

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química

LETÍCIA DE ALMEIDA

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

Araraquara
2017

LETÍCIA DE ALMEIDA

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

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

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

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

LETÍCIA DE ALMEIDA

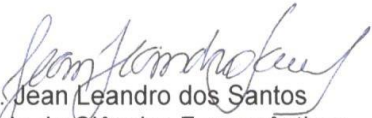
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 07 de março de 2017.

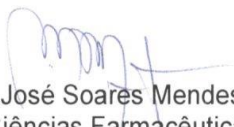
BANCA EXAMINADORA



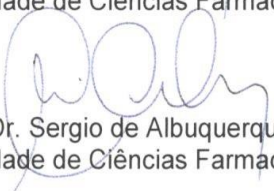
Profª Drª Marcia Aparecida Silva Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



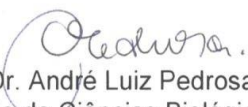
Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



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



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



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

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

Michael Jordan

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À **Profª Drª Angela Kaysel Cruz** e aluna **Eliza Vanessa C. A. Ferreira** que nos nortearam para os ensaios in vivo;

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE QUADROS E TABELAS

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

Sumário

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

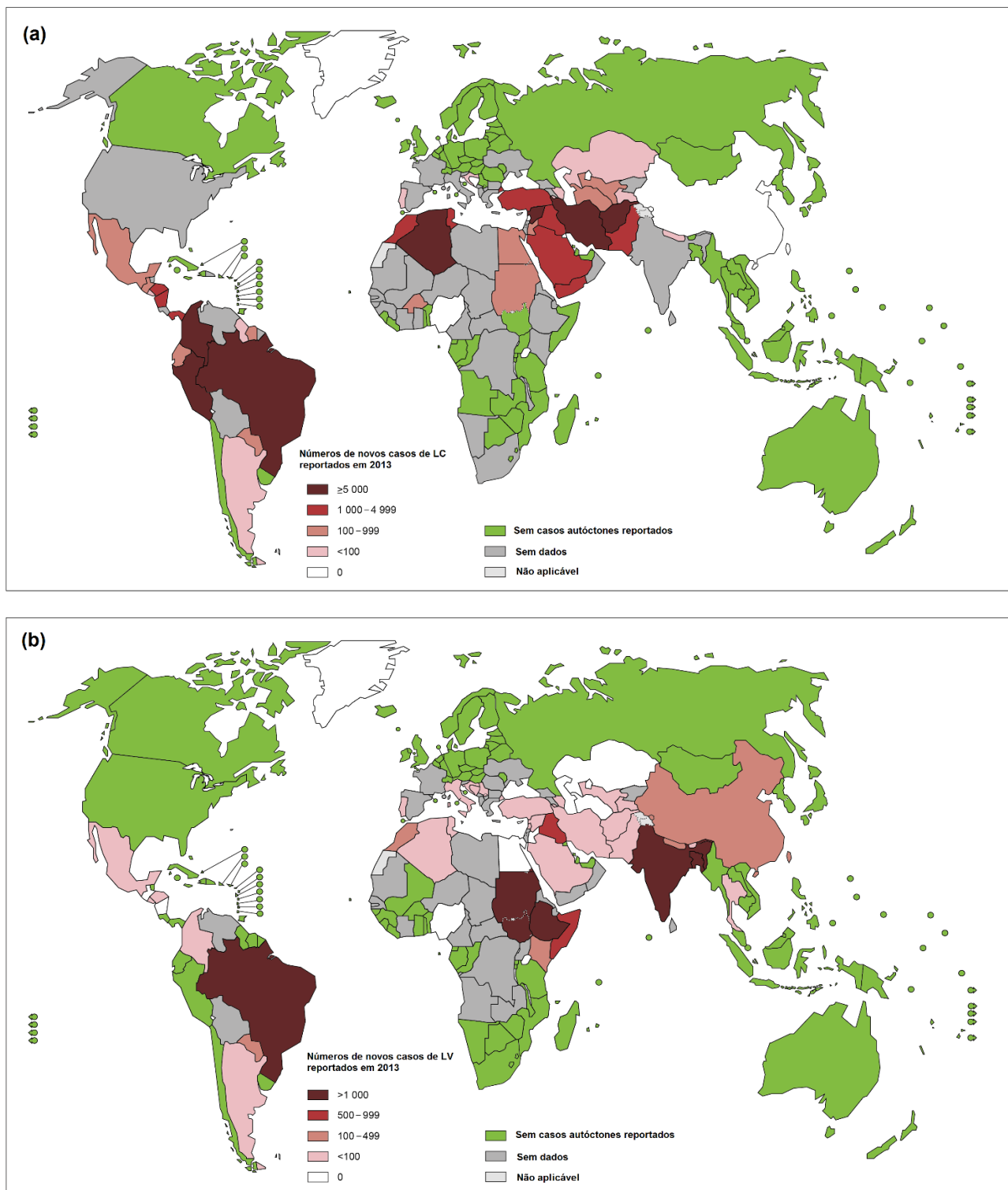
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de diversas doenças que prevalecem sob condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, custando às economias em desenvolvimento bilhões de dólares todos os anos. As populações principalmente afetadas vivem em regiões de pobreza, sem saneamento básico adequado e em estreito contato com vetores e animais domésticos, os quais podem ser reservatórios de muitas doenças (WHO, 2017). As doenças tropicais negligenciadas são geralmente crônicas, debilitantes e frequentemente estigmatizantes (HOTEZ; SAVIOLI; FENWICK, 2012; UTZINGER et al., 2012) sendo causadas por uma variedade de agentes infecciosos (CHOI; YU, 2015; MOLYNEUX; MALECELA, 2011). Porém, devido à expansão de casos de algumas dessas doenças em regiões da Europa, questiona-se o enquadramento destas como doenças tropicais negligenciadas. Sendo assim, este complexo de doenças não estaria mais restrito às áreas dos trópicos, sendo, portanto, o termo mais correto de referir-se a estas como doenças negligenciadas (DNs).

Dentre as 17 DNs descritas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), há um grupo de doenças cujos agentes etiológicos pertencem à família Trypanosomatidae (DENNY; STEEL, 2015; WILSON; DUNNE, 2014). Em particular, parasitos do gênero *Trypanosoma* são os responsáveis pela doença de Chagas na América do Sul e doença do sono na África, enquanto *Leishmania* é responsável pela leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV) ao redor do mundo (Figura 1). Apesar da doença de Chagas, doença do sono e LV corresponderem às três DNs com as maiores taxas de morte, estas não despertam o interesse da indústria farmacêutica devido ao maior impacto em populações de baixa renda. Por estas razões, a OMS as caracteriza como as mais desafiadoras DNs (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009).

Figura 1. Distribuição mundial das leishmanioses em 2013.



Em **(a)** distribuição da leishmaniose cutânea e **(b)** distribuição da leishmaniose visceral.

Fonte: Adaptado de (WHO, 2015).

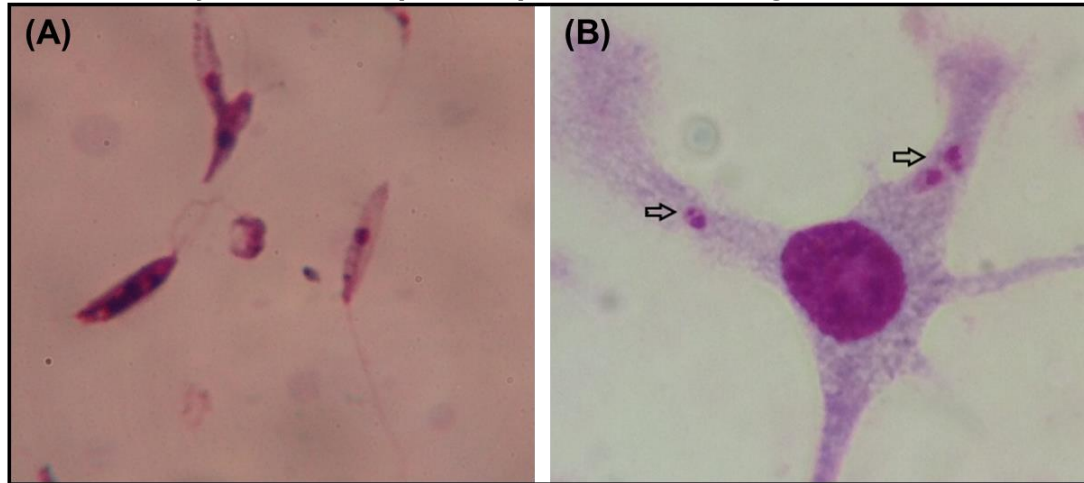
2.2 Leishmanioses

Dentre as DNs, as leishmanioses em termos de morbidade (taxa de pessoas infectadas em relação à população estudada de um determinado local) são consideradas a terceira causa mais comum, antecipada apenas pela malária e esquistossomose (KEDZIERSKI, 2011; PACE, 2014). A prevalência das leishmanioses é de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo e incidência de 2 milhões de novos casos anuais, com estimativas apontando LV como causa de 70 mil mortes anuais quando não tratada (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Porém acredita-se que estes dados sejam subestimados, uma vez que a notificação é compulsória em apenas 33 dos 98 países afetados pela doença (McGWIRE; SATOSKAR, 2014; WHO, 2010).

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas pelo protozoário intracelular do gênero *Leishmania* (DEN BOER et al., 2011). As características bioquímicas e estruturais desses parasitos incluem a presença do cinetoplasto, mitocôndria única com um discreto corpo estruturado de DNA, glicossomos que compartimentalizam parte da via glicolítica e um metabolismo de tióis (metabolismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio) único (BARRETT; CROFT, 2012; BARROS-ALVAREZ et al., 2014)

O protozoário *Leishmania* existe sob duas formas que são morfologicamente e bioquimicamente distintas (Figura 2). O estágio extracelular, promastigota (10-20 μm), é encontrado no tubo digestório do inseto vetor. São formas alongadas com um flagelo externalizado que emerge do corpo do parasito na sua porção anterior (STUART et al., 2008), apresentando núcleo central e cinetoplasto terminal. A forma intracelular, amastigota (3-7 μm de diâmetro) são corpos ovais ou arredondados, presentes em células do sistema fagocítico mononuclear, preferencialmente macrófagos de hospedeiros mamíferos; o cinetoplasto localiza-se adjacente ao núcleo e não possui um flagelo exteriorizado (KAYE; SCOTT, 2011).

Figura 2. Observação microscópica de protozoários do gênero *Leishmania*.



Em **(a)** formas promastigotas e **(b)** amastigotas intracelulares (seta) no interior de macrófagos peritoneais murinos, ambos cultivados em meio de cultura. Aumento 100X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

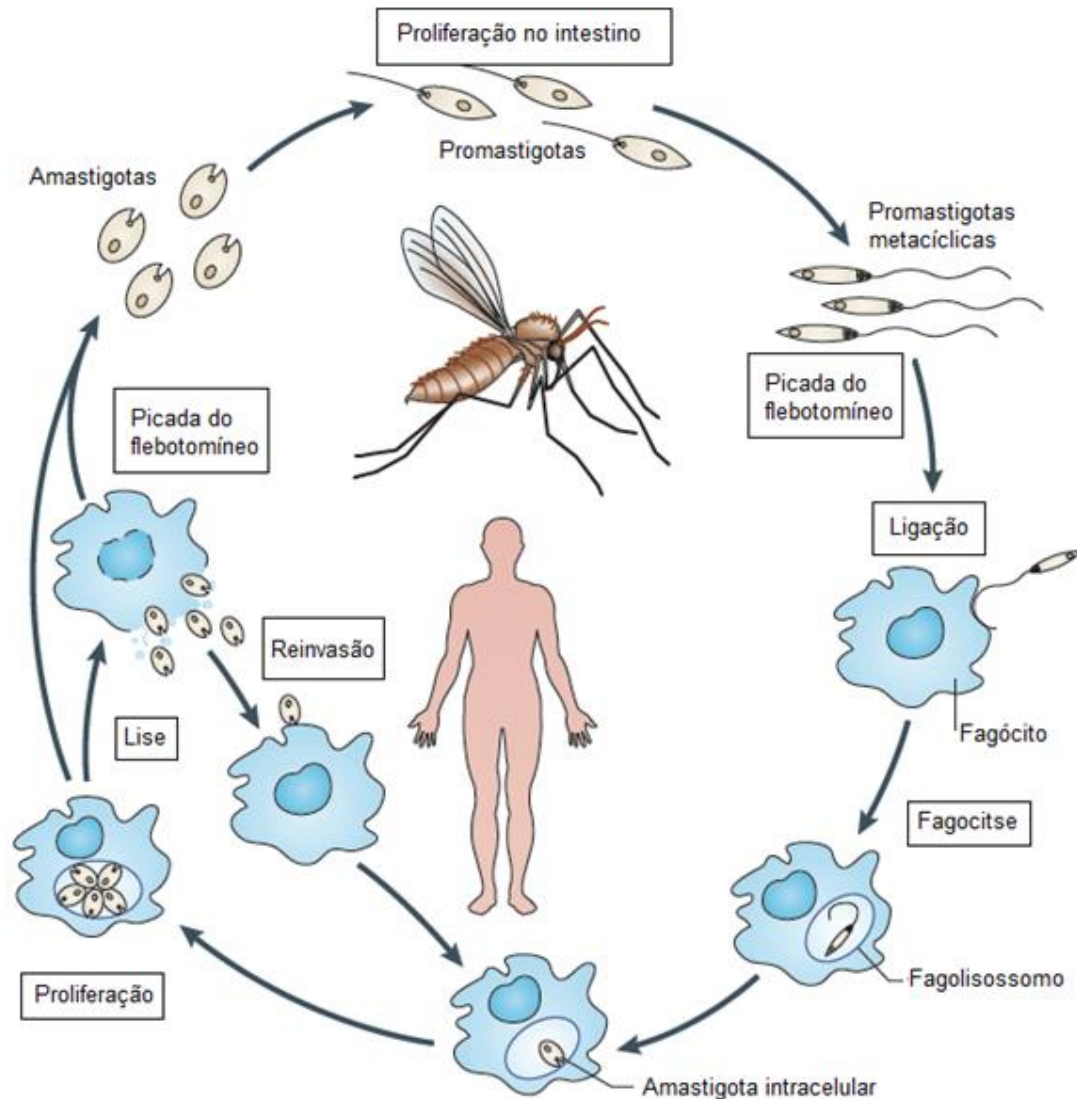
Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* spp. são transmitidas pela picada de dípteros da família Psychodidae. Estes vetores da doença são insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo, podem infectar tanto os animais reservatórios da doença, quanto o hospedeiro humano, representando o elo entre eles (GRIMALDI JUNIOR.; TESH, 1993; MATTOS et al., 2004; PACE, 2014). Muitos dos reservatórios da doença são bem adaptados ao ambiente urbano e desenvolvem infecções moderadas ou subclínicas, que podem persistir por anos. Uma importante exceção são os cães, os quais podem desenvolver uma doença generalizada e fatal (VAN ASSCHE et al., 2011). Além disso, o cão é a principal fonte de infecção para leishmaniose na área urbana.

O ciclo de vida deste parasito desenvolve-se quando a fêmea do inseto vetor flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, regurgita promastigotas infectantes (formas metacíclicas) na derme do hospedeiro mamífero. Os macrófagos atraídos ao local da picada fagocitam os parasitos. As interações parasito-hospedeiro iniciais são mediadas por receptores do complemento na superfície celular do macrófago (ANTOINE et al., 1998), os quais reconhecem moléculas abundantemente expressas na superfície das formas promastigotas, como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease de superfície (GP63) (MOSSER; ROSENTHAL, 1993). A fagocitose das promastigotas pelos macrófagos, mediada pelos receptores do complemento, origina o fagossomo. Este se

funde com os lisossomos do macrófago formando assim o fagolisossomo, onde as promastigotas completam sua diferenciação em amastigotas (BERMAN; DWYER; WYLER, 1979; CHANG; DWYER, 1976). Na maioria das vezes, os parasitos conseguem subverter os mecanismos imunes das células hospedeiras, e então os parasitos sofrem sucessivas multiplicações por divisão binária simples até que o macrófago infectado sofra lise, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos (BURCHMORE; BARRETT, 2001). O ciclo biológico completa-se quando um inseto pica novamente um hospedeiro contaminado e ingere os macrófagos infectados. Durante o trajeto pelo trato digestório do inseto, os macrófagos rompem-se liberando as amastigotas. Estas formas diferenciam-se em promastigotas não infectivas (forma procíclica), que se multiplicam rapidamente e transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando então atingem o estágio infectivo terminal estas são encontradas como promastigotas infectivas (promastigota metacíclica). O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72h (KILLICK-KENDRICK, 1990; WALTERS, 1993; WALTERS et al., 1993) (Figura 3).

Adicionalmente, o desenvolvimento diferenciado dos parasitos em seus hospedeiros invertebrados naturais possibilitou a divisão, por Lainson e Shaw, do gênero *Leishmania* em dois subgêneros. Sendo assim, a habilidade de desenvolvimento no intestino anterior (*Suprasyllaria*) ou no intestino posterior (*Peripylaria*) do flebotomíneo possibilitou que os dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, respectivamente, fossem distinguidos (LAINSON; SHAW, 1987). Além desta subdivisão a porção do intestino para o desenvolvimento pode ser correlacionada com a síndrome clínica causada.

Figura 3. Ciclo da vida do protozoário *Leishmania*.



As promastigotas procíclicas de *Leishmania* diferenciam-se nos flebotomíneos em promastigotas metacíclicas infecciosas. Durante repasto sanguíneo, o inseto regurgita as fomas metacíclicas, que são então fagocitados principalmente por macrófagos. Após o estabelecimento de uma residência intracelular, os promastigotas transformam-se em amastigotas aflagelados, as quais replicam dentro das células hospedeiras, que quando demasiadas rompem a célula, permitindo a reinfeção dos fagócitos locais. O ciclo de transmissão é completo quando os fagócitos infectados são capturados por outro flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de (KAYE; SCOTT, 2011).

2.3 Manifestações Clínicas

As leishmanioses são doenças que apresentam diferentes manifestações clínicas, que incluem leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose visceral (LV) ou calazar, e leishmaniose dermal pós-calazar (LDPC) (BEATTIE; KAYE, 2011). As espécies responsáveis pelas formas tegumentares da doença, denominadas dermatrópicas, apresentam tropismo pelas regiões de pele e mucosa, enquanto que, outras espécies apresentam tendência a proliferar e rapidamente disseminar do sítio inicial de infecção (pele) para órgãos viscerais tais como baço, linfonodos, medula óssea e fígado, causando LV (SOONG; HENARD; MELBY, 2012).

A forma tegumentar da doença pode ainda desencadear lesões ulceradas na pele característico da LC ou múltiplos nódulos não-ulcerativos, nesse caso conhecida como LCD (Figura 4A e 4B) (REITHINGER et al., 2007). A LC é caracterizada por lesões ulceradas com uma crosta aderente de exsudado seco, podendo ser únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas (GONZÁLEZ et al., 2009). As lesões de pele variam de 0,5 a 3 cm de diâmetro (WHO, 2007). Elas são causadas principalmente por *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) aethiopica* no Velho Mundo ou *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamanensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* no Novo Mundo (VAN ASSCHE et al., 2011). A LCD é uma forma anérgica de LC, sendo caracterizada pela presença de lesões nodulares que não ulceram. Esta é uma condição rara, a qual tem sido descrita na América do Sul, América Central e Etiópia. As lesões são ricas em parasitos e as espécies envolvidas são *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* no Novo Mundo e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo (GOTO; LINDOSO, 2010). O primeiro sinal de uma infecção é um pequeno eritema típico, que se desenvolve após um período variável no sítio da picada do inseto vetor. O eritema progride para uma pápula, e então um nódulo que progressivamente ulcera por um período de 2 semanas a 6 meses (REITHINGER et al., 2007).

A LM é uma forma crônica de leishmaniose (Figura 4C), sendo que cerca de 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (GONZÁLEZ et al., 2009; VAN

ASSCHE et al., 2011). Conhecida, também, como “espundia”, a LM é caracterizada pela destruição de cavidades faríngeas e oral-nasais, com lesões potencialmente desfigurantes. A espécie *L. (V.) braziliensis* está presente na maioria dos casos, mas outras espécies também são encontradas: *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (GOTO; LINDOSO, 2010). Estima-se que 1,5 milhões de novos casos são das formas cutânea ou mucocutânea (KEDZIERSKI, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011).

Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar.



Em **(A)** leishmaniose cutânea, **(B)** leishmaniose cutânea difusa e **(C)** leishmaniose mucocutânea. Fonte: Adaptado de (McGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LV é descrita em cerca de 70 países dos cinco continentes, adicionalmente há 200 milhões de pessoas em risco, e ocorrência de 500 mil novos casos anualmente (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Esta forma da doença é causada por parasitos intracelulares, que apresentam tropismo por macrófagos de órgãos linfoides. O período de incubação é geralmente de 2 semanas a 18 meses, com reações inflamatórias de órgão viscerais, porém a LV sintomática pode levar anos para manifestar-se. A doença é progressiva e geralmente fatal se não tratada apresentando uma taxa de mortalidade de 75%-95%. Os parasitos proliferam nas células do sistema mononuclear fagocitário do baço e do fígado ocasionando aumento no tamanho destes órgãos (hepatoesplenomegalia) (Figura 5A) (READY, 2014). Outros sintomas das anormalidades clínico-patológicas incluem febre, mal-estar, anemia, caqueixa, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia (IgG e IgM), e supressão progressiva da resposta imune celular (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

No leste da África, Índia e Ásia, a LV é causada pela espécie *Leishmania (L.) donovani*; e pela *Leishmania (L.) infantum* (sin. *Leishmania (L.) chagasi*) na Europa, Norte da África e América Latina (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Excepcionalmente, a visceralização de algumas espécies tipicamente associadas com LC foi observada, como por exemplo *L. (L.) amazonensis* na América do Sul. Em indivíduos co-infectados com HIV, a visceralização de espécies dermatrópicas também foi descrito (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). A forma zoonótica da LV apresenta os cães como reservatórios principais e ocorre na bacia do Mediterrâneo, China, Oriente Médio e América do Sul. Esta forma é causada principalmente por *L. (L.) infantum*. A forma antroponótica, com transmissão entre humanos e sem reservatório animal, é causada por *L. (L.) donovani*, sendo prevalente no leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal. Enquanto *L. (L.) infantum* predominantemente afeta crianças e indivíduos imunocomprometidos, *L. (L.) donovani* tende a afetar grupos de todas as idades (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

A LDPC (Figura 5B), uma complicação da LV, é caracterizada por uma erupção macular, maculo-papular ou nodular, e é frequentemente observada após o tratamento no Sudão, porém é raramente encontrada em outros países do leste Africano e subcontinentes da Índia (CHAPPUIS et al., 2007; READY, 2014).

Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.



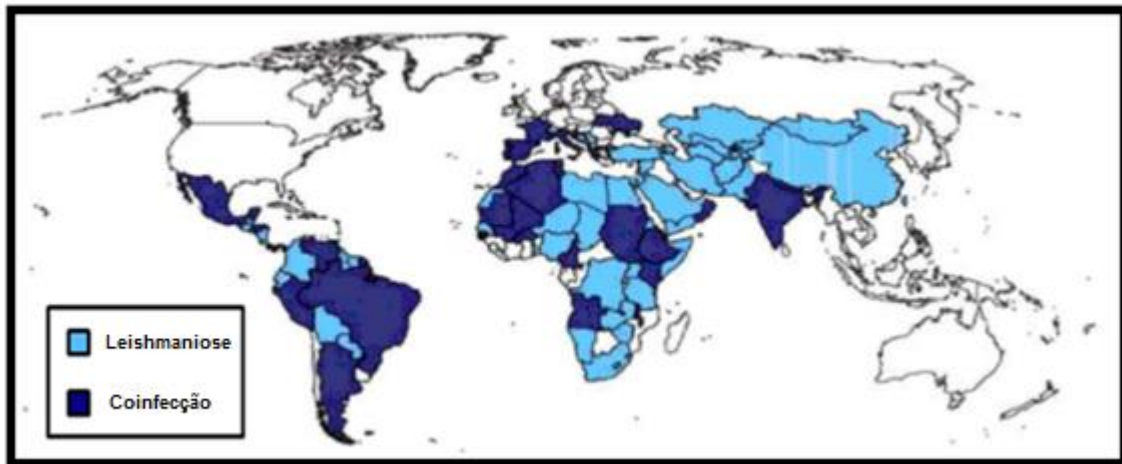
Em **(A)** leishmaniose visceral e **(B)** leishmaniose dermal pós-calazar.

Fonte: (A) Adaptado de (CHAPPUIS et al., 2007) e (B) adaptado de (McGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Além dos casos normalmente relatados, as leishmanioses (principalmente a LV) participam ainda do quadro de doenças oportunistas, que podem resultar no agravamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Recentemente, constatou-se um aumento da LV em áreas urbanas da América Latina (LINDOSO et al.,

2014), estas áreas de propagação são regiões onde concomitantemente indivíduos têm vivido com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). De acordo com a OMS estima-se 1,4 milhões de pessoas estejam nessas áreas de coinfeção leishmanioses-AIDS (Figura 6) (DESJEUX; ALVAR, 2003; LINDOSO et al., 2014). A LV e a AIDS compartilham mecanismos imunopatológicos semelhantes, incluindo o comprometimento dos mesmos compartimentos do sistema imunológico, tais como células dendríticas e macrófagos, contribuindo para a aceleração da progressão de ambas as doenças (BERNIER; TURCO; OLIVIER, 1995; MOCK et al., 2012). Adicionalmente, existem relatos de casos de coinfeção não responsivos à monoterapia (uso somente de miltefosina, por exemplo), sendo necessário o uso de terapia combinada (anfotericina B lipossomal + miltefosina) (PATOLE; BURZA; VARGHESE, 2014).

Figura 6. Mapa de distribuição dos casos de leishmanioses e casos de coinfeção *Leishmania*/HIV no mundo até 2001.



Fonte: Adaptado de (DESJEUX; ALVAR, 2003).

Sendo assim, é possível verificar que o tropismo do parasito resulta em um delineamento da manifestação clínica apresentada (ZIJLSTRA, 2014). Portanto, as leishmanioses compreendem um amplo espectro de manifestações clínicas dependendo das espécies envolvidas. Adicionalmente, acredita-se que variações nos glicoconjugados de superfície podem direcionar as respostas imunes Th1/Th2 e determinar o resultado da doença (ASSIS et al., 2012). As manifestações são, portanto, resultado da interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, sendo o entendimento dos

mecanismos imunológicos importante na administração da terapia de fármacos (ZIJLSTRA, 2014).

2.4 Tratamento Farmacológico

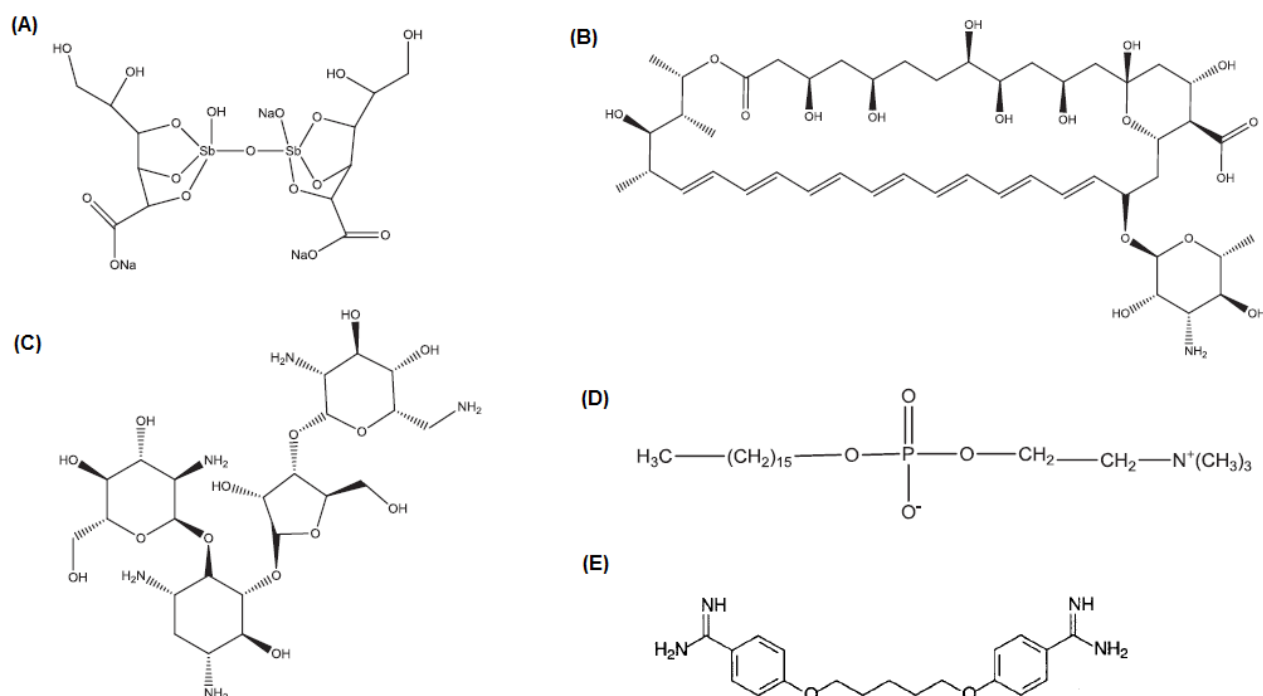
A quimioterapia continua a ser a opção mais empregada para controlar as leishmanioses, uma vez que até o momento verifica-se a falta de uma vacina humana efetiva contra LC, LM ou LV (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009). Porém, o tratamento das leishmanioses ainda permanece um problema, pois poucos fármacos foram desenvolvidos para este uso específico. Os principais fármacos disponíveis para o tratamento da LV são os agentes sistêmicos como os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), anfotericina B (AnfB), anfotericina B lipossomal, paromomicina e o único fármaco oral disponível, a miltefosina (Quadro 1, Figura 7) (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Por outro lado, para o tratamento da LC além dos fármacos citados, há também disponível a pentamidina (Quadro 1, Figura 7) (CROFT; OLLIARO, 2011). No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza três opções terapêuticas para LV: antimoniato de meglumina (Glucantime), AnfB deoxicolato e AnfB lipossomal (MELO; FORTALEZA, 2013).

Quadro 1. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, propriedades, administração e comentários.

Fármaco	Administração e propriedades	Indicações e comentários	Efeitos colaterais	Mecanismo de ação	Referências
Estibogluconato de sódio (Pentostam®) e Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	Parenteral. Complexos organometálicos em formas poliméricas.	LC e LV. Resposta variável em diferentes espécies que causam LC.	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e efeitos cardiotoxicos. Resistência no Bihar, Índia.	Inibição da glicólise e β -oxidação de ácidos graxos.	(BARRETT; CROFT, 2012; CROFT; OLLIARO, 2011; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006)
Anfotericina B (Fungizone®)	Intravenoso lento. Antifúngico poliênico.	LC, LV e formas complexas de LC.	Nefrotoxicidade, hipocalcemia, rigores e calafrios durante a infusão. Resistência não documentada.	Apresenta elevada afinidade para o ergosterol, o esteroide predominante da membrana celular de <i>Leishmania</i> .	(BALASEGARAM et al., 2012; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012)
Pentamidina	Intramuscular. Diamina, como sal isotionato.	LC. Tratamento preconizado apenas na América do Sul.	Dor, náuseas, vômitos, tonturas, mialgia, hipertensão, cefaléia.	Interfere com a síntese de DNA e modifica a morfologia do cinetoplasto.	(KAUR; RAJPUT, 2014)
Miltefosina	Oral. Hexadecilfosfocolina.	LV e LC. Primeiro fármaco para uso oral.	Efeitos gastrointestinais, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e possível teratogenicidade. Resistência relatada.	Interfere na biossíntese de fosfolípidos e no metabolismo de alquil-lípidos em <i>Leishmania</i> .	(CROFT; OLLIARO, 2011; PÉREZ-VICTORIA et al., 2003)
Paromomicina	Tópica (LC) ou parenteral (LV).	LC e LV	Eritema, dor, edema.	Inibe a translocação e reciclagem de subunidades ribossomais e, portanto, síntese de proteínas.	(KAUR; RAJPUT, 2014; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012)

FONTE: Adaptado de (ALMEIDA et al., 2017; CROFT; OLLIARO, 2011).

Figura 7. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.



Estibogluconato de sódio em (A), anfotericina B em (B), paromomicina em (C), miltefosina em (D) e pentamidina em (E).

Fonte: (A)-(D) de VAN ASSCHE *et al.*, 2011, (E) de CROFT *et al.*, 2006.

2.4.1 Tratamento de primeira escolha

Gaspar Vianna sugeriu o uso de antimoniais trivalentes para tratar os primeiros casos diagnosticados de LC em São Paulo em 1914 (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017). Porém, seu uso foi abandonado devido à alta toxicidade, apesar da eficácia para tratar as leishmanioses. Em 1923, descobriu-se o primeiro antimonial pentavalente, o qual mostrou ser menos tóxico que o antimônio trivalente antecessor. Posteriormente, este antimonial foi substituído pelo estibogluconato de sódio, o qual permanece como um dos fármacos de primeira escolha para as leishmanioses até os tempos atuais (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Há duas formulações de antimonial em uso: o estibogluconato de sódio, o qual contém 100 mg de antimônio/100 mL do Pentostam, e o antimoniato de meglumina, o qual contém 85 mg de antimônio/100 mL do Glucantime. Ambas as formulações apresentam eficácia e toxicidade comparáveis (MOORE; LOCKWOOD,

2010). Em 1984, a dose de antimonial pentavalente recomendado pela OMS era de 10 mg/Kg/dia por 20 dias (WHO, 1984), a qual foi alterada para 20 mg/Kg/dia por um período de 28-30 dias, já que diversos estudos mostraram que esta dose aumentava os níveis de cura sem apresentar aumento substancial em sua toxicidade. Adicionalmente, os antimoniais apresentam baixa absorção oral, e são, portanto, recomendadas injeções via parenteral (MOORE; LOCKWOOD, 2010). As últimas recomendações da OMS rebaixaram o uso dos antimoniais pentavalentes para segunda escolha, indicando a AnfB lipossomal como fármaco de primeira escolha (WHO, 2010). Entretanto, devido às restrições no uso da AnfB lipossomal, a maioria relacionadas ao preço e disponibilidade, os antimoniais pentavalentes permanecem amplamente usados como primeira opção para LV (ALMEIDA et al., 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017).

Relata-se que o antimoniato pentavalente (Sb^V) é considerado pró-fármaco, o qual é convertido a antimoniato trivalente (Sb^{III}), a forma ativa do fármaco (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Tanto a glutatona e tripanotona podem reduzir não-enzimaticamente Sb^V a Sb^{III} , particularmente sob condições ácidas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Porém, apesar dos vários anos de uso, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda permanece obscuro, mas autores descrevem que os fármacos possam inibir vias glicolíticas e vias oxidativas de ácidos graxos em amastigotas (GOTO; LINDOSO, 2010).

No entanto, estes fármacos apresentam efeitos colaterais tóxicos, como náusea, vômito, fraqueza e mialgia, cólica abdominal, arritmia cardíaca e pancreatite, os quais corroboram na dificuldade do tratamento (VAN ASSCHE et al., 2011). Recentemente, o uso dos antimoniais foi limitado na Índia, devido ao surgimento de casos de resistência aos fármacos (> 60%) (MELO; FORTALEZA, 2013). Entretanto, apesar de haver casos de resistência no Nepal, Bangladesh e Sudão, estes não estão documentados (OLLIARO, 2010). Acredita-se que o mecanismo de resistência em espécies de *Leishmania* esteja relacionado à superexpressão de bombas de efluxo pertencentes aos transportadores da superfamília ABC (LEANDRO; CAMPINO, 2003). Relata-se que a superexpressão desses transportadores resulta em um aumento do efluxo do fármaco, possibilitando ao parasito evadir os efeitos citotóxicos do estibogluconato de sódio (MALTEZOU, 2010; SINGH, 2006). Basu e colaboradores descreveram que a infecção

com *L. (L.) donovani* resistente ao estibogluconato de sódio induz uma regulação positiva da proteína associada à multirresistência a fármacos, resultando em uma ausência de acúmulo do fármaco e, portanto, favorecendo a replicação do parasito (BASU et al., 2008).

2.4.2. Tratamento de segunda escolha

A AnfB deoxicolato é um antifúngico poliênico, o qual foi introduzido para tratamento da LV no Novo Mundo em 1960, mas com uma janela terapêutica (faixa entre a dose mínima eficaz e máxima eficaz) estreita (ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012; MELO; FORTALEZA, 2013; WORTMANN et al., 2010). Em áreas em que casos de resistência aos antimoniais é prevalente, AnfB é o fármaco de escolha para a terapêutica (MOHAMED-AHMED; BROCCINI; CROFT, 2012). A AnfB possui alta afinidade por ergosterol, o esteroide predominante de fungos e de formas amastigotas de *Leishmania* (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Essa interação com a membrana do parasito leva à formação de canais transmembranas e poros aquosos, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana celular e promovendo o influxo de íons para o parasito, levando-o a morte (SEIFERT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011). Este fármaco apresenta excelente atividade leishmanicida, com índices de cura de 90-95% em estudos em países endêmicos (MELO; FORTALEZA, 2013). Além disso, casos de resistência ainda não foram descritos (BALASEGARAM et al., 2012). Porém, a administração intravenosa da AnfB deve ser lenta, de modo a evitar efeitos adversos relacionados à infusão, fato este que resulta na necessidade de internação para o tratamento. Além disso, os níveis de nefrotoxicidade podem ser maiores que 50% (MELO; FORTALEZA, 2013).

Afim de evitar os efeitos colaterais tóxicos, em 1986 Berman e colaboradores desenvolveram uma formulação lipossomal de AnfB. Esta formulação mostrou-se 350-750 vezes mais efetiva do que o antimoniato de meglumina e de 2-5 vezes mais ativos que AnfB (BERMAN et al., 1986). Em 1997, a formulação lipossomal de Anf (AmBisome®) foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration* – Administração de Fármacos e Alimentos) para o tratamento da LV (WORTMANN et al., 2010). Outra vantagem dessa

formulação, é a redução da duração total da terapia comparada à duração do tratamento com a forma não lipossomal (McGWIRE; SATOSKAR, 2014). Além disso, outras formulações lipídicas de AnfB foram desenvolvidas nas últimas duas décadas e vêm sendo usadas em estudo clínicos para tratamento das leishmanioses (MOHAMED-AHMED; BROCCCHINI; CROFT, 2012), como por exemplo o complexo lipídico de AnfB (Abelcet), e a dispersão coloidal de AnfB (Anfocil), além da forma lipossomal mencionada acima (MELO; FORTALEZA, 2013). Nestas formulações, o deoxicolato é substituído por alguns tipos de lipídios: o Abelcet inclui dois fosfolipídios dimiristoilfosfatidilcolina e L- α -dimiristoil fosfatidilglicerol sobre o fármaco; o Anfocil é uma mistura de AnfB e complexo de sulfato de colesteril; e o AmBisome é uma preparação liofilizada de AnfB consistindo de proporções específicas de substâncias anfifílicas, como fosfatidilcolina, distearoilfosfatidilglicerol e colesterol (ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012; ALMEIDA et al., 2017).

A paromomicina apesar de ser quimicamente um antibiótico aminoglicosídico, teve sua atividade leishmanicida descrita pela primeira vez nos anos 60, sendo proposto como um agente tópico para LC (EL-ON et al., 1986). Mais tarde foi alternativamente usado por via parenteral no tratamento da LV (CHUNGE et al., 1990). Relata-se que este fármaco atua através da inibição do metabolismo e respiração mitocondrial (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011). Em *Candida krusei* atua inibindo citocromo C, porém em *Leishmania* o mecanismo de ação da paromomicina não está totalmente elucidado. Estudos sugerem que este fármaco iniba mitocôndria em *Leishmania*, enquanto que outros estudos sugerem que este fármaco iniba a translocação e reciclagem das subunidades ribossomais (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Ambas as formas de LC e LV podem ser tratadas com este antibiótico, mas sua baixa capacidade de absorção por via oral levou ao desenvolvimento de formulações tópica e parenteral para LC e LV, respectivamente (GOTO; LINDOSO, 2010; TIUMAN et al., 2011). Os efeitos adversos incluem ototoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011).

A miltefosina é um alquilfosfolipídeo (hexadecilfosfocolina), o qual foi originalmente desenvolvido como agente antineoplásico (GOTO; LINDOSO, 2010). A atividade leishmanicida deste fármaco em modelos animais foi descrita no início dos anos

90. A miltefosina é ativa quando administrada via oral e estudos sugerem que a dose ótima é de 100 mg/dia durante 28 dias (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Portanto, pode-se verificar que este é o único fármaco oral disponível para LV (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011). Embora, o modo de ação da miltefosina não esteja claro, acredita-se que ocorra redução dos componentes lipídicos na membrana de promastigotas e aumente a quantidade de fosfatidiletanolamina, sugerindo uma inibição parcial da fosfatidiletanolamina-*N*-metiltransferase, levando à diminuição da proliferação do parasito (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Os efeitos adversos incluem náusea, vômito, vertigem, diarreia, hepatite, insuficiência renal e teratogenicidade (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011). Adicionalmente, estudos mostraram toxicidade reprodutiva, sendo assim, contraindicado para mulheres grávidas e em idade reprodutiva (MOORE; LOCKWOOD, 2010). O longo tempo de meia-vida deste fármaco é outro problema ($t_{1/2}$ = 152 horas), o que pode colaborar para o desenvolvimento de casos de resistência (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A pentamidina é uma diamina aromática, a qual foi inicialmente usada para tratar pacientes refratários aos antimoniais na Índia, mas a baixa eficácia e altos níveis de risco de resistência encerram seu uso (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Sugere-se que este fármaco interfira na síntese de DNA de *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo fragmentação da membrana mitocondrial, com consequente morte do parasito (GOTO; LINDOSO, 2010). A pentamidina é altamente tóxica, causando hipoglicemia, nefrotoxicidade e hipotensão (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Pode-se então constatar que a segurança limitada dos fármacos utilizados para tratar as leishmanioses é uma preocupação principal (KAISER et al., 2015), visto que estes medicamentos apresentam efeitos colaterais graves, frequentemente necessitam de administração parenteral, requerem longos períodos de tratamentos e de maneira crescente tem surgido falhas no tratamento devido ao aparecimento de cepas resistentes (CROFT, 2005). Apesar das pesquisas básicas envolvendo as DNAs serem produtivas, ainda há pouco sucesso na transferência dessas descobertas para a indústria farmacêutica, a qual não tem interesse em assumir os riscos associados ao desenvolvimento de novos fármacos para este propósito. Entretanto as parcerias público-

privadas (PPP) que tem surgido renovaram as possibilidades de desenvolvimento de novos produtos para as DNs (MILLET, 2006).

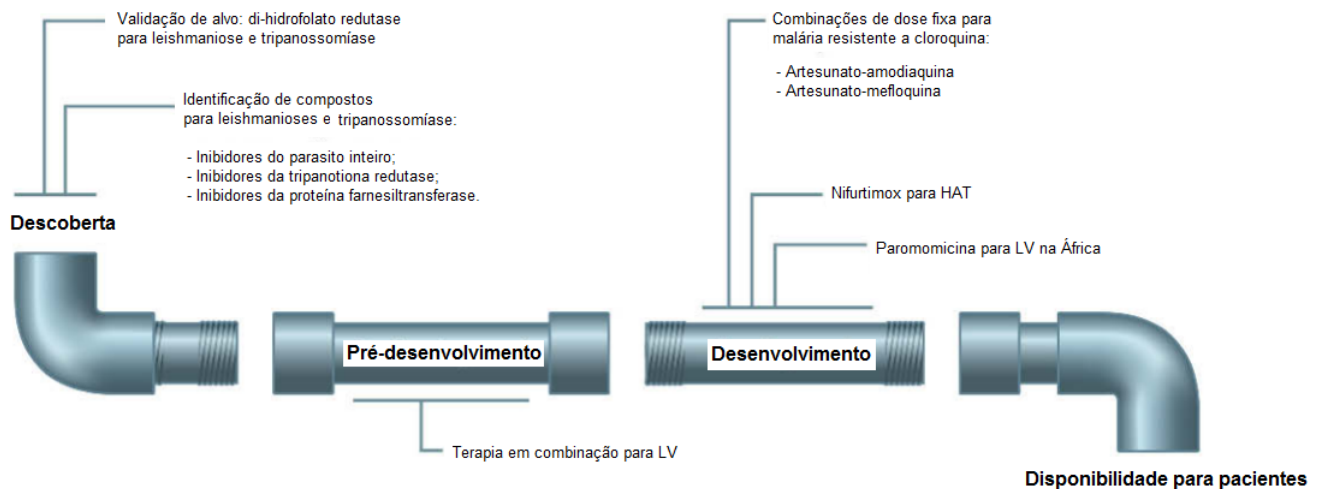
2.4.3. Novos fármacos e o pipeline do DNDi

O surgimento de PPPs para o desenvolvimento de fármacos veio a partir da necessidade de concentrar os recursos de forma eficaz na investigação e no desenvolvimento de fármacos para as doenças infecciosas que afetam as populações dos países em desenvolvimento, tendo em vista os limitados incentivos do mercado para o investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) (KATSUNO et al., 2015). Embora os problemas no desenvolvimento de novos fármacos para DNs tenham surgido antes dos anos 90, esta problemática se estende até os dias atuais. Atribui-se a falta de investimentos adequados em P&D de fármacos à ausência de retorno financeiro para as empresas farmacêuticas e de biotecnologia (PEDRIQUE et al., 2013). O aumento dos custos de P&D acarretou em falta de disposição para as indústrias farmacêuticas em desenvolver produtos específicos para doenças que afligem populações sem poder de compra e consequentemente, baixo retorno financeiro (CROFT, 2005). No momento, as PPPs, bem como financiamento de entidades filantrópicas são responsáveis pelo impacto e pelas mudanças em P&D para DNs que estão ocorrendo nos últimos anos (NWAKA; RIDLEY, 2003).

A organização sem fins lucrativos “Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas” (DNDi – do inglês *Drugs for Neglected Diseases Initiative*) foi criada para mobilizar recursos para P&D de novos medicamentos para as DNs. (PÉCOUL, 2004). O DNDi tem abordado questões envolvendo países com doenças endêmicas. Quatro de seus sócios fundadores são instituições de pesquisas de países em desenvolvimento, como a Fundação Oswaldo Cruz no Brasil (CROFT, 2005). Atualmente, a cartela de projetos do DNDi possui nove projetos em diferentes estágios de desenvolvimento para atender o tratamento da LV, doença do sono, doença de Chagas e malária. Focando nas leishmanioses, na fase de descoberta, o DNDi está trabalhando na validação de enzimas como a diidrofolato-redutase timidilato sintase como potencial alvo terapêutico e na identificação de inibidores das enzimas tripanotona redutase e farnesiltransferase. Na

fase de pré-desenvolvimento, tem investido em possíveis combinações de fármacos existentes para LV, enquanto que, no estágio de desenvolvimento, tem sido avaliado o uso da paromomicina para LV na África (CROFT, 2005; PÉCOUL, 2004) (Figura 8).

Figura 8. Projetos do DNDi.



A cartela de projetos do DNDi contém nove projetos espalhados pelo pipeline do desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses, tripanossomíase humana Africana, doença de Chagas.

Fonte: Adaptado de (PÉCOUL, 2004).

A OMS é outra importante organização que contribuído na diminuição do impacto do cenário desfavorável da terapêutica para as DN, chamando atenção da comunidade científica para a necessidade de combatê-las pela descoberta de novos compostos bioativos, controle, treinamento, entre outras ações. Estas organizações atuam na formação de PPPs, envolvendo diferentes parceiros, cada um detentor de um conhecimento específico e executor de ações que aceleram o processo de descoberta de novos compostos bioativos dentro do *pipeline* que engloba esforços desde a descoberta de um *hit* até sua colocação no mercado. Para as doenças infecciosas, os candidatos a *hit* geralmente derivam de triagens envolvendo o patógeno inteiro, como o *screening* fenotípico (KATSUNO et al., 2015). Após a seleção do *hit* deve-se prosseguir para estudos *in vivo*, e então realizar a otimização do *hit* e posterior identificação de um composto líder ("*lead*") (CHATELAIN; IOSET, 2011). Mesmo com este panorama, as terapias atualmente disponíveis apresentam sérias deficiências e, portanto, é evidente a

necessidade de se desenvolver e explorar novos compostos bioativos, melhorar o diagnóstico e controlar a progressão dessas doenças.

2.5 Derivados de Furoxano e Benzofuroxano

Os furoxanos (1,2,5-oxadiazol-2*N*-óxido) e benzofuroxanos (benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-1*N*-óxido) foram sintetizados pela primeira vez há cerca de 100 anos e, mesmo após todo este período, suas estruturas químicas ainda se mostram interessantes para a descoberta de moléculas bioativas. Diversos compostos destes grupos foram associados a atividades antimicrobiana (CALVINO et al., 1980, 1984; PERSICHINI et al., 1999), antiparasitária (BENÍTEZ et al., 2014; BOIANI et al., 2008; CASTRO et al., 2009; GALLI et al., 2005; PORCAL et al., 2007) e anticâncer (TIRONI et al., 1989; ZOU et al., 2011), dentre outros (CERECETTO; PORCAL, 2005).

A atividade leishmanicida e tripanocida de derivados de benzofuroxanos, os quais mostraram-se mais seletivos que o fármaco de referência (AnfB), foi descrita por Castro e colaboradores. A ação destes compostos foi relatada por estar associada à interferência com a mitocôndria do parasito e produção de estresse oxidativo (CASTRO et al., 2009).

Por outro lado, os derivados de furoxanos, os quais foram descritos por sua atividade frente a formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) pifanoi*, tiveram seu mecanismo de ação associado à geração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNS), dentre os quais destacamos o óxido nítrico (NO) (BOIANI et al., 2008). De fato, a atividade leishmanicida destes derivados parece estar relacionada ao aumento dos níveis de NO, uma vez que há perda na atividade descrita quando o grupamento *N*-óxido é retirado dos derivados de furoxanos (BOIANI et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2013). Sendo assim pode-se dizer que os furoxanos são uma classe importante de doadores de NO, o qual é descrito como uma importante molécula efetora no controle do parasito *Leishmania* (ZOU et al., 2011). De fato, autores ressaltam que o NO é capaz de interromper o ciclo de vida da *Leishmania*, através da inativação de enzimas importantes para a virulência do parasito, como por exemplo, as cisteíno proteases. Especificamente, o derivado de furoxano SNO-102 foi capaz de doar NO e

mediar a modificação química do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico de proteases de *Leishmania* spp. bloqueando sua atividade enzimática (ASCENZI et al., 2004).

Vale ressaltar que alguns dos furoxanos supracitados por sua atividade leishmanicida, tratavam-se de estruturas híbridas de furoxanos conectados à diferentes resíduos aromáticos por moléculas de *N*-acil-hidrazonas (HERNÁNDEZ et al., 2013). A subunidade *N*-acil-hidrazona vem sendo descrita por atuar na inibição de proteases do parasito (IFA et al., 2000; ROMEIRO et al., 2009). Alguns autores além de descreverem a atividade em formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, mostraram a inibição da enzima cruzaina por moléculas contendo *N*-acil-hidrazona em sua estrutura (CARVALHO et al., 2012). De fato, esta subunidade foi amplamente explorada no desenho de novos compostos bioativos com diferentes perfis farmacológicos (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; FRAGA; BARREIRO, 2006), e a sua característica farmacofórica foi identificada durante o desenvolvimento de alguns inibidores de cisteíno proteases (IFA et al., 2000; LI et al., 1996; RODRIGUES et al., 2002).

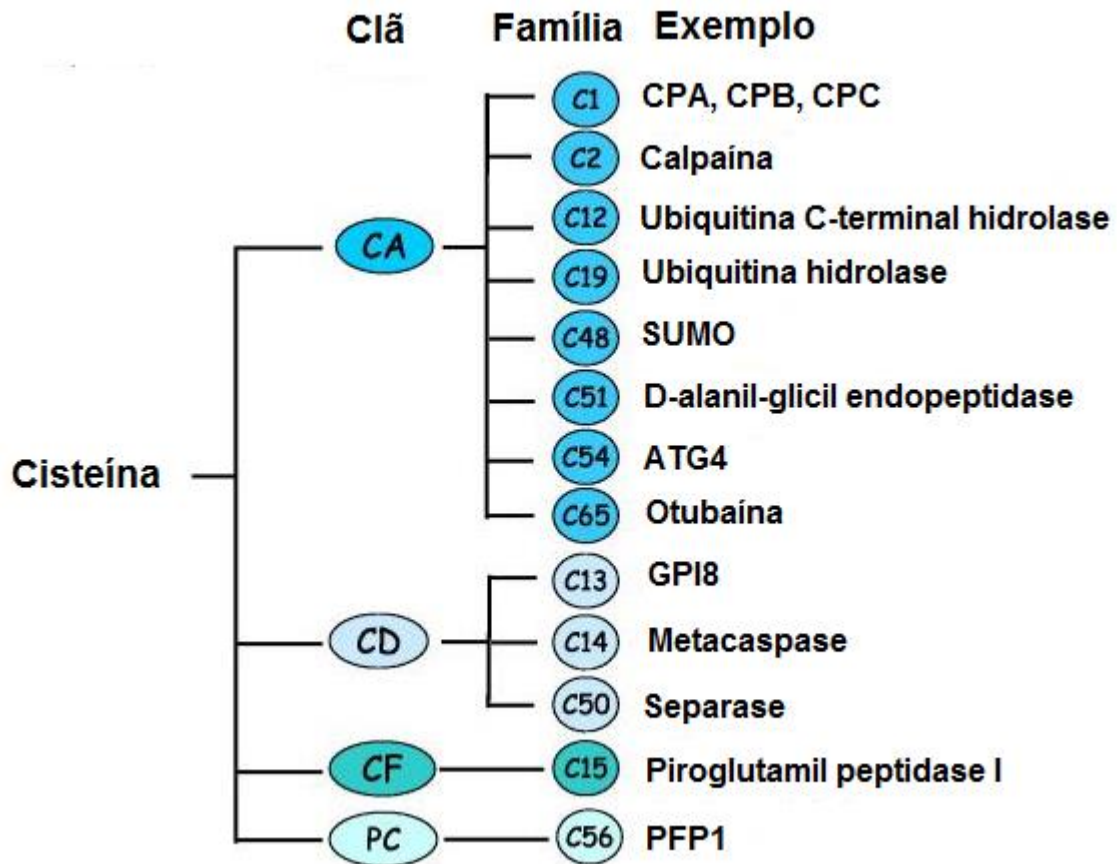
2.6 Cisteíno Proteases

As proteases são enzimas que fazem parte de vias bioquímicas e metabólicas e são essenciais para o ciclo de vida e patogenia dos agentes causadores de doenças como as leishmanioses e doença de Chagas (DAS; ALI, 2014; SAJID; McKERROW, 2002). Estas enzimas permitem a perpetuação de parasitos dentro de seus hospedeiros, uma vez que ativam mecanismos de sobrevivência, e por outro lado, podem ser exploradas como os potenciais alvos para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento de tais doenças parasitárias (MICHELS; AVILÁN, 2011). Estas também estão envolvidas em diversos mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, incluindo a evasão ou modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação, contribuindo para a invasão do hospedeiro e o estabelecimento da infecção, além de

interferir na resistência do parasito aos tratamentos (COOMBS; MOTTRAM, 1997; SAJID; McKERROW, 2002).

As proteases são divididas em classes (ou grupos), de acordo com seu mecanismo de ação e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico, como por exemplo as aspartil-, serino-, cisteíno-, treonino-, glutamil- e metalo-proteases, além de outras enzimas com mecanismos ainda desconhecidos (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006). Dentro de um grupo, as proteases podem ser ainda distribuídas em clãs e famílias dependendo de uma série de características como: similaridade de sequências, inserção de *loops* peptídicos e especificidade bioquímica à substratos peptídicos (Figura 9) (SAJID; McKERROW, 2002). Ressalta-se que dentre as proteases de *Leishmania*, especialmente as cisteíno proteases (CPs), metaloproteases e serino proteases foram amplamente investigadas e consideradas essenciais para os parasitos e patogênese (DAS; ALI, 2014). Adicionalmente, ao longo das últimas décadas, estudos evidenciaram as características altamente promissoras de CPs de protozoários como alvos terapêuticos (LIMA; REIS; COSTA, 2013). Em 1879, a primeira CP foi purificada e caracterizada a partir de *Carica papaya*, posteriormente denominada papaína. A partir desta descoberta, várias proteases similares à papaína vem sendo designadas como proteases semelhantes à papaína (do inglês *papain-like*) (SAJID; McKERROW, 2002). *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* spp. possuem uma abundância de CPs (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998), a maioria destas CPs de protozoários caracterizadas pertencem ao clã CA, o qual compreende as enzimas similares à papaína, mas que também inclui as CPs de mamíferos como as catepsinas B, C, K, L e S. Dentre as CPs de protozoários pertencentes a este clã, temos a cruzaína de *T. cruzi*, as CPA, CPB e CPC de *Leishmania* e as falcipainas de *Plasmodium falciparum* (MOTTRAM et al., 2003). A CPA é codificada por genes em cópia única e foi descrita em *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*. Enquanto que a CPB é codificada por genes que ocorrem em cópias múltiplas arranjadas *em tandem*. Além disso, uma extensão C-terminal não usual de 100 aminoácidos, que é frequentemente glicosilada, é uma característica da CPB que pode distingui-la da demais CPs na superfamília da papaína (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; REBELLO et al., 2009).

Figura 9. Clãs e famílias de proteases de *L. (L.) major*. A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

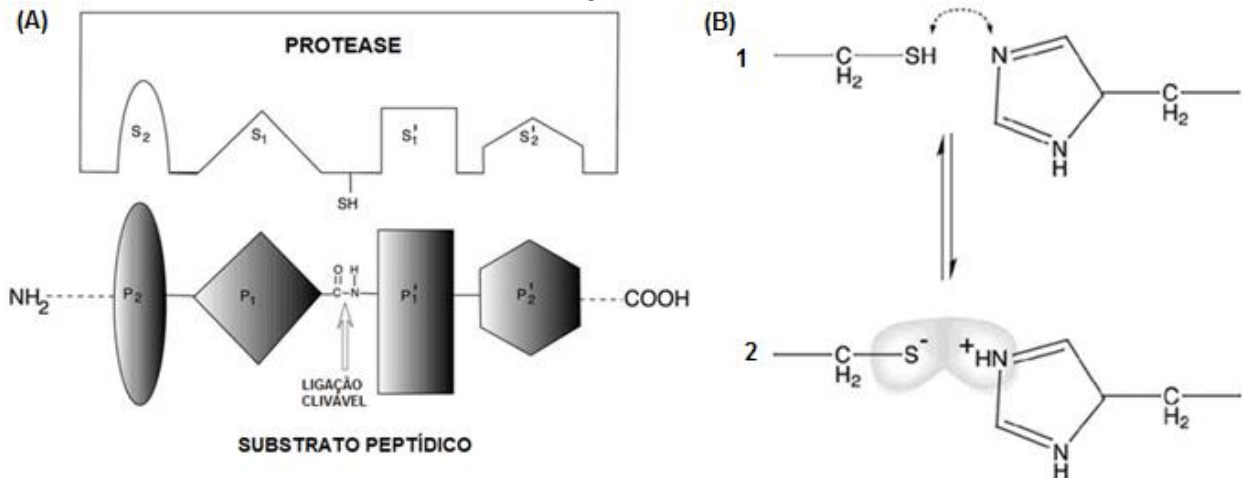


Em destaque clãs e famílias de cisteíno proteases, e exemplos de proteases presentes em cada família.

Fonte: Adaptado de (BESTEIRO et al., 2007).

Para que a hidrólise ocorra, as CPs requerem um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima (MOTTRAM et al., 1997). Estas enzimas são excelentes nucleófilos devido à presença de uma nuvem eletrônica presente no enxofre do grupo tiol. Portanto, o grupo tiol é reforçado como nucleófilo devido à proximidade de uma histidina do sítio ativo que atua como protón doador. O grupo sulfidril (ou grupo -SH) da cadeia lateral da cisteína e o imidazol da histidina dão origem a um tiolato-imidazólio que transmite a carga da díade (Figura 10) (SAJID; McKERROW, 2002).

Figura 10. Representação diagramática de interação do substrato peptídico com os bolsões de sítio ativo de uma cisteíno protease.



Em **(A)** os resíduos de aminoácidos do peptídeo são indicados por 'P' e os subsítios que interagem com o peptídeo é indicado por 'S'. O nucleófilo sulfidril do sítio ativo da cisteína é representado como -SH, e a ligação peptídica correspondente que é atacado antes da hidrólise está indicado pela seta. Em **(B)** representação esquemática da proximidade espacial no local de exibição ativo: (1) o grupo sulfidril da cisteína com o grupo imidazol da histidina, e o equilíbrio em (2) com o tiolato-imidazólico que redistribui a carga díade. A área sombreada representa uma densa nuvem de elétrons deslocalizada.

Fonte: (SAJID; MCKERROW, 2002).

Estudos revelam que as CPs de *L. (L.) mexicana* atuam como fatores de virulência e que estão envolvidas na evasão das defesas microbicidas dos macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasito no interior da célula (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Isso decorre da possível participação de CPs no processo de diferenciação de promastigotas metacíclicas a amastigotas, bem como em seu papel no balanço da resposta Th1/Th2 (CAMERON et al., 2004). O favorecimento da resposta Th2 e o envolvimento de CPs neste processo ocorrem pela degradação de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II do macrófago do hospedeiro, com consequente aumento na expressão de IL-4 e IL-1, as quais direcionam a diferenciação de precursores de células T CD4⁺ para o fenótipo de células T *helper* 2 (Th2). Tais efeitos gerados pelas CPs do protozoário favorecem a proliferação do parasito e, adicionalmente, a replicação de formas amastigotas pode ser promovida através da regulação negativa da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), devido as grandes quantidades de TGF- β que é secretado por macrófagos infectados com *Leishmania*

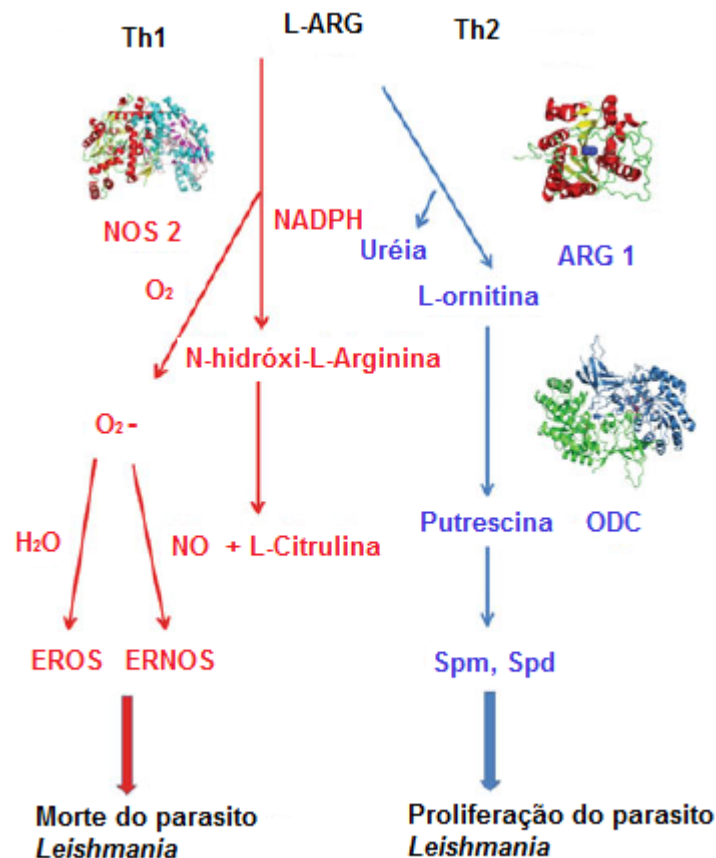
(MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Estudos mostram um comportamento semelhante ao descrito acima para o protozoário *T. cruzi*, que possui uma enzima homóloga a CPB, a cruzaína. Essa enzima (cruzaína) estimula a ativação alternativa de macrófagos, resultando, por sua vez, em um aumento da atividade da arginase e produção de IL-10 e TGF- β . Consequentemente, o crescimento do *T. cruzi* é facilitado em macrófagos devido ao aumento da síntese das poliaminas, que promove multiplicação do parasito e regulação negativa da iNOS. Estudos em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* indicam que mecanismos similares podem promover a multiplicação de *Leishmania* (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Tais dados corroboraram com o potencial da CP como importante fator de virulência de *Leishmania*, devido à indução de resposta imune Th2 e inibição de respostas Th1 do hospedeiro e imunidade protetora (CAMERON et al., 2004; McKERROW et al., 2006).

2.7 *Leishmania* e o Escape do Sistema Imune do Hospedeiro

Enquanto as formas promastigotas interagem com macrófagos apenas no início da infecção, as formas amastigotas devem continuamente infectar e sobreviver no interior destas células e, para isso, empregam estratégias diferentes para escapar dos efeitos microbicidas do hospedeiro. Estudos sugerem que a imunoglobulina G (IgG) parasito-específicas produzida durante a doença facilita a opsonização de amastigotas e a ligação aos receptores gama Fc (Fc γ Rs). A ligação aos Fc γ Rs de macrófagos resulta na expressão de IL-10 (UENO; WILSON, 2012), por sua vez a expressão dessa interleucina resulta na supressão da resposta Th1, facilitando a sobrevivência e replicação do parasito (MALTEZOU, 2010). De fato, uma resposta imune Th2 desviada por agentes intracelulares, resulta em um aumento da suscetibilidade do hospedeiro às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito. Isto ocorre, uma vez que, os macrófagos ativados por linfócitos Th2 promovem uma via alternativa através de quimiocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- β , e as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13 e, dessa maneira, tornam-se permissivos ao desenvolvimento do parasito via ativação da biossíntese de poliaminas. As enzimas da biossíntese das poliaminas são essenciais para sobrevivência e virulência do parasito *Leishmania*. (BALAÑA-FOUCE et al., 2012).

O precursor dessa via é a L-arginina (L-Arg), a qual é o substrato de duas vias divergentes dependendo da expressão de duas moléculas induzíveis, óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e arginase (ARG), as quais são competitivamente controladas pela produção de citocinas com perfil Th1 ou Th2. Citocinas anti-inflamatórias Th2 induzem a expressão de ARG e inibe a NOS2 e consequentemente aumenta a produção das poliaminas e a tolerância do hospedeiro para a proliferação de *Leishmania*. Por outro lado, a ativação Th1 dependente da NOS2 determina a morte do parasito, uma vez que macrófagos são ativados a produzir NO (Figura 11) (COLOTTI; ILARI, 2011).

Figura 11. Via L-Arg e determinação do resultado da infecção.



Macrófagos ativados por linfócitos Th1 resultam na morte do parasito *Leishmania*, enquanto que aqueles ativados por linfócitos Th2 resultam na proliferação do protozoário.

NOS2: via óxido nítrico sintase, NO: óxido nítrico, EROS: espécies reativas de oxigênio, ERNOS: espécies reativas de óxido nítrico, ARG1: via arginase, ODC: ornitina descarboxilase, Spm: espermina e Spd: espermidina.

Fonte: Adaptado de (COLOTTI; ILARI, 2011).

Portanto, o metabolismo da L-Arg está situado entre a sobrevivência e eliminação de parasitos, e seu metabolismo é determinante para a infecção de *Leishmania*. A via biossintética das poliaminas incia-se com a síntese de L-ornitina (um precursor da poliamina) catalizado pela ARG. L-ornitina é então descarboxilada pela ornitina descarboxilase (ODC) à putrescina, a qual a espermidina sintase (SpdS) adiciona um grupo aminopropil doado a partir da S-adenosilmetionina descarboxilada, proporcionada pela S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC). Em *Leishmania*, a via das poliaminas é interligada à via da tripanotiona, nesta a tripanotiona sintetase (TS) sintetiza a tripanotiona ($T(SH)_2$) unindo uma molécula de espermidina com duas moléculas de glutathione. A $T(SH)_2$ é mantida reduzida e fornece equivalentes redutores para a detoxificação de peróxidos e outros EROs produzidos pelo macrófago (Figura 12) (ILARI et al., 2017). A tripanotiona redutase (TryR) é uma enzima chave no metabolismo tiol, cuja função é converter tripanotiona dissulfeto ($T(S)_2$) em $T(SH)_2$ (HAMILTON et al., 2005). Sendo assim, o sistema $T(SH)_2$ /TryR está envolvido na defesa do parasito contra o estresse químico e oxidante, ou seja, ela ajuda na luta contra EROs geradas por macrófagos do hospedeiro (McCONVILLE; NADERER, 2011; SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2011). Essa defesa antioxidante é particularmente importante para amastigotas de *Leishmania*, pois elas sobrevivem a uma explosão oxidativa gerada pelos macrófagos do hospedeiro, os quais produzem grandes quantidades de NO para eliminar células invasoras (BOCEDI et al., 2010; SWENERTON et al., 2010).

do paradigma Th1/Th2, resultando na sobrevivência do parasito (KAR; SHARMA; DAS, 2011).

2.9 Cálcio, Mitocôndria e EROs

Como descrito, vimos que o NO é uma molécula mensageira em diferentes tipos de células, apresentando numerosos alvos moleculares em *Leishmania*, incluindo as enzimas metabólicas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e aconitase (LEMESRE et al., 1997; MAUËL; RANSIJN, 1997) ou CP (LEMESRE et al., 1997; MAUËL; RANSIJN, 1997; SALVATI et al., 2001). A eliminação de *Leishmania* em macrófagos depende de citocinas envolvidas na ativação da iNOS com consequentemente produção de NO. Autores relatam que o NO atua como um agente sinalizador em células de animais e de plantas, modulando o Ca^{2+} livre, o qual atua como segundo mensageiro (BESSON-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008; HESS et al., 2005). O cálcio intracelular exerce papel no controle de uma variedade de funções celulares como contração, divisão celular, secreção e diferenciação. A captura do íon Ca^{2+} através da membrana plasmática e organelas intracelulares ocorre por diversos sistemas transportadores de Ca^{2+} para o controle da concentração intracelular desse íon. Uma vez dentro da célula, o Ca^{2+} pode interagir com as proteínas ligadoras de Ca^{2+} ou ser sequestrado por organelas intracelulares. Algumas dessas proteínas, como a calmodulina atuam como receptores de Ca^{2+} , enquanto outras, como a calreticulina parecem atuar como dispositivos de armazenamento de Ca^{2+} . Por outro lado, as principais organelas envolvidas no sequestro de Ca^{2+} intracelular são: mitocôndria, retículo endoplasmático e acidocalcisomos (MORENO; DOCAMPO, 2003).

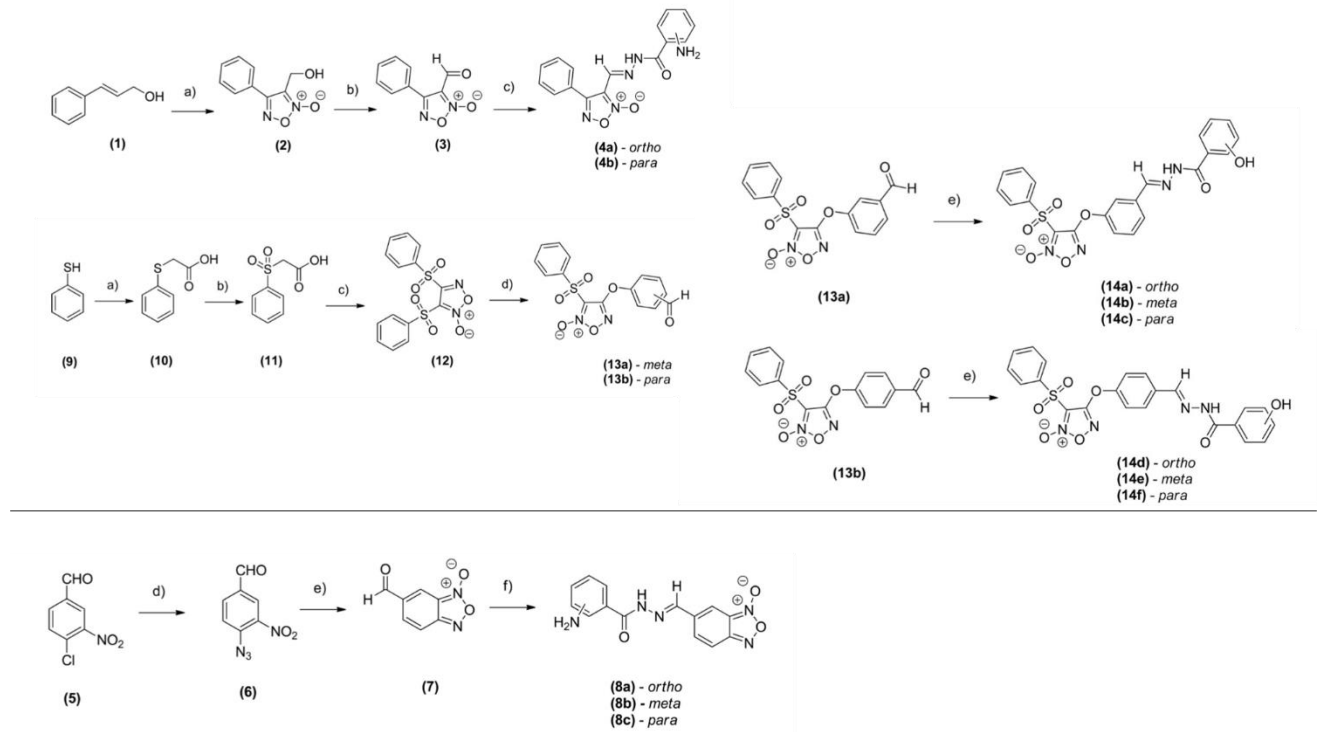
As mitocôndrias possuem uma alta capacidade de sequestro de Ca^{2+} , esta organela apresenta um papel na regulação dos aumentos de Ca^{2+} citosólico. A liberação de Ca^{2+} dos acidocalcisomos ou a entrada de Ca^{2+} através da membrana plasmática resulta em uma rápida captação mitocondrial de Ca^{2+} que atinge os níveis intramitocondriais, os quais são mais elevados do que os níveis citosólicos. (XIONG et al., 1997). A membrana mitocondrial interna possui uma proteína transportadora para o Ca^{2+} denominada MCU (*mitochondrial calcium uniporter*), a qual permite a entrada do

cátion impulsionado pelo gradiente eletroquímico gerado pela respiração ou hidrólise de ATP (PENDIN; GREOTTI; POZZAN, 2014). A manutenção desse gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial de tripanossomatídeos é importante para sobrevivência da *Leishmania* (TER KUILE, 1994), pois uma diminuição ou aumento no potencial mitocondrial leva à morte celular (SHAHA, 2006).

Estudos indicam a ação da alicina em promastigotas de *Leishmania* induz rápida elevação dos níveis de Ca^{2+} citosólico com consequente disfunção mitocondrial com colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e alta produção de EROs. Estes eventos promovem queda da produção de ATP mitocondrial e morte celular por necrose (CORRAL et al., 2016). Portanto, verifica-se que a regulação de Ca^{2+} em protozoários parasitos é essencial para a sobrevivência destes organismos proporcionando, desta forma, oportunidade para o encontro de novos alvos terapêuticos (MORENO; DOCAMPO, 2003).

Sendo assim, com base nestas instruções preconizadas pelo DNDi, o presente trabalho almejou a identificação de um novo *hit* para o tratamento das leishmanioses, através da avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*, e identificação de possíveis mecanismos de ação de um novo composto bioativo. Para tanto, contamos com a investigação de uma classe de compostos - os furoxanos e benzofuroxanos - descritos por diversas bioatividades, dentre elas a atividade leishmanicida. Os estudos de mecanismos de ação foram direcionados pela estrutura química da molécula mais promissora, sendo primeiramente avaliado a produção de óxido nítrico, uma vez que o grupamento *N*-óxido presente na estrutura dos furoxanos foi relacionado à esta atividade. Associado a isso, o grupamento *N*-acil-hidrazona também presente na estrutura química dos derivados furoxânicos (Figura 14) poderia potencializar a identificação de compostos leishmanicidas, uma vez que este grupamento é descrito por potencialmente inibir cisteíno proteases de parasitos. O conhecimento dos mecanismos de ação de novas moléculas é fundamental para posterior processo de desenvolvimento de derivados químicos para otimização do agente terapêutico (*Hit to Lead*, *H2L*), minimizando a taxa de atrito e, conseqüentemente, aumentando a chance de sucesso no desenvolvimento do produto final (KATSUNO et al., 2015; KHANNA, 2012).

Figura 14. Estrutura química dos derivados furoxânicos (4a, 4b, 14a-f) e benzofuroxânicos (8a-c) e os compostos precusores (3, 7, 13a e 13b).



Fonte: (DUTRA et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi realizar uma triagem inicial para avaliar o potencial leishmanicida e a capacidade de produção de NO de uma série de derivados de furoxano e benzofuroxano em diferentes espécies de *Leishmania*. Pretendeu-se ainda avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* e identificar os potenciais alvos terapêuticos envolvidos na atividade leishmanicida do derivado **14e**, a molécula mais potente identificada nesta triagem, seguido de determinação de seu potencial mecanismo de ação.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliação da atividade *in vitro* anti-*Leishmania*

1. Avaliar a atividade leishmanicida dos derivados de furoxano e benzofuroxano e seus precursores em formas promastigotas (EC_{50-PRO}) e amastigotas (EC_{50-AMA}) de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*;
2. Avaliar a citotoxicidade (CC₅₀) dos derivados de furoxano e benzofuroxano e seus precursores em macrófagos peritoneais murinos;
3. Determinar o índice de seletividade dos compostos ($IS_1 = CC_{50}/EC_{50-PRO}$ e $IS_2 = CC_{50}/EC_{50-AMA}$) para selecionar os derivados mais seletivos para os parasitos ($IS \geq 5,0$);
4. Avaliar a capacidade de produção de NO dos derivados furoxânicos e benzofuroxânicos através da dosagem dos níveis desta molécula em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com as espécies *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* na presença dos derivados.

3.2.2 Estudos de Mecanismos de ação

1. Realizar ensaios de estabilidade *in vitro* da molécula pH 5,4 e pH 7,0 por HPLC;
2. Avaliar o potencial dos compostos derivados de furoxano e benzofuroxano em inibir a enzima cisteíno protease 2.8 (CPB2.8) de *L. (L.) mexicana*;
3. Avaliar níveis de susceptibilidade dos mutantes nulos para CPA e/ou CPB; ou superexpressores da CPB2.8 frente ao derivado **14e**;
4. Selecionar uma cepa de *L. (L.) infantum* resistente ao derivado **14e**;
5. Realizar ensaios para avaliação da homeostase do cálcio.

3.2.3 Avaliação da eficácia *in vivo* do derivado **14e** em modelo de LV

1. Avaliar eficácia do derivado de furoxano, **14e**, no tratamento da LV em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) infantum*;
2. Realizar estudos histopatológicos de fígado, baço e rim após o tratamento dos hamsters infectados com *L. (L.) infantum*;
3. Realizar estudos de marcadores bioquímicos de funções hepáticas e renais para avaliar potencial efeitos tóxicos do derivado **14e**.

4 MATERIAL E MÉTODOS

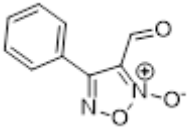
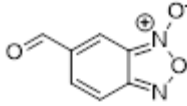
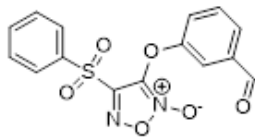
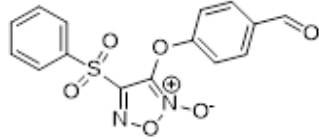
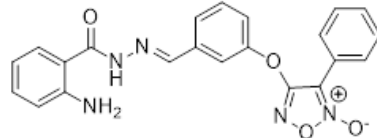
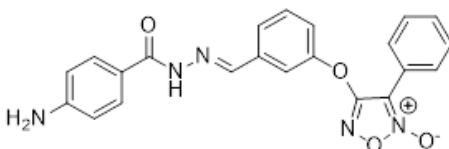
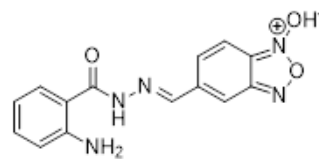
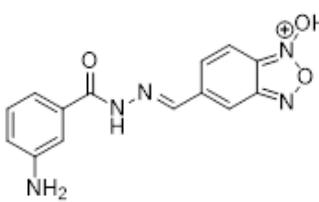
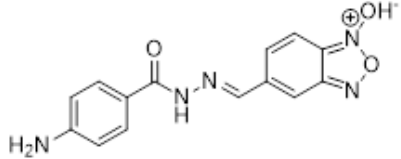
4.1 Reagentes

Os reagentes a seguir foram adquiridos pelos seguintes fabricantes:

1. Sigma Aldrich: Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, duodecil sulfato de sódio (SDS), metanol, etanol, butanol, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT), metossulfato de fenazina (PMS), Meio Schneider, Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), estreptomicina/penicilina, pentamidina, sulfanilamida, naftilenodiamina;
2. Merck: Giemsa;
3. Cultilab: Meio M-199;
4. Cristália: anfotericina B.

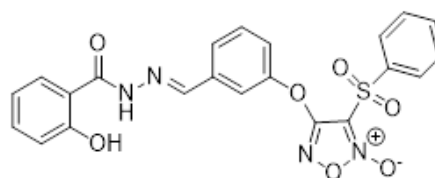
Os compostos precursores **3**, **7**, **13a**, **13b** e os derivados de benzofuroxanos **8a**, **8b**, **8c** e furoxanos **4a**, **4b**, **14a**, **14b**, **14c**, **14d**, **14e**, **14f** (Tabela 2) foram sintetizados como previamente descrito (DUTRA et al., 2014) e gentilmente cedidos na forma cristalizados pelo LAPSDEF (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus Araraquara.

Tabela 1. Derivados furoxânicos e benzofuroxânicos, código e estrutura química.

Nome	Código	Estrutura Química
4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3-carbaldeído 2-óxido	3	
6-formil-2,1,3-benzoxadiazol 1-óxido	7	
3-[[5-óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-3-il]oxi] benzaldeído	13a	
4-[[5-óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-3-il]oxi] benzaldeído	13b	
2-amino- <i>N'</i> -[(1 <i>E</i>)-(2-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3-il)metileno] benzhidrazida	4a	
4-amino- <i>N'</i> -[(1 <i>E</i>)-(2-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3-il)metileno] benzhidrazida	4b	
2-amino- <i>N'</i> -[(1 <i>E</i>) - (3-óxido-2,1,3-benzoxadiazol-5-il)metileno] benzhidrazida	8a	
3-amino- <i>N'</i> -[(1 <i>E</i>) - (3-óxido-2,1,3-benzoxadiazol-5-il)metileno] benzhidrazida	8b	
4-amino- <i>N'</i> -[(1 <i>E</i>) - (3-óxido-2,1,3-benzoxadiazol-5-il)metileno] benzhidrazida	8c	

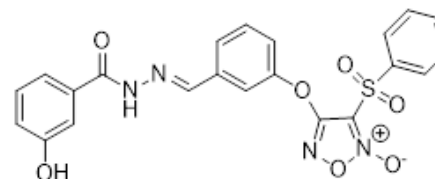
2-hidroxi-*N'*-[(1*E*)-(3- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi}fenil)
metileno] benzhidrazida

14a



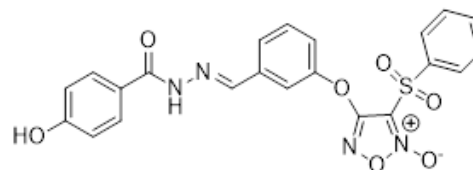
3-hidroxi-*N'*- [(1*E*)-(3- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi}fenil)
metileno] benzhidrazida

14b



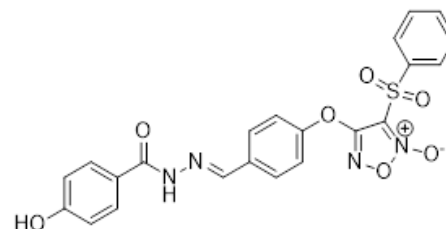
4-hidroxi-*N'*- [(1*E*)-(3- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi}fenil)
metileno] benzhidrazida

14c



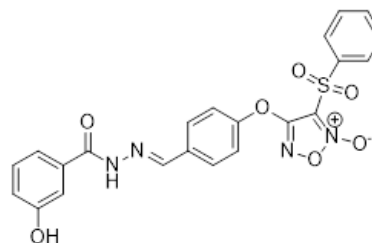
2-hidroxi-*N'*-[(1*E*)-(4- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi} fenil)
metileno] benzhidrazida

14d



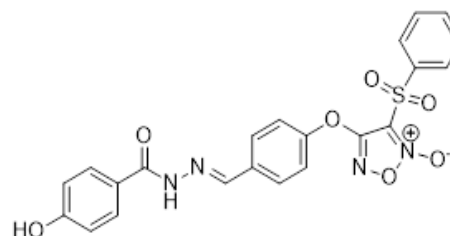
3-hidroxi-*N'*-[(1*E*)-(4- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi} fenil)
metileno] benzhidrazida

14e



4-hidroxi-*N'*-[(1*E*)-(4- {[5-
óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-
oxadiazol-3-iloxi} fenil)
metileno] benzhidrazida

14f



4.2 Parasitos e Células de Mamíferos

Neste estudo foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) e de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), gentilmente cedidas pelos profs. Dr. Bia Stolf e Dr. José Angelo Lindoso, respectivamente, são mantidas em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) e isoladas quando necessário. As formas promastigotas isoladas são mantidas e cultivadas em meio LIT completo (*Liver Infusion Tryptose*: 5,0 g de *Liver Infusion Broth*; 5,0 g de triptose; NaCl 85,6 mM; Na₂HPO₄ 7 mM; KCl 107,3 mM; glicose 22,2 mM; hemina 0,15 mM - suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina) ou meio M199 completo (M199 suplementado com 10% de SFB, 10% urina humana masculina, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Campus Araraquara (FCFAR-UNESP).

Foram também utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), recentemente isoladas de camundongos BALB/c e as respectivas linhagens mutantes nocaute para o gene *CPB* (Δ cpb) ou duplo nocaute para os genes *CPA* e *CPB* (Δ cpa/cpb) e superexpressora para *CPB* 2.8 (Δ cpb+pXcpb2.8) (DENISE et al., 2003; MOTTRAM et al., 1996), as quais foram cultivadas em meio HOMEM completo (HOMEM suplementado com 10% de SFB, 1% penicilina/estreptomicina) e mantidas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular na Universidade de Glasgow. Estas mesmas linhagens foram mantidas em meio Schneider no LabBioqBioMolTrip.

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss, após exposição à solução de tioglicolato de sódio 3%, por meio de lavagem com tampão fosfato estéril (pH 7,2). Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, (RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina) e mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂, como previamente descrito (SANTOS et al., 2013).

4.3 Animais para Experimentação

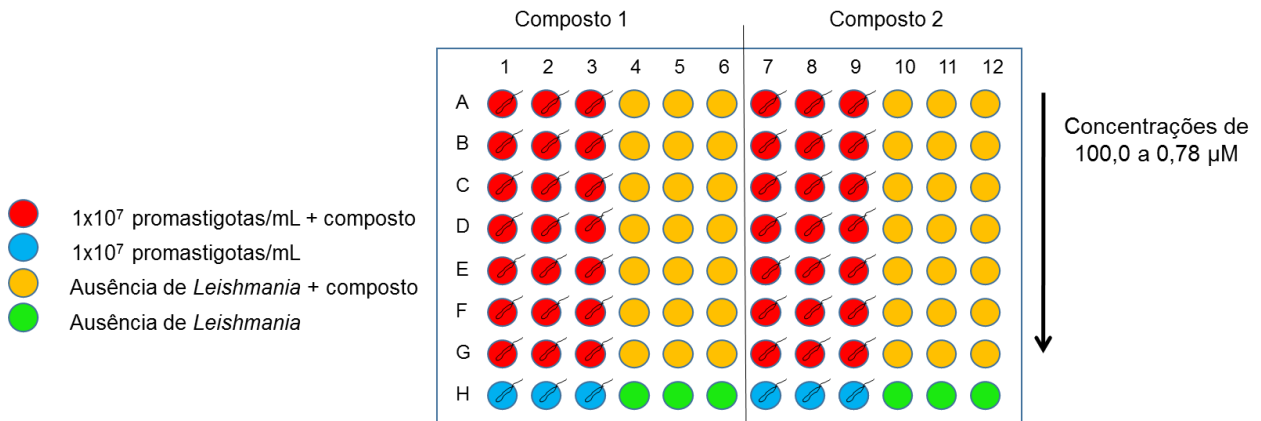
Camundongos albinos Swiss machos ou BALB/c e Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) foram mantidos sob regime claro/escuro 12h/12h e temperatura controlada (22 ± 2 °C) no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr-Unesp, em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em concordância com as diretrizes de cuidados com animais de laboratório e diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes, aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal da FCFAr (CEUA/FCF/Ar nº 09/2013 ou CEUA/FCF/Ar nº 23/2014).

4.4 Ensaios de atividade leishmanicida *in vitro*

4.4.1 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* na fase exponencial do crescimento foram plaqueadas à razão de 1×10^7 parasitos/mL em placas de 96 poços. Os derivados de furoxano ou benzofuroxano, seus precursores e anfotericina B foram solubilizados em DMSO e adicionados à suspensão de parasitos, a uma concentração final entre 0,78-100,00 µM. As placas foram montadas conforme a Figura 15. A concentração final de DMSO nos ensaios foi de 3%.

Figura 15. Representação esquemática da disposição dos compostos e parasitos em placas de 96 poços do ensaio com formas promastigotas de *Leishmania*.



Promastigotas de *Leishmania* na presença (vermelho) ou ausência (azul) de diferentes concentrações dos compostos em estudo. Como controle, foram utilizados meio de cultura com (amarelo) ou sem compostos (verde).

Após incubação das placas a 28°C por 72h, foi adicionado 10 µL de uma solução de MTT 6 mM/PMS 0,7 mM, seguido por nova incubação por 75 minutos. Então foi adicionado SDS 10%/HCl 1 M para solubilizar os cristais de formazana, e após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 490 nm (leitor de Elisa – Readwell Touch/robonik) (SANTOS et al., 2013).

A porcentagem de parasitos mortos expressos em porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GÓMEZ-BARRIO, 2000).

$$\%C = \left[\frac{(G_C - G_P)}{G_C} \right] \times 100$$

Onde: $G_C = A_C - A_m$

Sendo que, G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controles com ausência de substância; A_c o valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitos; e A_m o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito.

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_p representa o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias; A_p o valor da absorbância nos testes e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito.

Ao final foi determinada por regressão não linear a concentração efetiva para 50% das formas promastigotas (EC_{50-PRO}) no software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de três replicatas independentes.

4.4.2 Bioensaio para determinar a citotoxicidade in vitro em macrófagos peritoneais murinos

Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com uma solução de tioglicolato de sódio 3% para a migração de macrófagos à região peritoneal. Após quatro dias, os animais foram eutanaziados em câmara de CO_2 . Para obtenção dos macrófagos, procedeu-se a exposição do peritônio, seguido de injeção de 5 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,2) e leve massagem manual. As células foram coletadas com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril, transferidas para tubo cônico estéril e mantidas em gelo. Após contagem diferencial das células, a concentração celular foi ajustada à 3×10^5 células/mL em meio RPMI-1640. O volume de 100 μ L dessa suspensão foi transferido para cavidades de placas de microtitulação, e procedeu-se incubação por 4h, $37^\circ C$, 5% de CO_2 . Após incubação para adesão dos macrófagos foi adicionado 100 μ L de cada uma das substâncias diluídas em meio RPMI-1640 em concentrações variáveis (0,78-100,00 μ M). Como controle utilizou-se o mesmo volume de RPMI-1640 completo. Após nova incubação (24h, $37^\circ C$, 5% de CO_2), foi adicionado 10 μ L da solução MTT/PMS em cada poço, incubando-se novamente por 75 minutos. Após esse período foi adicionado 100 μ L de SDS 10%/HCl 1 M para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm (leitor de Elisa – Readwell Touch/robonik) (SANTOS et al., 2013). Ao final foi determinada a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) no software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de três replicatas independentes.

4.4.3 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*

Macrófagos peritoneais murinos (3×10^5 células/mL) foram cultivados em meio RPMI-1640, distribuídos em lamínulas circulares em placas de 24 poços. A adesão das células ocorreu a 37°C em 5% CO₂ por 4h. Macrófagos foram então infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* no final da fase exponencial do crescimento, à razão de 5:1 para *L. (L.) amazonensis* ou 10:1 para *L. (L.) infantum* e mantidos a 37°C em 5% CO₂ por mais 4h (*L. (L.) amazonensis*) ou 18h (*L. (L.) infantum*). Ao final, os parasitos não fagocitados foram removidos por lavagem, e então os compostos, solubilizados em meio fresco em concentrações variáveis de 0,6 a 40,0 µM, foram adicionados. A placa foi mantida a 37°C, 5% de CO₂ por 24h (SANTOS et al., 2013).

Por fim, o meio foi removido e as lamínulas fixadas com metanol e coradas com Giemsa, para posterior análise em microscopia óptica. O número de amastigotas/100 macrófagos e percentual de células infectadas foram determinados. Resultados foram expressos como a concentração efetiva para 50% de inibição do crescimento das formas amastigotas intracelulares (EC_{50-AMA}) determinados por regressão não-linear no software BioEstat, e os dados foram expressos como média ± DP de três replicatas independentes. (MANANDHAR et al., 2008; PRAJAPATI et al., 2012). A razão entre o valor de CC₅₀ e EC_{50-PRO} ou EC_{50-AMA} possibilitou a determinação dos índices de seletividade (IS₁ e IS₂, respectivamente).

4.4.4 Dosagem de óxido nítrico *in vitro*

Uma solução de cada composto em DMSO foi adicionada a uma mistura de tampão fosfato 50 mM (pH 7.4) e metanol (1:1, v/v), contendo 5 mM de L-cisteína. A concentração final do composto foi 10⁻⁴ M. Após 1h a 37°C, 1 mL da mistura reacional foi tratada com 250 µL do reagente de Griess. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540 nm usando espectrofotômetro Shimadzu UV-2501PC. Soluções padrão de nitrito de sódio (10 a 80 nmol/mL) foram utilizadas para construção

da curva de calibração. O rendimento de nitrito foi expresso como %NO₂⁻ (mol/mol). Nenhuma produção de nitrito foi observada na ausência de L-cisteína (SANTOS et al., 2011; SORBA et al., 1997; TSIKAS, 2007). Os dados foram expressos como média ± DP de três replicatas independentes.

4.4.5 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células

Os sobrenadantes da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* na presença das substâncias testadas, foram coletados após 48 horas e a produção indireta de NO foi determinada pelo reagente de Griess. A avaliação das concentrações de NO foi realizada pela medida de NO⁻² em sobrenadantes de cultura (BENJAMIN; VALLANCE, 1994; MOSHAGE et al., 1995). Foram pipetados 100 µL dos sobrenadantes de cultura e 100 µL do reagente de Griess em placas de 96 poços, em duplicata e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir foi determinada a absorbância a 540 nm em leitor de ELISA (GREEN et al., 1982). Os resultados expressos em µM foram determinados após a extrapolação de valores obtidos a partir de uma curva padrão realizada com NaNO₂ nas concentrações de 5,0 -100,0 µM para cada placa. O reagente de Griess foi preparado na hora do uso, homogeneizando partes iguais da solução A – sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 2,5% e da solução B - naftilenodiamina 0,1% em água bidestilada (GREEN et al., 1982). Nesse ensaio foi utilizado como controle negativo apenas macrófagos, dos quais não se esperava um aumento na produção de NO. O controle positivo utilizado foi macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* com a adição de 5 ou 10 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS). Adicionalmente macrófagos infectados com *Leishmania* foram também utilizados como controle. O ensaio foi realizado em duplicata, os resultados expressos como média ± DP e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para todos ensaios *in vitro* utilizou-se como controle experimental o fármaco de referência anfotericina B e todos experimentos foram realizados em triplicatas experimentais.

4.5 Ensaio de Estabilidade dos Derivados Furoxânicos e Benzofuroxânicos

A estabilidade das moléculas **14a** foi determinada por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) ou do **14e** por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) como previamente descrito (DUTRA et al., 2014). O composto **14a** foi separado em uma coluna C18 BEH fase reversa (2,1X50 mm, partícula de 1,7 µm), enquanto que o **14e** foi separado em coluna C18 Kinetex fase reversa (2,1X100 mm, partícula de 2,6 µm). Para isso, utilizou-se um gradiente de separação inicial de 50:50 (água:acetonitrila) em 0 minuto, até 70:30 (água:acetonitrila) em 3 minutos para **14a** ou 6 minutos para **14e**. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL/min para o método de **14a**, e de 0,6 mL/min para **14e**; e detecção a 254 nm para todos os métodos. Para hidrólise, os compostos foram diluídos em acetonitrila a 100 µg/mL. As soluções foram então diluídas a uma concentração de 50 µg/mL para ambos compostos em tampão (pH 5,0) ou água (pH 7,4). As amostras nos diferentes pHs foram mantidas sob agitação constante a 37°C durante todo ensaio. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24h. Os resultados foram expressos como a média ± DP das concentrações em porcentagem.

4.6 Ensaios de inibição da enzima Cisteíno Protease de *L. (L.) mexicana*

4.6.1 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida in vitro em formas promastigotas de *L. (L.) mexicana*

Os ensaios com formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* foram realizados no Instituto de Infecção, Imunidade e Inflamação da Universidade de Glasgow, Escócia, sob supervisão do Prof. Dr. Jeremy C. Mottram. Para tal ensaio, formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* na fase exponencial do crescimento foram plaqueadas à razão de 2×10^6 parasitos/mL em placas de 96 poços. Os derivados de furoxano e benzofuroxano, alguns de seus precursores e anfotericina B foram solubilizados em DMSO e adicionados à suspensão de parasitos, a uma concentração final entre 0,078-30,00 µM. Após 48h, adicionou-se 0,49 mM do reagente colorimétrico *alar blue* e procedeu-se nova

incubação de 24h. Ao final, as placas foram lidas em espectrômetro de fluorescência Phera Star nos seguintes comprimentos de onda (λ): $\lambda_{\text{excitação}}$ 530 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 590 nm. Ao final foi determinada por regressão não linear a concentração efetiva para 50% das formas promastigotas (EC_{50-PRO}). As análises foram realizadas em triplicata e analisadas no software Prism 5.0. E os resultados expressos como média $\pm$ DP de três replicatas independentes.

4.6.2 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) mexicana*

Este ensaio foi realizado como descrito anteriormente no LabBioqBioMolTrip. Brevemente, após a adesão de macrófagos peritoneais murinos (3×10^5 células/mL), distribuídos em lamínulas circulares em placas de 24 poços, estes foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* no final da fase exponencial do crescimento, à razão 10:1 e mantidos a 37°C em 5% CO₂ por mais 18h. Ao final, os parasitos não fagocitados foram removidos por lavagem, e então os compostos, solubilizados em meio fresco em concentrações variáveis de 0,6-40,0 μ M, foram adicionados. A placa foi mantida a 37°C, 5% de CO₂ por 24h (SANTOS et al., 2013). Por fim, o meio foi removido e as lamínulas fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Resultados foram expressos como a concentração efetiva para 50% da inibição do crescimento das formas amastigotas intracelulares (EC_{50-AMA}) determinados por regressão não-linear. E os resultados expressos como média $\pm$ DP de três replicatas independentes. (MANANDHAR et al., 2008; PRAJAPATI et al., 2012).

4.6.3 Ensaio para avaliar a atividade inibitória de cisteíno protease (rCPB 2.8) de *L. (L.) mexicana* por compostos derivados de furoxano e benzofuroxano

A isoforma recombinante da CPB 2.8 de *L. (L.) mexicana* (rCPB 2.8) foi expressa, purificada e ativada como descrito previamente (SANDERSON et al., 2000). A concentração da solução estoque de enzima foi determinada por titulação do sítio ativo com E64, um inibidor de proteases do tipo competitivo. Os compostos foram dissolvidos

em DMSO a uma concentração de 20,0 mM, alíquotados e estocados a - 20°C. O ensaio com a rCPB 2.8 foi realizado em 1 mL de acetato de sódio 100,0 mM (pH 5,0); 2,0 mM de EDTA; 1,0 mM de DTT; 4,0 nM da enzima, várias concentrações dos inibidores e 300,0 µM do substrato colorimétrico Z-FR-pNA. A concentração final de DMSO foi 1,5% (v/v). A enzima e inibidores foram pré-incubados a 30°C por 10 minutos antes de iniciar a reação, através da adição do substrato Z-FR-pNA. A absorbância a 410 nm foi determinada continuamente por 10 minutos a 30°C. Os compostos foram testados a 80,0 µM, e aqueles os quais mostraram potencial de inibição enzimática (**13a, 13b, 14a, 14b, 14c, 14d e 14e**) foram avaliados em 6 diferentes concentrações (40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 1,0 e 0,1 µM) para determinação da concentração efetiva para inibir em 50% a atividade da enzima (IC₅₀) (STEERT et al., 2010). E os resultados expressos como média ± DP de três replicatas independentes.

O ensaio de determinação do mecanismo de ação foi realizado como supracitado, porém utilizando várias concentrações do substrato (5,0 – 300,0 µM) e aumentando gradativamente a concentração deste composto (0,1 – 10,0 µM). Ao final os resultados foram algebricamente transformados e plotados graficamente, procedeu-se então a análise gráfica do duplo-recíproco analisando os valores de V_{max} e K_m . Nessa análise o slope da linha é K_m/V_{max} , no eixo das ordenadas ($1/V_0$) o intercepto é $1/V_{max}$, e no eixo das abcissas ($1/[S]$) o intercepto é $-1/K_m$.

Os ensaios com a isoforma rCPB 2.8 foram realizados no Instituto de Farmácia e Ciências Biomédicas da Universidade de Strathclyde, Glasgow, sob supervisão do Prof. Dr. Graham H. Coombs.

4.6.4 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida do derivado **14e** em diferentes linhagens de *L. (L.) mexicana*

Este ensaio foi realizado em formas amastigotas das diferentes linhagens de *L. (L.) mexicana*: mutante nocaute para CPB (Δ cpb), mutante duplo nocaute para CPA e CPB (Δ cpa/ Δ cpb) e mutante nocaute para CPB e superexpressor de CPB 2.8 (Δ cpb+pXcpb2.8). Para tal ensaio, macrófagos peritoneais murinos, coletados como descrito anteriormente, foram infectados com amastigotas recém coletadas da lesão de

camundongos BALB/c infectados na razão 10:1. Os períodos de incubação ocorreram como descrito anteriormente. Ao final foi determinada por regressão não linear a concentração efetiva para 50% das formas amastigotas (EC_{50-AMA}). As análises foram realizadas em triplicata e analisadas no software Bioestat. E os resultados expressos como média $\pm$ DP de três replicatas independentes.

4.7 Ensaios com *Leishmania* para Desenvolvimento de Cepa Resistente ao Derivado 14e

4.7.1 Desenvolvimento da cepa de *Leishmania* resistente ao derivado 14e

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* foram cultivadas em meio de cultura (meio LIT e meio M199, respectivamente) na presença do derivado **14e**, com intuito de obter cepa de *Leishmania* resistente por pressão de fármacos. A seleção dos parasitos resistentes iniciou-se usando diferentes concentrações do derivado **14e**, seguida por um aumento gradual da concentração do composto até atingir os valores de EC_{50-PRO} = 6,4 e 9,8 μ M para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, respectivamente, previamente determinados.

Para *L. (L.) amazonensis*, os parasitos foram mantidos por 27 passagens na presença de 1,6 μ M do **14e**, após isso 14 passagens foram realizadas com um aumento gradual da concentração até atingir 3,2 μ M. Nesta concentração (3,2 μ M) os parasitos foram mantidos por mais 27 passagens. Novo aumento gradual foi realizado até atingir 6,4 μ M. Ao final, os parasitos foram selecionados após 54 passagens nas diferentes concentrações de **14e**.

Para *L. (L.) infantum*, os parasitos foram mantidos por 35 passagens na presença de 2,5 μ M do **14e**, após isso 10 passagens foram realizadas com um aumento gradual da concentração até atingir 4,9 μ M. Nesta concentração (4,9 μ M) os parasitos foram mantidos por mais 24 passagens. Novo aumento gradual foi realizado até atingir 9,8 μ M. Ao final, os parasitos foram selecionados após 70 passagens nas diferentes concentrações de **14e**. As cepas foram analisadas construindo-se curva de crescimento das diferentes linhagens (selvagem e selecionadas por pressão de fármacos). Ao final

do período de tratamento *in vitro* das formas promastigotas para seleção dos parasitos, realizou-se também a determinação do EC₅₀ da linhagem selecionada por pressão por fármacos ao final do tratamento e cálculo do índice de resistência (razão entre EC₅₀ resistente/EC₅₀ selvagem).

4.8 Ensaios para Avaliar a Homeostase do Cálcio

4.8.1 Marcação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com Fluo8-AM

Os ensaios preliminares para avaliar a homeostase do cálcio foram realizados utilizando-se formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, estes ensaios foram realizados no laboratório do Dr. Andrew Thomas, Departamento de Farmacologia, Fisiologia e Neurociências da Escola Médica da Universidade Estadual de Nova Jersey, Rutgers.

Formas promastigotas (1×10^8 células/mL) na fase logarítmica de crescimento foram marcadas com o indicador de cálcio Fluo8-AM (Abcam), na presença de tampão A (NaCl 137 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, NaH₂PO₄ 8,5 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 1 mM) (SERRANO-MARTÍN et al., 2009). Ao tampão foi acrescentado probenecide para concentração final de 200 µM. No momento de marcação, foi adicionado 10 µM de Fluo8-AM, seguido por incubação a 28°C, sob agitação constante. Ao final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com o tampão A (centrifugação a 600xg, remoção do sobrenadante, ressuspensão em tampão A).

4.8.2 Avaliação dos níveis de cálcio em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Um volume de 100 µL de 10^9 promastigotas/mL marcadas com Fluo8-AM foram transferidas para placas de microtitulação pretas com fundo transparente (96 poços) para leitura da fluorescência em leitor Flex Station (Molecular Devices). Após registro da fluorescência basal por 30s, foram adicionados 10 µL de uma diluição seriada dos compostos **13b** e **14e**. A variação na fluorescência, a qual é diretamente proporcional à quantidade de cálcio, foi monitorada por um período adicional de 300s, quando foi

adicionado o ionóforo ionomicina, seguido de leitura por mais 240s. As mudanças na fluorescência relativa de Fluo8-AM para cada poço foram expressas como $\Delta F = (F - F_0)$, onde F e F₀ correspondem aos valores de fluorescência nos tempos de interesse (SERRANO-MARTÍN et al., 2009).

4.9 Ensaios *in vivo*

4.9.1 Bioensaio para avaliar a eficácia do composto **14e** no tratamento da LV

Para avaliar a eficácia do composto **14e**, hamsters doutorados machos com 8 semanas de idade foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 1×10^8 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* (final da fase exponencial do crescimento) (PIMENTEL et al., 2012). Os animais foram randomicamente separados em 7 grupos de 5 animais cada, sendo os grupos experimentais: animais não infectados (G1); animais infectados e não tratados (G2); animais infectados e tratados com **14e** em três diferentes doses – 3,0 mg/Kg/dia (G3), 1,5 mg/Kg/dia (G4), 0,75 mg/Kg/dia (G5); tratados com veículo (G6) e animais infectados e tratados com anfotericina B - 20,0 mg/Kg/dia (G7).

O tratamento teve início 75 dias após a infecção; para isso, os animais receberam doses diárias via i.p. por 15 dias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂ e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca para coleta do soro para análises toxicológicas. Então, foram retirados fígado e baço, os quais foram utilizados para determinação da carga parasitária por diluição limitante (AFONSO; SCOTT, 1993; LIMA; BLEYENBERG; TITUS, 1997) e avaliação histopatológica (também realizada para o rim).

A dose foi calculada através de cálculos de extrapolações alométricas. Estes foram feitos baseados no valor de EC_{50-AMA} e peso molecular do **14e** (479,4 Da), a dose equivalente foi então multiplicada pelo volume de distribuição de hamsters. Levando-se em conta ainda, a alta taxa de ligação do **14e** a proteínas do plasma chegamos à concentração de uma dose de aproximadamente 1,5 mg/Kg. As outras duas doses escolhidas são equivalentes ao dobro (3.0 mg/Kg) e a metade (0.75 mg/Kg).

4.9.2 Avaliação da carga parasitária por diluição limitante

Os tecidos dos animais foram processados imediatamente após a retirada e a suspensão de parasitos foi então serialmente diluída em meio Schneider completo (meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2% urina humana masculina, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de gentamicina) distribuído em placas de 96 poços (AFONSO; SCOTT, 1993; LIMA; BLEYENBERG; TITUS, 1997). Foram feitas 24 diluições 1:5, em duplicata, para cada órgão. As placas foram acompanhadas diariamente até o 7º dia para avaliar presença de parasitos. Os resultados expressos como média $\pm$ DP e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.9.3 Avaliação toxicológica

Após o sangue ter sido coletado por punção cardíaca, esse foi centrifugado e os soros foram coletados. Os seguintes parâmetros bioquímicos foram analisados: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) e creatinina. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus Araraquara. Os resultados expressos como média $\pm$ DP e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.9.4 Avaliação histopatológica

Para análises histopatológicas, parte do fígado, baço e rim dos animais foram mantidos em formol tamponado 10% por 24h. Após esse período os órgãos foram lavados e mantidos em etanol 70%. As características morfológicas dos órgãos foram anotadas. Em seguida, uma secção diagonal do fígado, uma secção horizontal secção do baço e uma secção vertical do rim foram obtidas e processadas de acordo com Lim et al., 2010 (LIM et al., 2010). Os tecidos processados foram embebidos em parafina e seccionados em 4 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro fosco e secos sobre

uma placa a 70°C por 30 minutos. Por fim, foram corados com Hematoxilina/Eosina (H&E) (CELIS; ROMO; ROMERO, 2015). Toda a lâmina foi analisada em microscopia óptica por um patologista que não conhecia os grupos experimentais.

Nas análises dos fígados foram verificadas: morfologia dos hepatócitos, necrose, edema, presença de infiltrados inflamatórios nas regiões periportal e lobular, e a identificação de amastigotas e corpúsculos de Schaumann. Os infiltrados próximos à região periportal foram quantificados e classificados de acordo com o tipo (agudo, crônico ou misto) e intensidade (leve, moderado ou intenso). Na região lobular os infiltrados inflamatórios foram quantificados e classificados quanto ao tipo (agudo, crônico ou misto) e tamanho como pequenos (até 25 células) e grandes (mais de 25 células). Foi realizada a análise quantitativa dos infiltrados inflamatórios no fígado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para os demais parâmetros foram feitas análises semi-quantitativas.

Nos baços foram analisados a presença de cápsula, polpa branca e polpa vermelha, zona marginal e folículos, e a presença de amastigotas. No rim foram analisadas as áreas cortical e medular, sendo que na região cortical foi verificado a presença da cápsula de Bowman, espaço urinário e os dutos proximais e distais; na área medular foram examinados dutos e presença de inflamação. As análises da polpa branca e vermelha, zona marginal, cápsula de Bowman, espaço urinário e os ductos proximal/distal foram realizadas por meio de análise semi-quantitativa.

As análises histopatológicas de fígado, baço e rim tinham como objetivo identificar possíveis danos aos tecidos causados pela doença ou pelo tratamento usado em cada grupo de animais. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade da Faculdade de Odontologia da UNESP - Campus Araraquara.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O Derivado Furoxânico 14e Apresentou Atividade Leishmanicida nos Ensaios *in vitro*

Este trabalho iniciou-se com ensaios *in vitro* para realizar o *screening* inicial e avaliar a atividade leishmanicida (EC_{50}) dos derivados de furoxano (**4a**, **4b**, **14a**, **14b**, **14c**, **14d**, **14e**, **14f**), benzofuroxano (**8a**, **8b**, **8c**) e seus precursores (**3**, **7**, **13a**, **13b**) frente às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, além da avaliação do potencial citotóxico a macrófagos peritoneais murinos para determinação de seus níveis de seletividade pelo índice IS_1 . A determinação do IS, o qual compara a citotoxicidade e a atividade frente ao parasito, ajuda na escolha de compostos que possam apresentar menor toxicidade (WINK, 2012). As promastigotas, apesar de não serem as formas responsáveis pelas manifestações clínicas no hospedeiro mamífero, são rotineiramente utilizadas em programas de *screening* fenotípico devido à facilidade de cultivo. As dificuldades experimentais impostas pelas formas amastigotas intracelulares, faz com que estas triagens iniciais de moléculas possam ser realizadas com as formas promastigotas devido ao cultivo rápido em diferentes opções de meios de cultura, facilitando a realização de ensaios de bioatividade; desta forma, apenas compostos que apresentaram alguma atividade leishmanicida passam para esta próxima etapa que consiste na avaliação da atividade contra as formas intracelulares dos parasitos (SANTOS et al., 2012; SIQUEIRA NETO et al., 2010). Neste caso, como as formas extracelulares compartilham muitas vias metabólicas com as formas intracelulares, compostos que apresentaram alguma atividade na triagem inicial poderão ser ativos também contra as formas amastigotas. No entanto, muitos compostos promissores podem ser perdidos nesta abordagem, já que esta estratégia poderá excluir, por exemplo, o encontro de substâncias ativas apenas contra as formas amastigotas, como por exemplo, os antimonialis pentavalentes, os quais são pró-fármacos, metabolizáveis nas células hospedeiras e que desempenham, portanto, sua atividade apenas contra as formas amastigotas (CALLAHAN et al., 1997; FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

Tabela 2. Determinação da concentração efetiva em formas promastigotas (EC_{50-PRO}, µM) de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, e citotoxicidade (CC₅₀, µM) em macrófagos peritoneais murinos dos derivados de furoxano, benzofuroxano e seus precursores.

Compostos	CC ₅₀	EC _{50-PRO}			
		<i>L. (L.) amazonensis</i> (IS ₁)		<i>L. (L.) infantum</i> (IS ₁)	
3	28,2 ± 0,4	7,8 ± 0,6	(3,6)	24,6 ± 2,4	(1,1)
4a	152,2 ± 2,2	68,0 ± 0,3	(2,2)	15,5 ± 0,5	(9,7)
4b	180,1 ± 25,8	95,8 ± 0,7	(1,9)	52,3 ± 0,4	(3,4)
7	9,9 ± 1,0	26,2 ± 1,3	(0,4)	71,2 ± 0,7	(0,1)
8a	63,2 ± 0,6	2,1 ± 0,2	(30,2)	13,8 ± 1,2	(4,6)
8b	248,3 ± 2,8	163,8 ± 0,8	(1,5)	42,8 ± 3,3	(5,8)
8c	200,3 ± 2,4	40,2 ± 0,3	(5,0)	21,9 ± 2,3	(9,1)
13a	4,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1	(2,1)	2,9 ± 0,4	(1,7)
13b	5,9 ± 2,4	2,4 ± 0,1	(2,5)	12,8 ± 0,7	(0,5)
14a	114,6 ± 4,1	2,9 ± 0,18	(38,5)	47,9 ± 2,9	(2,4)
14b	32,1 ± 5,8	3,2 ± 0,2	(10,0)	5,7 ± 3,3	(5,6)
14c	35,8 ± 1,6	4,8 ± 0,4	(7,5)	6,2 ± 2,4	(5,8)
14d	45,6 ± 1,5	4,6 ± 0,4	(9,9)	7,8 ± 0,48	(5,9)
14e	208,3 ± 0,2	6,4 ± 0,5	(32,4)	9,8 ± 0,50	(21,3)
14f	23,5 ± 2,2	12,4 ± 0,7	(1,9)	9,4 ± 0,7	(2,5)
Anf B	23,1 ± 2,5	3,2 ± 0,1	(7,2)	0,9 ± 0,1	(25,1)

Os valores de IS₁ ≥ 5 em itálico indicam os compostos promissores, isto é, aqueles que apresentam baixa citotoxicidade para células de mamíferos e alta toxicidade para os parasitos. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicatas ± desvio padrão.

*valores de IS₁ estão apresentados entre parênteses (IS₁ = CC₅₀/EC_{50-PRO}).

n.t. significa não testado.

5.1.1 Ensaios de atividade antipromastigota para *L. (L.) amazonensis* indicam os derivados **8a**, **14a**, **14b**, **14c**, **14d** e **14e** para avaliação antiamastigota

Os precursores **3** ($EC_{50-PRO} = 7,8 \mu M$; $IS_1 = 3,6$), **13a** ($EC_{50-PRO} = 2,3 \mu M$, $IS_1 = 2,1$) e **13b** ($EC_{50-PRO} = 2,4 \mu M$; $IS_1 = 2,5$), os quais apresentam um núcleo de furoxano em sua estrutura, mostraram boa atividade antipromastigota para *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2). As modificações realizadas no composto **3**, as quais resultaram nos derivados **4a** ($EC_{50-PRO} = 68,0 \mu M$; $IS_1 = 2,2$) e **4b** ($EC_{50-PRO} = 95,8 \mu M$; $IS_1 = 1,9$), não foram capazes de otimizar os derivados quer seja em relação à atividade leishmanicida, quer seja para a atividade citotóxica, o que pode ser verificado pelos valores de IS_1 , mostrando que as moléculas são pouco seletivas para o parasito. Os demais derivados de furoxano (**14a-e**) tiveram como precursores as moléculas **13a** ou **13b**, os quais foram altamente ativos em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, porém altamente citotóxicos ($CC_{50} = 4,9$ e $5,9 \mu M$, respectivamente). Os derivados **14a** ($EC_{50-PRO} = 2,9 \mu M$; $IS_1 = 38,5$), **14b** ($EC_{50-PRO} = 3,2 \mu M$; $IS_1 = 10,0$) e **14c** ($EC_{50-PRO} = 4,8 \mu M$; $IS_1 = 7,5$) exibiram atividade leishmanicida equiparável ao seu precursor **13a**. No entanto, destacam-se os valores de IS_1 apresentados pelos derivados **14a-c**, os quais se mostram pelo menos quatro vezes mais seletivos para o parasito que o **13a**. O precursor **13b** originou derivados menos citotóxicos, porém apenas os derivados **14d** ($EC_{50-PRO} = 4,6 \mu M$, $IS_1 = 9,9$) e **14e** ($EC_{50-PRO} = 6,4 \mu M$, $IS_1 = 32,4$) exibiram valores de IS_1 otimizados. Para os derivados benzofuroxânicos, temos que o precursor **7** ($EC_{50-PRO} = 26,2 \mu M$; $IS_1 = 0,4$), além de ser pouco efetivo em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, mostrou-se citotóxico para células de mamíferos, como pode ser denotado pelo baixo valor de IS_1 obtido. Dentre os derivados **8a** ($EC_{50-PRO} = 2,1 \mu M$ e $IS_1 = 30,2$), **8b** ($EC_{50-PRO} = 163,8 \mu M$; $IS_1 = 1,5$) e **8c** ($EC_{50-PRO} = 40,2 \mu M$; $IS_1 = 5,0$), apenas **8a** exibiu tanto atividade leishmanicida, quanto padrão de citotoxicidade otimizadas. Ao final ao considerarmos a atividade em formas promastigotas (valores de EC_{50-PRO}) verifica-se que os compostos **8a**, **13a**, **13b** e **14a** mostraram-se mais efetivos que o fármaco de referência, e o derivado **14b** mostrou atividade leishmanicida equiparada. Porém ao considerarmos o IS_1 , os derivados **8a**, **14a**, **14b**, **14c**, **14d** e **14e** exibem atividade melhorada em comparação à AnfB e, portanto, ao

final do ensaio em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* podem ser indicados para avaliação em formas amastigotas.

5.1.2 Ensaio de atividade antipromastigota para *L. (L.) infantum* indicam os derivados **4a**, **8a**, **8b**, **8c**, **14b**, **14c**, **14d** e **14e** para avaliação anti-amastigota

Em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, tanto o precursor **3** ($EC_{50-PRO} = 24,6 \mu M$; $IS_1 = 1,1$) quanto seu derivado **4b** ($EC_{50-PRO} = 52,3 \mu M$; $IS_1 = 3,4$) não se mostraram ativos; entretanto, o derivado **4a** teve apresentou atividade leishmanicida e citotóxica melhorada ($EC_{50-PRO} = 15,5 \mu M$; $IS_1 = 9,7$). Os outros precursores com núcleo furoxânico **13a** ($EC_{50-PRO} = 2,9 \mu M$, $IS_1 = 1,7$) e **13b** ($EC_{50-PRO} = 12,8 \mu M$; $IS_1 = 0,5$) apesar de exibirem atividade leishmanicida, mostraram-se tóxicos às células de camundongos, como evidenciado pelo baixo valor de IS_1 . Dentre os derivados de **13a**, o composto **14a** ($EC_{50-PRO} = 47,9 \mu M$; $IS_1 = 2,4$) exibiu uma perda considerável na atividade leishmanicida quando comparado ao seu precursor; os demais derivados **14b** ($EC_{50-PRO} = 5,7 \mu M$; $IS_1 = 5,6$) e **14c** ($EC_{50-PRO} = 6,2 \mu M$; $IS_1 = 5,8$) foram efetivos contra o parasito e exibiram melhores valores de IS_1 . Os derivados **14d** ($EC_{50-PRO} = 7,8 \mu M$; $IS_1 = 5,9$), **14e** ($EC_{50-PRO} = 9,8 \mu M$; $IS_1 = 21,3$) e **14f** ($EC_{50-PRO} = 9,4 \mu M$; $IS_1 = 2,5$) exibiram atividade leishmanicida equiparável ao precursor seu **13b**. Ressalta-se que o valor de IS_1 apresentado pelo derivado **14e** mostrou-se pelo menos quarenta vezes mais seletivos para o parasito que o precursor. Para os derivados benzofuroxânicos, temos que o precursor **7** ($EC_{50-PRO} = 71,2 \mu M$; $IS_1 = 0,1$), também se mostrou pouco efetivo em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. Seus derivados **8a** ($EC_{50-PRO} = 13,8 \mu M$ e $IS_1 = 4,6$), **8b** ($EC_{50-PRO} = 42,8 \mu M$; $IS_1 = 5,8$) e **8c** ($EC_{50-PRO} = 21,9 \mu M$; $IS_1 = 9,1$) exibiram pequeno incremento na atividade leishmanicida e consequentemente no índice de seletividade (Tabela 2).

Quando estes resultados são comparados à anfotericina B ($EC_{50-PRO} = 3,2 \mu M$, $IS_1 = 7,2$ em *L. (L.) amazonensis* e $EC_{50-PRO} = 0,9 \mu M$, $IS_1 = 25,1$ em *L. (L.) infantum*) e levando-se em conta os severos efeitos colaterais que este fármaco apresenta aos pacientes (BES et al., 2014; BOTERO AGUIRRE; RESTREPO HAMID, 2015; HAMILL, 2013; KHALILI; BAIRAMI; KARGAR, 2013; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; TUON et al., 2013; WADE et al., 2013), verifica-se que os derivados **8a**, **14a**, **14b**,

14d e **14e** se mostraram efetivos frente à espécie responsável pela LC; **4a**, **8a**, **8b**, **8c**, **14b**, **14c**, **14d** e **14e**, enquanto que para a espécie responsável pela LV. Portanto, **8a**, **14b**, **14d** e **14e** para ambas manifestações.

5.1.3 Ensaio de atividade anti-amastigota para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* indicam os derivados **14b**, **14d** e **14e** como promissores candidatos no tratamento da LC ou LV

A avaliação inicial da atividade anti-promastigota para as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, e citotóxica frente a macrófagos murinos possibilitou a determinação dos valores de EC_{50-PRO} e IS_1 para seleção dos compostos mais ativos ($EC_{50-PRO} \leq 40,0 \mu M$) e mais seletivos para o parasito ($IS_1 \geq 5$) para a avaliação da atividade leishmanicida frente a amastigotas intracelulares. Desta forma, os compostos **8a**, **14a-14e** foram selecionados para avaliação da atividade anti-amastigota para *L. (L.) amazonensis*, enquanto **4a**, **8a-8c**, **14b-14e** para *L. (L.) infantum*.

Para *L. (L.) amazonensis*, apesar dos derivados **8a** ($EC_{50-AMA} = 2,2 \mu M$; $IS_2 = 29,3$), **14a** ($EC_{50-AMA} = 2,1 \mu M$; $IS_2 = 54,1$), **14b** ($EC_{50-AMA} = 4,3 \mu M$; $IS_2 = 7,5$), **14c** ($EC_{50-AMA} = 6,3 \mu M$; $IS_2 = 5,7$), **14d** ($EC_{50-AMA} = 4,6 \mu M$; $IS_2 = 9,8$) e **14e** ($EC_{50-AMA} = 8,2 \mu M$; $IS_2 = 25,3$) terem apresentado atividade anti-amastigota e serem seletivos para o parasito; os derivados **8a**, **14a**, **14b** e **14d** foram mais ativos quando comparados a AnfB ($EC_{50-AMA} = 4,9 \mu M$, $IS_2 = 4,7$). Ressalta-se ainda, que os compostos mais seletivos aos parasitos foram **8a**, **14a** e **14e**, os quais apresentaram valores de IS_2 pelo menos cinco vezes maior que o IS_2 do fármaco de referência. Quando a espécie analisada foi a causadora da LV, os compostos **14b** ($EC_{50-AMA} = 3,1 \mu M$; $IS_2 = 10,5$), **14d** ($EC_{50-AMA} = 2,1 \mu M$; $IS_2 = 21,6$) e **14e** ($EC_{50-AMA} = 3,1 \mu M$; $IS_2 = 66,4$) foram os mais ativos, com destaque para o derivado **14e**, o qual é cerca de três vezes mais seletivo para o parasito quando comparado a AnfB ($EC_{50-AMA} = 1,0 \mu M$, $IS_2 = 23,3$). Os demais derivados **4a** ($EC_{50-AMA} = 19,9 \mu M$; $IS_2 = 7,6$), **8a** ($EC_{50-AMA} = 18,2 \mu M$; $IS_2 = 3,5$), **8b** ($EC_{50-AMA} = 25,6 \mu M$; $IS_2 = 9,7$) e **8c** ($EC_{50-AMA} = 45,0 \mu M$; $IS_2 = 4,5$) não se mostraram tão ativos frente a esta espécie de *Leishmania* (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da concentração efetiva em formas amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, e citotoxicidade (CC_{50} , μM) em macrófagos peritoneais murinos dos derivados de furoxano e benzofuroxano.

Compostos	CC_{50} (μM)	EC_{50-AMA}			
		<i>L. (L.) amazonensis</i> (IS_2)		<i>L. (L.) infantum</i> (IS_2)	
4a	$152,2 \pm 2,2$	n.t.		$19,9 \pm 1,7$	(7,6)
8a	$63,2 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,2$	(29,3)	$18,2 \pm 0,1$	(3,5)
8b	$248,3 \pm 2,8$	n.t.		$25,6 \pm 0,4$	(9,7)
8c	$200,3 \pm 2,4$	n.t.		$45,0 \pm 7,4$	(4,5)
14a	$114,6 \pm 4,1$	$2,1 \pm 0,1$	(54,1)	n.t.	
14b	$32,1 \pm 5,8$	$4,3 \pm 0,5$	(7,5)	$3,1 \pm 0,2$	(10,5)
14c	$35,8 \pm 1,6$	$6,3 \pm 0,4$	(5,7)	$7,1 \pm 0,1$	(5,0)
14d	$45,6 \pm 1,5$	$4,6 \pm 0,1$	(9,8)	$2,1 \pm 0,1$	(21,6)
14e	$208,3 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$	(25,3)	$3,1 \pm 0,1$	(66,4)
AnfB	$23,1 \pm 2,5$	$4,9 \pm 0,1$	(4,7)	$1,0 \pm 0,1$	(23,3)

Os valores de $IS_1 \geq 5$ em itálico indicam os compostos promissores, isto é, aqueles que apresentam baixa citotoxicidade para células de mamíferos e alta toxicidade para os parasitos. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicatas $\pm$ desvio padrão.

*valores de IS_2 estão apresentados entre parênteses ($IS_2 = CC_{50}/EC_{50-AMA}$).

n.t. significa não testado.

Para a realização dos ensaios com amastigotas intracelulares foram utilizados macrófagos peritoneais murinos infectados com *Leishmania* spp. Este modelo experimental é preciso pois, além de apresentar elevada taxa de infecção, fornece resultados reprodutíveis (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011).

Para fins didáticos, os resultados da atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) mexicana* serão apresentados mais a frente juntamente com os resultados de inibição de cisteíno proteases desta espécie de *Leishmania*.

5.1.4 Ensaios de dosagem de óxido nítrico indicam **14e** como liberador de NO in vitro e em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum*

Sabendo que o NO é uma importante molécula efetora no combate a patógenos intracelulares (HORTA et al., 2012), explorar o potencial de compostos em produzir NO

constitui uma estratégia interessante para contra-atacar o parasito e seus sofisticados mecanismos de evasão da resposta imune. O grupamento *N*-óxido de derivados de furoxanos pode agir como grupo biorredutível no parasito gerando espécies de radicais livres, como o NO (BOIANI et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2013); de fato, furoxanos são capazes de produzir altas concentrações desta molécula efetora (ZOU et al., 2011), a qual pode estar diretamente relacionada à atividade leishmanicida. Desta forma, foi avaliada a produção de NO *in vitro* pelos derivados em estudo, bem como a produção em macrófagos infectados com *Leishmania* quando na presença dos compostos **8a**, **14a-14e**. Para isso, utilizamos como controle LPS, o qual é capaz de ativar monócitos (COLONNA; FACCHETTI, 2003).

A determinação do próprio NO é difícil devido seu curto tempo de meia vida, portanto a dosagem de seus produtos finais estáveis, como o nitrito é a medida mais frequentemente usada para avaliar a produção de NO (MOSHAGE et al., 1995; SORBA et al., 1997). Então, realizou-se a medida *in vitro* da produção de nitritos, resultado da reação oxidativa entre o NO, O₂ e água de todos os compostos seguindo procedimento de Griess (SANTOS et al., 2011; SORBA et al., 1997; TSIKAS, 2007). Este procedimento baseia-se na reação de diazotação química, a qual utiliza sulfonamida e *N*-1-naftilenodiamina dihidroclorato sob condições ácidas. A proporção de geração de NO induzido por tiol foi determinada após 1h de incubação na presença de excesso de L-cisteína (1:50). Os resultados demonstraram que todos os compostos furoxânicos foram capazes de induzir a formação de nitritos entre 7,8% e 27,4% (Tabela 4). A habilidade de doação de NO está diretamente relacionada ao efeito eletrônico devido à substituição no átomo de carbono na posição 3, nas proximidades da subunidade *N*-óxido. Os derivados de furoxano com uma substituição com bis-aril sulfonil (compostos **14a-f**) foram capazes de gerar NO a níveis maiores do que aqueles substituídos com fenil-furoxanos (**4a** e **4b**) e fenil-benzofuroxanos (**8a-c**).

Tabela 4. Liberação de NO *in vitro* (%). Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicatas $\pm$ desvio padrão.

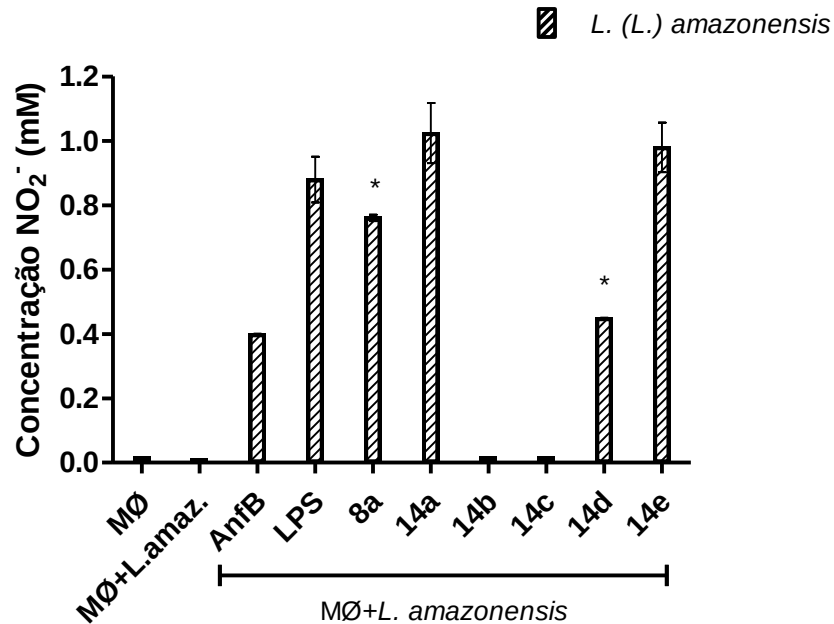
Compostos	%NO ₂ ⁻ (mol/mol), L- Cys, 50x10 ⁻⁴ M
3	12,3 $\pm$ 0,7
4a	8,2 $\pm$ 0,5
4b	7,8 $\pm$ 0,6
7	0
8a	0
8b	0
8c	0
13a	28,2 $\pm$ 1,1
13b	27,8 $\pm$ 1,5
14a	25,3 $\pm$ 1,3
14b	24,1 $\pm$ 2,6
14c	27,4 $\pm$ 3,1
14d	24,5 $\pm$ 2,3
14e	26,2 $\pm$ 2,7
14f	25,8 $\pm$ 2,4
AnfB	0

Macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* foram tratados com 5 μ g/mL dos derivados de furoxanos ou LPS. Para *L. (L.) amazonensis*, os derivados **8a**, **14a** e **14e** foram capazes de produzir NO similarmente ao controle positivo (Figura 16). Interessante ressaltar que estes compostos são os menos citotóxicos como denotado pelos seus valores de IS₂ maiores que 25. Por outro lado, nas células infectadas

com *L. (L.) infantum*, apenas LPS foi capaz de estimular os macrófagos a produzirem NO. O ensaio foi novamente realizado na presença 10 µg/mL de **4a**, **8a**, **8b**, **8c**, **14a**, **14b**, **14c**, **14d** e **14e**. E nesse caso, apenas o derivado **14e** foi capaz de estimular a produção de 7 µM de NO, concentração 64 vezes menor que o controle (Figura 17).

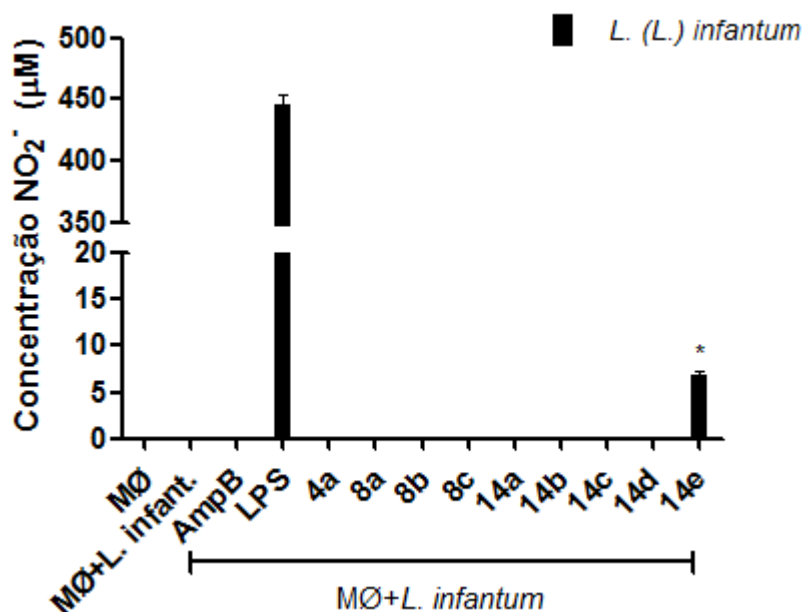
Ao final destes estudos, a análise da relação estrutura atividade indicou que, em geral, os derivados bis-aril sulfonil (compostos **14a-e**) são mais ativos que os fenil-furoxanos (**4a** e **4b**) e benzofuroxanos (**8b** e **8c**). Além disso, o padrão de substituição da molécula de benzoil parece influenciar na atividade leishmanicida. Observou-se de uma maneira geral, que a substituição em *orto* é mais potente que a substituição em *meta*, o qual é mais potente que a substituição em *para*. Apesar dos derivados de benzofuroxanos não terem atuado na liberação de NO *in vitro*, estes compostos parecem induzir uma produção de NO em *L. (L.) amazonensis*. Tem sido relatado que alguns compostos são capazes de induzir a produção de NO em macrófagos infectados, embora este mecanismo não seja completamente entendido (LEZAMA-DÁVILA et al., 2012; MELLO et al., 2014).

Figura 16. Concentração de NO em mM produzido por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* na presença de derivados de furoxanos ou benzofuroxanos.



Macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 5 µg/mL por 48h, após esse período sobrenadante da cultura destas células foi coletado. Macrófagos não infectados (MØ), macrófagos infectados com *Leishmania* (MØ+leish); macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com anfotericina B (AnfB), macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com LPS (LPS) ou macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com os derivados (**8a** ou **14a** ou **14b** ou **14c** ou **14d** ou **14e**). Os resultados foram expressos como média ± DP. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao controle positivo (tratamento com LPS) ($P < 0,05$) foi realizado pelo teste de Tukey.

Figura 17. Concentração de NO em μM produzido por macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* na presença de derivados de furoxanos ou benzofuroxanos.



Macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 10 $\mu\text{g/mL}$ por 48h, após esse período sobrenadante da cultura destas células foi coletado. Macrófagos não infectados (MØ), macrófagos infectados com *Leishmania* (MØ+leish); macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com anfotericina B (AnfB), macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com LPS (LPS) ou macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com os derivados (**4a** ou **8a** ou **14a** ou **14b** ou **14c** ou **14d** ou **14e**).

Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao controle positivo (tratamento com LPS) ($P < 0,05$) foi realizado pelo teste de Tukey.

Ao compararmos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* e tratados com LPS, vale ressaltar que foi necessário o dobro de LPS para tratar as células infectadas com *L. (L.) infantum* para gerar metade do NO produzido pelos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Este dado é inédito e pode estar relacionado com características únicas das espécies em estudo, por exemplo, *L. (L.) infantum*, diferentemente de *L. (L.) amazonensis*, pode apresentar mecanismos únicos que controlam os níveis de NO para sua sobrevivência e que outros mecanismos de ação podem estar agindo. Esta foi a primeira observação que nos levou a considerar o envolvimento de múltiplos alvos de ação para os derivados de furoxanos, visto que a atividade leishmanicida em formas amastigotas é mais potente para a espécie *L. (L.) infantum*. Portanto, os ensaios seguintes discutem potenciais mecanismos de ação e a eficácia *in vivo* de **14e**, já que ao final dos experimentos *in vitro*, este derivado mostrou-

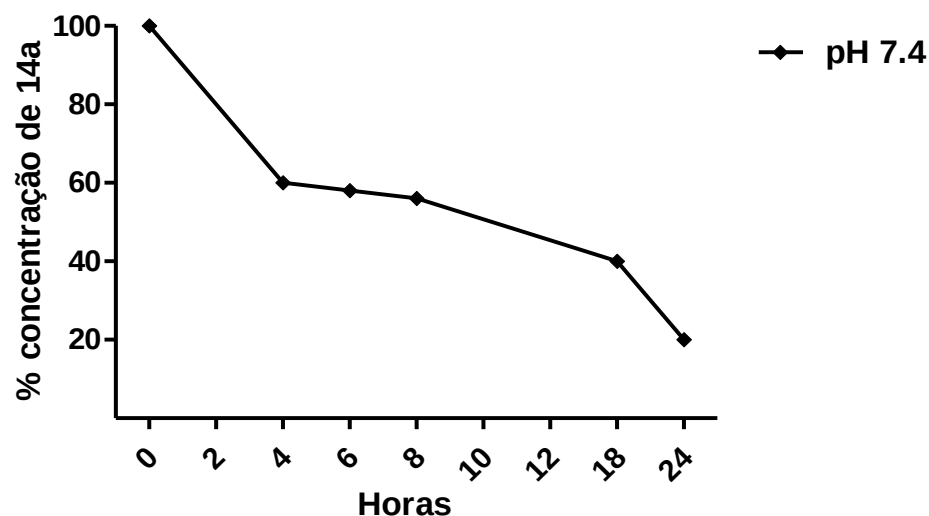
se o mais promissor, visto que este composto apresentou boa atividade leishmanicida tanto para as formas promastigotas e amastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* ($EC_{50-PRO} = 6,4 \mu M$ e $EC_{50-AMA} = 8,2 \mu M$) e *L. (L.) infantum* ($EC_{50-PRO} = 9,8 \mu M$ e $EC_{50-AMA} = 3,1 \mu M$), além de também apresentar boa seletividade para os parasitos em estudo ($IS_1 = 32,4$ e $IS_2 = 25,3$ para *L. (L.) amazonensis*; $IS_1 = 21,3$ e $IS_2 = 66,4$ para *L. (L.) infantum*) e, do ponto de vista dos estudos iniciais de mecanismos de ação, **14e** foi capaz de estimular macrófagos infectados com ambas espécies de *Leishmania* a produzir NO.

5.1.5 A estabilidade dos derivados de furoxanos indicam uma atividade pH-dependente da molécula

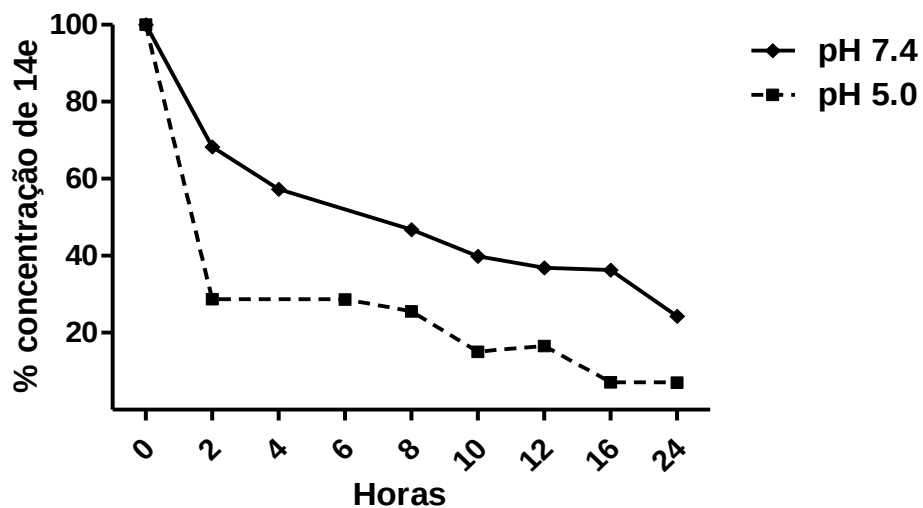
Para caracterizar a estabilidade química de alguns dos compostos mais ativos, **14a** e **14e**, realizou-se ensaio de hidrólise química *in vitro*, uma vez que foi descrito que a subunidade *N*-acil hidrazona pode ser instável em pH ácido (CHELUCCI et al., 2014; MELO et al., 2014). O estudo foi realizado em dois pHs diferentes: 5,0 e 7,4. A escolha do pH 5,0 foi feita de modo a mimetizar o pH ácido do fagolisossomo, e pH 7,4 para mimetizar o pH do citoplasma do macrófago (e pH plasmático). A concentração dos furoxanos **14a** e **14e** diminuíram em 40% após 4h em pH 7,4. Ambos se mostraram instáveis em pH ácido, sendo que **14a** foi imediatamente hidrolisado em pH 5,0, enquanto **14e** teve sua concentração reduzida em 70% nas duas primeiras horas de ensaio (Figura 18). Destaca-se que para estes compostos foram identificados seus aldeídos precursores **13a** e **13b**, respectivamente. Estes resultados sugerem que **14a** e **14e** exibam atividade pH-dependente, mascarando a citotoxicidade dos aldeídos precursores: **13a** ($EC_{50-PRO} = 2,3 \mu M \pm 0,1$; $IS_1 = 2,1$) e **13b** ($EC_{50-PRO} = 2,4 \mu M \pm 0,1$; $IS_1 = 2,5$); desta forma, no meio ácido do fagolisossomo, **14a** ou **14e** podem ser quimicamente convertidos, liberando os aldeídos precursores **13a** e **13b**, respectivamente, causando efeitos tóxicos apenas ao parasito.

Figura 18. Ensaio de estabilidade *in vitro* de 14a (A) e 14e (B) nos pHs 5,0 e 7,4.

A)



B)



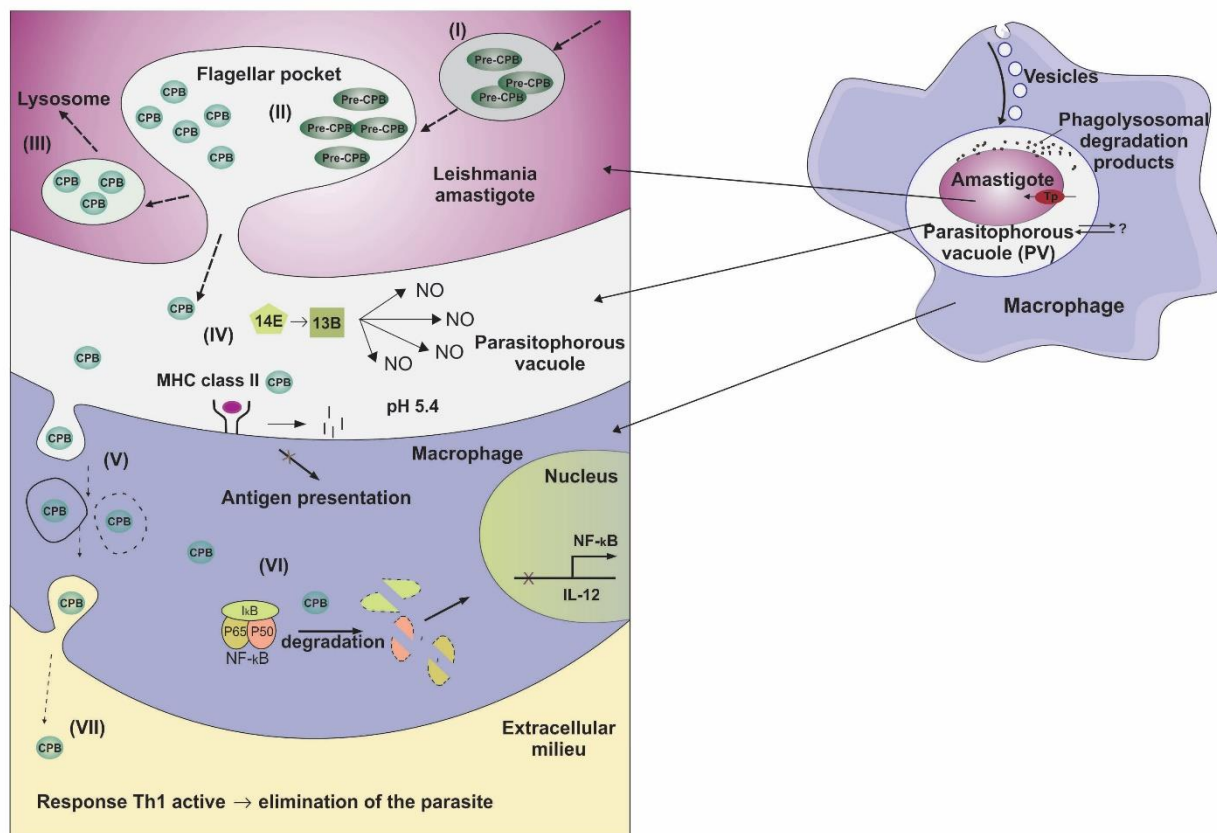
Análises foram feitas em UPLC ou HPLC, e amostras foram coletadas a cada duas horas e realizadas em triplicata experimental.

Relata-se também a relação do pH na conversão dos antimoniais pentavalente, que são pró-fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, neste caso o Sb^{V} é convertido ao Sb^{III} , a forma ativa do medicamento (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Autores identificaram que os tióis predominantes nos compartimentos acídicos de mamíferos (cisteína e cisteinil-glicina) e o principal tiol intracelular de *Leishmania* ($\text{T}(\text{SH})_2$)

promovem a redução de Sb^{V} a Sb^{III} , sendo estas reações favorecidas em pH ácido (apesar de ocorrem em ambos pH 5 e 7) (FERREIRA et al., 2003). Outro estudo, que não descarta o envolvimento de ativação não-enzimática, relata o envolvimento de uma enzima não usual amastigota-específica, que estaria também envolvida na atividade leishmanicida do fármaco. Adicionalmente, este estudo ressalta que a perda da atividade desta enzima poderia constituir um dos mecanismos de resistência aos antimoniais (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Ressalta-se ainda que a subunidade *N*-acil hidrazona presente na estrutura dos derivados em estudo (Figura 14) foi descrita como uma estrutura privilegiada para desenho de compostos com diferentes efeitos farmacológicos incluindo atividade antiparasitária pela inibição da enzima CP (HERNÁNDEZ et al., 2013; IFA et al., 2000; LI et al., 1996; ROMEIRO et al., 2009). De fato, para o parasito *Leishmania*, CP é um importante fator de virulência induzindo resposta imune Th2 em detrimento de Th1, favorecendo a proliferação do parasito. Assim, nossa hipótese é de que **14a** e **14e** podem apresentar mecanismos de ação pH-dependente: em pH 7,0 o grupo *N*-acil hidrazona promoveria a inibição da CP do parasito, a qual é secretada para o citosol do macrófago e, tão logo as moléculas atingissem o interior do fagolisossomo, o pH ácido favoreceria a hidrólise das moléculas, liberando **13a** ou **13b**, respectivamente, promovendo um efeito parasiticida adicional (Figura 19). A atividade antiparasitária destas moléculas pode ser devido à liberação de NO, já que **13a** e **13b** apresentam esta propriedade *in vitro* como previamente descrito (DUTRA et al., 2014).

Figura 19. Ação pH-dependente dos derivados furoxânicos 14a e 14e em macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*.



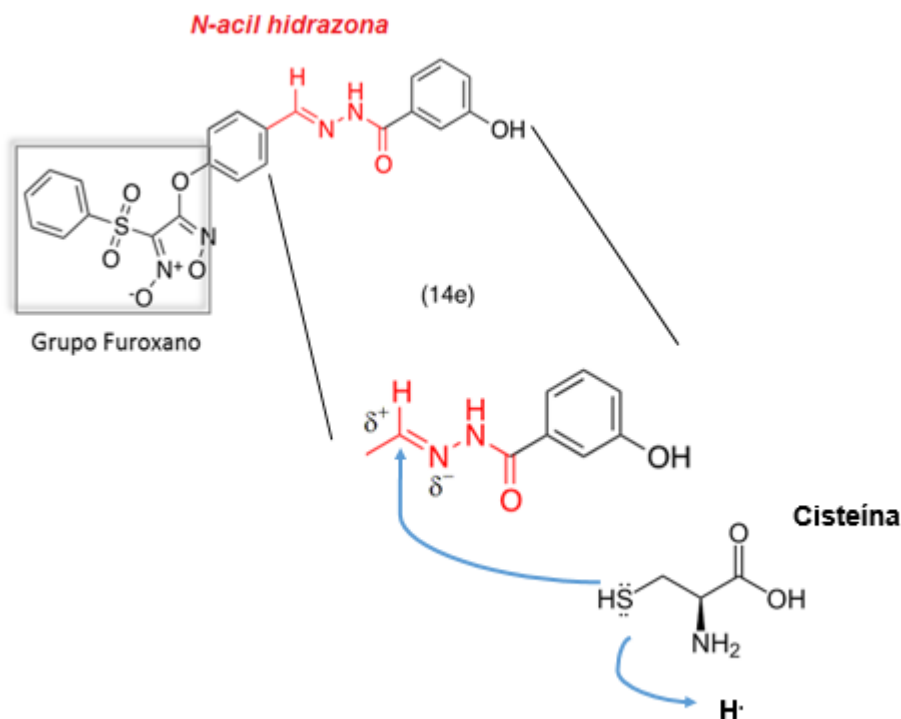
À direita representação de amastigota (região em roxo) no interior do fagolisossomo (região em cinza claro) de macrófago (região em azul). À esquerda ampliação dessas regiões, em destaque a produção da pré-CPB pelo parasito, a qual é então secretada para o citosol do macrófago, onde teríamos a atuação de **14a** ou **14e** inibindo a enzima. Ao atingir o fagolisossomo o composto é hidrolisado ao seu precursor, representado pela conversão de **14e** a **13b**, o qual atua liberando NO.

Fonte: Adaptado (MOTTRAM et al., 2004).

O potencial supracitado da subunidade *N*-acil hidrazona dos derivados de furoxanos e benzofuroxanos em inibir CP pode ocorrer devido à diferença de eletronegatividade dos átomos desse grupamento, o que promoveria deslocamento de elétrons (do átomo de C para o átomo de N), gerando uma carga parcial positiva no átomo de C e, negativa no átomo de N, o que torna o C um sítio eletrofílico (Figura 20). Visto que, os resíduos de aminoácidos das proteases apresentam pares de elétrons disponíveis, como por exemplo resíduos de cisteína (elétrons disponíveis no átomo de S) ou tirosina (elétrons disponíveis no átomo de O), estes irão atuar como nucleófilo, realizando assim um ataque nucleofílico ao C (da *N*-acil hidrazona) deficiente em

elétrons. Com base nessas inferências da estrutura da molécula, decidimos então investigar se CP poderia ser um alvo de ação dos derivados furoxanos e benzofuroxanos.

Figura 20. Estrutura química do derivado furoxânico 14e, evidenciando *N*-acil hidrazona e ataque nucleofílico de um resíduo de aminoácido.



Destaque para parte da estrutura química do **14e**, o grupamento *N*-acil hidrazona (em vermelho), e as cargas parciais do nitrogênio e carbono da *N*-acil hidrazona. As setas azuis indicam o ataque nucleofílico a um resíduo de cisteína.

5.1.6 Alguns derivados furoxânicos são inibidores de CP e exibem atividade leishmanicida em *L. (L.) mexicana*

Como os ensaios foram todos realizados com CP de *L. (L.) mexicana*, realizou-se inicialmente avaliação da atividade leishmanicida dos derivados de furoxanos e benzofuroxanos frente a esta espécie. Estas análises foram realizadas nas Universidades de Glasgow e Strathclyde, Glasgow, RU. Neste ensaio com *L. (L.) mexicana* (Tabela 5), os derivados **4a**, **4b**, **8b** e **8c** não exibiram atividade leishmanicida frente à promastigotas

de *L. (L.) mexicana*, enquanto que **8a** exibiu valores de EC_{50-PRO} igual a 8,2 μM ; sendo 7,7 vezes mais seletivo para o parasito. O precursor **13a** exibiu atividade leishmanicida ($EC_{50-PRO} = 4,9 \mu M$), porém um baixo índice de seletividade ($IS_1 = 1,0$). Seus derivados **14b** ($EC_{50-PRO} = 16,6 \mu M$; $IS_1 = 1,9$) e **14c** ($EC_{50-PRO} = 15,3 \mu M$, $IS_1 = 2,3$) exibiram atividade leishmanicida moderada e baixa seletividade para o parasito. Apesar do precursor **13b** não ter exibido atividade leishmanicida ($EC_{50-PRO} > 30,0 \mu M$), seus derivados **14d** ($EC_{50-PRO} = 1,6 \mu M$; $IS_1 = 29,2$) e **14e** ($EC_{50-PRO} = 10,2 \mu M$; $IS_1 = 20,4$) foram ativos e altamente seletivos para o parasito. Para amastigotas intracelulares, os derivados **8a**, **14d** e **14e** foram testados. Os derivados furoxânicos **14d** ($EC_{50-AMA} = 2,7 \mu M$; $IS_2 = 17,0$) e **14e** ($EC_{50-AMA} = 5,7 \mu M$; $IS_2 = 25,4$) foram ativos e seletivos contra o parasito. Visto que os compostos exibiram alto potencial leishmanicida, prosseguiram-se os ensaios com a isoforma recombinante da enzima CPB2.8 (rCPB2.8) de *L. (L.) mexicana*, a qual de acordo com a estrutura química das moléculas poderia ser um possível alvo de ação.

Para os ensaios de inibição de CP, determinou-se inicialmente a porcentagem de inibição da rCPB2.8 para cada derivado de furoxano e benzofuroxano na concentração de 80,00 μM . Utilizou-se 0,02 μM da enzima, como determinado pelo ensaio de titulação realizado com E64, um inibidor suicida de CPs. Foram selecionados os compostos mais efetivos (inibição $< 80,0 \mu M$) para serem testados em 6 diferentes concentrações (40; 20; 10; 5; 1 e 0,1 μM), para então determinar a concentração necessária para inibir 50% (IC_{50}) da atividade enzimática de rCPB2.8. Os compostos **14b** ($IC_{50} = 1,8 \mu M$) e **14e** ($IC_{50} = 1,0 \mu M$) foram os mais potentes inibidores da enzima (Tabela 6). Ressalta-se que ambos exibem substituição em *meta* do grupamento hidróxi em relação à hidrazona, revelando que esse padrão de substituição na estrutura de seus precursores favorece inibição enzimática. Por outro lado, os precursores **13a** e **13b** foram menos eficientes na inibição da enzima, apresentando valores de IC_{50} de 12,0 e 25,5 μM , respectivamente. Os derivados **4a**, **4b**, **8a**, **8b** e **8c** não inibiram a enzima rCPB2.8. Ressalta-se que, o derivado **14e** o qual foi o mais potente inibidor da rCPB2.8 ($IC_{50} = 1,0 \mu M$), foi o único derivado capaz de estimular a produção de NO em macrófagos infectados com as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*.

Tabela 5. Determinação da concentração efetiva em formas promastigotas (EC_{50-PRO} , μM) e amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) e atividade inibitória de isoforma recombinante de rCPB2.8 (IC_{50} , μM) de *L. (L.) mexicana* dos derivados de furoxano e benzofuroxano.

Compostos	<i>L. (L.) mexicana</i>		rCPB2.8
	EC_{50-PRO} (IS_1)	EC_{50-AMA} (IS_2)	IC_{50}
3	n.t.	n.t.	n.t.
4a	> 30,0	n.t.	> 80,0
4b	> 30,0	n.t.	> 80,0
7	n.t.	n.t.	n.t.
8a	8,2 $\pm$ 0,1 (7,7)	5,3 $\pm$ 0,1 (12,0)	> 80,0
8b	> 30,0	n.t.	> 80,0
8c	> 30,0	n.t.	> 80,0
13a	4,9 $\pm$ 0,4 (1,0)	n.t.	12,0 $\pm$ 4,0
13b	> 30,0	n.t.	25,6 $\pm$ 2,7
14a	> 30,0	n.t.	16,9 $\pm$ 0,6
14b	16,6 $\pm$ 1,4 (1,9)	n.t.	1,8 $\pm$ 0,3
14c	15,3 $\pm$ 3,0 (2,3)	n.t.	n.t.
14d	1,6 $\pm$ 0,4 (29,2)	2,7 $\pm$ 0,1 (17,0)	4,2 $\pm$ 1,3
14e	10,2 $\pm$ 0,8 (20,4)	5,7 $\pm$ 0,1 (25,4)	1,0 $\pm$ 0,1
14f	19,3 $\pm$ 0,1 (1,2)	n.t.	n.t.
Anfotericina B	0,3 $\pm$ 0,1 (67,9)	0,3 $\pm$ 0,1 (74,5)	n.t.

Os valores de $IS_1 \geq 5$ em itálico indicam os compostos promissores, isto é, aqueles que apresentam baixa citotoxicidade para células de mamíferos e alta toxicidade para os parasitos. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicatas $\pm$ desvio padrão. * n.t. significa não testado.

De fato, estudos sugerem que inibidores de cisteíno proteases podem ter efeitos terapêuticos seletivos em doenças como as leishmanioses, por exemplo, a administração

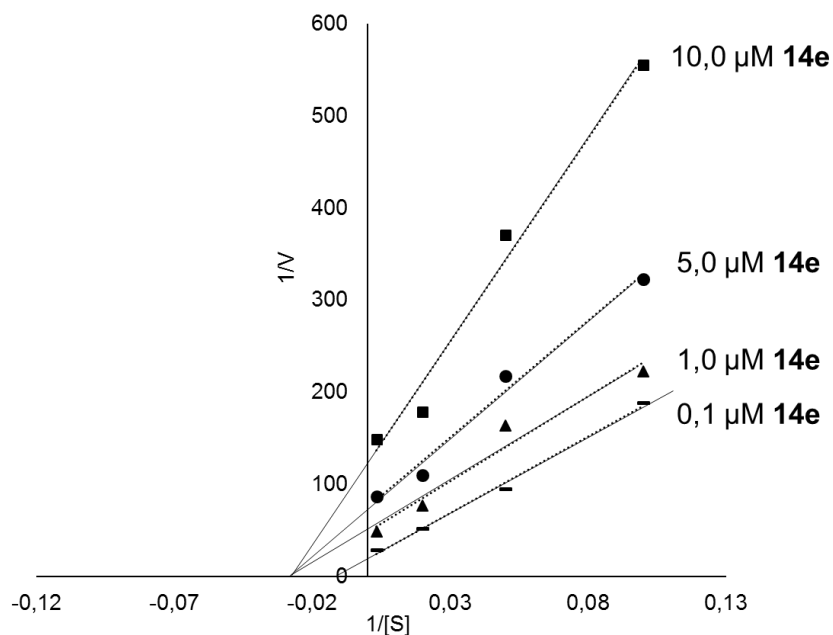
de um inibidor específico de catepsina B (CA074) em camundongos BALB/c resultaram em uma mudança da resposta ineficaz de citocina Th2 para uma resposta Th1, a qual ajuda a eliminar a infecção de *Leishmania* (MAEKAWA et al., 1998; SELZER et al., 1999). Relata-se ainda, que um inibidor reversível de CP, que é encontrado em alguns eucariotos inferiores e algumas bactérias, é um potente inibidor de peptidases da família C1, tais como as catepsinas-L de mamíferos e CPB (SANDERSON et al., 2003). Essa família de enzimas é, portanto, um importante alvo molecular para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para uma série de doenças. Mais ainda, a inibição da CPB2.8 nos parece ser uma interessante estratégia de interferir na doença causada pela *Leishmania*, uma vez que esta isoforma de CP foi descrita quanto ao seu alto potencial de induzir respostas imunes Th2, as quais prejudicam o hospedeiro na luta contra o parasito (POLLOCK et al., 2003).

5.1.7 O composto **14e** é um inibidor não-competitivo

Enzimas podem ser inibidas reversível ou irreversivelmente de acordo com o tipo de formação do complexo enzima-inibidor, o qual pode ou não ser desfeito. Inibidores irreversíveis ligam-se ao sítio ativo da enzima de modo definitivo, usualmente pela formação de ligações covalentes. Inibidores reversíveis levam à formação de um complexo em um sistema de equilíbrio, no qual a enzima tem um grau de inibição definido e é dependente das concentrações dos reagentes no sistema reacional. Os processos de inibição reversível podem ser divididos em três tipos: competitivo, não competitivo e acompetitivo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2003; DIXON; WEBB, 1964).

A análise do mecanismo de inibição foi realizada através do procedimento de plotagem duplo-recíproco, onde os dados experimentais são transformados e plotados graficamente, nessa análise gráfica o slope da linha é K_m/V_{max} , no eixo das ordenadas ($1/V_0$) o intercepto é $1/V_{max}$, e no eixo das abcissas ($1/[S]$) o intercepto é $-1/K_m$. Ao final, constatou-se que esse derivado furoxânico apresenta inibição do tipo não-competitiva com o substrato da enzima rCPB2.8 ($V_{max} = 0,04$ e $K_m = 32,36$) (Figura 21).

Figura 21. Ensaio de mecanismo de inibição da rCPB2.8 pelo derivado 14e.



Este ensaio foi realizado aumentando gradativamente a concentração de **14e** (0,1 – 10,0 μM), e como evidenciado pelo gráfico o **14e** exibe inibição do tipo não-competitiva.

5.1.8 O composto **14e** pode apresentar outros alvos de ação em *Leishmania*

O derivado **14e** também foi avaliado frente a diferentes linhagens mutantes de *L. (L.) mexicana* para CP: mutante nocaute para CPB (Δ cpb), mutante duplo nocaute para CPA e CPB (Δ cpa/ Δ cpb) e mutante nocaute para CPB e superexpressor de rCPB2.8 (Δ cpb+pXcpb2.8) (Tabela 6). O composto **14e** exibiu atividade frente a linhagem selvagem de *L. (L.) mexicana* com valor de EC_{50-AMA} de 5,7 μM. O EC_{50-AMA} para o mutante Δ cpa/ Δ cpb foi igual a 7,3 μM. Nota-se que o EC_{50-AMA} da linhagem Δ cpa/ Δ cpb está 1,3 vezes maior, revelando um aumento na tolerância deste duplo nocaute frente ao composto, fato que não se repete para o mutante Δ cpb (EC_{50-AMA} = 5,6 μM), indicando que **14e** também deve inibir outras isoformas de CP. Ao analisarmos a linhagem de mutantes nulos apenas para a CPB não se constatou diferenças nos valores de EC_{50} ao compararmos com a linhagem selvagem (EC_{50-AMA} = 5,6 μM), dessa maneira é possível inferir que a CPA exibe papel como alvo de ação mais pronunciado na atividade leishmanicida do **14e**.

Como foi descrito anteriormente, há uma diversidade de CPs que estão presentes em *Leishmania* e a ampla gama de processos biológicos importantes com os quais estas enzimas parecem estar envolvidas. A percepção dessa grande variedade de CPs alerta para a interpretação de alguns dados provenientes do uso de inibidores de CP (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Como destacado por alguns autores que a toxicidade de inibidores, ativos não apenas contra CPB, pode ser uma consequência da inibição de múltiplas enzimas (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; SELZER et al., 1999). Dessa maneira, ressaltamos o importante papel do **14e** na inibição de não apenas uma enzima, mas de ambas CPA e da CPB2.8 de *L. (L.) mexicana*.

Tabela 6. Determinação da concentração efetiva, pelo derivado furoxânico **14e**, em formas amastigotas (EC_{50-AMA} , μM) de *L. (L.) mexicana* em diferentes linhagens: selvagem, mutante nocaute para CPB (Δcpb), mutante duplo nocaute para CPB e CPA ($\Delta cpa/\Delta cpb$) e mutante nocaute para CPB e superexpressor de CPB 2.8 ($\Delta cpb+pXcpb2.8$) (EC_{50-AMA}).

Linhagem de <i>L. (L.) mexicana</i>	CPB expressa	EC_{50} (μM)
		Amastigotas
Selvagem	CPB1-18	$5,7 \pm 0,04$
$\Delta cpa/cpb$	Nenhuma	$7,3 \pm 0,07$
Δcpb	Nenhuma	$5,6 \pm 0,07$
$\Delta cpb+pXcpb2.8$	CPB2.8	$3,4 \pm 0,08$

De fato, se CPB2.8 fosse o único alvo de ação de **14e**, o aumento na oferta de CPB2.8 da linhagem superexpressora ($\Delta cpb+pXcpb2.8$) deveria “diluir” a atividade leishmanicida de **14e**, o que poderia ser verificado através de um aumento de EC_{50-AMA} ; no entanto, verificou-se que esta linhagem se mostrou mais susceptível. Isto pode ser devido ao fato que **14e** pode ter outros alvos de ação em *Leishmania* e a ausência de expressão de CPB permitiria que o **14e** estivesse livre para interagir com outros alvos moleculares essenciais para a sobrevivência de *Leishmania*, inclusive, outras isoformas de CP. Adicionalmente, tentativas de desenvolver cepas de diferentes espécies de *Leishmania* resistentes ao **14e** se mostraram infrutíferas. Para isso, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* foram cultivadas na presença de concentrações crescentes do derivado **14e**. Os parasitos foram mantidos por mais de 20 passagens e,

ao final deste período, verificou-se que as linhagens não apresentaram alteração significativa em seu padrão de susceptibilidade ao **14e** (Tabela 7).

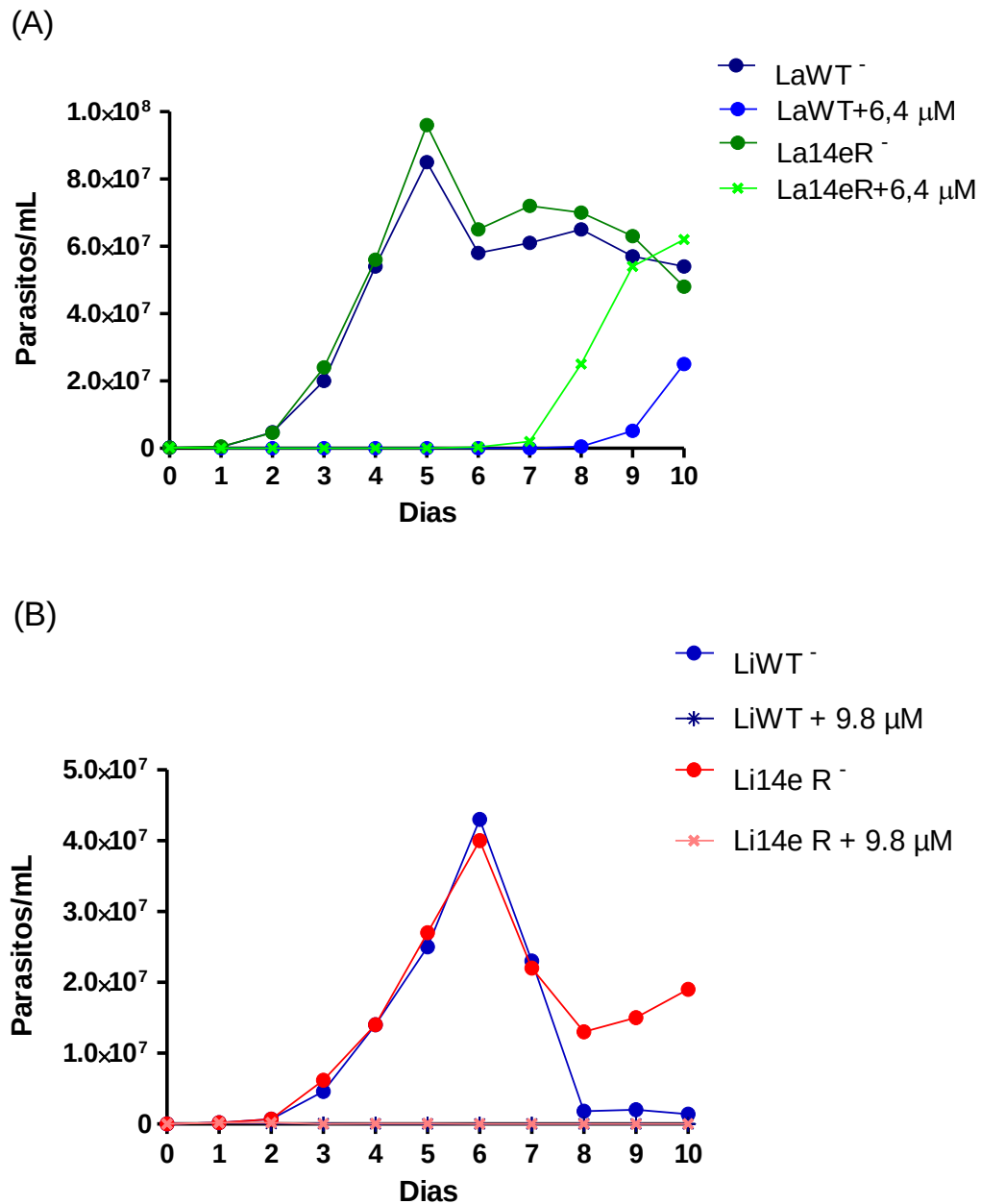
Tabela 7. Valores de EC_{50-PRO} das linhagens selvagem e resistente de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* frente ao composto **14e**.

Parasito	EC _{50-pro} (μM)	Índice de resistência
<i>L. (L.) amazonensis</i> (selvagem)	6,4 ± 0,5	-
<i>L. (L.) amazonensis</i> (resistente)	7,8 ± 2,1	1,2
<i>L. (L.) infantum</i> (selvagem)	9,8 ± 0,5	-
<i>L. (L.) infantum</i> (resistente)	13,9 ± 0,2	1,4

O resultado obtido na determinação do EC₅₀ é coerente com as observações feita durante a construção das curvas de crescimento de ambas espécies cultivadas na presença do composto, que teve por objetivo avaliar possíveis diferenças de crescimento quando em comparação com a cepa selvagem.

A Figura 22A mostra as curvas de crescimento de *L. (L.) amazonensis* após cultivo em BOD a 28°C e contagem durante 10 dias consecutivos. É possível verificar que os parasitos selvagens (LaWT, sensível a **14e**) e resistentes (La14eR, cultivados na presença de concentrações crescentes de **14e**) não cresceram na presença de 6,4 μM do **14e** até o oitavo dia. Entretanto, no nono dia da curva de crescimento, foi possível observar crescimento exponencial desses parasitos, embora La14eR⁻ tenha apresentado um ritmo de crescimento superior à cepa LaWT⁻. A Figura 22B mostra as curvas de crescimento de *L. (L.) infantum*. De maneira análoga ao visto para a outra espécie, verificou-se que os parasitos selvagens (LiWT, sensível a **14e**) e resistentes (Li14eR, cultivados na presença de concentrações crescentes de **14e**) não cresceram na presença de 9,8 μM do **14e**; adicionalmente Li14eR⁻ apresentou um ritmo de crescimento semelhante ao da LiWT⁻, exibindo diferenças após o oitavo dia. Além disso, ao final do experimento, também não se constatou diferenças nos valores de EC_{50-PRO} (Tabela 7), nas curvas de crescimento entre as linhagens selvagem e resistente de ambas espécies estudadas.

Figura 22. Curva de crescimento das linhagens selvagem e resistente de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* em meio de cultura.



Em azul está representado as linhagens de *L. (L.) amazonensis* selvagem na ausência (LaWT⁻) e na presença (LaWT+6,4 μM) do **14e**. Em verde as linhagens de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao **14e** na ausência (La14eR⁻) e na presença (La14eR+6,4 μM) do **14e**. Em azul está representado as linhagens de *L. (L.) infantum* selvagem na ausência (LiWT⁻) e na presença (LiWT+9,8 μM) do **14e**. Em vermelho as linhagens de *L. (L.) infantum* resistentes ao **14e** na ausência (Li14eR⁻) e na presença (Li14eR+9,8 μM) do **14e**.

A resistência aos fármacos está relacionada com a capacidade dos patógenos de contornar os efeitos dos fármacos e é devido à adaptabilidade genética que permite a seleção de estratégias adequadas contra estes medicamentos (VANAERSCHOT et al., 2014). A seleção de parasitas resistentes a fármacos tem sido utilizada para a identificação de genes de resistência a fármacos em protozoários e também contribuiu para a compreensão dos mecanismos de ação de alguns desses agentes terapêuticos (ALSFORD et al., 2013; MULLER; HEMPHILL, 2011; OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). Usualmente, os agentes quimioterápicos que possuem apenas um alvo proteico são mais susceptíveis a um alto nível de resistência, resultante de uma mutação sítio específico na proteína alvo. De maneira análoga, fármacos que apresentam uma baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência endógena são aqueles que interagem com múltiplos alvos moleculares, as estruturas dos quais são determinados por múltiplos genes (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009).

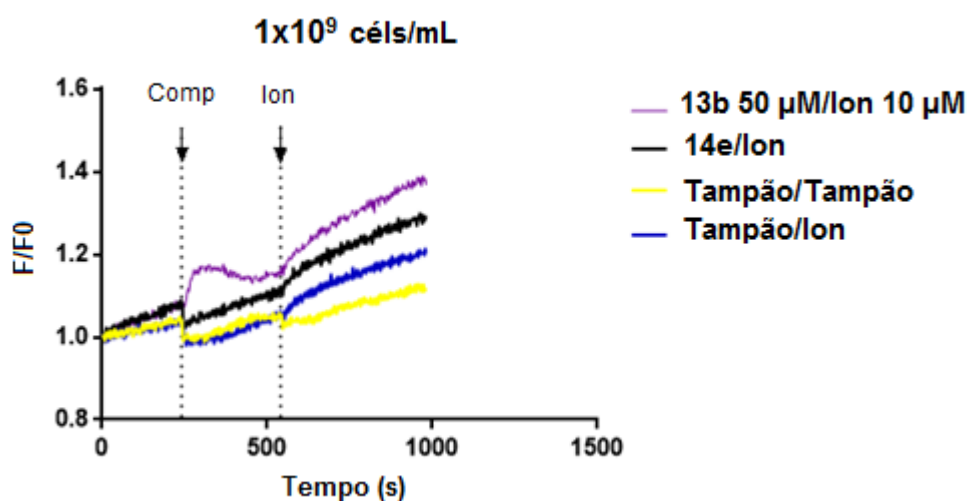
Apesar não se ser amplamente descrito na literatura, a incapacidade de selecionar organismos resistentes a compostos bioativos pode ser considerada um traço positivo no desenvolvimento de fármacos, em parte devido à dificuldade em saber até onde deve-se ir para se certificar de que a resistência é inalcançável (COELHO et al., 2015). Contudo, embora não possamos completamente descartar a possibilidade de encontrar *Leishmania* resistente ao **14e**, há evidências que nos permitem concluir ao final desses ensaios que o derivado **14e** apresenta múltiplos alvos de ação. Sendo assim, os passos seguintes consistiram na investigação desses demais possíveis alvos moleculares.

Esse resultado do envolvimento de múltiplos alvos de ação reforçam os achados encontrados frente aos diferentes mutantes para CP, pois havendo superexpressão da rCPB2.8 na linhagem Δ cpb+pXcpb2.8 era de se esperar um aumento no valor de EC₅₀, porém dado o envolvimento de outros alvos de ação (como a CPA e possivelmente outros alvos) é passível o entendimento da diminuição do valor de EC₅₀ revela a interação do composto com os outros alvos, também essenciais para a sobrevivência do parasito. Baseado neste achado, prosseguiu-se então na identificação de outros potenciais alvos de ação do **14e**.

5.1.9 Ensaios iniciais indicam outros possíveis alvos de ação em *Leishmania* do derivado **14e**: alterações nos níveis de cálcio intracelular

Relatos de literatura mostram o papel do NO como um agente sinalizador em células de animais e de plantas, modulando o Ca^{2+} livre, o qual atua como segundo mensageiro no controle de uma variedade de funções celulares como contração, divisão celular, secreção e diferenciação (BESSON-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008; MORENO; DOCAMPO, 2003). Visto que **14e** se mostrou capaz de alterar os níveis de NO, e dada a relação direta que o Ca^{2+} pode ter neste processo, procedeu-se então estudos para verificar se **14e** estaria promovendo alteração na homeostase do Ca^{2+} . Estas análises foram realizadas em parceria com Prof. Dr. Andrew Thomas, da Universidade Estadual de Nova Jersey, Rutgers. Interessantemente, resultados preliminares mostraram que o precursor **13b**, e não o derivado **14e**, modificou os níveis de Ca^{2+} citosólico em *Leishmania* (Figura 23). É importante ressaltar que o **13b** é o precursor do **14e** e corresponde à porção da molécula onde encontramos o grupamento N-óxido, o qual tem uma relação direta com a produção de NO. Além disso, o composto **13b** produziu altos níveis de NO *in vitro*.

Figura 23. Ensaio de mobilização de cálcio intracelular.



A adição do composto está indicada pela seta Comp, e a adição de ionomicina (Ion) comprova a viabilidade da célula.

Ressalta-se que estes experimentos para avaliar alterações nos níveis de cálcio citosólico tratam-se de ensaios preliminares, os quais nos fornecem um indicativo do envolvimento de **13b** no influxo de Ca^{2+} intracelular. Porém, novos ensaios precisam ser realizados para obter repetições experimentais, bem como determinar a fonte do cálcio intracelular que está sendo utilizada.

5.2 Ensaios *in vivo*

5.2.1 O derivado **14e** reduziu a carga parasitária *in vivo* no fígado e baço na dose de 3,0 mg/Kg/dia

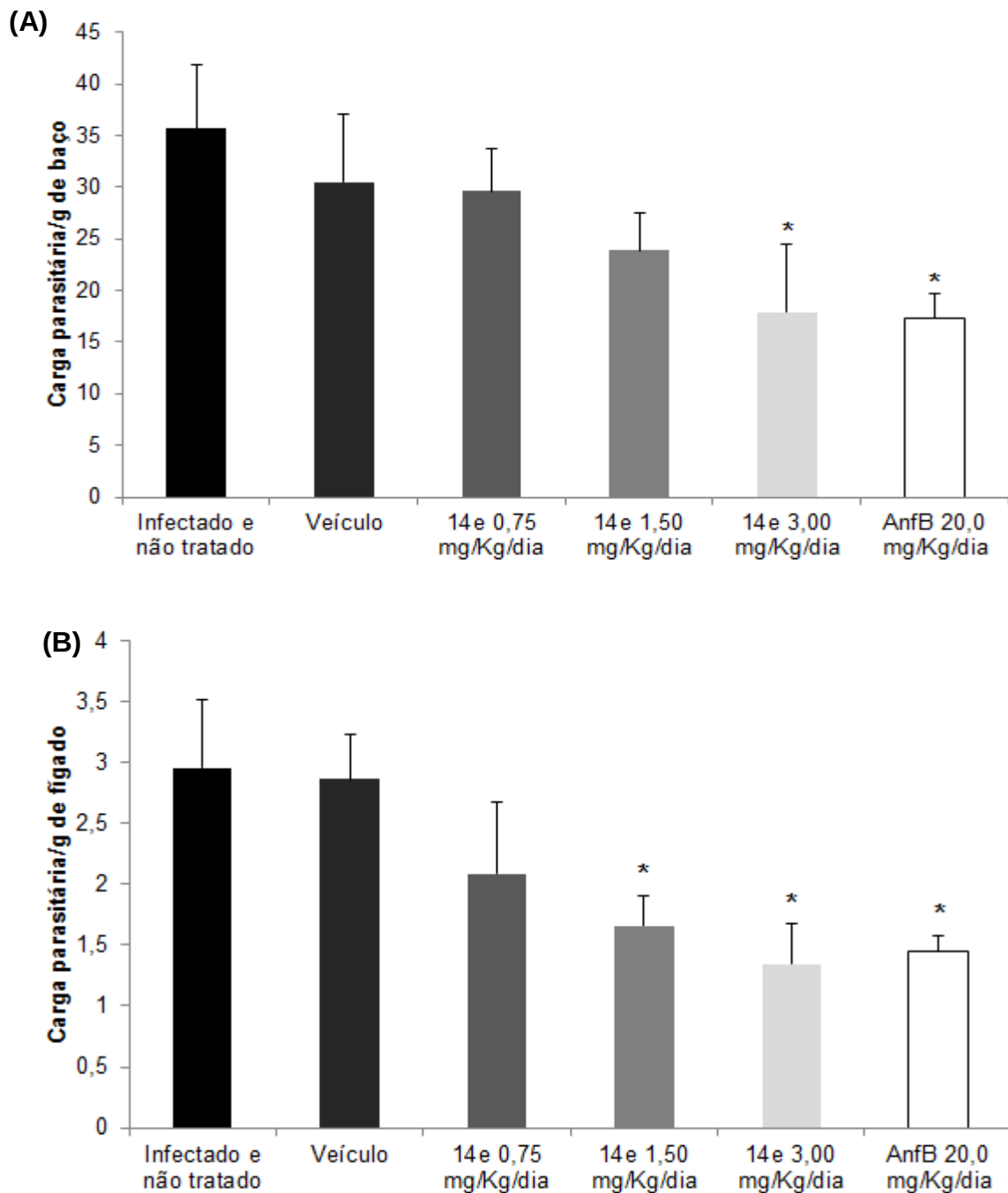
Afim de prosseguir a avaliação da atividade leishmanicida baseando-se nas instruções do manual do DNDi, procedeu-se ensaio *in vivo* com o **14e**, composto mais promissor selecionado nos ensaios *in vitro* realizados. No ensaio *in vivo*, optou-se em pesquisar a eficácia do composto em estudo no tratamento da LV, devido ao alto impacto da forma visceral em países da América do Sul. Em especial na América Latina há ocorrência de casos em 12 países, sendo que 96% desses casos ocorrem no Brasil (LINDOSO et al., 2014). Adicionalmente, a LV apresenta sintomas clínicos graves, os quais estão associados com febre intermitente, perda de peso, massiva hepatoesplenomegalia, podendo ainda causar progressiva deterioração do hospedeiro com hemorragias e edemas que podem surgir no curso final da doença (SHAKYA; BAJPAI; GUPTA, 2011). Baseado em relatos da literatura optou-se pelo uso de hamsters como modelo animal para esta doença. E embora os camundongos sirvam como um bom modelo animal para dissecar as respostas imunes protetoras com os reagentes imunológicos disponíveis, normalmente a infecção em camundongos difere da LV em humanos, além de verificar-se auto-cura nesses animais. Em contraste, os sintomas clínicos da doença em hamsters mimetiza a LV humana caracterizada por imunossupressão grave, podendo ainda haver o desenvolvimento de infecção progressiva fatal (DAS; ALI, 2014; ESPITIA et al., 2014; MELBY et al., 2001).

Antes de iniciar o tratamento dos animais foi testado o veículo mais adequado para solubilizar o derivado **14e**. Apesar de relatos do uso de solução salina ou PBS como veículo, nesse caso não foi possível o uso destes veículos, dada a baixa solubilidade do composto em soluções hidrofílicas. Encontrou-se uma proporção adequada de DMSO e PBS (DMSO 57%), o qual possibilitou a solubilização do composto sem causar efeitos colaterais nos animais. Para análise da atividade leishmanicida *in vivo*, foram utilizados 7 grupos de animais: animais não infectados (G1); animais infectados com *L. (L.) infantum* e não tratados (G2); animais infectados e tratados com o **14e** em três diferentes concentrações: 3,0 mg/Kg/dia (G3), 1,5 mg/Kg/dia (G4) e 0,75 mg/Kg/dia (G5); animais infectados e tratados com o veículo (G6) e animais infectados e tratados com AnfB a 20,0 mg/Kg/dia (G7).

Um dos sintomas clínicos associados à LV é massiva hepatoesplenomegalia, podendo ainda causar progressiva deterioração do hospedeiro com hemorragias e edemas que podem surgir no curso final da doença (SHAKYA; BAJPAI; GUPTA, 2011). Após o surgimento dos sintomas clínicos, como hepatoesplenomegalia, iniciou-se o tratamento dos animais. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e a eficácia do tratamento *in vivo* foi avaliada empregando-se a metodologia de diluição limitante para a quantificação da carga parasitária por grama de órgão, sendo baço e fígado os órgãos analisados.

No baço constatou-se que as cargas parasitárias dos grupos de animais infectados e não tratados e aqueles infectados e tratados com o veículo foram estatisticamente iguais. Tal resultado comprova que a diminuição da carga parasitária vista é devido ao composto em estudo e não devido ao veículo utilizado. Adicionalmente, apenas os tratamentos com 3,0 mg/Kg/dia de **14e** e 20,0 mg/Kg/dia de AnfB reduziram a carga parasitária em 49,9% e 51,5%, respectivamente (Figura 24A). No fígado também foi constatada que a carga parasitária dos animais infectados e não tratados é estatisticamente igual à carga parasitária dos animais infectados e tratados com veículo. Neste órgão, o tratamento com doses de 3,0 e 1,5 mg/Kg/dia de **14e** e 20,0 mg/Kg/dia de AnfB reduziram a carga de parasitos no fígado em 54,2%; 43,7% e 50,5%, respectivamente (Figura 24B).

Figura 24. Tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) infantum* com 14e ou AnfB.



Sete grupos hamsters foram infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após a infecção os animais foram tratados com 14e ou AnfB. A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante no final do tratamento em (A) no baço e (B) no fígado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo infectado e não tratado ($P < 0,05$) foi realizado pelo teste de Tukey.

Portanto, verifica-se ao final do tratamento experimental que o derivado **14e** mostrou-se eficaz em reduzir a carga parasitária no baço e fígado de animais infectados com *L. (L.) infantum*. Essa eficácia ocorreu com doses diárias de 3,0 mg/Kg/dia por 15 dias em ambos os órgãos avaliados, podendo ser equiparada à eficácia do tratamento com uma dose de 20,0 mg/Kg/dia de AnfB. Sendo assim, esse composto além do potencial leishmanicida *in vitro*, exibe também atividade *in vivo*. Ressalta-se ainda, que o **14e** com uma dose 7 vezes menor exibiu a mesma eficácia do fármaco de referência. O passo seguinte foi analisar as alterações em parâmetros bioquímicos no sangue dos animais que pudessem dar indícios de efeitos tóxicos no fígado e rim. Além disso, foram feitas análises histopatológicas para também avaliar possíveis efeitos colaterais aos órgãos.

5.2.2 O tratamento com **14e** na dose de 3,0 mg/Kg/dia não exibiu toxicidade de acordo com os marcadores bioquímicos de toxicidade

Os métodos de hepatotoxicidade *in vitro* são rotineiramente usados para avaliar a toxicidade ao fígado de fármacos, químicos e biológicos, e para entender os mecanismos e estabelecer sua correlação com toxicidade *in vivo* (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2010; INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014). A determinação das várias enzimas do fígado na circulação, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) ajudam a entender o status funcional do fígado e a detectar possíveis danos causados por fármacos (INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014).

As atividades no soro da ALT e AST são consideradas marcadores bioquímicos da toxicidade no fígado induzida por fármacos em estudos envolvendo animais de laboratório. Essas metodologias relacionadas à dosagem da atividade enzimática no soro foram consideradas cruciais para a garantia de segurança de novos fármacos (SOOKOIAN; PIROLA, 2015; TARRANT; MEYER; KATAVOLOS, 2013). Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto a AST está presente na membrana do hepatócito. Essa diferença tem auxiliado nas avaliações de dano hepatocelular leve, sendo que a forma predominante no soro é citoplasmática (ALT),

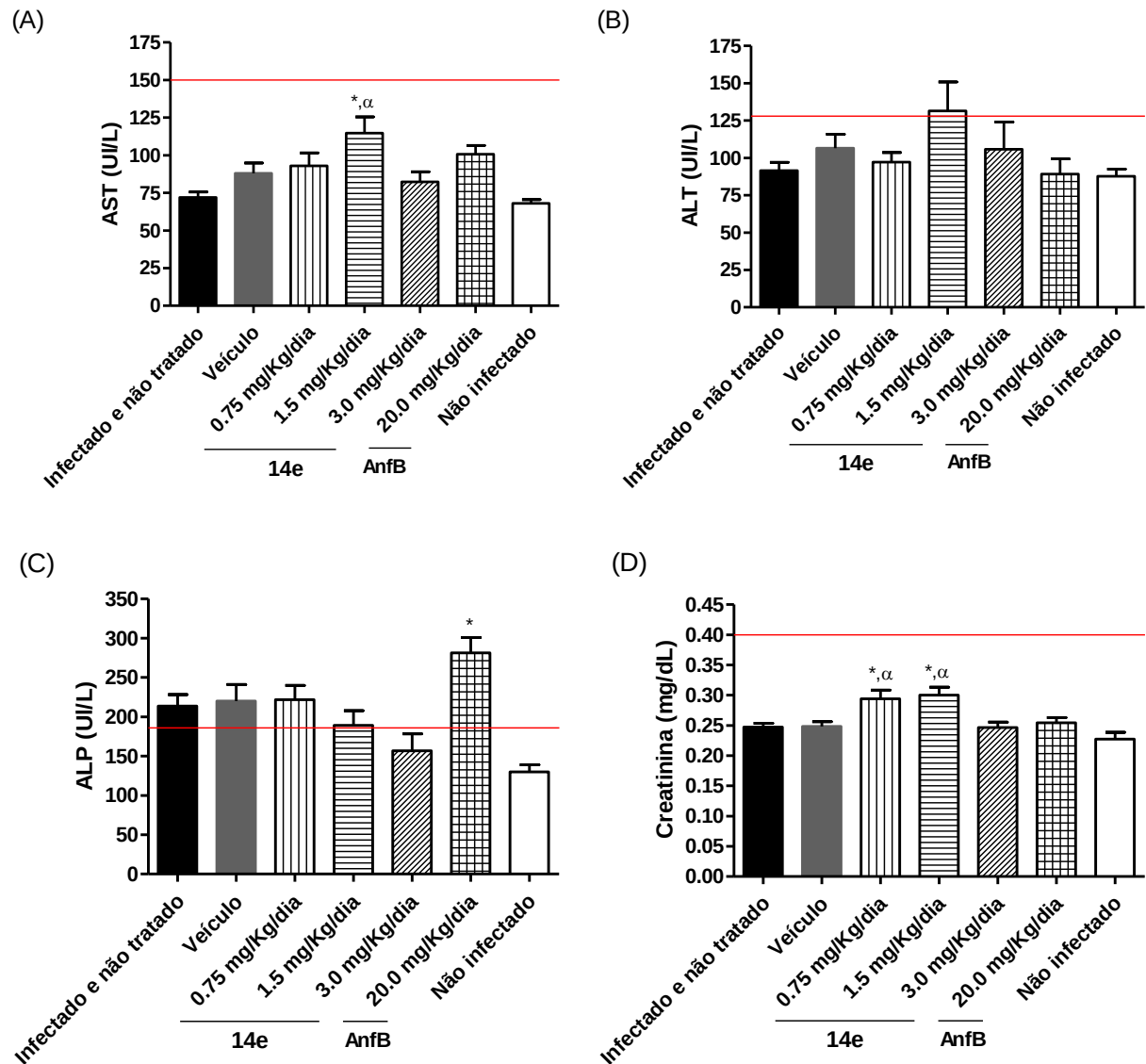
enquanto, em lesões graves há liberação da (AST), elevando a relação AST/ALT. Portanto, é razoável especular que a atividade enzimática de ALT e AST medidas na circulação, refletem aspectos relevantes da patofisiologia da função do fígado além do rompimento da membrana do hepatócito (SOOKOIAN; PIROLA, 2015). Para a função hepática, não foram verificadas alterações significativas nos níveis de AST e ALT para todos os grupos de animais analisados (Figura 25A e 25B). Demonstrando assim que os tratamentos não causaram danos aos hepatócitos.

No fígado, a ALP está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parênquimais aos canalículos biliares. Como a fosfatase alcalina está localizada nas membranas de revestimentos dos canalículos biliares, a enzima está elevada nas desordens do trato biliar. Devido ao impedimento do fluxo biliar os níveis séricos da ALP aumentam, e esses aumentos são devidos, fundamentalmente, ao: incremento na síntese da enzima, retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos. O aumento dessa enzima é visto com frequência em lesões expansivas como carcinoma hepatocelular, metástases e granuloma (MOTTA, 2003). Neste estudo, foram observados níveis elevados de ALP no grupo infectado não tratado e para ambos os animais tratados com **14e** (0,75 mg/Kg/dia) e AnfB (20,0 mg/Kg/dia). Este fato corrobora com o que foi visto nas análises histopatológicas, uma vez que foi constatado acúmulo de pigmento amarelado próximo aos ductos biliares. O fato das alterações hepáticas agravarem-se após o tratamento com AnfB pode ser parcialmente devido ao efeito tóxico de AnfB. É interessante notar que os níveis de ALP são inversamente proporcionais à dose aumentada de **14e**, uma vez que após o tratamento os níveis de ALP regressam aos valores normais à medida que ocorre a depuração do parasito (Figura 25C).

Além de parâmetros para determinação da hepatotoxicidade, é também necessária identificação de parâmetros para a determinação da função renal. Os rins exercem múltiplas funções que podem ser didaticamente caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endócrinas e metabólicas. A função primordial dos rins é a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno predominantemente pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos e excreção de outras substâncias. A creatinina é um dos marcadores laboratoriais da função renal (SODRÉ;

COSTA; LIMA, 2007). Esta difunde do músculo para o plasma de onde é removida quase inteiramente e em velocidade relativamente constante por filtração glomerular (EMANUELLI et al., 2008). Qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina, com o consequente aumento nas concentrações plasmática da mesma. A concentração da creatinina sérica aumenta quando ocorre a formação ou excreção reduzida de urina. Sendo assim, valores aumentados indicam uma deterioração da função renal, sendo que o nível sérico geralmente acompanha, paralelamente, a severidade da enfermidade (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Apesar das dosagens de creatinina no soro revelarem nos tratamentos com doses de 1,5 mg/Kg/dia e 0,75 mg/Kg/dia do **14e** valores maiores do que o visto para o controle negativo; as dosagens de creatinina de todos os grupos analisados estavam abaixo dos valores de referência (Figura 25D).

Figura 25. Avaliação da toxicidade em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* após tratamento com 14e ou AnfB.



As concentrações séricas de AST **(A)**, ALT **(B)**, ALP **(C)** e creatinina **(D)** em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* 15 dias após o tratamento com **14e** ou AmpB. A linha vermelha representa os valores máximos de referência para hamsters, que são: AST: 20-150 UI/L; ALT: 20-128 UI/L; ALP: 50-186 UI/L; Creatinina: 0,4-1,0 mg/dL. (WASHINGTON; VAN HOOSIER, 2012). Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo não infectado ($P < 0,05$); α : diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo infectado e não tratado ($P < 0,05$) foram realizadas pelo teste de Tukey.

5.2.3 O tratamento com **14e** na dose de 3,0 mg/Kg/dia não causou efeitos tóxicos no fígado, baço e rim pelas análises histopatológicas

Com intuito de checar possíveis alterações histopatológicas amostras de fígado, baço e rim dos animais de todos os grupos foram seccionadas em parafina e coradas com H&E.

O fígado é considerado um órgão monitor, sendo capaz de representar em sua própria ultraestrutura as respostas biológicas às alterações ambientais (VIANNA; TAKIYA; BRITO-GITIRANA, 2002) (Figura 26). Relatos na literatura descrevem que o processo inflamatório no fígado contendo LV envolve macrófagos e linfócitos parasitados, afetando região periportal e também lobular (EL HAG et al., 1994). De fato, foram observadas a presença de infiltrados inflamatórios que, muitas vezes encontravam-se na região periportal. Estes infiltrados demonstraram-se variáveis nos diferentes grupos estudados. Também se verificou a presença de infiltrados inflamatórios formando aglomerados na região lobular. Sendo assim, os infiltrados próximos às regiões de espaços porta (periportal) foram classificados quanto ao tipo (infiltrados crônicos ou mistos) e intensidade (leve, moderado ou intenso). Os infiltrados lobulares foram apenas classificados em infiltrados pequenos ou grandes.

e misto na região periportal e, do mesmo modo, expressiva quantidade de grandes infiltrados inflamatórios na região lobular. A presença de amastigotas também foi verificada no tecido hepático (Figura 29)

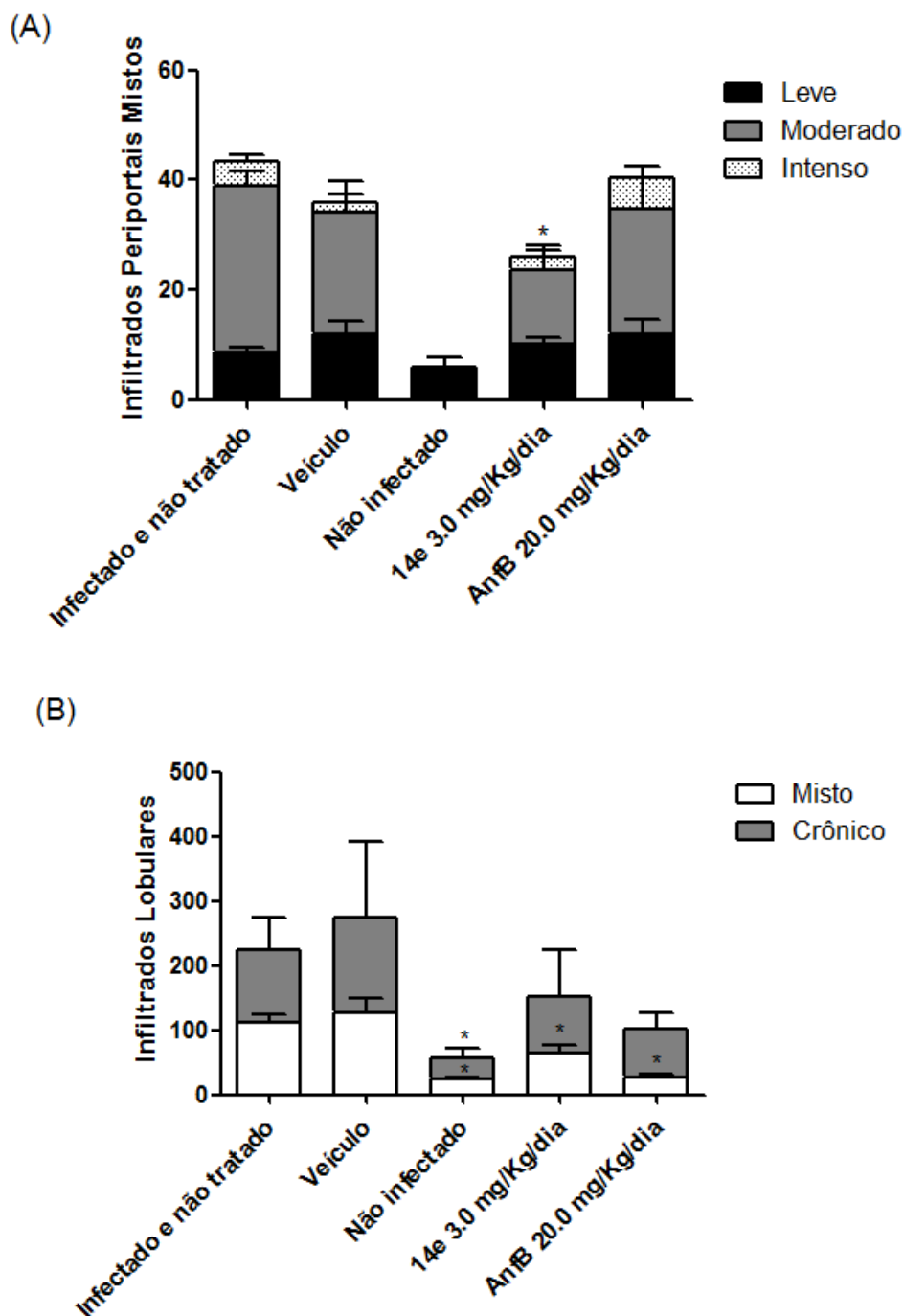
Por outro lado, infiltrados inflamatórios leves, crônicos e mistos, nas regiões de espaço porta foram vistos nos animais não infectados. Na região lobular do fígado haviam infiltrados crônicos e mistos, porém em sua maioria apresentando-se como pequenos infiltrados inflamatórios (Figura 27 e 28).

O tratamento dos animais com 3,0 mg/Kg/dia do **14e** reduziu em 55% e 49% os infiltrados inflamatórios moderado e intenso, respectivamente, na região de espaço porta, podendo ser comparado ao que foi visto no grupo de animais não infectados. Além dessa diminuição de infiltrados intensos e moderados, constatou-se ainda um aumento nos infiltrados leves. Na região lobular verificou-se também redução do número de aglomerados inflamatórios (Figura 27 e 28).

Os tratamentos com doses de 1,5 mg/Kg/dia e 0,75 mg/Kg/dia do derivado **14e** revelaram alterações que podem ser comparadas ao visto no grupo infectado e não tratado, ou seja, grande quantidade de infiltrados inflamatórios na região de espaço porta. Os grupos tratados com 0,75 mg/Kg/dia e 1,5 mg/Kg/dia do **14e** resultaram em um aumento da quantidade de parasitos vistos em relação ao tratamento com 3,0 mg/Kg/dia do **14e**.

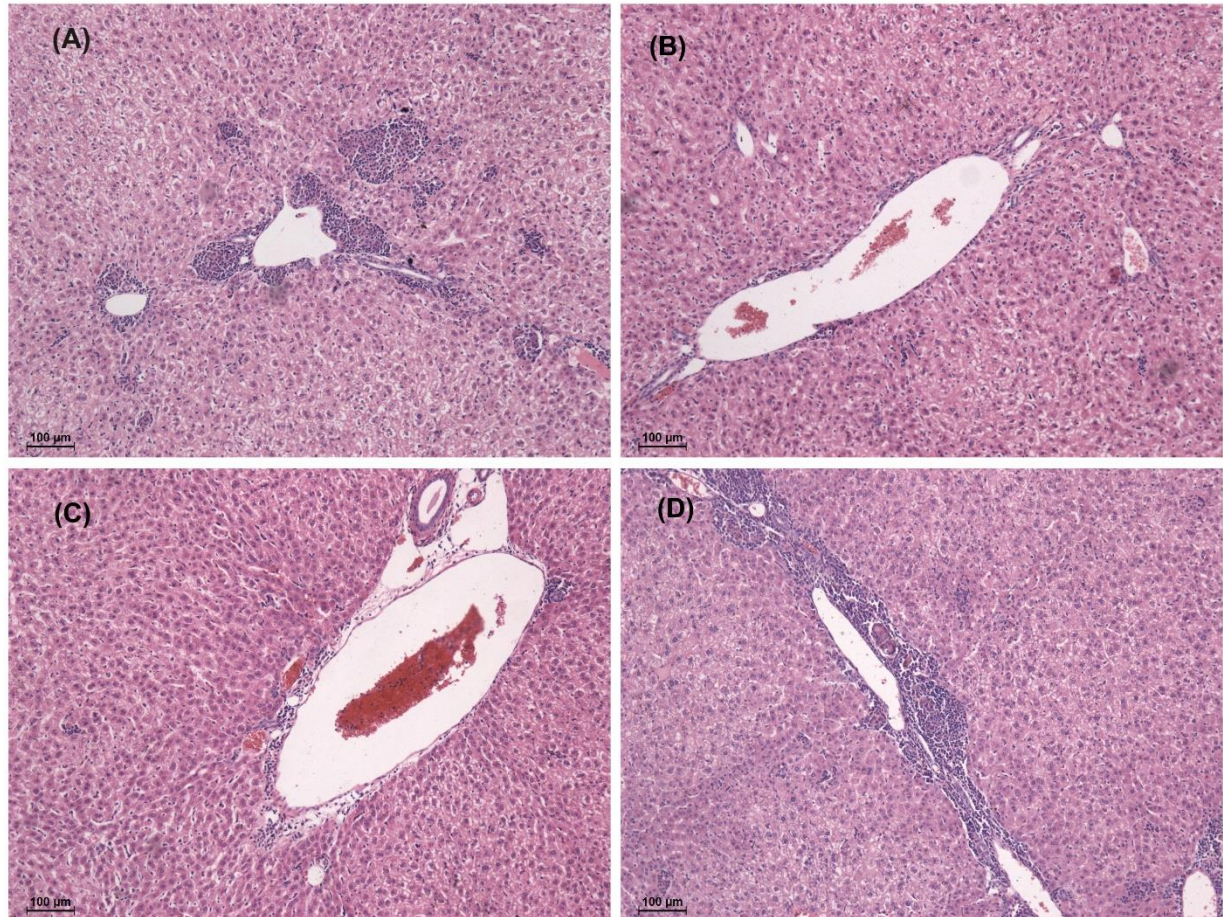
As análises dos animais tratados com 20,0 mg/Kg/dia de AnfB demonstraram a mesma frequência de infiltrados inflamatórios ao visto no grupo infectado e não tratado na região de espaço porta, entretanto, proporcionou uma mudança no padrão de infiltrados com tendência de aumento de infiltrados leves e redução dos infiltrados moderados. Na região lobular também se verificou redução no número de infiltrados, mas ainda com maior proporção de grandes aglomerados celulares. Outro ponto que demonstrou alteração foi a proporção de infiltrados crônicos e mistos, neste grupo da AnfB verificou-se redução do número de infiltrados mistos com aumento de infiltrados crônicos (Figura 27 e 28).

Figura 27. Alterações histopatológicas no fígado de hamster infectado com *L. (L.) infantum* após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.



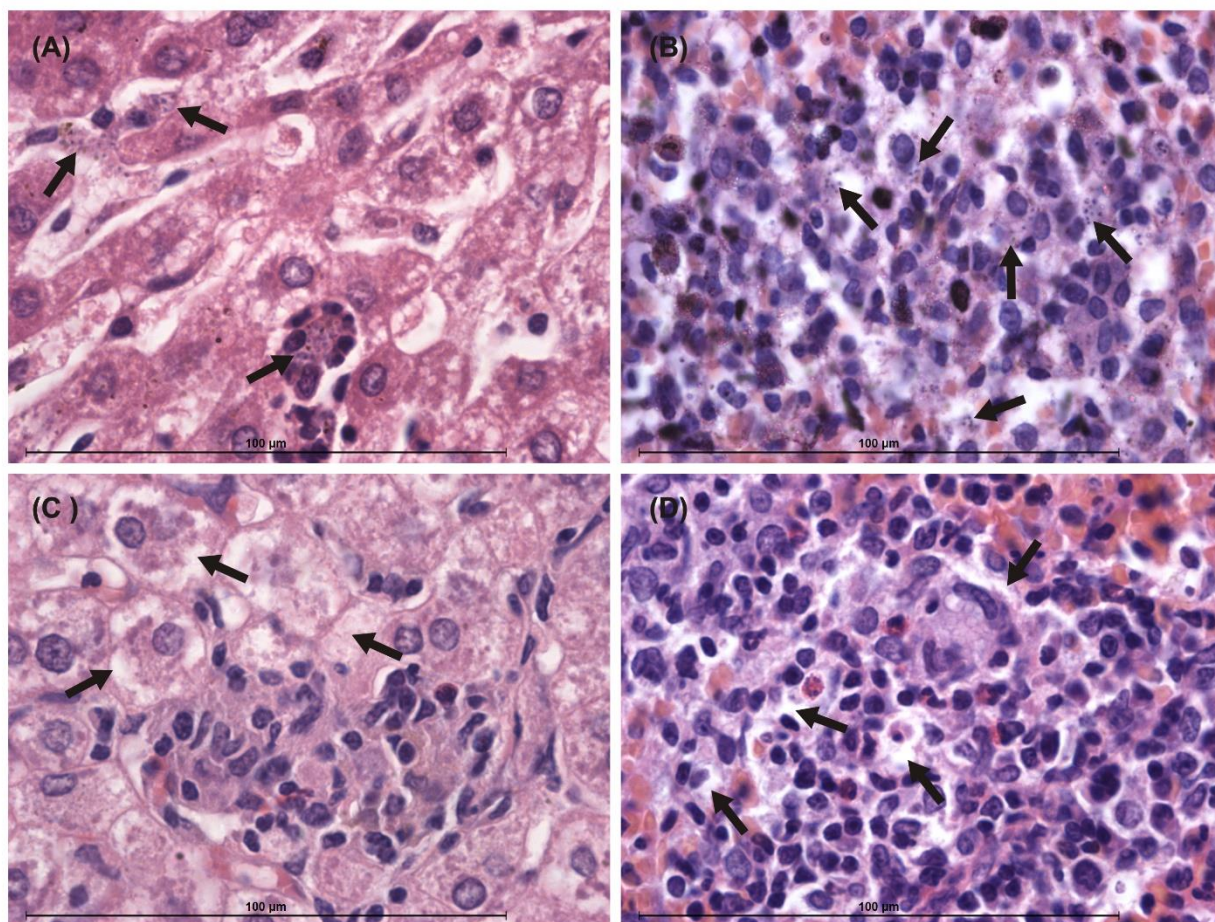
Grupos de sete hamsters foram infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após a infecção os animais foram tratados com **14e** ou AnfB. Cortes do fígado foram seccionados em parafina e coradas com H&E, e analisadas sob um microscópio. **(A)** Infiltrados periportais mistos nos grupos testados, **(B)** tipo de infiltrados lobulares. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo infectado e não tratado ($P < 0,05$) foram realizadas pelo teste de Tukey.

Figura 28. Fotomicrografia das alterações histopatológicas do fígado de hamster infectado com *L. (L.) infantum* tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.



Grupos de hamsters infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após uma infecção de animais tratados com **14e** ou AnfB. Fígados foram seccionados em parafina, corados com H&E, e analisados sob microscopia. Infecções inflamatórias na área periportal de **(A)** grupo infectado não tratado, **(B)** animais não infectados, **(C)** animais tratados com 3,0 mg/Kg/dia de **14e** e **(D)** 20,0 mg/Kg/dia de AnfB. Ampliação de 10x.

Figura 29. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no fígado e baço de hamster infectado com *L. (L.) infantum* após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.

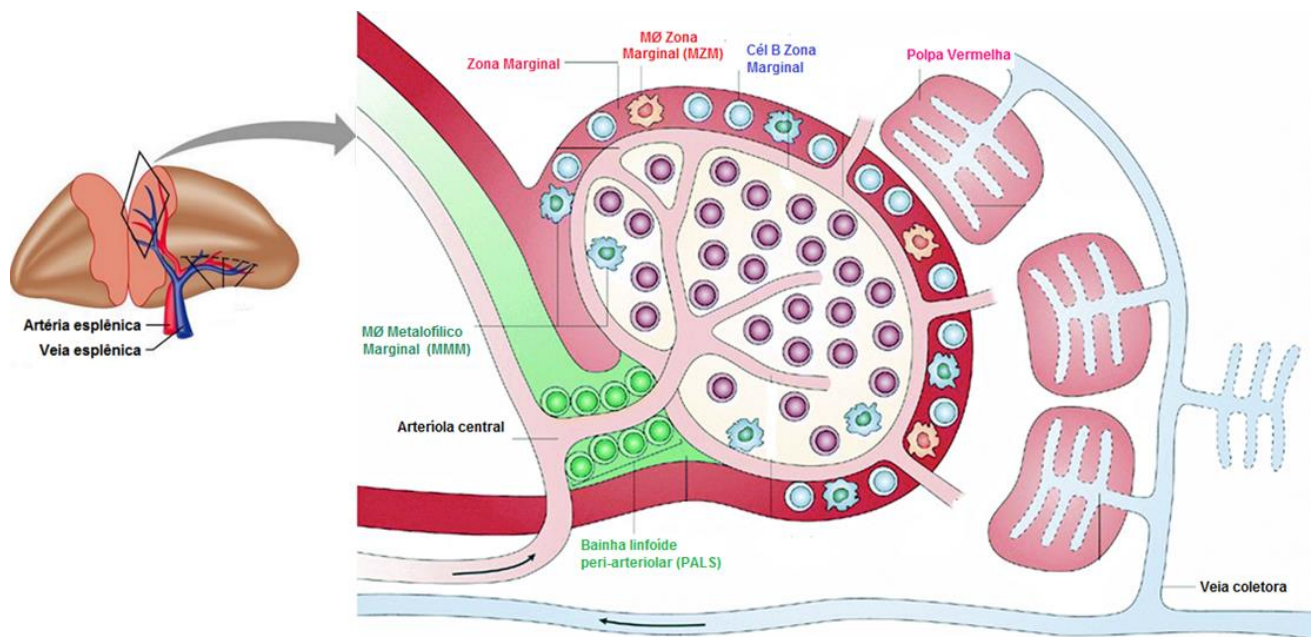


Grupos de hamsters infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após a infecção animais foram tratados com **14e** ou AnfB. Fígados e baços foram seccionados em parafina, corados com H&E, e analisados sob microscopia. As setas indicam amastigotas no fígado **(A)** e no baço **(B)** do grupo infectado não tratado. Ou as setas indicam vacúolos vazios em fígado **(C)** e baço **(D)** de animais tratados com **14e** (3,0 mg/Kg/dia). Aumento 100x.

O baço é o maior órgão linfoide secundário e suas funções estão centradas na circulação sistêmica. Morfologicamente este órgão é composto pela polpa vermelha separada da polpa branca por uma zona marginal (ZM) especializada. A polpa vermelha remove materiais estranhos e eritrócitos danificados. A polpa branca contém linfócitos, os quais iniciam respostas imunes à antígenos transmitidos pelo sangue (CESTA, 2006). A função da ZM está relacionada à geração de respostas imunes adquiridas contra patógenos. Na ZM são encontradas células B, células dendríticas e dois tipos de

macrófagos: os macrófagos da zona marginal (MZM) e os macrófagos metalofílicos marginais (MMM) (Figura 30). Essas duas populações de macrófagos são importantes para *Leishmania* estabelecer a infecção, pois os MZM possuem alta capacidade fagocitária, enquanto que os MMM têm atividade fagocitária limitada. Nos estágios iniciais da infecção a estrutura esplênica funciona, e ambos macrófagos são parasitados, havendo até um certo controle da doença. Porém durante os estágios crônicos de infecção (> 28 dias) muitas mudanças patológicas associadas com a LV humana são frequentemente observadas no baço. Nessa fase, há uma perda seletiva dos MZM, mas não dos MMM resultando no status imunocomprometido do hospedeiro (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; STANLEY; ENGWERDA, 2007). Ainda associado aos estágios crônicos da doença verifica-se uma desorganização de polpa branca, tal como redução de tamanho e surgimento de área hipertrófica na polpa vermelha. Adicionalmente, é possível observar macrófagos altamente infectados em múltiplas localizações (CESTA, 2006; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Figura 30. Estrutura geral do baço.



Em destaque polpa branca, polpa vermelha, zona marginal, macrófagos de zona marginal, macrófagos metalofílicos marginais, bainha linfóide peri-arteriolar, artéria esplênica e veia esplênica.

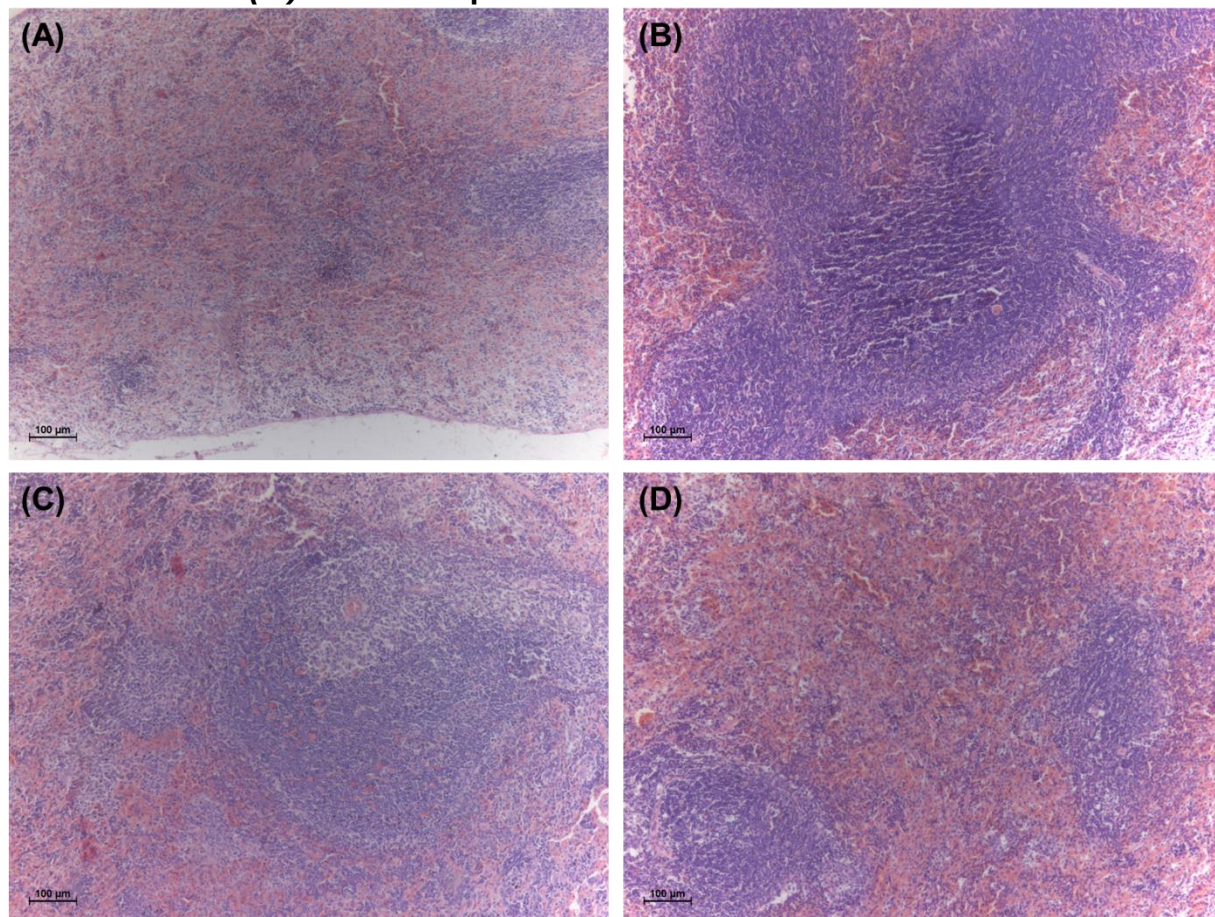
Neste estudo, todos os grupos apresentaram cápsula intacta, porém diferenças foram observadas na polpa branca e vermelha, ZM e folículos. No grupo infectado e não tratado, foi observado que a infecção por *Leishmania* causou algumas alterações no baço, como a hipoplasia da polpa branca acompanhada de perda da definição estrutural, seguida de aumento da ZM (Figura 31). As análises histológicas também revelaram a presença de granulomas, bem como amastigotas (Figura 29). Estes mesmos resultados foram verificados no grupo de animais infectados e tratados com o veículo. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois grupos (grupos infectado e não tratado, e infectados e tratados com veículo).

Nas análises histopatológicas do baço do grupo não infectado verificou-se polpa branca e ZM normal como esperado (Figura 31), e nenhuma indicação para a presença de granulomas.

O baço de animais infectados tratados com a dose mais elevada de **14e** (3,0 mg/Kg/dia) revelou uma proporção normal entre a polpa branca/vermelha, embora a ZM estava inesperadamente aumentada (Figura 31). Apesar da presença de granulomas, os parasitos foram raramente encontrados (Figura 29). As menores doses de **14e** (0,75 e 1,5 mg/Kg/dia) resultaram em hipoplasia de polpa branca, aumento da ZM, formação de granulomas e identificação de amastigotas no baço, conforme observado nos animais infectados e não tratados.

O grupo tratado com AnfB (20,0 mg/Kg/dia) exibiu hipoplasia severa de polpa branca seguida pela perda estrutural do órgão (Figura 31) e o aparecimento de granuloma; entretanto, os parasitos foram raramente encontrados. O grupo AnfB também apresentou espessamento fibroso da cápsula esplênica, o que não foi observado nos demais grupos. A hiperplasia da ZM pode ocorrer com um grau variável de atrofia folicular. Este achado, quando associado à obliteração dos limites entre áreas distintas do tecido linfóide, indica uma desorganização estrutural da polpa branca. Este resultado está de acordo com as observações descritas por Veress et al. (1977) (VERESS et al., 1977).

Figura 31. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no baço de hamster infectado com *L. (L.) infantum* após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.

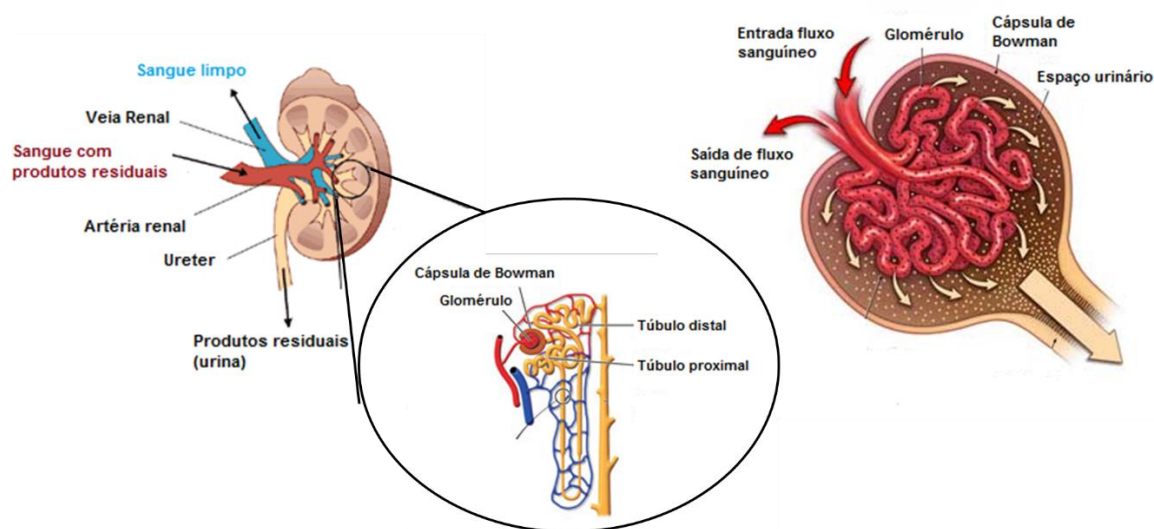


Grupos de hamsters infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após a infecção animais foram tratados com **14e** ou AnfB. Baços foram seccionados em parafina, corados com H&E, e analisadas sob microscopia. Foco nas regiões de polpa branca/polpa vermelha e zona marginal no grupo infectado não tratado **(A)**, não infectado **(B)**, animais tratados com dose de 3,0 mg/Kg/dia **14e (C)**, e animais tratados com dose de 20,0 mg/Kg/dia de AnfB **(D)**. Ampliação de 10x.

As demais análises histopatológicas envolveram o rim, um órgão que desempenha um papel como de um filtro para o sangue, sendo importante na eliminação de fármacos e remoção de resíduos metabólicos endógenos (BONATE; REITH; WEIR, 1998; VARMA et al., 2009). O rim é geralmente dividido em córtex e medula; o córtex renal é a parte externa do rim que contém os glomérulos (que compreende os capilares glomerulares e cápsula de Bowman) (Figura 32), os túbulos proximal e distal, e a porção externa da alça de Henle, e dutos coletores. O córtex renal também contém muitas das enzimas metabolizadoras de fármacos. A medula renal, por sua vez, é a parte interna do

rim e contém a parte inferior das extremidades finais da alça de Henle e dutos coletores (BONATE; REITH; WEIR, 1998). A nefrotoxicidade de fármacos ou xenobióticos podem estar relacionados à sua acumulação nas células tubulares renais ou ainda à danos aos glomérulos (FENG et al., 2010). Quando um fármaco causa nefrotoxicidade, as células do glomérulo incham e então o espaço urinário diminui. Sendo assim, é importante a aplicação da experiência do metabolismo de fármacos à seleção de compostos (BEAUMONT; SMITH, 2009).

Figura 32. Estrutura geral do rim.

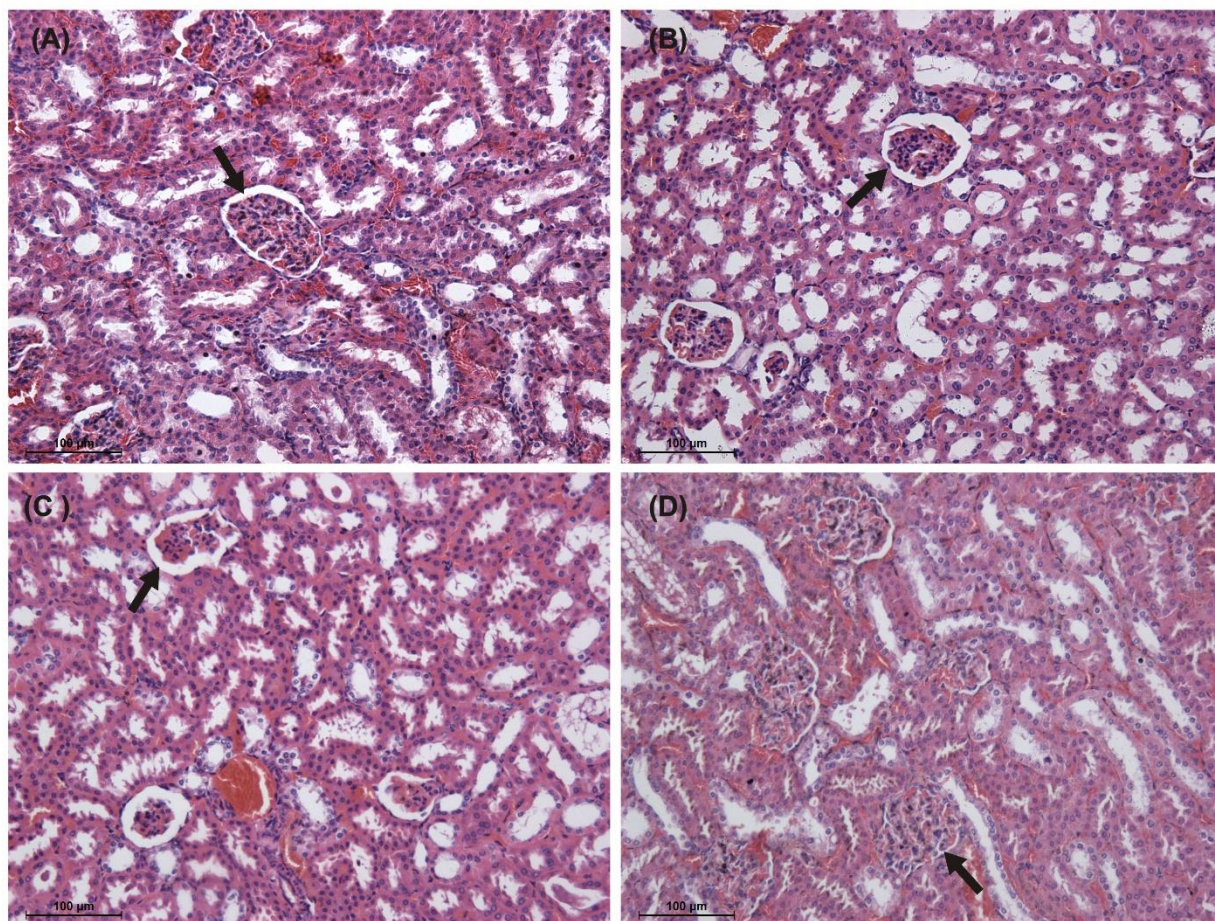


Em destaque cápsula de Bowman, glomérulo, túbulo distal e túbulo proximal e espaço urinário.

Para confirmar a ausência de toxicidade por **14e** para a função renal, realizou-se análise histopatológica do rim afim de avaliar possíveis lesões teciduais. A análise do rim revelou que todos os grupos exibiram a cápsula de Bowman intacta; dutos proximais e distais na região cortical estavam normais na maioria dos animais, sem diferenças estatísticas entre os grupos. No entanto, foram observadas diferenças no espaço urinário e nos dutos da área medular, o quais serão discutidos a seguir. Nos animais infectados e não tratados observou-se uma redução no espaço urinário (Figura 33), curiosamente, para este grupo foi observado granuloma na região cortical e edema nos dutos da área medular. Alterações semelhantes foram verificadas no rim dos animais infectados e tratados com o veículo, não havendo, portanto, diferenças estatisticamente significativas

entre estes grupos. Apesar de não ter sido observado a maior parte das alterações acima descritas no grupo de animais infectados e tratados com o **14e** nas doses de 1,5 ou 3,0 mg/Kg/dia, 3 dos 5 animais destes grupos exibiram edema nos canais da área medular. Adicionalmente, na maior dose usada do **14e** verificou-se espaço urinário normal, assim como nos animais não infectados (Figura 33). Na dose de 0,75 mg/Kg/dia do **14e** foi observado o mesmo padrão do grupo infectado e não tratado. Para o grupo de animais infectados e tratados com AnfB, observou-se que houve danos ao rim e diminuição do espaço urinário (Figura 33), acompanhado de edema proximal; 3 de 5 animais deste grupo também exibiram edema em dutos da área medular (picnose/necrose em alguns casos). Estes achados confirmam o efeito nefrotóxico de AnfB previamente relatado na literatura (BES et al., 2014; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; TUON et al., 2013; WADE et al., 2013). Além disso, nossos dados sugerem que a combinação de análises bioquímicas e histopatológicas fornece dados mais precisos sobre a toxicidade de compostos em estudo.

Figura 33. Fotomicrografia das alterações histopatológicas no rim de hamster infectado com *L. (L.) infantum* após tratamento com 14e ou AnfB durante 15 dias.

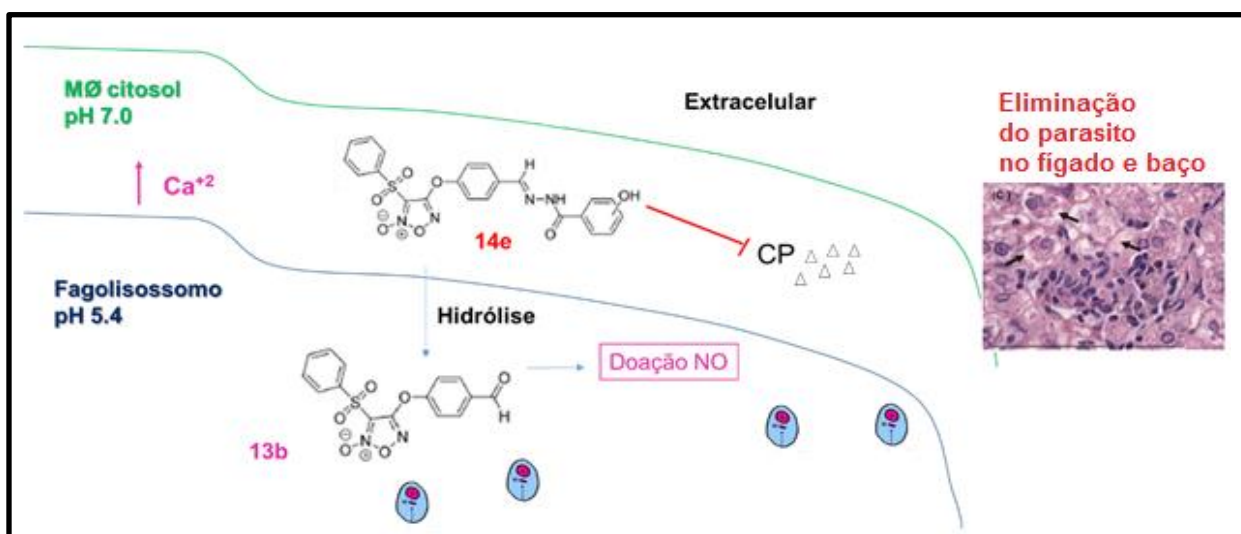


Grupos de hamsters infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum*, 75 dias após a infecção animal foram tratados com **14e** ou AnfB. Rins foram seccionados em parafina, corados com H&E, e analisadas sob microscopia. A seta indica o espaço urinário no grupo infectado não tratado (**A**), não infectado (**B**), animais tratados com dose de 3,0 mg/Kg/dia **14e** (**C**), e animais tratados com dose de 20,0 mg/Kg/dia de AnfB (**D**). Ampliação de 20x.

Por fim, sugerimos ao final dessa pesquisa de doutorado um efeito leishmanicida sinérgico entre o composto (**14e**) e sua molécula precursora (**13b**), uma vez que em pH ácido o **14e** é rapidamente hidrolisado ao **13b**. Sendo assim, nossa hipótese é que o **14e** iniba as cisteíno proteases no citosol e consequentemente desligue a maquinaria usada pela *Leishmania* na subversão da resposta imune. Associado a isso, acreditamos que o **13b** atue de maneira sinérgica na geração de óxido nítrico, favorecendo a eliminação do

parasito como verificado no ensaio *in vivo* através das análises histopatológicas. Além disso, sugerimos que o **13b** ainda atue no aumento do cálcio citosólico prejudicando o funcionamento normal de proteínas do parasito (Figura 34).

Figura 34. Hipótese do mecanismo de ação do derivado furoxânico 14e.



Representação esquemática do modelo de hipótese gerado ao final da presente pesquisa. Os efeitos gerados pelo **14e** na inibição de cisteína proteases e eliminação do parasito do fígado e baço estão demonstrados em vermelho. Os efeitos gerados pelo **13b** como a doação de NO e alterações nos níveis de cálcio intracelular estão demonstrados em rosa.

7 CONCLUSÕES

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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