos distintos para cálculo de parasitemia e observação dos estágios do parasita.

Para determinar se o efeito observado de **4m** na morfologia do parasita está associado ao acúmulo, mesmo que mínimo, de hemoglobina não degradada como observado após o tratamento com **E64**, o lisado de parasitas tratados com ambos compostos foi analisado por SDS-PAGE 15%. Apenas para o tratamento com **E64** é possível observar uma banda referente a acumulação de hemoglobina (Hb) não degradada, enquanto que para o tratamento com **4m**, cloroquina (CQ) ou DMSO 0,2% não é observada nenhuma banda (Figura 6).

Figura 6. Acumulação de proteínas não degradadas em parasitas tratados com DMSO 0,2%, cloroquina (CQ), 4m e E64 observadas por SDS-PAGE.



Culturas homogêneas de parasitas (9% parasitemia) em estágio trofozoíta foram tratados por 10 h na presença de DMSO 0,2%, 27 μ M E64, 6 μ M 4m ou 0.624 μ M cloroquina, concentrações correspondentes a aproximadamente 3X o EC_{50} . Os parasitas foram obtidos através de tratamento com saponina 0.01%, seguido de lavagem com PBS 1X, lise mecânica e fervura das amostras e separação do lisado contendo 150 μ g de proteínas totais em gel de SDS-PAGE 15%. É possível observar que apenas para o tratamento com **E64** há uma banda entre 10KDa e 15KDa, indicada pela seta, correspondente ao mesmo perfil da canaleta contendo apenas hemoglobina (Hb), não sendo observadas bandas na mesma altura para os tratamentos com **4m**, cloroquina (CQ) ou DMSO 0,2% (veículo). MW: Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher). O experimento foi realizado em duplicatas independentes, analisado em mais de um gel, com resultados reprodutíveis.

Desta forma, os resultados obtidos (Figuras 4 e 6) sugerem que as falcipainas não correspondam ao alvo molecular principal. Isto posto, é importante realizar outros estudos para determinação do IC_{50} de **4m** frente às formas recombinantes das falcipainas FP-2 e FP-3 de *P. falciparum*. Para isso, estabeleceu-se colaboração com o grupo do Dr. Phillip Rosenthal da Universidade da Califórnia, São Francisco, Estados Unidos, para estas análises.

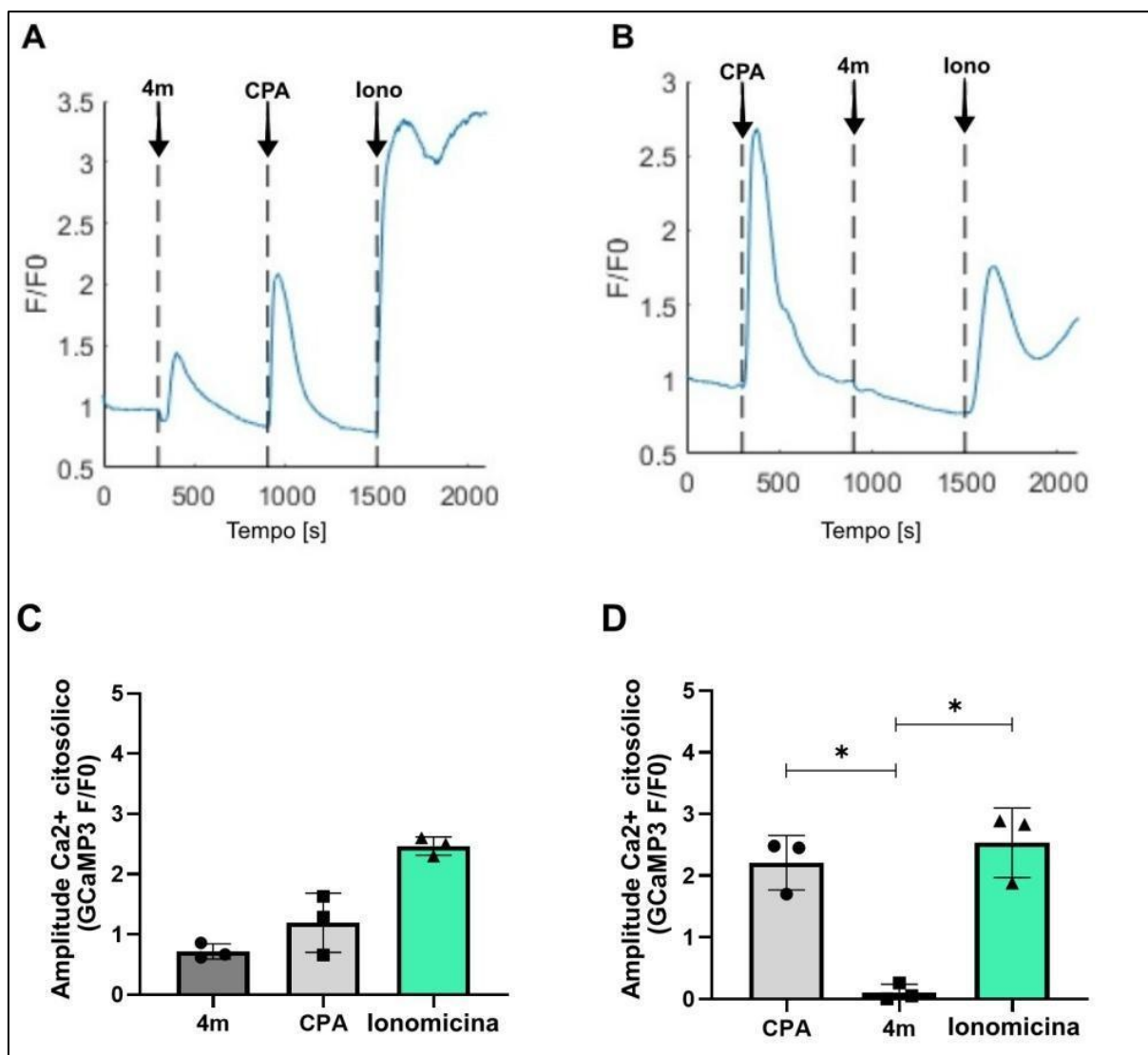
3.2 4m é capaz de mobilizar cálcio proveniente do retículo endoplasmático e também acidificação do citosol em *P. falciparum*.

Foi relatado por nosso grupo que o furoxano **13b**, precursor de **LapDesf14e** pode levar a alterações na homeostase do cálcio intracelular em *Leishmania*, o que aumentou a probabilidade de que **4m** poderia estar atuando neste alvo (DE ALMEIDA, 2017).

Portanto, foi avaliada a capacidade de **4m** em causar alteração na homeostase do cálcio intracelular em *P. falciparum*. Uma única adição com 10 μ M de **4m** foi realizada, seguido da adição de 10 μ M de ácido ciclopiazônico (CPA), para esgotar o cálcio do retículo endoplasmático e 10 μ M de ionomicina (Iono), como controle positivo, sendo a primeira adição após cinco minutos do início do experimento e as demais com intervalo de dez minutos entre cada. O CPA é um inibidor da bomba SERCA que libera o cálcio remanescente no retículo endoplasmático para o citosol e a ionomicina é um ionóforo que permite o transporte de cálcio através das membranas biológicas para aumentar os níveis intracelulares de cálcio (GAZARINI et al., 2003; MONCOQ; TRIEBER; YOUNG, 2007).

O furoxano **4m** apresentou uma rápida resposta na alteração do cálcio intracelular em *P. falciparum*. (Figura 8). A molécula **4m** levou à alteração do cálcio intracelular quase que imediatamente após sua adição (Figura 8A) em uma proporção menor que CPA. Interessantemente, quando **4m** é adicionado após CPA (Figura 8B), observamos que a resposta de **4m** é drasticamente suprimida, o que nos indica que este furoxano possui o retículo endoplasmático como alvo desta alteração de cálcio citosólico.

Figura 8. Traços representativos e quantificação da liberação de cálcio intracelular pelo furoxano 4m.

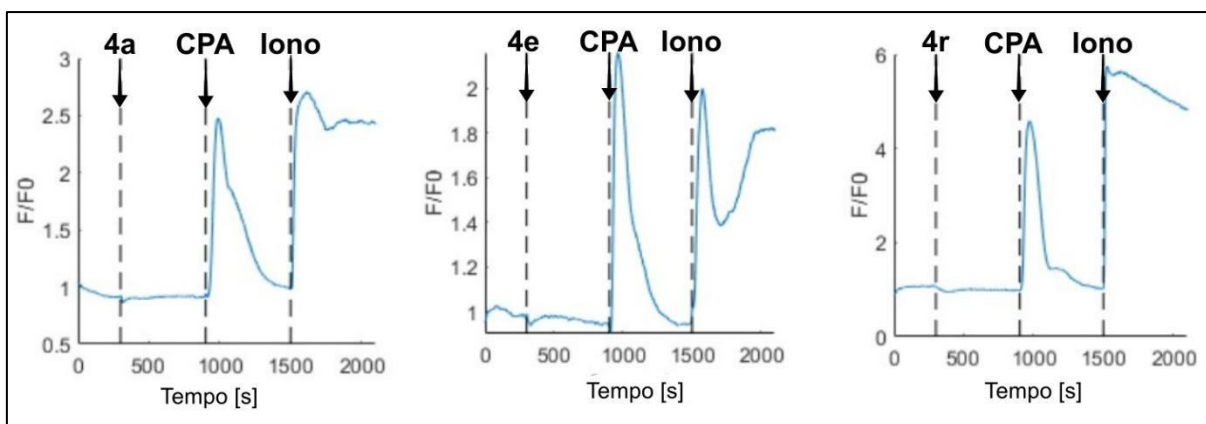


A visualização instantânea da liberação de cálcio em *P. falciparum* expressando o indicador GCaMP3 foi realizada em lamínula com eritrócitos infectados enriquecidos em estágio trofozoíta. Após cinco minutos de visualização do sinal de GCaMP3 foram adicionados 10 μ M de cada composto, com intervalo de 10 minutos entre cada adição. **A e B** – Traço médio representativo correspondente à média de pelo menos 50 células que responderam aos estímulos com os compostos. **C e D** – Quantificação da amplitude do cálcio citosólico após o tratamento com **4m** e os controles. Os dados são correspondentes à medida de três experimentos independentes, em triplicata. * $p < 0,05$. CPA foi adicionado para liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ionomicina (Iono) para verificar a viabilidade celular.

De fato, a quantificação da amplitude do cálcio intracelular após a adição de **4m** (Figura 8C e 8D) mostra que quando o furoxano é adicionado primeiro, observa-se uma diminuição na resposta de CPA, mesmo que não seja estatisticamente significativa. Diferentemente, quando CPA é adicionado primeiro, a resposta de **4m** é suprimida quase completamente, sugerindo que o composto possui o mesmo alvo de CPA.

Observado o efeito de **4m** na mobilização do cálcio intracelular em *P. falciparum*, testou-se também os demais furoxanos que apresentaram efeito inibitório no desenvolvimento do parasita, **4a**, **4e** e **4r**. Contudo, embora **4a**, **4e** e **4r** apresentarem semelhança estrutural a **4m**, nenhum deles foi capaz de alterar os níveis de cálcio citosólico no parasita (Figura 9).

Figura 9. Traços representativos da liberação de cálcio intracelular pelos furoxano 4a, 4e e 4r.



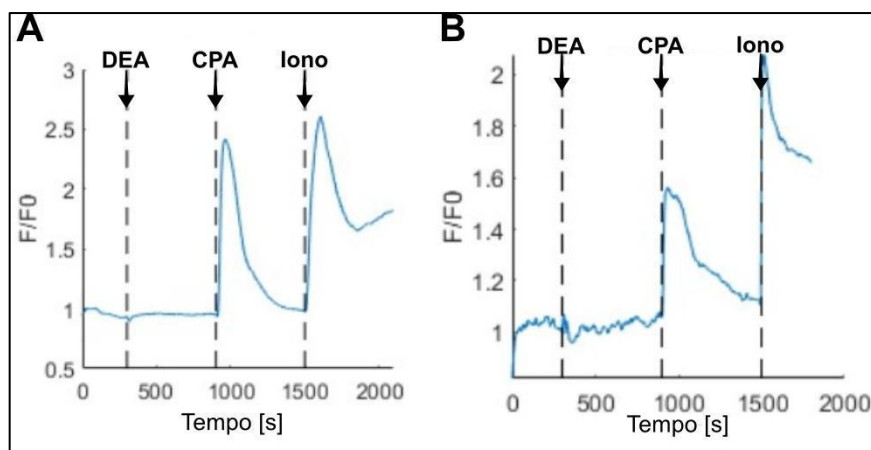
A visualização instantânea da liberação de cálcio em *P. falciparum* expressando o indicador GCaMP3 foi realizada em lamínula com eritrócitos infectados enriquecidos em estágio trofozoíta. Após cinco minutos de visualização do sinal do GCaMP3 foram adicionados 10 μ M de cada composto, com intervalo de 10 minutos entre cada adição. Traços correspondentes a média de pelo menos 50 células que responderam ao tratamento. CPA foi adicionado para liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ionomicina (Iono) para verificar a viabilidade celular.

O grupo *N*-óxido presente na molécula **4m** é descrito por sua capacidade de gerar espécies reativas de nitrogênio, com destaque para o agente microbicida NO (BOIANI et al., 2008); importante molécula efetora envolvida em diversos processos celulares microbicidas (RADI; CASSINA; HODARA, 2002); podendo ainda atuar como segundo mensageiro em plantas e animais, modulando o Ca^{2+} livre (BESSON-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008). Foi avaliada então a possível participação do NO na resposta para o cálcio observada para **4m**, mas agora na presença do doador de NO DEA. O DEA é capaz de permear membranas biológicas e se dissociar espontaneamente liberando 1,5 mol de NO por mol de composto, de forma pH dependente, apresentando meia vida de 2-16 minutos em pH 7,4 à 37°C (FERRERO et al., 1999; SAMPSON; PLANE; GARLAND, 2001).

Não foi observado, tanto no experimento realizado com eritrócitos infectados, quanto naquele utilizando-se parasitas isolados e tratados com 10 μ M de DEA,

qualquer alteração do cálcio intracelular (Figura 10), o que descartou a possibilidade do NO produzido por **4m**, estar influenciando nesta resposta.

Figura 10. Traços representativos da liberação de cálcio intracelular após o tratamento com DEA.



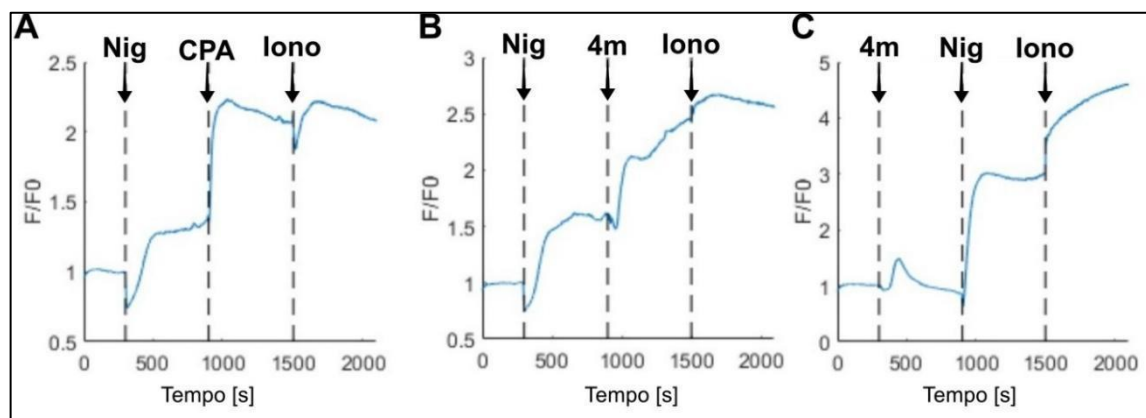
A visualização instantânea da liberação de cálcio em *P. falciparum* expressando o indicador GCaMP3 foi realizada em lamínula com eritrócitos infectados enriquecidos em estágio trofozoíta. Após cinco minutos de visualização do sinal do GCaMP3 foram adicionados 10 μ M de cada composto, com intervalo de 10 minutos entre cada adição. Traços correspondentes a média de pelo menos 50 células que responderam ao tratamento. **A** – Experimento realizado com eritrócitos infectados; **B** – Experimento realizado com parasitas isolados. CPA foi adicionado para liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ionomicina (Iono) para verificar a viabilidade celular. Experimentos realizados em duplicata.

Embora o papel do NO seja reportado na literatura como crucial para a bioatividade desta classe de moléculas, como observado para *L. infantum*, *L. braziliensis*, *Leishmania pifanoi* e *T. cruzi* (BOIANI et al., 2008; CASTRO et al., 2009; DUTRA et al., 2014); e cepas cloroquina-resistentes de *P. falciparum* (GALLI et al., 2005), neste trabalho não foi observada sua relação com a mobilidade de cálcio para **4m**.

Outro fato importante observado logo após a adição de **4m** refere-se ao surgimento de uma inflexão do sinal captado, seguido de incremento da fluorescência, i.e., incremento de cálcio citosólico (Figura 8a). Considerando que este efeito não parece estar relacionado diretamente ao composto, já que é um pó branco e transparente quando ressuspensionado em DMSO, foi investigado se este fenômeno poderia ser devido a uma rápida acidificação do citoplasma provocada por **4m**. Para corroborar esta hipótese, comparamos estas análises ao efeito provocado pelo ionóforo carboxílico (K^+/H^+) nigericina, o qual libera cálcio de compartimentos

acídicos, incluindo o vacúolo digestivo, devido acidificação do citoplasma por ele provocada (GARCIA et al., 1998) (Figura 11).

Figura 11. Traços representativos da liberação de cálcio intracelular após adição de nigericina.



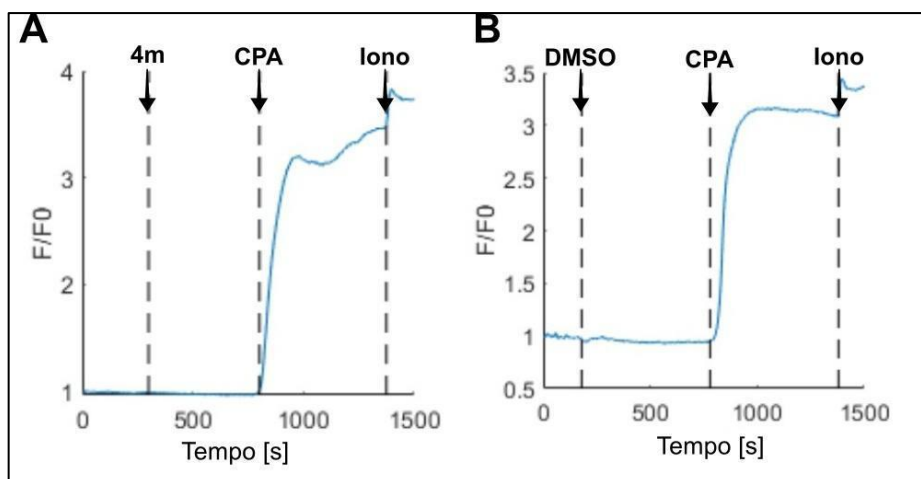
A visualização instantânea da liberação de cálcio em *P. falciparum* expressando o indicador GCaMP3 foi realizada em lamínula com eritrócitos infectados enriquecidos em estágio trofozoíta. Após cinco minutos de visualização do sinal do GCaMP3 foram adicionados 10 μ M de cada composto, com intervalo de 10 minutos entre cada adição, exceto Nig (2,5 μ M). Traços correspondentes a média de pelo menos 50 células que responderam ao tratamento. **A** – Traço padrão para resposta ao CPA; **B** – Traço com adição de **4m** após nigericina; **C** – Traço com adição de nigericina após **4m**. CPA foi adicionado para liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ionomicina (Iono) para verificar a viabilidade celular. Experimentos realizados em duplicata.

A resposta a nigericina foi observada pela inflexão acentuada do sinal de fluorescência captado, correspondente ao aumento da acidez do pH citosólico, seguido de incremento de cálcio proveniente de compartimentos acídicos, como descrito por Borges-Pereira e colaboradores (BORGES-PEREIRA et al., 2020) (Figura 11A). Na Figura 11B é possível observar que **4m** mantém sua resposta para o cálcio intracelular quando adicionado após nigericina, entretanto, quando adicionado antes (Figura 11C) nota-se uma resposta mais rápida deste ionóforo, com pouca inflexão de fluorescência após adicionado, o que pode indicar que ocorreu acidificação prévia do citosol.

As alterações observadas na homeostase do cálcio promovidas por **4m** mostraram-se seletivas para o parasita, já que hepatócitos expressando GCaMP6f e tratados com **4m** não apresentaram variações na fluorescência (Figura 12). Este dado é importante e aliado aos valores de seletividade quando avaliados em macrófagos

murinos descrito anteriormente ($CC_{50} > 500$, $SI = 78$), indica a baixa citotoxicidade desta molécula (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021).

Figura 12. Traços representativos da liberação de cálcio intracelular em hepatócitos murinos.



A visualização da liberação do cálcio em células de hepatócitos murinos expressando o indicador GCaMP6, em lamínula, contendo as células fixadas *overnight*. Após três minutos de visualização do sinal de GCaMP6 foram adicionados 10 μ M de cada composto, com intervalo de 10 minutos entre cada adição. **A** – 4m (10 μ M) foi adicionado sem nenhum efeito observado. **B** – DMSO foi utilizado como controle negativo. CPA foi adicionado para liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ionomicina (Iono) para verificar a viabilidade celular. Experimentos realizados em duplicata.

Foi observado que o mecanismo de ação de **4m** pode estar relacionado à acidificação do citosol do parasita, causando liberação de cálcio do retículo endoplasmático em um primeiro momento. Em *P. falciparum* a acidificação do citoplasma pode ocorrer devido a inibição de bombas H^+ -ATPases, enzimas presentes na membrana do vacúolo digestivo e membrana plasmática do parasita, que utilizam energia derivada da hidrólise de ATP para bombear íons H^+ a partir do citosol celular, regulando o pH desta organela, e conseqüentemente do citoplasma (SALIBA; KIRKI, 1999).

No entanto, quando estas enzimas são inibidas ocorre aumento do pH citosólico, porém, sem correlação com desbalanço de cálcio (SALIBA; KIRKI, 1999; VAN SCHALKWYK et al., 2010). Desta forma, novos estudos deverão ser realizados para identificar o alvo de **4m** em *P. falciparum* para verificar se realmente está ocorrendo a acidificação do citosol e por qual via. Além disso, é necessário investigar

também se o composto está sendo hidrolisado, como este fenômeno pode estar contribuindo na atividade antiparasitária observada e no desbalanço do cálcio.

Finalmente é importante apontar o potencial de **4m** como um protótipo para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos, sendo necessário avançar neste estudo para melhor contribuir no entendimento dos mecanismos de ação envolvidos, permitindo a modificação racional desta molécula para obtenção de um hit seletivo e seguro para tratamento da malária.

4 DISCUSSÃO

A proposta geral deste trabalho foi a realização de modificações estruturais no composto **Lapdesf14e** afim de melhorar, principalmente, a solubilidade observada para este composto uma vez que o mesmo já apresenta excelente atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* descrita por nosso grupo de pesquisa (DUTRA et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2017). Portanto, foram realizadas substituições específicas junto ao grupamento *N*-óxido: Foi retirando o grupamento sulfidril, originalmente ligado ao *N*-óxido em **Lapdesf14e**, e adicionados outros grupamentos químicos, originando os compostos fenil-, amida- e benzofuroxanos. Em todas as novas moléculas geradas, foi mantida a *N*-acil-hidrazona, associada a diferentes grupos químicos como substituições amina e tert-butil. Estas modificações resultaram em solubilidades distintas para estes compostos.

Conforme observado no capítulo 1 desta Tese, as moléculas geradas apresentaram potente atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. infantum* e baixa citotoxicidade para macrófagos murinos, como também inibiram a enzima CPB2.8, expressa neste trabalho, importante enzima responsável pela modulação do sistema imune em *Leishmania* (CAMERON et al., 2004).

Os melhores compostos identificados foram os amida- e fenil-furoxanos, indicando que as alterações realizadas que geraram estas moléculas mantiveram a atividade observada em seu precursor, originando moléculas ainda mais promissoras. Estes compostos apresentaram melhor atividade leishmanicida, comparada aos benzofuroxanos e hidrazonas aqui estudados. Este fato pode estar associado a capacidade destes compostos liberarem *N*-óxido, que pode atuar como molécula

efetora na eliminação do parasita, causando S-nitrosilação de proteínas como a CPB (BOIANI, et al., 2008).

Como principal contribuição do capítulo 1, podemos destacar a identificação da molécula **4f**, que após análise *in silico* de parâmetros farmacocinéticos, mostrou grande potencial terapêutico por via oral. Após ensaio *in vivo* realizado com esta molécula, em camundongos infectados com *L. infantum*, durante cinco dias, 2x ao dia, tratados via oral, verificou-se a redução de ~90% da carga parasitária no fígado e baço, similar ao tratamento realizado com o fármaco de referência miltefosina e com maior eficácia que seu precursor **Lapdesf14e** (DE ALMEIDA et al., 2007). Associado a esta robusta redução da carga parasitária, **4f** mostrou-se seguro, não apresentando alterações nos marcadores bioquímicos de função hepática e renal, indicando sua segurança.

Com isto atingimos nosso principal objetivo relacionado às modificações estruturais do protótipo **Lapdesf14e**, gerando a molécula **4f** que apresenta enorme potencial para continuação dos estudos no sentido de evoluir para uma alternativa terapêutica de curto período de tratamento por via oral, para a leishmaniose visceral.

Como uma contribuição para o entendimento da bioatividade dos compostos aqui desenvolvidos, estendemos nossos estudos dentro do programa CAPES-PrInt UNESP, para outra importante doença, que atinge o mesmo perfil populacional das leishmanioses. Os compostos foram testados para malária causada por *Plasmodium falciparum* durante estágio sanduíche de 6 meses na Escola de Medicina da Rutgers University, Newark-Nova Jersey, EUA.

Assim como observado para *Leishmania*, os furoxanos apresentaram melhor atividade que os benzofuroxanos, quanto à sua capacidade em inibir *in vitro* o crescimento de *P. falciparum*, sendo **4m** o composto mais promissor. Como parte dos estudos de mecanismo de ação deste composto, observou-se que, embora possua a *N*-acil-hidrazona em sua estrutura não foi possível observar dentro dos experimentos realizados a inibição das falcipainas (cisteíno proteases de *Plasmodium*).

Foram utilizados experimentos indiretos para verificar a atividade de **4m** frente as falcipainas de *P. falciparum*, como a alteração do vacúolo parasitóforo ou a acumulação de hemoglobina não degradada em parasitas tratados com o composto. Entretanto, experimentos adicionais como testes enzimáticos diretos nas falcipainas

recombinantes FP-2 e FP-3 estão sendo realizados afim de verificar de forma direta esse possível efeito de **4m**.

Uma vez que o aldeído precursor de **Lapdesf14e**, o composto **13b**, apresentou potencial em causar alterações na homeostase de cálcio intracelular em *Leishmania* (DE ALMEIDA, 2017), verificou-se este potencial dos compostos ativos em *P. falciparum*. Dentre os compostos que inibiram o crescimento do parasita, apenas **4m** apresentou alteração no cálcio intracelular. Foi observado que o composto causa mobilização do cálcio intracelular do retículo endoplasmático, sem associação com o fato de ser doador de óxido nítrico, que poderia influenciar neste fenômeno (RADI et al., 2002; MORENO; DOCAMPO, 2003).

Observou-se também que **4m** pode estar causando acidificação do citoplasma em *P. falciparum*, ao verificar uma resposta acelerada do ionóforo nigericina quando adicionado após **4m** nos ensaios de homeostase do cálcio. Este composto possui apenas um grupamento amida ligado ao *N*-óxido que o difere dos outros furoxanos que apresentaram atividade contra *P. falciparum*, mas não foram capazes de causar alterações na homeostase do cálcio intracelular. Estudos adicionais precisam ser realizados para verificar a participação deste grupo amida na resposta para o cálcio intracelular, assim como se há outros mecanismos acontecendo que estão levando a este fenômeno.

Adicionalmente, foi verificada que esta alteração na homeostase do cálcio intracelular é específica para o parasita, uma vez que hepatócitos murinos tratados com **4m** não apresentaram tal fenômeno. Estes dados mostram o enorme potencial destes compostos em especial **4m**, para o desenvolvimento de fármacos anti-maláricos e, assim como observado para *Leishmania*, seletivos para *P. falciparum*.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra o potencial promissor dos novos derivados furoxanos para as doenças parasitárias leishmanioses e malária. Durante o seu desenvolvimento, também contribuiu para a identificação de novos agentes anti-leishmaniais de origem natural ou sintética, produzindo nove artigos científicos publicados e uma patente. Para a leishmaniose visceral, todas as moléculas apresentaram baixa citotoxicidade ($SI < 10$), sendo os derivados furoxanos os mais potentes contra formas amastigotas

de *L. infantum*, sendo o $EC_{50} < 10 \mu M$, exceto para **4i**, **4j**, **4n** e **4o**, e para os benzofuroxanos, apenas **4r** apresentou estes critérios. Os furoxanos foram capazes de liberar *N*-óxido, o que pode ter contribuído na atividade leishmanicida observada. Isto foi observado após a utilização da enzima recombinante LmCPB2.8 Δ CTE expressa em *P. pastoris* e verificar que derivados como os benzofuroxanos e hidrazonas inibem a CPB, entretanto possuem pouca ou nenhuma atividade para formas amastigotas de *L. infantum*.

A análise *in silico* do ADME das melhores moléculas indicou que **4f** apresenta as melhores características para testes *in vivo* por administração oral, característica muito desejada para novos agentes leishmanicidas, principalmente considerando que todos os fármacos, exceto miltefosina, são administrados por longos períodos de tempo (~30 dias) e por via parenteral, o que requer hospitalização do paciente, comprometendo a adesão deste ao tratamento. A molécula **4f** mostrou ser eficaz em um curso de tratamento muito curto (cinco dias, 2x ao dia), com a maior dose (7.7 mg/kg/dia correspondente a dose da miltefosina) e quando administrado por via oral, reduzindo em ~90% a carga parasitária no fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum* em um modelo agudo da infecção. A análise dos marcadores bioquímicos através do plasma sanguíneo indicou que o composto não apresenta toxicidade para o fígado ou rim, já que não causou alterações nos marcadores avaliados.

Adicionalmente, no âmbito do programa CAPES-PrInt, estendemos nossos estudos, investigando o potencial antimalárico destes compostos para futura aplicação no tratamento da malária. Três furoxanos apresentaram boa potência quando investigados em culturas sincronizadas de *P. falciparum*., sendo **4m** (EC_{50} 2.8 μM) o melhor composto. Diferentemente do que era esperado, estudos de mecanismo de ação sugerem que **4m** não é inibidor de facipainas (cisteíno proteases) de *P. falciparum*, apesar destas proteases pertencerem à classe das papaínas, assim como cisteíno protease de *L. mexicana* (IC_{50} = 6 μM), uma vez que ensaios indiretos de avaliação desta inibição baseado em estudos de microscopia, não detectaram alterações morfológicas do vacúolo digestivo do parasita, bem como não foi possível observar acúmulo de hemoglobina não degradada após o tratamento com o composto, sugestivos de inibição das proteases.

Contudo, verificou-se que **4m** é capaz de causar a liberação de cálcio intracelular, possuindo como alvo o retículo endoplasmático, com efeito seletivo para o parasita, uma vez que hepatócitos tratados com o composto não apresentaram tal efeito. Essa liberação de cálcio deve estar ocorrendo após acidificação do citoplasma, em decorrência das propriedades físico-químicas da molécula relacionadas à presença de um grupo amida ligado ao *N*-óxido associada à liberação de NO, promovendo em conjunto efeitos deletérios para a viabilidade do parasita.

6 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of immunology**, v. 161, p. 6794-6801 1998.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e35671, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

ANSORGE, I. et al. Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. **Biochemical Journal**, v. 315, n. 1, p. 307–314, 1996.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, p. 1608-1621, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

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.

BASU, S.; SAHI, P. K. Malaria: An Update. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 48, n. 7, p. 521-528, 2017.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, n. 37, p. 1097-1106, 2007. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

BESSION-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.

BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155322>.

BLASCO, B.; LEROY, D.; FIDOCK, D. A. Antimalarial drug resistance : linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 917–928, 2017.

BOIANI, L. et al. Furoxan-, alkyl nitrate-derivatives and related compounds as anti-trypansomatid agents: Mechanism of action studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 7900–7907, 2008.

BORGES-PEREIRA, L.; CAMPOS, B. R. K. L.; GARCIA, C. R. S. The GCaMP3 - A GFP-based calcium sensor for imaging calcium dynamics in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **MethodsX**, v. 1, p. 151–154, 2014.

BRAGA, C. B. E. et al. Side effects of chloroquine and primaquine and symptom reduction in malaria endemic area (Mâncio lima, Acre, Brazil). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2015, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/346853>

BRASIL. **Guia de tratamento da malária no Brasil - Ministério da Saúde**. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>>. Acesso em 10 Mai 2022.

BRAY, P. G. et al. Access to Hematin: The Basis of Chloroquine Resistance. **Molecular Pharmacology**, v. 54, p. 170-179, 1998.

BROCHET, M.; BILLKER, O. Calcium signalling in malaria parasites. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 397–408, 2016.

BURALLI, R. J. et al. Moving towards the Sustainable Development Goals: The UNLEASH Innovation Lab experience. **Ambiente e Sociedade**, v. 21, 2018. doi: 10.1590/1809-4422asoc17Ex0001vu18L1TD.

BURGOS, L. M. et al. Neglected tropical diseases and other infectious diseases affecting the heart. The NET-heart project: Rationale and design. **Global Heart**, v. 15, n. 1, 2020.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMARDA, G. et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

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. **The 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, n. 12, p. 5055–5065, 2009.

CERECETTO, H; GONZÁLEZ, M. Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology. **Topics in Heterocyclic Chemistry**, v. 10, p. 265–308. 2007.

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.

CHEN, Y. et al. Structural insight into enhanced calcium indicator GCaMP3 and GCaMPJ to promote further improvement. **Protein and Cell**, v. 4, n. 4, p. 299–309, 2013.

CLEMENTINO, L. da C. et al. *In vitro* activities of glycoalkaloids from the Solanum lycocarpum against Leishmania infantum. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 673-677. 2018.

CLEMENTINO, L. da C. et al. The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, v. 65, n. 23, p. 5470-5474, 2020. doi: 10.1080/14786419.2020.1782403.

COSTA, D. N. C. C. et al. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002355.

COSTA, N. C. S. et al. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. **PLoS ONE**, v. 15, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0228740.

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

DA COSTA CLEMENTINO, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of N-oxide derivatives with potent in vivo antileishmanial activity. **PLoS ONE**, v. 16, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0259008.

DAVIES, C. R. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ Clinical research**, v. 326, n. 7385, p. 377–382, 2003.

DE ALMEIDA, L. **Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano : atividade biológica in vitro e in vivo e potenciais mecanismos de ação**. Tese. 2017. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, São Paulo, 2017., 2017.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Calcium in the Backstage of Malaria Parasite Biology. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–15, 2021.

DE RYCKER, M. et al. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 2018.

DE VILLIERS, K. A.; MARQUES, H. M.; EGAN, T. J. The crystal structure of halofantrine-ferriprotoporphyin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 8, p. 1660–1667, ago. 2008.

DELHAES, L. et al. The microculture tetrazolium assay (MTA): Another colorimetric method of testing Plasmodium falciparum chemosensitivity. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 31–40, 1999.

DÍAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. Leishmaniasis: The biology of a parasite. In: PONTE-SUCRE, A; PADRON-NIEVES M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatment**. Springer, p. 1–16, 2018.

DO ESPÍRITO SANTO, R. D. et al. N, N' N"-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 116-128, 2019.

DOCAMPO, R.; HUANG, G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell Calcium**, v. 57, n.3, p. 194-202, 2015.

DOS SANTOS, G. S. et al. GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga Desmarestia antarctica. **Planta Medica International Open**, v. 07, n. 03, p.122–132, 2020.

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.

EKLAND, E. H.; FIDOCK, D. A. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 743–747, 2008.

ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, 2020. doi: 10.1186/s40249-020-0630-9.

ENOMOTO, M. et al. Blockage of spontaneous Ca^{2+} oscillation causes cell death in intraerythrocytic plasmodium falciparum. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

FARAHMAND, M. et al. An overview of a diagnostic and epidemiologic reappraisal of cutaneous leishmaniasis in Iran. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n.1, p. 17-21, 2011.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2010.

FENG, L. U. et al. A brief history of artemisinin: Modes of action and mechanisms of resistance. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 17, n. 5, p. 331-336, 2019.

FERRERO, R. et al. Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: Correlation with nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 779–787, 1999.

GALLI, U. et al. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1335–1340, 2005.

GARCIA, C. R. S. et al. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. **European Journal of Cell Biology**, v. 71, n. 4, 1996.

GARCIA, C. R. S. et al. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, n. 2, p. 133–138, 1998.

GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 2004.

GAZARINI, M. L. et al. Calcium signaling in a low calcium environment: How the intracellular malaria parasite solves the problem. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 1, p. 103–110, 2003.

GAZARINI, M. L. et al. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 329–334, 2007.

GIL, A. et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of new quinoxaline derivatives as anti-Plasmodium falciparum agents. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2166–2180, 2014.

- GOTO, H., LINDOSO, J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
- GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 117-145, 2005.
- HOTEZ, P. J. et al. What constitutes a neglected tropical disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1 2020. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>.
- 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.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.
- KOTEPUI, M. et al. Global prevalence and mortality of severe Plasmodium malariae infection: A systematic review and meta-analysis. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, 2020.
- KUMAR, P. et al. Design, synthesis, conformational and molecular docking study of some novel acyl hydrazone based molecular hybrids as antimalarial and antimicrobial agents. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2017.
- LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480-489, 2019.
- LEVI, G.; BALLALAI, I.; ANDRADE, J. Vacina contra a malária. **Imunizações**, v. 8, n. 4.
- LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 69–77, 2012.
- LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges. **HIV/AIDS - Research Palliative Care**. v. 8, p. 147–156, 2016.
- LOHARIKAR, A. et al. Status of new vaccine introduction — Worldwide, september 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 41, p. 1136-1140, 2016.
- LOPERA, A. A. et al. Solution-combustion synthesis of doped TiO₂ compounds and its potential antileishmanial activity mediated by

photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 64-74, 2018.

LOURIDO, S.; MORENO, S. The Calcium Signaling Toolkit of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 1–19, 2015.

MAIER, A. G. et al. *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 481-482, 2019.

MAKLER, M. T.; PIPER, R. C.; MILHOUS, W. K. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. **Parasitology Today**, v. 14, n. 9, p. 376–377, 1998.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, p. 121–132, 2021.

MARTINS, A. C. et al. Review of the mechanism underlying mefloquine-induced neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 209-216, 2021.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101664.

MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 263-269, 2009.

MCKERROW, J. H. Update on drug development targeting parasite cysteine proteases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0005850.

MIGUEL, D. C. et al. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect?. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 694-697, 2021.

MISHRA, M.; SINGH, V.; SINGH, S. Structural insights into key plasmodium proteases as therapeutic drug targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 36, p. 1-15, 2017.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: Progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 6736, n. 16, 2016.

MONCOQ, K.; TRIEBER, C. A.; YOUNG, H. S. The molecular basis for cyclopiazonic

acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9748–9757, 2007.

MORAES, B. S. et al. Leishmanicidal candidate LASSBio-1736, a cysteine protease inhibitor with favorable pharmacokinetics: Low clearance and good distribution. **Xenobiotica**, v. 48, n. 12, p. 1258–1267, 2018.

MOTT, B. T. et al. A furoxan-amodiaquine hybrid as a potential therapeutic for three parasitic diseases. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 3, n. 12, p. 1505–1511, 2012.

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.

MULLER, R.; BAKER, J. R.; ROLLINSON, D. Cell Biology of *Leishmania*. **Advances in parasitology**, v. 44, 2000.

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

MUSYOKA, T. M.; NJUGUNA, J. N.; BISHOP, Ö. T. Comparing sequence and structure of falcipains and human homologs at prodomain and catalytic active site for malarial peptide based inhibitor design. **Malaria Journal**, v. 18, n. 159, p. 1–21, 2019.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919–928, 2003.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705–1721, 2010.

OLÍAS-MOLERO, A. I. et al. Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model?. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2021.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 97-96, 2011.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1,

p. 107–110, 2011.

PIMENTA, P. F. P. et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23–47, 2015.

PRASAD, R. et al. Blocking Plasmodium falciparum development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2013.

RADI, R. et al. Serial Review: Nitric Oxide in Mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2002.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 401-409, 2002.

RANGEL, K. C. et al. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae Iridaea cordata (Gigartinales; Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 825-834, 2018.

RAWAT, A. et al. Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. **Microbiological Research**, v. 249, 2021. doi: 10.1016/j.micres.2021.126784.

RIDGLEY, E. L.; XIONG, Z. H.; RUBEN, L. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism Trypanosoma brucei. **Biochemical Journal**, v. 340, n. 1, p. 33–40, 1999.

ROHRBACH, P. et al. Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27960–27969, 2005.

ROONEY, T. A.; SASS, E. J.; THOMAS, A. P. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 29, p. 17131–17141, 1989.

ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases of malaria parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1489–1499, 2004.

ROSENTHAL, P. J. Falcipains and Other Cysteine Proteases of Malaria Parasites.

Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 712, p. 30–48, 2011.

SAHID, E. D. N. et al. Baccharis trimera (Less.) DC leaf derivatives and eupatorin activities against Leishmania amazonensis. **Natural Product Research**, v. 36, n. 6, p. 1599–1603, 2022.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SALIBA, K. J.; KIRKI, K. pH regulation in the intracellular malaria parasite, Plasmodium falciparum. H⁺ extrusion via a V-type H⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33213–33219, 1999.

SAMPSON, L. J.; PLANE, F.; GARLAND, C. J. Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, n. 3, p. 220–225, 2001.

SANGENIS, L. H. C. et al. Expansão da Leishmaniose Visceral no estado do Rio de Janeiro, Brasil: Relato do primeiro caso autóctone no município de Volta Redonda e a dificuldade de diagnóstico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 3, p. 271–274, 2014.

SANZ, L. M. et al. *P. falciparum* in vitro killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
doi:10.1371/journal.pone.0030949.

SATO, S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2021.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.

SIJWALI, P. S.; ROSENTHAL, P. J. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4384–4389, 2004.

SINGH, K.; GARG, G.; ALI, V. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 9, p. 897–919, 2016.

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.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–9, 2014.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, 2018.doi: 10.1371/journal.pntd.0006512.

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

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, 2017. doi: 10.1098/rsob.170165.

TAKASHIMA, E. et al. Identification of Novel Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.805482.

THOMAS, A. P.; RENARD, D. C.; ROONEY, T. A. Spatial and temporal organization of calcium signalling in hepatocytes. **Cell Calcium**, v. 12, n. 2–3, p. 111–126, 1991.

TORRES, K. L. et al. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of Plasmodium vivax in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitology Research**, v. 98, n. 6, p. 519–524, 2006.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

UPEGUI ZAPATA, Y. A. et al. Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, p. 94–106, 2020.

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.

VAN SCHALKWYK, D. A. et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* pH regulation by small molecule indole derivatives results in rapid parasite death. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1291–1299, 2010.

VARUGHESE, K. I. et al. Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex. **Biochemistry**, v. 7, n. 28, 1989. doi: 10.1021/bi00429a058.

VERMA S., DIXIT, R., PANDEY K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7. 2016. doi.org/10.3389/fphar.2016.00107.

VICENTE, E. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline- 2-carbonitrile 1,4-Di-N-oxide derivatives. **Molecules**, v. 13, n. 1, p. 69–77, 2008.

VIDADALA, R. S. R. et al. Development of potent and selective Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) inhibitors that block the transmission of malaria to mosquitoes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 562–573, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**. Geneva, 2021. (WHO technical reports series, n. 35, p. 401-420).

WHO. WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2019**. Geneva, 2019 (WHO technical report series).

WHO. WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2021**. Geneva, 2021 (WHO technical report series).

WINSTANLEY, P.; WARD, S. Malaria Chemotherapy. **Advances in Parasitology**, v. 61, 2006. doi: 10.1016/S0065-308X(05)61002-0.

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