



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA, FACULDADE
DE FARMÁCIA E NUTRIÇÃO (FACFAN)



AMARITH RODRIGUES DAS NEVES

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS DERIVADOS DAS
NEOLIGNANAS TETRAHIDROFURÂNICAS: A BUSCA POR NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

CAMPO GRANDE – MS

2023

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA, FACULDADE
DE FARMÁCIA E NUTRIÇÃO (FACFAN)

AMARITH RODRIGUES DAS NEVES

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS DERIVADOS DAS
NEOLIGNANAS TETRAHIDROFURÂNICAS: A BUSCA POR NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área de concentração química medicinal e parasitologia, com a orientação do Prof. Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni e coorientação da Prof.^a Dr. Carla Cardozo P. de Arruda.

CAMPO GRANDE – MS

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Amarith Rodrigues das Neves

Estudo pré-clínico de análogos isoxazólicos derivados das neolignanas tetrahidrofurânicas: a busca por novos candidatos a fármacos com atividade antileishmania.

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área de concentração química medicinal e parasitologia, com a orientação do Prof. Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni e coorientação da Prof.^a Dr. Carla Cardozo P. de Arruda.

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

CAMPO GRANDE – MS

2023

Ficha catalográfica

Das Neves, Amarith Rodrigues

Estudo pré-clínico de análogos isoxazólicos derivados das neolignanas tetrahidrofurânicas: a busca por novos candidatos a fármacos com atividade antileishmania. Campo Grande, 2023.

Xp: il.; 30 cm.

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área de concentração química medicinal e parasitologia, com a orientação do Prof. Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni e coorientação da Prof.^a Dr. Carla Cardozo P. de Arruda.

1. Leishmanioses.
2. Análogos isoxazólicos.
3. Derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas.
4. Efeito terapêutico *in vivo*.
5. Tratamento intralesional.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as mulheres da minha vida: Nilda (mãe), Anadyr (avó) e Denise (esposa).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar os meus passos e conceder a serenidade necessária para superar as dificuldades e apreciar os momentos de conquista.

À minha mãe por todo o apoio, desde a faculdade, mestrado e agora concluindo o doutorado. Obrigada por me ensinar a sonhar e todo seu apoio para transformar esses sonhos em realidade. Gostaria de agradecer a minha companheira Denise, meu amor, que esteve ao meu lado, me abraçando com todo seu amor e cuidado, compreendendo minha falta de tempo e cansaço, e deixando os meus dias sempre mais alegres. Eu te amo.

Ao professor Adriano, meu mentor, toda a minha admiração e gratidão. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e participar de trabalhos tão importantes, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos da vida acadêmica e também pelos aprendizados para a vida pessoal.

À professora Carla, pelo acolhimento no laboratório de parasitologia humana. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e pelo espaço oferecido para que eu pudesse desenvolver as minhas habilidades enquanto pesquisadora.

Obrigada minha amiga Natália Valério, parceira de faculdade e mestrado, foi através dela que conheci o professor Adriano, quem possibilitou a minha entrada na vida acadêmica.

À minha amiga, Fernanda, que esteve ao meu lado como parceira de laboratório, me ajudando em experimentos intermináveis, acompanhando os dias difíceis, mas também felizes, levando café para alegrar o dia, obrigada pelas conversas e momentos de descontração.

Ao meu amigo, Pedro, que também acompanhou os altos e baixos da pós-graduação, obrigada por sua amizade.

À minha amiga, Victória, pelos momentos que passamos juntas no laboratório desde aquele dia chuvoso que nos conhecemos por acaso.

Aos amigos que conheci, também através da pós-graduação, Samella e Daniel, como foram bons os momentos que passamos juntos conversando sobre a vida.

Aos meus colegas que tanto me ajudaram: Diego (que enquanto ele sintetizava eu estava loucamente fazendo os ensaios biológicos idealizados pelo professor Adriano); Bruno (por estar sempre disposto a ajudar, obrigada pelos ensaios de genotoxicidade).

Aos meus alunos de iniciação científica, que me acompanharam e fizeram meus dias mais alegres, renovando em mim o propósito de finalizar este doutorado. Gleice, Érika e Rafael.

Ao pessoal do laboratório de parasitologia humana que me acolheu desde a época do mestrado, obrigada pelos momentos que passamos juntos, Natália, Aline, Ju, Wagner, Professoras Alessandra e Eliane.

À professora Thalita que na sua imensa atenção, me ajudou muito nesta caminhada. Obrigada pela parceria e compartilhamento de conhecimento.

À professora Alda, por toda a ajuda, parceria e momentos de descontração.

Ao Grupo de pesquisa da Universidade da Grande Dourados por realizar em parceria os ensaios de mutagenicidade dos compostos.

Obrigada aos professores Giselle Bulhões Portapilla e Davi Campos que aceitaram o nosso convite para participar da banca de qualificação como avaliadores deste trabalho.

Minha gratidão às professoras Maiara Voltarelli Providello, Kelly Mari Pires de Oliveira, Nídia Cristiane Yoshida e Thalita Bachelli Riul que aceitaram o nosso convite para participar da banca de defesa como avaliadoras deste trabalho.

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sempre foi um sonho estudar nesta Universidade.

Aos órgãos de fomento pelo financiamento deste trabalho, Capes, CNPq, Fundect, PPSUS.

A todos que colaboraram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Epígrafe

“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância”.

Simone de Beauvoir

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, consideradas uma ameaça às populações em vulnerabilidade e em áreas endêmicas, como ocorre no Brasil. Os efeitos adversos, toxicidades e também resistência dos parasitos, são fatores que limitam a utilização dos fármacos antileishmaniais disponíveis para o tratamento como o antimoniato de *N*-metil glucamina e a anfotericina B. Neste contexto é ressaltada a importância de estudos que busquem identificar novos candidatos a fármacos, com a capacidade de fornecer um melhor tratamento aos acometidos por essa doença. As neolignanas tetrahidrofurânicas são estudadas em relação a suas diversas atividades biológicas incluindo o seu potencial antileishmania. Este trabalho traz análogos sintéticos inspirados no *scaffold* das neolignanas veraguensina, grandisina e machilina G que foram planejados e sintetizados utilizando estratégias de modificação molecular como a hibridização estrutural e obioisosterismo. Em acordo aos estudos prévios do nosso grupo de pesquisa com resultados antileishmania promissores *in vitro*, planejamos a investigação da atividade *in vivo* desta classe de compostos em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, por meio de tratamento intralesional. Foram realizadas análises de carga parasitária através da técnica de diluição limitante e também o acompanhamento da cinética da lesão durante o tratamento. Além do mais propomos análises *in silico* dos parâmetros de toxicidade, e também a investigação da mutagenicidade (teste de Ames) dos compostos que apresentaram efeito terapêutico *in vivo*. Outro segmento deste mesmo trabalho foi o estudo pré-clínico *in vitro* e *in vivo* de análogos isoxazólicos clorados, bem como os estudos *in silico* e de mutagenicidade. Desta forma o trabalho traz resultados importantes com dois compostos derivados das neolignanas tetrahidrofurânicas estudadas, um híbrido ente a veraguensina e a grandisina, e o outro um híbrido clorado entre a grandisina e machilina G, significativamente eficazes no tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, comparados ao grupo controle, assim como o grupo tratado com o fármaco de referência, o Glucantime. Desta forma, estes derivados isoxazólicos das neolignanas tetrahidrofurânicas podem ser uma alternativa promissora ao tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: *Leishmaniose cutânea; núcleo isoxazol; efeito terapêutico in vivo; tratamento intralesional; modelo murino*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of neglected diseases caused by *Trypanosomatidae* parasites belonging to the *Leishmania* genus and a health threat to vulnerable populations in endemic areas, such as Brazil. Adverse effects, toxicity, and parasite resistance limit the available antileishmanial treatment. In this context, searching for new drug candidates is relevant, providing improved treatment possibilities to individuals with this disease. Tetrahydrofuran neolignans present several biological activities, including its antileishmanial potential. This work aims to study synthetic isoxazole analogs inspired by the scaffold of neolignans veraguensin, grandisin, and machilin G and designed with molecular modification strategies such as hybridization and bioisosterism. Thus, to continue the *in vitro* study previously concluded with relevant results, we planned to investigate the *in vivo* antileishmanial activity with a murine model experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by intralesional treatment. Also, we were interested in analyzing the parasite load by the limiting dilution technique as the kinetics of lesions during the treatment. Hence, we proposed to perform the *in silico* toxicity parameters of the analogs and to evaluate the mutagenicity potential (Ames test) of the analogs with therapeutic effect *in vivo*. Another segment of this work was to perform a preclinical *in vitro* and *in vivo* study of chlorine-isoxazole analogs as further *in silico* assessment and mutagenicity evaluation. Hence this work provides a relevant milestone in searching for new drug candidates once two analogs, a hybrid between veraguensin and grandisin, and a chlorine derivative of grandisin and machilin G, showed significant therapeutic effect after the intralesional treatment of BALB/ c mice infected with *L. amazonensis* compared to the control group. Furthermore, there was a non-significative difference between the groups treated with isoxazole derivatives and Glucantime. These findings suggest that isoxazole-neolignan analogs might be promising alternatives to treat cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Cutaneous leishmaniasis; isoxazole core; in vivo therapeutic effect; intralesional treatment; murine model*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1. Situação de vulnerabilidade e risco de infecção por DTNs.	23
Figura 2. Prevalência de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) por países, expresso em número de DTNs (valores variando de 1 a 7 ou mais).	24
Figura 3. Arte em cerâmica, “huaco mochica”, com lesões ulceradas na face e mucosas, sugerindo um caso de leishmaniose mucocutânea.	27
Figura 4. A) Gravura ilustrando caso de leishmaniose tegumentar americana, LTA, (1884); B) Imagem em aquarela ilustrando um caso de LTA, (1906).	28
Figura 5. Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> (Adaptado de OPAS, 2021).	32
Figura 6. Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i> . (A) formas promastigotas coradas pelo método de Giemsa; (B) Macrófago com três formas amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo.	34
Figura 7. Representação ultraestrutural da forma promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp.	35
Figura 8. Fêmea adulta de <i>Lutzomyia</i> spp. ingerindo sangue sobre a pele humana.	37
Figura 9. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. nas Américas.	39
Figura 10. Lesão característica de leishmaniose cutânea.	41
Figura 11. Lesões características de leishmaniose cutânea disseminada.	42
Figura 12. Lesões característica de leishmaniose cutânea difusa.	43
Figura 13. Lesões característica de leishmaniose mucocutânea.	44
Figura 14. Leishmaniose visceral.	45
Figura 15. Número de casos de LC no mundo, em 2019.	46
Figura 16. Número de casos notificados de LV no mundo, em 2020.	47
Figura 17. (A) Casos de leishmaniose cutânea e mucosa e de (B) leishmaniose visceral na região das Américas em 2021.	48
Figura 18. Distribuição espacial de casos confirmados de leishmaniose visceral no Estado do Mato Grosso do Sul.	49
Figura 19. Estrutura química do antimoniatto de <i>N</i> -metilglucamina.	50
Figura 20. Estrutura química da Anfotericina B.	53
Figura 21. Estrutura química da pentamidina.	54
Figura 22. Estrutura química da paromomicina.	55
Figura 23. Estrutura química da miltefosina.	56
Figura 24. Abordagem fenotípica na investigação antileishmania de compostos bioativos.	62
Figura 25. Estratégias de modificação molecular, bioisosterismo e hibridização no planejamento de derivados das neolignananas tetrahidrofurânicas de interesse (Veraguensina, Grandisina e Machilina G).	64
Figura 26. Estrutura privilegiada das neolignananas tetrahidrofurânicas Veraguensina, Grandisina e Machilina G.	66
Figura 27. Fármacos disponíveis no mercado farmacêutico contendo o núcleo isoxazol na estrutura química.	67
Figura 28. Núcleo isoxazol como estrutura privilegiada na química medicinal.	68

Figura 29. Planejamento estrutural de novos análogos isoxazóis clorados.	69
--	-----------

INFOGRÁFICO

Infográfico 1. Processo de <i>drug design</i>	60
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies de <i>Leishmania</i> identificadas em humanos nas Américas.	32
Tabela 2. Principais espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pelas leishmanioses no Brasil.	33
Tabela 3. Resumo dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, mecanismos de ação principais, vantagens e desvantagens.	57
Tabela 4. Principais protocolos de tratamento descritos pela OPAS para a leishmaniose tegumentar/cutânea, a manifestação clínica de interesse do trabalho.	58
Tabela 5. Regra dos cinco de Lipinski.	65
Tabela 6. Resumo dos protocolos experimentais com as formas promastigotas e amastigotas de <i>L.</i> <i>amazonensis</i>	70
Tabela 7. Trabalhos contendo ensaios antileishmania <i>in vivo</i> em modelo murino experimental.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQP1: aquagliceroporina
ATP: adenosina trifosfato
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTNs: doenças tropicais negligenciadas
ECG: eletrocardiograma
EROs: espécies reativas de oxigênio
GTP: guanosina trifosfato
HIV/AIDS: vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida
IFN- γ : citocina interferon gama
IM: administração intramuscular
IV: administração intravenosa
kDNA: DNA do cinetoplasto
LC: leishmaniose cutânea
LCD: leishmaniose cutânea difusa
LCDs: leishmaniose cutânea disseminada
LCL: leishmaniose cutânea localizada
LCM: leishmaniose cutânea mucosa
LMC: leishmaniose mucocutânea
LT/LC: leishmaniose tegumentar/ leishmaniose cutânea
LV: leishmaniose visceral
MS: Mato Grosso do Sul
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde
PNs: produtos de origem natural
REA: relação-estrutura atividade
RNA: ácido ribonucleico
TCD4+: linfócitos
TGI: trato gastrointestinal
TR: tripanotona redutase
SUS: Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2	OBJETIVO	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA/FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	23
4	HISTÓRICO DAS LEISHMANIOSES	25
4.1	A DESCOBERTA DE UMA NOVA DOENÇA	25
4.2	LEISHMANIOSES NO CONTINENTE AMERICANO	27
4.3	A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL	29
4.4	LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL: MAIS UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA	30
5	AGENTE ETIOLÓGICO	31
6	BIOLOGIA CELULAR DA <i>LEISHMANIA</i>	33
7	O INSETO VETOR	36
8	ANIMAIS RESERVATÓRIOS	37
9	CICLO BIOLÓGICO	38
10	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES	40
10.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR OU CUTÂNEA (LT/LC)	40
10.2	LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA (LCL)	40
10.3	LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA (LCDs)	41
10.4	LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)	42
10.5	LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA/MUCOSA (LMC)	43
10.6	LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)	44
11	EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	45
12	FÁRMACOS	49
12.1	ANTIMONIAIS	49
	<i>Antimoniais trivalentes: o primeiro tratamento das leishmanioses</i>	49
	<i>Antimoniais pentavalentes</i>	50
12.2	O QUE É O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS?	52
12.3	ANFOTERICINA B	52
12.4	PENTAMIDINA	54
12.5	PAROMOMICINA	55
12.6	MILTEFOSINA	56
13	NOVA GERAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA LEISHMANIOSES	59
14	DRUG DISCOVERY: A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTILEISHMANIA	59
14.1	ABORDAGEM FENOTÍPICA	61
14.2	ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR	63
14.3	A REGRA DOS CINCO: <i>DRUG-LIKE</i>	64
14.4	ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS NO PLANEJAMENTO DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA	65
	<i>Produtos de origem natural</i>	65
	<i>Núcleo heterocíclico e isoxazol</i>	66
15	BRIEFING DO TRABALHO: PLANEJAMENTO DOS ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS DE INTERESSE E SUA APLICAÇÃO	68
16	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	69
16.1	ASPECTOS RELEVANTES DO MODELO <i>IN VITRO</i>	70
16.2	CICLO BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	71
16.3	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM MODELO <i>IN VIVO</i>	72

16.4	MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO <i>IN VIVO</i>	72
16.5	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	73
16.6	LIMITAÇÕES DO ENSAIO <i>IN VIVO</i> PARA LC EXPERIMENTAL	73
CONSIDERAÇÕES		77
REFERÊNCIAS		77
ANEXO: CERTIFICADO CEUA (COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL)		93
CAPÍTULO 2: ARTIGO 1		94
CAPÍTULO 3: ARTIGO 2		95

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA



1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública por impactar as populações acometidas no âmbito social, psicológico e econômico. Os poucos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam limitações devido aos efeitos adversos, toxicidade e resistência dos parasitos (WHO, 2022).

O planejamento e o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com atividade antileishmania é uma área de pesquisa relevante, pois tem como objetivo impactar positivamente os acometidos pelas diferentes formas clínicas das leishmanioses (DNDI, 2022a). Entre as manifestações clínicas a leishmaniose cutânea é de nosso interesse, por estar amplamente presente no Brasil (BRASIL, 2017).

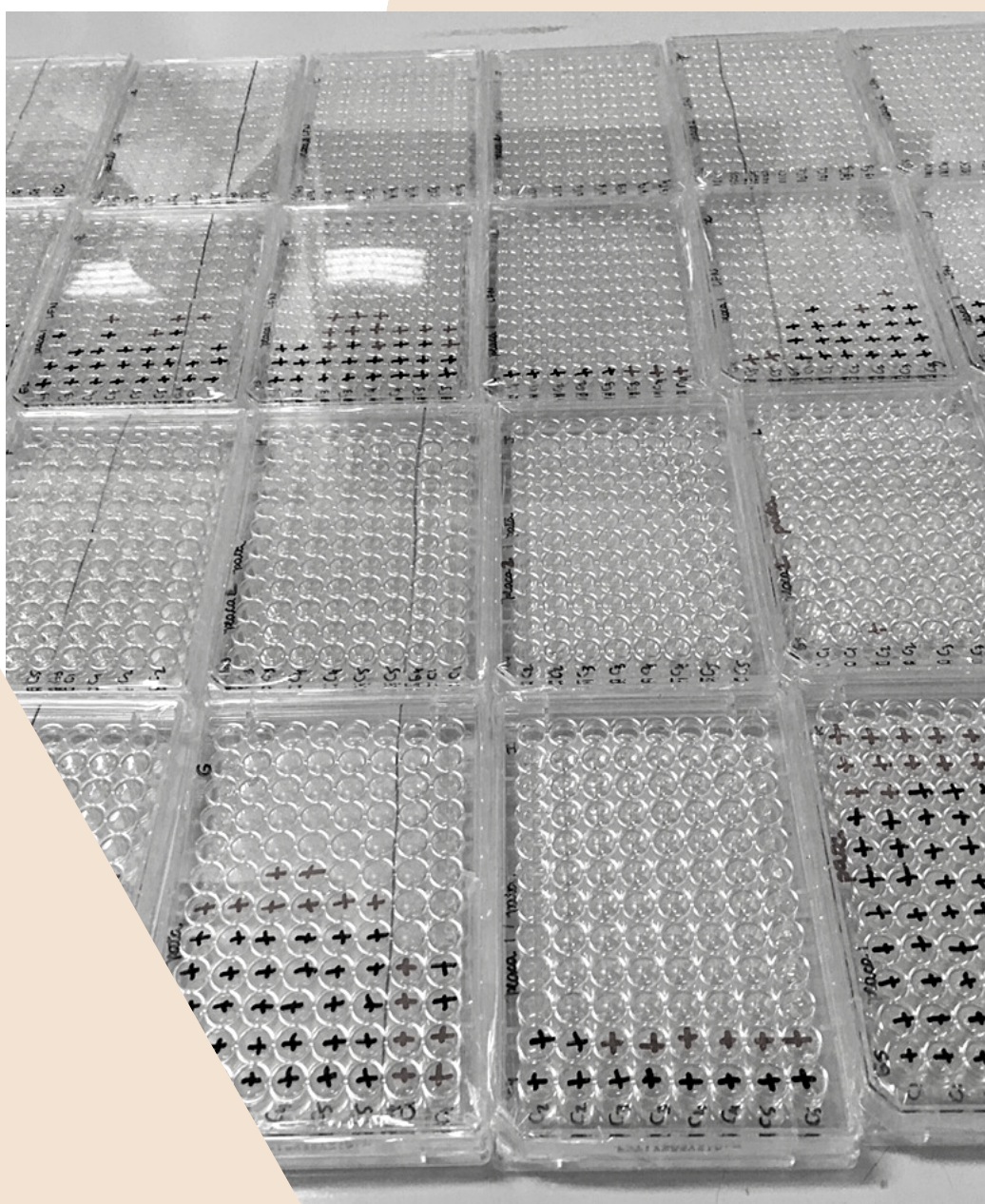
A química medicinal utiliza estratégias de modificação molecular como o bioisosterismo e hibridização para a obtenção de uma biblioteca de compostos possibilitando a realização de estudos de relação-estrutura atividade (REA) como uma das formas de interpretar os dados das atividades biológicas investigadas (GILBERT, 2013; IVASIV *et al.*, 2019; JAYASHREE; NIKHIL; PAUL, 2022; MOFFAT *et al.*, 2017). Neste contexto, a abordagem fenotípica permite a obtenção de resultados em ensaios biológicos de forma concomitante a síntese de compostos.

Os ensaios *in vitro* permitem obter informações preliminares de atividade biológica sobre o parasito ou célula alvo, sendo o ensaio com formas amastigotas de *Leishmania* spp. internalizadas por macrófagos o padrão ouro de resposta antileishmania. A próxima etapa entre os estudos pré-clínicos é a avaliação do efeito terapêutico em modelo animal com leishmaniose induzida experimentalmente, neste caso a forma cutânea (CROFT, 2017; LAMOTTE *et al.*, 2017; MEARS *et al.*, 2015).

Desta forma, é fundamental a busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento das leishmanioses visando a obtenção de compostos com maior seletividade e menor toxicidade. Esse processo possibilita até a inclusão de análogos em estudos pré-clínicos mais específicos, como por exemplo, aqueles que envolvem estudos da farmacocinética e toxicidade, e consequentemente, possibilitem o avanço no processo de desenvolvimento de um novo fármaco.

2023

OBJETIVOS



AMARITH RODRIGUES DAS NEVES

2 OBJETIVO

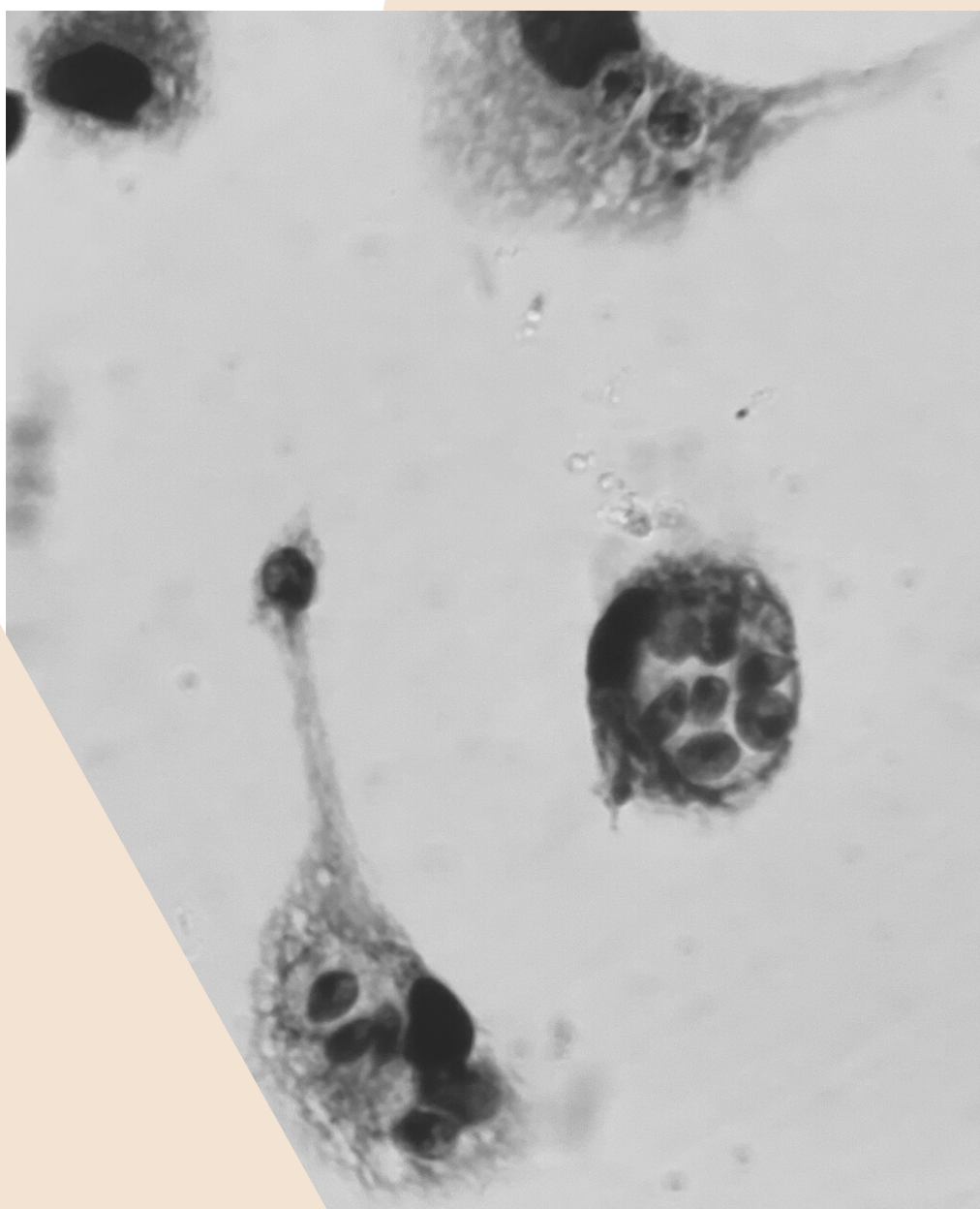
Este trabalho tem como objetivo a avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* de análogos isoxazólicos clorados e a atividade *in vivo* de análogos isoxazólicos derivados das neolignanas tetrahidrofurânicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ☐ Investigar a atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* dos análogos isoxazólicos clorados derivados das neolignanas;
- ☐ Investigar a atividade antileishmania *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* dos análogos isoxazólicos clorados derivados das neolignanas;
- ☐ Realizar o ensaio de citotoxicidade com macrófagos peritoneais, com os análogos clorados, de forma a calcular a concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) das células;
- ☐ Avaliar o efeito terapêutico *in vivo*, em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. amazonensis*, por meio de tratamento intralesional, do análogo isoxazólico clorado mais ativo *in vitro*;
- ☐ Avaliar o efeito terapêutico *in vivo*, em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. amazonensis*, por meio de tratamento intralesional, dos análogos isoxazólicos que apresentaram atividade *in vitro* comprovada anteriormente;
- ☐ Avaliar a carga parasitária no tecido infectado, pata e linfonodo poplíteo drenante após o término do tratamento intralesional através da metodologia de diluição limitante;
- ☐ Acompanhar a cinética das lesões por meio da medida semanal das patas dos animais pertencentes a cada grupo de tratamento;
- ☐ Investigar a mutagenicidade dos análogos mais ativos utilizados nos ensaios *in vivo* por meio do teste de Ames;
- ☐ Realizar a previsão *in silico* dos parâmetros de toxicidade dos análogos isoxazólicos de interesse.

2023

REVISÃO DE LITERATURA



AMARITH RODRIGUES DAS NEVES

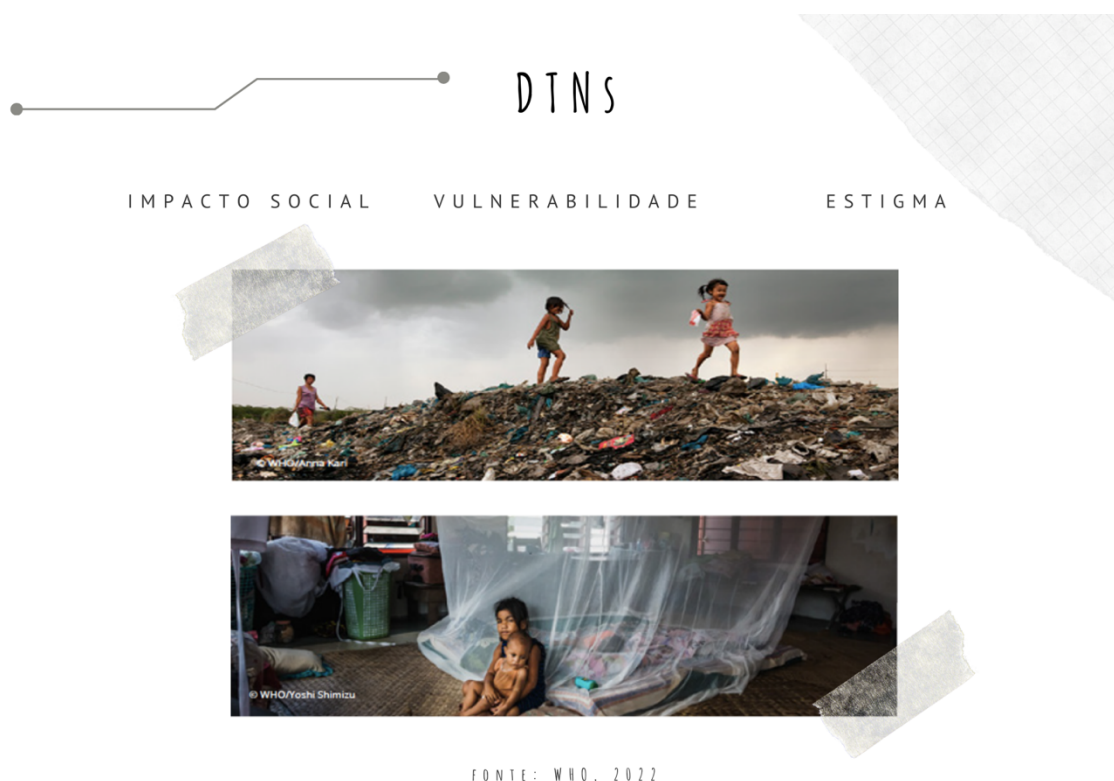
3 REVISÃO DA LITERATURA/FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) acometem aproximadamente 1 bilhão de pessoas anualmente. Estimativas indicam que aproximadamente 10% da população mundial (700 milhões de pessoas) vivencie condições de extrema pobreza, sem acesso às necessidades básicas de saúde, educação, acesso a água e higiene sanitária (Figura, 1 e 2) (UN, 2020; WHO, 2021).

Os impactos sociais, econômicos e nos sistemas de saúde apresentam relação direta com a situação de vulnerabilidade da população acometida, pois muitas vezes mais de uma doença negligenciada é adquirida simultaneamente (Figura 1), (WHO, 2021). Aspectos inerentes as DTNs como o estigma, discriminação, incapacidades físicas, desnutrição entre outros limitam a possibilidade de uma vida produtiva, impactando na renda familiar dos indivíduos acometidos (MITRA; MAWSON, 2017; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017).

Figura 1. Situação de vulnerabilidade e risco de infecção por DTNs.

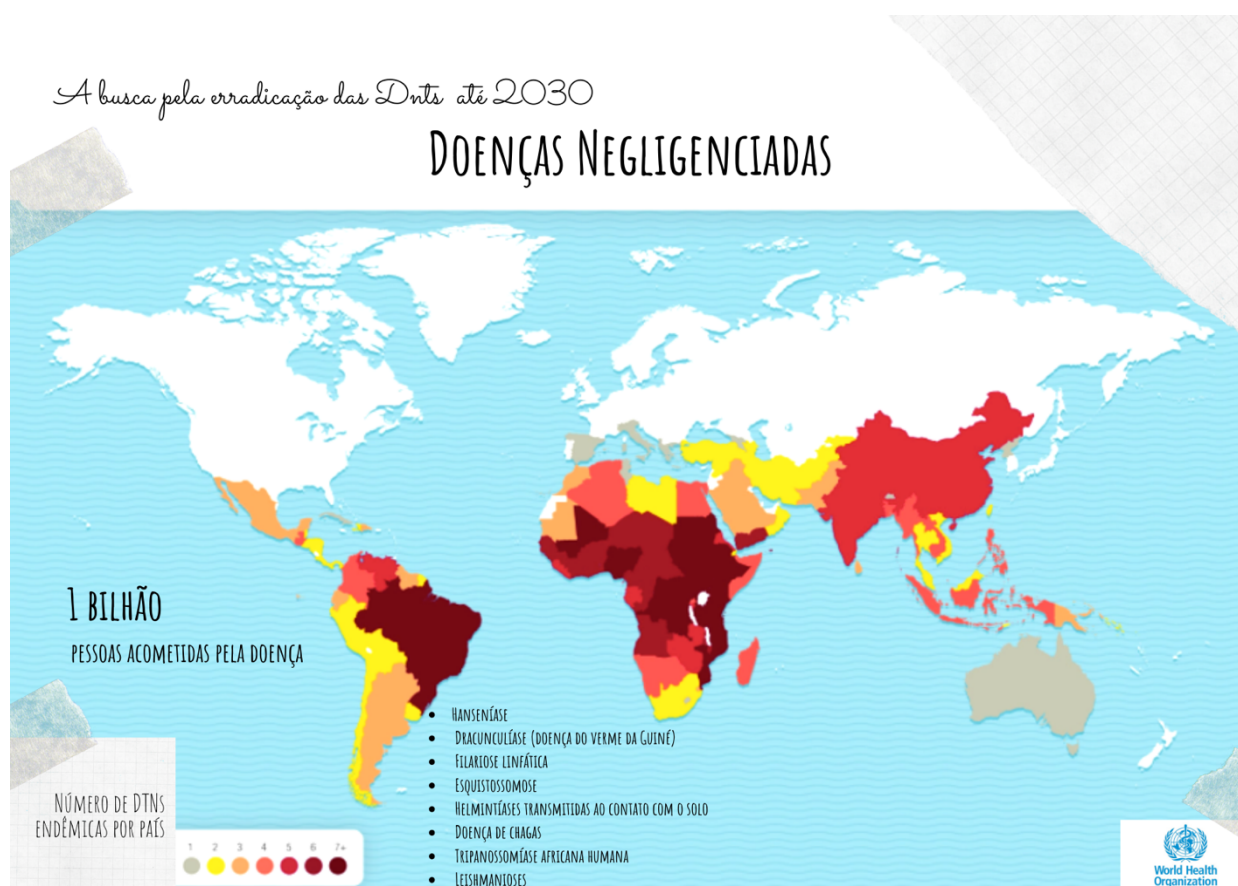


Fonte: Autora; imagens WHO, 2022.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são consideradas DTNs: a dengue e Chikungunya; raiva; tracoma; úlcera de Buruli; treponematose endêmica (Bouba); hanseníase;

cisticercose; dracunculíase (doença do verme da Guiné); equinococose; micoses profundas como micetoma e cromoblastomicose; infecções por trematódeos de origem alimentar; sarna e outras ectoparasitoses; filariose linfática; oncocercose; esquistossomose; helmintíases transmitidas pelo solo; envenenamento por animal peçonhento (cobra/serpente); doença de chagas; tripanossomíase africana humana (doença do sono) e as leishmanioses (WHO, 2021).

Figura 2. Prevalência de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) por países, expresso em número de DTNs (valores variando de 1 a 7 ou mais).



Fonte: Adaptado de Uniting to combat Neglected Tropical Diseases, Acesso em: 09/03/22

A busca por soluções como o controle e/ou erradicação das doenças nas comunidades é fundamental no processo de melhoria de qualidade de vida, da economia e do desenvolvimento local. Com esta finalidade existe a necessidade de estabelecimento de parcerias entre as universidades e grupos de pesquisa com indústrias farmacêuticas e programas de financiamento. No entanto, as doenças negligenciadas não despertam os interesses de parceiros, para investimentos em pesquisas, devido principalmente ao baixo retorno financeiro relacionado e dificuldade socioeconômica da população alvo (WHO, 2012, 2021).

A melhoria da qualidade de vida dos acometidos envolve aspectos básicos como acesso a água tratada, melhores condições sanitárias e de higiene; a aspectos mais complexos como o

controle dos vetores e acesso aos medicamentos disponíveis (HOTEZ, 2007; MACKEY *et al.*, 2014; WHO, 2021).

Entre as doenças negligenciadas destaco as leishmanioses como objeto de interesse neste estudo, que são consideradas endêmicas no Brasil (ANVERSA *et al.*, 2018; HOTEZ; FUJIWARA, 2014; OPAS, 2019; WHO, 2022). Apesar dos progressos obtidos em relação ao controle de algumas DTNs, os desafios ainda permanecem em evidência, principalmente quando tratamos de doenças mais complexas como as leishmanioses, sendo fundamental o acesso ao diagnóstico precoce e a tratamentos mais eficazes.

4 HISTÓRICO DAS LEISHMANIOSES

4.1 A DESCOBERTA DE UMA NOVA DOENÇA

A migração europeia para regiões tropicais, na segunda metade do século XIX, apresentou como consequência um aumento de relatos na literatura sobre as doenças endêmicas destes locais (KILLICK-KENDRICK, 2010). Com isso, o termo “doenças tropicais” foi utilizado para descrever as doenças com prevalência em países tropicais, porém não exclusivas a estas regiões (MASON, 1898).

Entre as doenças endêmicas, eram frequentes aquelas que apresentavam úlceras cutâneas, que passaram a ser nomeadas de acordo com a região geográfica em que eram encontradas ou em relação ao seu curso clínico como por exemplo, botão do oriente, botão de Aleppo, Mila, Creta ou Biskra, ferida de um ano entre outros (KILLICK-KENDRICK, 2010; MASON, 1898).

Botão do oriente foi um termo precursor, amplamente conhecido entre os viajantes da época (antes de 1906), denominado o *souvenir* (lembrança de viagem) daqueles que se aventuravam para as regiões tropicais, sendo considerada misteriosa a causa das lesões adquiridas em partes do corpo que estavam descobertas (BOUQUET, 1887; DUTTA, 2008, 2009; JOGAS JUNIOR, 2017a, 2017b).

A predominância demográfica de casos de botão do oriente ocorria principalmente em regiões do norte da África; países do Oriente Médio; e ainda na América do Sul (MASON, 1898). No Brasil, o primeiro caso clínico da doença ocorreu na Bahia em 1895, evidenciando a não exclusividade da doença ao oriente. (MOREIRA, 1895).

Na Índia, além da preocupação com doenças como a malária e o botão do oriente, ainda existia a “calazar”, que apresentava sintomas como febre, anemia, aumento do baço, emagrecimento em caso mais avançados e mudança na coloração da pele (escurecimento) (GIBSON, 1983).

Nos Estados Unidos, James H. Wright ao atender uma criança de 9 anos da Armênia, identificou pela primeira vez nas Américas, por meio da análise do raspado de lesão cutânea, um caso de “úlceras de Alepo ou tropical” (WRIGHT, 1903). Através de análise microscópica, identificou características inerentes aos protozoários e ao acreditar que se tratava de um novo parasito denominou o parasito de *Helcosoma tropicum* (WRIGHT, 1903).

Willian B. Leishman (1903), encontrou um parasito desconhecido na autopsia do baço de um paciente, que descreveu como sendo “formas mortas e degeneradas de tripanossomas” (LEISHMAN, 1903). Neste mesmo período, Charles Donovan também encontrou um parasito desconhecido na biópsia de uma paciente, com febre e aumento de baço. Após enviar a amostra para Leishman, o mesmo confirmou que tanto o parasito identificado por ele anteriormente quanto o de Donovan tratavam-se do mesmo patógeno. A descoberta possibilitou a denominação de um novo gênero de protozoário o *Leishmania donovani* (DONOVAN, 1903; LEISHMAN, 1903; ROSS, 1903).

Donovan (1904) encontrou o mesmo parasito na circulação sanguínea periférica e nos órgãos internos de um paciente com calazar, durante um acesso de febre alta. Esta descoberta possibilitou a realização de diagnósticos semelhantes em outras regiões endêmicas da doença. Desta forma, os estudos de Leishman e Donovan foram reconhecidos nos principais centros de referência de saúde da Europa, e o agente da calazar passou a ser atribuído ao protozoário *Leishmania donovani* (GIBSON, 1983).

O botão do oriente (forma cutânea, com cura espontânea e de baixa letalidade) e o calazar (forma visceral, grave, com óbitos frequentes) eram consideradas inicialmente como doenças distintas (JOGAS JUNIOR, 2017a). Max Luhe, parasitologista alemão, sugeriu renomear o parasito responsável pelo botão do oriente (*Helcosoma tropica*) para *Leishmania tropica* de forma a contribuir para a unificação das manifestações da doença em um grupo (BENCHIMOL, 2019). Finalmente, os estudos aprofundados sobre a morfologia do protozoário permitiram a denominação das leishmanioses como um grupo de doenças.

Mesmo com a nova denominação para as leishmanioses, ainda existiam muitas dúvidas e questionamentos sobre a doença: como protozoários morfologicamente idênticos causavam doenças diferentes? Existia um hospedeiro intermediário? Qual seria a relação entre o ambiente e as manifestações da doença? (JOGAS-JUNIOR, 2019). Desta forma, diante de tantas perguntas, as leishmanioses passaram a ser um tópico de pesquisa frequente na área de medicina tropical.

4.2 LEISHMANIOSES NO CONTINENTE AMERICANO

No continente americano a população era frequentemente acometida por doenças capazes de causar lesões na pele, porém a sua compreensão era limitada e incerta. Estudos antropológicos do período pré-colombiano demonstraram que povos incas, situados em diversas regiões do Peru costumavam retratar figuras humanas com lesões na face e mucosas através de desenhos e esculturas de cerâmica (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003). Estes dados permitiram a compreensão de que muitos destes povos foram dizimados por uma doença que hoje sabemos ser a leishmaniose (Figura 3).

Figura 3. Arte em cerâmica, “huaco mochica”, com lesões ulceradas na face e mucosas, sugerindo um caso de leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Adaptado pela autora de (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003).

A intensa publicação científica de casos clínicos e diagnóstico parasitológico de casos de leishmanioses no continente latino-americano, entre 1910 e 1913, colaborou com o enriquecimento desta área de pesquisa (DARLING, 1910; FLU, 1911; MONGE, 1913; SEIDELIN, 1912; STRONG *et al.*, 1913; VELEZ LOPES, 1913). Além das particularidades em relação as manifestações cutâneas e mucosas existia uma relação entre a presença de casos predominantemente em áreas com florestas, o que a diferenciava do que ocorria no Oriente, no Velho Mundo (BENCHIMOL, 2019).

Nas Guianas (1909), um caso de úlcera mucosa chamou a atenção dos pesquisadores, sendo o paciente diagnosticado com uma manifestação diferenciada de leishmaniose (NATTAN-LARRIER; TOUIN ET HECKENROTH, 1909).

Edmundo Escomel era um estudioso da área de medicina tropical que descreveu diversos casos de uma doença crônica, muito comum em locais quentes e úmidos, com formação de úlceras granulosas na pele, nomeando-a de “*La espundia*” (ESCOMEL, 1911). Em contribuição ao estudo de Escomel, surgiu a hipótese de se tratar de *L. tropica*, após a análise parasitológica de um fragmento da mucosa do paciente crônico de espundia. Após novas análises, foi publicado um novo estudo confirmando o diagnóstico do artigo anterior, como leishmaniose, sugerindo a denominação de *L. tropica var americana*, como o parasito responsável pela leishmaniose tegumentar americana (LTA), figura 4 (LAVERAN; NATTAN-LARRIER, 1912).

Figura 4. A) Gravura ilustrando caso de leishmaniose tegumentar americana, LTA, (1884); B) Imagem em aquarela ilustrando um caso de LTA, (1906).



Fonte: Adaptado pela autora de (VALE; FURTADO, 2005).

Na América Latina, devido as descobertas e estudos envolvendo as particularidades da doença (graves lesões mucosas e a ausência de cura espontânea), existia o interesse por parte dos pesquisadores em considerar como mais uma modalidade de leishmaniose. No entanto esta discussão dividia opiniões, principalmente considerando que o parasito apresentava a mesma morfologia presente no botão do oriente e também da calazar (CARINI, 1911; SPLENDORE, 1911).

As leishmanioses tornaram-se uma nova área de estudo aos pesquisadores latino-americanos, pois havia muito a ser investigado e discutido, uma vez que as manifestações clínicas presentes eram diferentes quando comparadas as encontradas na África e Ásia.

4.3 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

A primeira observação clínica da leishmaniose tegumentar foi realizada em 1895, sendo denominada de “botão da Bahia” devido a sua semelhança ao “botão do oriente” descrito nos casos de leishmaniose tegumentar em países do Velho Mundo, como a Índia (DUTTA, 2008, 2009; JOGAS JUNIOR, 2017a, 2017b).

O interesse em desenvolver pesquisas sobre as leishmanioses no Brasil ocorreu após 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, ferrovia que ligaria o porto de Santos, na região sudeste à capital do Estado de Mato Grosso, Cuiabá, no Centro-Oeste brasileiro (BENCHIMOL, 2019; JOGAS-JUNIOR, 2019). Neste período houve um surto de “úlcera de Bauru”, manifestação mucocutânea da leishmaniose tegumentar, em trabalhadores localizados na área de mata virgem próximo a cidade de Bauru no interior de São Paulo (CARINI, 1911; LINDENBERG, 1909b, 1909a).

O primeiro diagnóstico parasitológico do protozoário *Leishmania* no Brasil foi de grande importância, pois até o momento existia apenas o registro de Wright (1903) com uma paciente emigrante da armênia. O protozoário foi isolado de úlceras cutâneas e mucosas, sendo identificado e descrito como o agente etiológico da doença (CARINI, 1911; LINDENBERG, 1909b, 1909a).

Gaspar de Oliveira Vianna realizou a correlação entre a manifestação de lesões na pele e a presença do protozoário do gênero *Leishmania* estabelecendo o nome *Leishmania (Vianna) braziliensis*, diferenciando-a das espécies de leishmanias descritas no Velho Mundo (VIANNA, 1911).

A presença do parasito nas lesões cutâneas foi descrita em 1910, sendo este achado adicionado ao quadro clínico da doença (DA MATTA, 1910; RAO, 1910). A forma mucosa da doença foi diagnosticada em 1911, por Splendore. A identificação de parasitos do gênero *Leishmania* nas úlceras mucosas, foi de extrema relevância possibilitando a análise das lesões possivelmente causadas por leishmanioses em outras áreas do continente (RABELLO, 1925).

Inspirado em estudos sobre o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos, como a doença de Chagas e as leishmanioses, Gaspar Vianna decide realizar um tratamento farmacológico experimental com o tártaro emético, composto derivado do antimônio. Sabendo

de sua elevada toxicidade, o mesmo foi substituído pela forma pentavalente do antimonial, considerada menos tóxica, que ainda continua sendo utilizada como fármaco no tratamento das leishmanioses (VIANNA, 1912).

4.4 LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL: MAIS UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A partir da década de 1930, a leishmaniose visceral (LV) começou a ser considerada um problema de saúde pública no Brasil. A parceria com o Serviço de Febre Amarela permitiu a identificação, por análise microscópica, a presença de protozoários do gênero *Leishmania* em amostras de tecido hepático de pacientes, trazendo uma nova perspectiva sobre a doença em nosso país (CHAGAS, 1936; CHAGAS *et al.*, 1937).

O primeiro diagnóstico de LV ocorreu em 1936, sendo levantadas algumas hipóteses da diferença entre as cepas de *Leishmania* presentes no Brasil, *L. donovani* no Oriente e *L. infantum* no mediterrâneo, bem como outras particularidades como a área de incidência, presença de animais reservatórios e grupo populacional mais acometido (CHAGAS, 1936; CHAGAS *et al.*, 1937; DEANE, 1986; GUALANDI, 2013). Diante disso, Carlos Chagas propôs uma denominação específica para a cepa presente no Brasil, responsável pelos casos de leishmaniose visceral, a *Leishmania chagasi* (CHAGAS, 1936).

O crescente número de casos e consequente necessidade de tratamento mobilizou os pesquisadores em buscar alternativas terapêuticas. Assim, Gaspar Vianna, em 1912, introduziu o uso de antimoniais trivalentes, também conhecido como tártaro emético, no tratamento das leishmanioses, apesar da toxicidade relacionada ao seu uso (VIANNA, 1912).

Na década de 1920, estudos sobre o papel dos flebotomíneos no ciclo biológico do protozoário possibilitaram a obtenção de informação sobre as principais espécies do parasito nas diferentes regiões do mundo. No Brasil, até aquele momento, as evidências estudadas indicavam a participação do *Phlebotomus intermedius* (*Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*) na transmissão da *Leishmania braziliensis* (ARAGAO, 1922).

A comunidade científica entrou em um consenso que os protozoários responsáveis pela leishmaniose visceral humana e canina, botão do oriente e leishmaniose tegumentar americana eram *L. donovani* (ROSS, 1903), *L. tropica* (WRIGHT, 1903) e *L. braziliensis* (VIANNA, 1911), respectivamente.

O surto de LV em 1953, no nordeste brasileiro, permitiu aos pesquisadores observarem que a doença estava presente tanto em áreas rurais como urbanas. Nas áreas urbanas a frequente

infecção de cães domésticos, era um agravante, pois colaborava para o aumento de casos por domicílio (DEANE; DEANE, 1954).

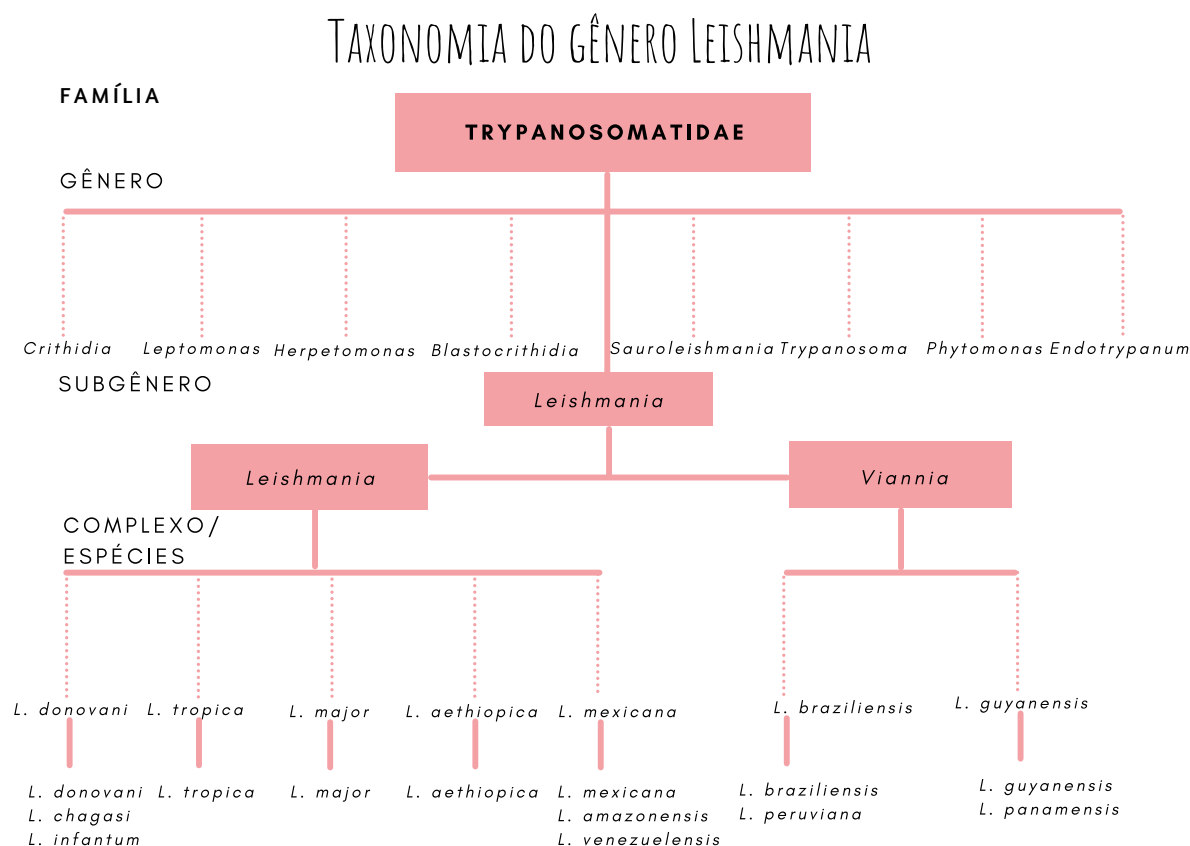
Neste período, como estratégia de controle dos flebotomíneos foi realizada a dedetização domiciliar. No entanto, a estratégia não foi eficaz, pois os animais domésticos eram acomodados em outros locais, como o quintal das casas (BENCHIMOL, 2019). Na região mediterrânea e na China os cães eram considerados como principais reservatórios. Enquanto na Índia os cães não eram infectados, sendo o homem seu principal reservatório (ADLER; THEODOR, 1957).

Outro aspecto levantado envolvia o hábito noturno dos insetos flebotomíneos (*P. longipalpis*) e ainda a presença de larvas e pupas em locais não exclusivamente aquáticos (BENCHIMOL, 2019). Com isso, era destacada a importância do estudo das espécies de vetores (*Phlebotomus*) comuns a cada região, possibilitando a obtenção de maiores informações sobre as características de longevidade, influência sazonal, hábitos alimentares entre outras (DEANE; DEANE, 1954).

A promessa de erradicação da leishmaniose no Brasil é discutida a muito tempo (BENCHIMOL, 2019). O que aconteceu nesta trajetória que nos afastou deste objetivo?

5 AGENTE ETIOLÓGICO

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. Aproximadamente 22 espécies do gênero *Leishmania* são consideradas patogênicas ao ser humano (OPAS, 2020b). Os avanços nas áreas de microscopia eletrônica, biologia molecular, bioquímica e imunologia colaboraram para a determinação de novas perspectivas na taxonomia do parasito (Figura 9).

Figura 5. Taxonomia do gênero *Leishmania* (Adaptado de OPAS, 2021).

Fonte: Adaptado pela autora de (OPAS, 2020b).

As espécies são categorizadas em relação à sua presença no Velho Mundo e Novo Mundo (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). No Novo Mundo, foram descritas aproximadamente 15 espécies com tropismos variando entre cutâneo, mucoso e visceral (Tabela 1), (OPAS, 2021a).

A diferença taxonômica tem relação com o local de desenvolvimento do parasito, nas espécies do subgênero *Leishmania* ocorre no intestino anterior e médio do inseto vetor, enquanto nas espécies do subgênero *Viannia* ocorre no intestino médio e grosso do flebotomíneo (BRASIL, 2017; LAISON; SHAW, 1987; WHO, 2022).

Tabela 1. Principais espécies de *Leishmania* identificadas em humanos nas Américas.

Tropismo	Visceral	Cutâneo	Cutâneo	Mucoso
Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
	<i>L. infantum</i> *	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. guyanensis</i>

<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>
	<i>L. naiffi</i>
	<i>L. lainsoni</i>
	<i>L. lindenbergi</i>
	<i>L. peruviana</i>
* <i>L. infantum</i> , sinônimo de <i>L. chagasi</i> no novo mundo (Adaptado de OPS, 2019). (OPAS, 2019)	

Tabela 2. Principais espécies de *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses no Brasil.

Leishmaniose tegumentar			
LCL ^a	LCDs ^b	LMC ^c	LCD ^d
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> *	
<i>L. (V.) guyanensis</i>		<i>L. (V.) guyanensis</i> *	
Leishmaniose visceral			
<i>L. (L.) infantum</i> ou <i>L. chagasi</i>			

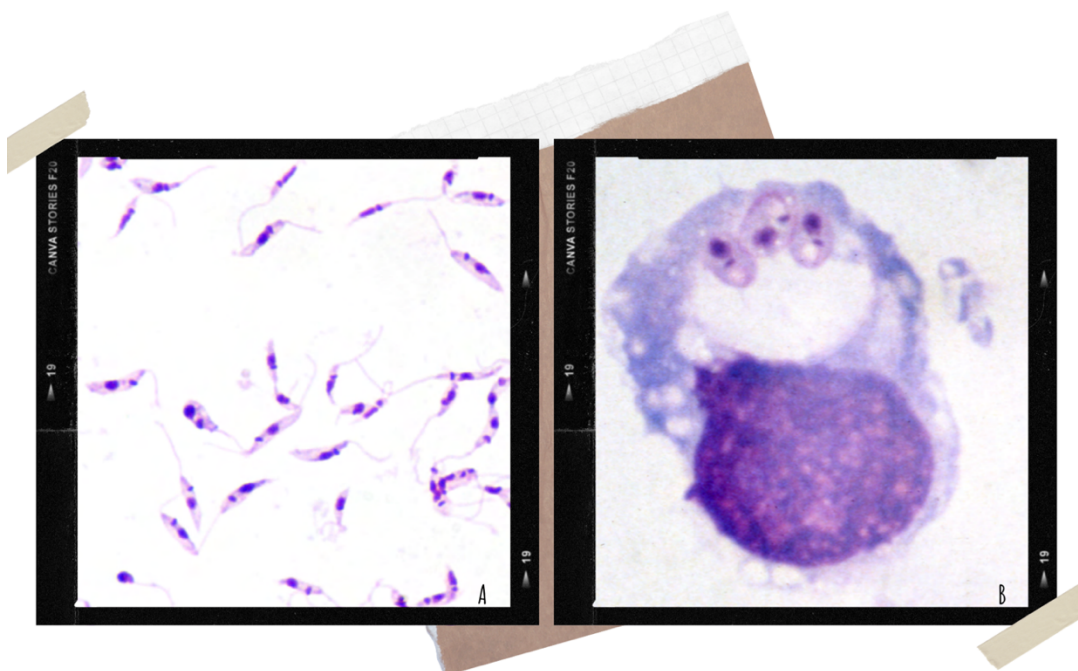
^aLCL: leishmaniose cutânea localizada; ^bLCDs: leishmaniose cutânea disseminada; ^cLMC: leishmaniose mucocutânea; ^dLCD: leishmaniose cutânea difusa. *espécies menos frequentes, adaptado de (ANVERSA *et al.*, 2018).

No Brasil as três principais espécies são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. A *Leishmania (L.) amazonensis* é responsável pela forma cutânea com lesões disseminadas e a forma anérgica, a leishmaniose cutânea difusa (LCD). A *Leishmania (L.) chagasi* ou *L. infantum* é a responsável pela LV americana, como descrito na tabela 2 (OPAS, 2019).

6 BIOLOGIA CELULAR DA *LEISHMANIA*

O protozoário apresenta duas formas evolutivas principais, as formas promastigotas (presentes no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, os flebotomíneos) e as formas amastigotas (intracelulares, no tecido dos hospedeiros vertebrados), Figura 11.

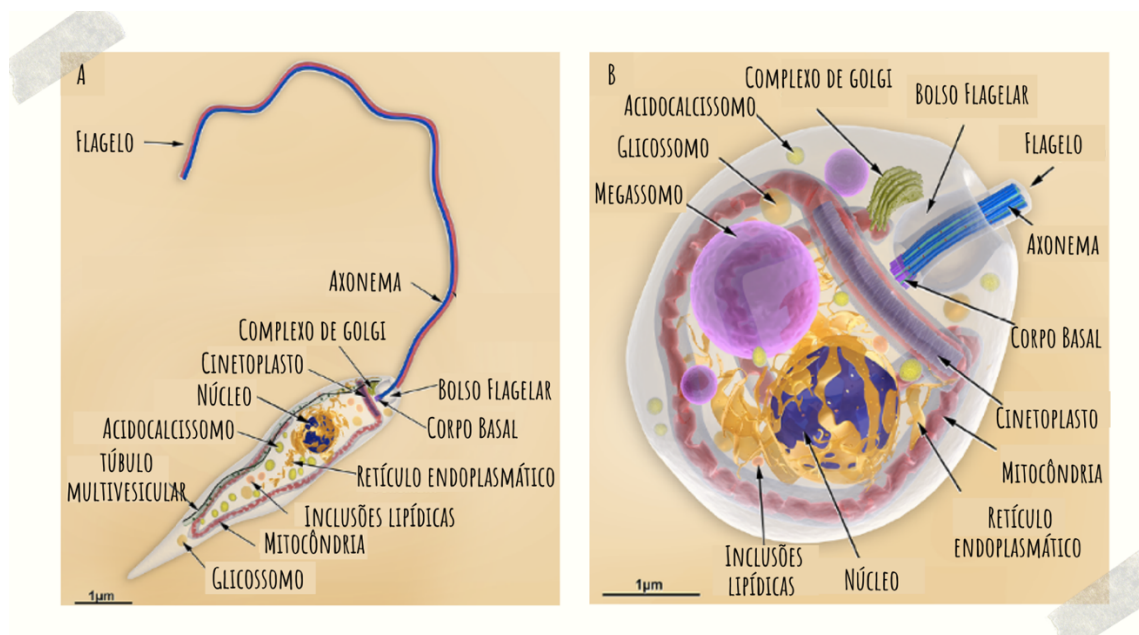
Figura 6. Formas evolutivas do gênero *Leishmania*. (A) formas promastigotas coradas pelo método de Giemsa; (B) Macrófago com três formas amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo.



Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

As formas promastigotas são alongadas, com extremidade posterior afilada apresentando flagelo na região anterior, sendo esta mais arredondada (Figura 12, A). O tamanho pode variar entre 16-20 μ m de comprimento e 1,5-3,0 μ m de largura. Enquanto as formas amastigotas são ovais ou esféricas, com tamanho variando entre 1,5-3,0 μ m e 3,0-6,5 μ m de diâmetro (Figura 12, B). Apresentam flagelo internalizado ou não aparente na região da bolsa flagelar.

Figura 7. Representação ultraestrutural da forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado pela autora de (TEIXEIRA *et al.*, 2013)

Em ambas as formas o núcleo é arredondado e o cinetoplasto é localizado na extremidade anterior ao núcleo, próximo da bolsa flagelar, onde está localizado o flagelo (NEVES *et al.*, 2016). O cinetoplasto é constituído por uma única mitocôndria que é ramificada e encontrada por toda a extensão celular (NEVES *et al.*, 2016). Essa organela é responsável pela síntese e armazenamento de material genético celular (DNA: ácido desoxirribonucleico) (SIMPSON, 1986). O DNA é codificado pela enzima topoisomerase II, sendo de grande importância em processos celulares como transcrição, recombinação, condensação da cromatina e segregação cromossômica no parasito (WANG, 2002).

O citoplasma ainda apresenta organelas comuns à células eucarióticas como retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos e vacúolos (NEVES *et al.*, 2016; REY, 2011). Em contrapartida, os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam algumas organelas específicas como os megassomos, acidomegassomos e glicossomos. Os megassomos são comparados aos lisossomos, apresentando relação com os processos de armazenamento e degradação de substâncias. Além disso, ainda é descrito o possível envolvimento na interação parasito e célula hospedeira, diferenciação e sobrevivência intracelular do parasito (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2002).

Os acidomegassomos estão presentes em maior quantidade nas formas promastigotas metacíclicas e amastigotas, destacando o seu papel na infectividade do parasito (DOCAMPO; MORENO, 2001; ZHANG *et al.*, 2005). Por apresentarem a capacidade de acumular íons

(cálcio e magnésio), essas organelas estão envolvidas em processos de resposta celular de interação parasito-hospedeiro promovendo mudança de pH e alteração nos níveis de pressão osmótica, mecanismo importante para a entrada de parasito nas células (RUIZ; RODRIGUES; DOCAMPO, 2001).

Os glicossomas são descritos como organelas importantes na regulação das vias metabólicas do parasito como a via glicolítica, que é responsável pela produção de ATP celular (MICHELS *et al.*, 2006).

7 O INSETO VETOR

Os hospedeiros invertebrados ou vetores das leishmanioses são flebotomíneos, popularmente conhecidos no Brasil como mosquito palha, tatuquira, asa dura, birigui entre outros (BRASIL, 2017), no entanto, apenas as fêmeas são hematófagas, figura 10 (OPAS, 2019).

Pertencem ao Filo Arthropoda; Classe Insecta/Hexapoda; Ordem Diptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae. O gênero *Lutzomyia* está presente no Novo Mundo (América do Sul e América Central) e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, África, Oriente Médio, Ásia Central e Subcontinente indiano) sendo as principais espécies a *Flaviscutellata*, *Longipalpis*, *Olmea*, *Trapidoi*, *Diabolica* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2016; OPAS, 2019; READY, 2011).

O gênero e as espécies são diferentes dependendo da localização geográfica. Na literatura é descrito que o principal vetor da espécie *Leishmania infantum*, responsável pelos casos de LV, é o *Lutzomyia longipalpis* (DUARTE; BADARÓ, 2015).

Enquanto a espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* é considerada o principal vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, principal espécie responsável pela LC na em diversas regiões do Brasil (DEANE, 1956; DEANE; DEANE, 1954; LAISON; WARD; SHAW, 1977; LUTZ; NEIVA, 1912).

Figura 8. Fêmea adulta de *Lutzomyia* spp. ingerindo sangue sobre a pele humana.



Fonte: Adaptado pela autora de (OPAS, 2021a)

8 ANIMAIS RESERVATÓRIOS

Um sistema reservatório vivo é constituído por um conjunto de espécies animais responsáveis por manter o parasito na natureza. São exemplos de reservatórios silvestres das leishmanioses os mamíferos das ordens *Didelphimorphia* (gambá), *Cingulata* (tatu), *Pilosa* (tamanduás, preguiças), *Rodentia* (roedores), *Primata* (primatas não humanos, casos raros e pouco estudados), *Carnivora* (cães domésticos e canídeos silvestres) *Chiroptera* (morcegos) (ROQUE; JANSEN, 2014).

9 CICLO BIOLÓGICO

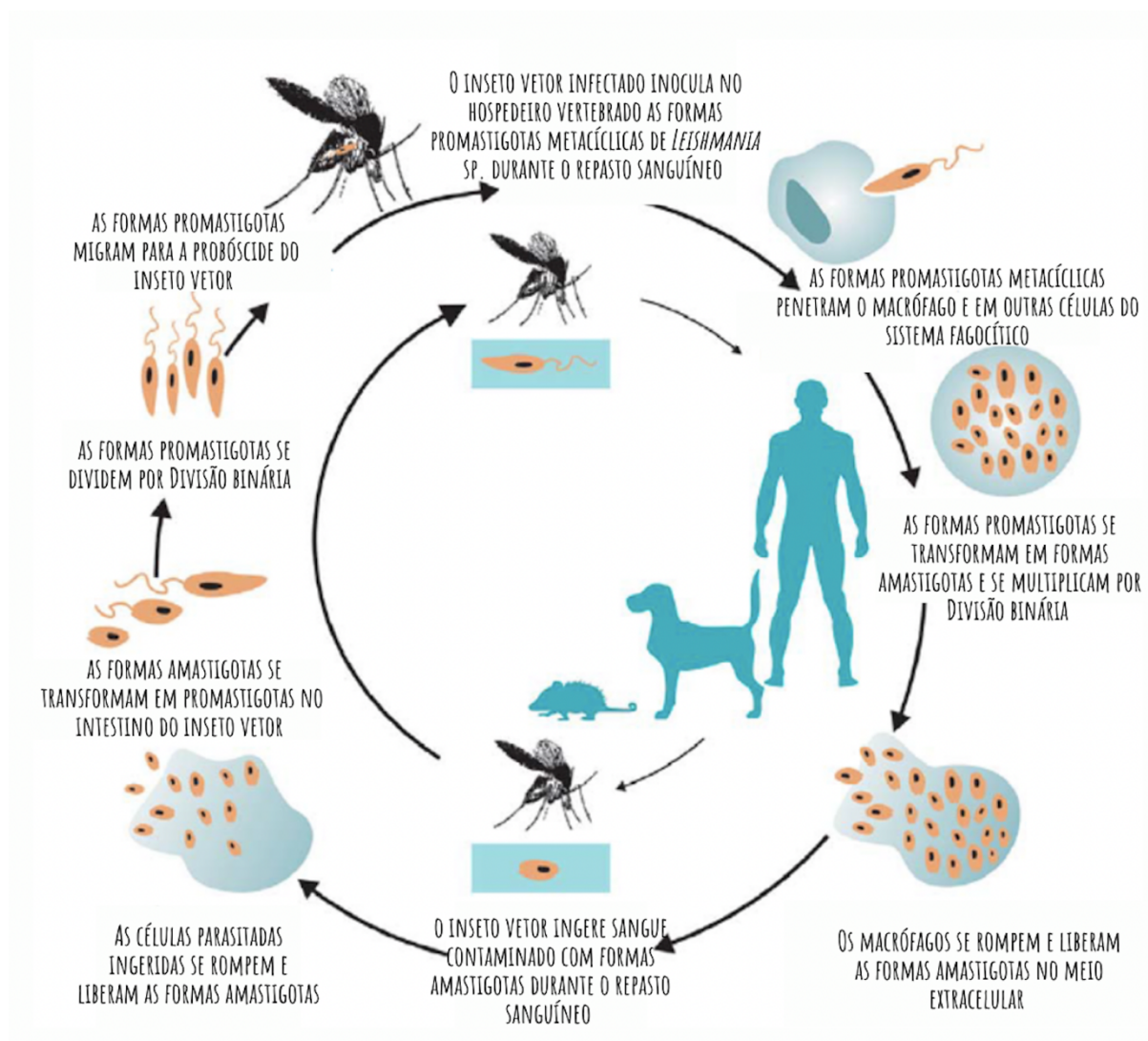
O ciclo de vida é considerado heteroxênico (digenético) sendo necessários tanto os hospedeiros vertebrados como invertebrados (Figura 13).

A transmissão dos protozoários para o hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo através da picada do flebotomíneo infectado. Na saliva dos flebotomíneos são encontrados neuropeptídeos vasodiladores que facilitam a alimentação do inseto além de promover a imunossupressão na resposta do hospedeiro vertebrado (NEVES *et al.*, 2016; RIBEIRO; ROSSIGNOL; SPIELMAN, 1986).

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneo inoculam as formas promastigotas no hospedeiro mamífero (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Com isso, ocorre a indução da infiltração de neutrófilos e recrutamento de macrófagos para a região da pele (PETERS *et al.*, 2008). As formas promastigotas serão fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente os macrófagos ou ainda podem entrar ativamente nestas células. Outras células como os fibroblastos (manutenção da integridade do tecido conjuntivo) e as células epidérmicas de Langerhans (3-6% na pele, com funções de captação e apresentação de antígenos) também podem ser infectadas (PETERS *et al.*, 2008).

Os macrófagos são células de extrema importância no ciclo de vida do parasito desempenhando o estabelecimento e amplificação da infecção (PETERS *et al.*, 2008; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). No interior dos macrófagos, nos vacúolos parasitóforos, ocorrerá a diferenciação em formas amastigotas (STUART, 2008). Após a multiplicação por divisão binária, e consequente proliferação, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas para o meio extracelular, que podem infectar novas células, ou serem ingeridas por um novo flebotomíneo, durante o seu repasto sanguíneo. Ocorre a disseminação pela circulação sistêmica para outros tecidos com abundância de células fagocíticas como linfonodos, baço e fígado (NEVES *et al.*, 2016).

Figura 9. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. nas Américas.



Fonte: Adaptado pela autora de (OPAS, 2019).

Quando um flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ocorre a laceração da pele e lesão de capilares sanguíneos, assim são ingeridos os macrófagos infectados contendo as formas amastigotas (NEVES *et al.*, 2016; REY, 2011; RIBEIRO, 1995). No intestino do vetor as formas amastigotas irão se diferenciar em promastigotas procíclicas, que se multiplicam por divisão binária.

As formas promastigotas tornam-se infectantes através de um processo denominado de metaciclogênese. Nesta etapa, após finalizar a sua diferenciação, ocorrem alterações bioquímicas na superfície do parasito que resultam na perda da capacidade de adesão ao epitélio intestinal do flebotomíneo. Com isso ocorre um aumento da resistência à lise ou rompimento, que é induzida pelo sistema complemento do hospedeiro (BRASIL, 2017; NEVES *et al.*, 2016; REY, 2011).

Assim, após uma nova diferenciação serão obtidas as formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) que são propagadas no esôfago e faringe do inseto, e ali permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até o próximo repasto sanguíneo, migrando para a probóscide (cavidade bucal) do inseto, para serem inoculadas em um novo hospedeiro mamífero (PIMENTA *et al.*, 1992).

10 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses apresentam manifestações clínicas tegumentares (cutânea localizada, cutânea difusa, cutânea disseminada, mucosa e manifestações atípicas) e visceral. As diferentes formas clínicas dependem das espécies dos parasitos e também das condições imunológicas dos indivíduos em questão (OPAS, 2019; WHO, 2022).

10.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR OU CUTÂNEA (LT/LC)

A leishmaniose tegumentar apresenta um polimorfismo nas lesões, que iniciam como uma mácula (relacionada a picada produzida pelo inseto), evoluindo para pápula (granuloma dérmico aumentado), depois nódulo (indolor) e por fim avança para a formação de úlcera. Os sinais e sintomas podem variar, sendo observada linfadenomegalia satélite durante ou após o surgimento da lesão. Podem ainda ocorrer infecções bacterianas nas lesões, provocando dor e presença de exsudato purulento (HANDLER *et al.*, 2015).

As espécies de *Leishmania* consideradas dermatrópicas podem causar LC (OPAS, 2019). Com isso, as lesões causadas por *L. amazonensis* pertencente ao subgênero *Leishmania*, apresentam como característica a presença de bordas mais infiltradas, ou seja, ocorre a presença de macrófagos com elevada quantidade de parasitos. Enquanto as lesões causadas pelo subgênero *Viannia* observa-se um discreto infiltrado com quantidade reduzida de macrófagos e parasitos na lesão, sendo predominante a presença de linfócitos e plasmócitos (linfócito B ativado) (MIRANDA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

10.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA (LCL)

A LCL apresenta-se como uma lesão no local da picada do flebotômio ocorrendo em áreas da pele que ficam expostas, como o rosto, pernas e braços (HANDLER *et al.*, 2015).

As lesões podem ser únicas ou múltiplas, indolores, com formato arredondado ou ovalado, com bordas delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granuloso, figura 14 (OPAS, 2019; WHO, 2022).

Quando não tratadas, as lesões podem apresentar cura espontânea no período de alguns meses, ou ainda apresentarem um longo processo de cicatrização, dependendo da efetividade de resposta do sistema imunológico dos indivíduos acometidos (BERMAN, 1997; BRASIL, 2017). De uma forma geral, os pacientes apresentam resposta positiva ao tratamento (MIRANDA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 10. Lesão característica de leishmaniose cutânea.



Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

10.3 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA (LCDS)

É caracterizada pela presença de lesões múltiplas e disseminadas, que acometem diversas regiões do corpo, sendo frequentemente observada a presença de infecção bacteriana secundária (OPAS, 2019). Entre os efeitos sistêmicos gerais são descritos febre, dores musculares, emagrecimento entre outros (MIRANDA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

Após o surgimento de uma lesão clássica de LC, ocorre a disseminação do parasito pela via sanguínea ou linfática originando as lesões disseminadas (BRASIL, 2017; OPAS, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2009). Estas podem ocorrer mesmo depois do início do tratamento para a

forma cutânea localizada. É descrito a possibilidade de evolução para lesões mucosas em cerca de 30% dos pacientes, figura 15 (OPAS, 2019; WHO, 2022).

O indivíduo com LC disseminada pode apresentar resposta imune celular contra a *Leishmania* (*L. braziliensis* ou *L. amazonensis*) apresentando boa resposta terapêutica, quando realizado com associação de fármacos (MIRANDA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 11. Lesões características de leishmaniose cutânea disseminada.



Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

10.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)

É uma forma rara e severa da doença, considerada crônica, com a presença de polimorfismo de lesões na pele (pápulas, nódulos, placas infiltradas, tubérculos e erosões) provocando deformidades e marcas, responsáveis pelo estigma e sofrimento dos pacientes acometidos, figura 16 (OPAS, 2020b).

A lesão é inicialmente única, evoluindo para múltiplas placas e nódulos não ulcerados na região cutânea, que podem evoluir para lesões mucosas, agravando ainda mais a doença. (ARONSON *et al.*, 2016). No Brasil, a LCD está exclusivamente relacionada a infecção por *L. amazonensis* (BRASIL, 2017).

A LCD é caracterizada por uma anergia (ausência de resposta imunológica dos pacientes aos antígenos do parasito), sendo observada limitada ou nenhuma resposta ao tratamento. É

comum a incidência de casos na infância, devido a presença de um sistema imunológico ainda não estabelecido. Neste momento ocorre a multiplicação dos parasitos e aumento das lesões cutâneas. Recidivas são frequentes ainda que ocorra diminuição das lesões com o tratamento, que é limitado (MIRANDA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 12. Lesões característica de leishmaniose cutânea difusa.



Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

10.5 LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA/MUCOSA (LMC)

É caracterizada por presença de lesões desfigurantes na mucosa oronasofaríngea e também em cartilagens, figura 17 (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; REITHINGER *et al.*, 2007). A disseminação do parasito ocorre pelo sistema sanguíneo e linfático a partir de uma lesão cutânea ou durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo na região das mucosas (OPAS, 2019).

Neste caso, não ocorre a cura espontânea como observado na LC, havendo evolução crônica quando não ocorre tratamento ou quando o mesmo é inadequado ou ineficaz (HANDLER *et al.*, 2015; REITHINGER *et al.*, 2007). A progressão das lesões e

comprometimento das mucosas que evoluem inclusive para possíveis mutilações de áreas acometidas, afetam a qualidade de vida dos indivíduos (OPAS, 2019).

Figura 13. Lesões característica de leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

10.6 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

A LV humana é a forma mais grave da doença, considerada crônica e de elevada letalidade (WHO, 2022). Após a invasão das formas amastigotas em tecidos e órgãos alvos como o fígado, baço, gânglios linfáticos entre outros, são observados sintomas como febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia (aumento dos linfonodos), anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia (aumento das imunoglobulinas no sangue) e hipoalbuminemia (frequentemente associada a desnutrição), perda de peso, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia (perda de peso e de massa muscular) e, até mesmo, ao óbito, figura 18 (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; OPAS, 2019; WHO, 2022).

A coinfeção LV/HIV representa um agravamento ao quadro clínico do paciente, devido à imunodeficiência provocada pelo HIV. Com isso, uma infecção que seria considerada assintomática pode apresentar evolução mais grave, com óbitos frequentes e recidivas da LV

(ANVERSA *et al.*, 2018; DRUZIAN *et al.*, 2015; LINDOSO *et al.*, 2014). As recidivas são caracterizadas pela reativação endógena de formas latentes de *Leishmania*. Quando presentes simultaneamente a LV/HIV ocorre um déficit de linfócitos TCD4+ (principal alvo do HIV para realizar a sua multiplicação), sendo possivelmente responsável por esta reativação (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Figura 14. Leishmaniose visceral.



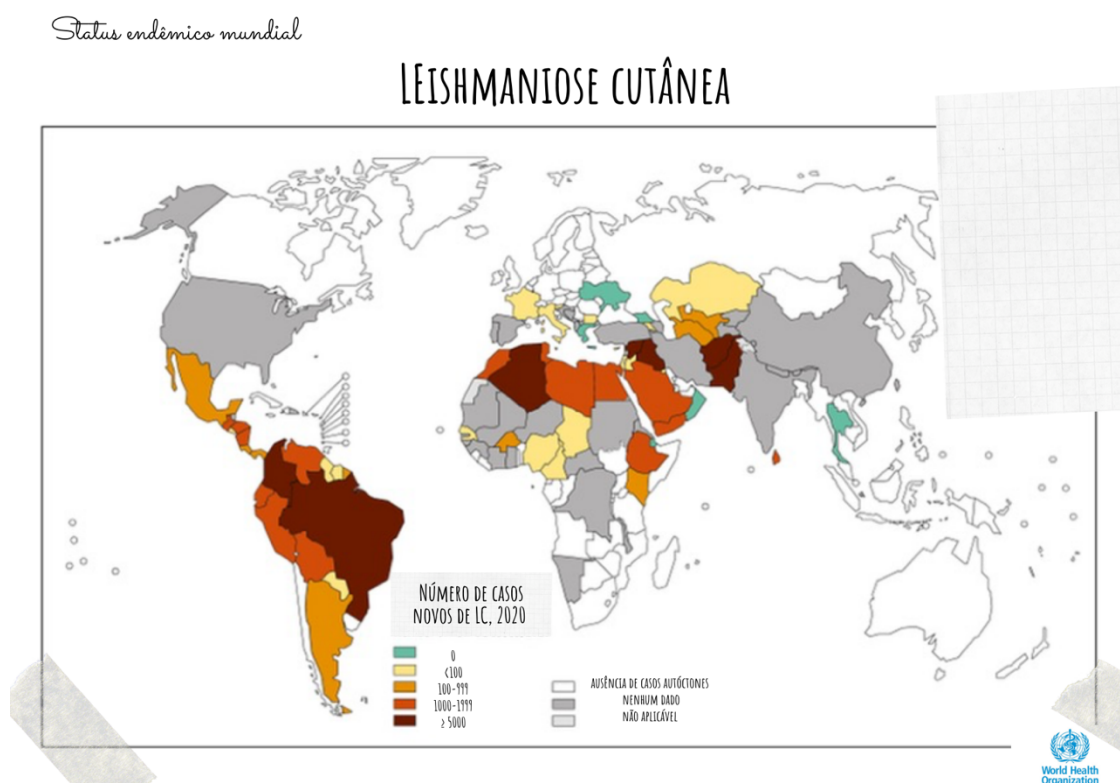
Fonte: Adaptado pela autora de OPAS, 2021.

11 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses representam um problema de saúde pública, afetando comunidades que vivem em situação de vulnerabilidade e exclusão social, com condições inadequadas de habitação e higiene, limitados recursos financeiros, presença de desnutrição e sistema imunológico debilitado, sendo ainda mais graves em pacientes com HIV/AIDS e outras comorbidades (OPAS, 2020a; WHO, 2022).

Anualmente a leishmaniose cutânea (LC) afeta de 600 mil a 1 milhão de pessoas. Em 2019 foram notificados 277.224 novos casos no mundo (DNDI, 2020; WHO, 2022). Essa doença é endêmica em 87 países e 85% dos casos estão localizados no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Peru, Iraque, Paquistão, Líbia, República Árabe da Síria e Tunísia, (Figura 5) (WHO, 2022).

Figura 15. Número de casos de LC no mundo, em 2019.



Fonte: Adaptado pela autora de WHO, 2022.

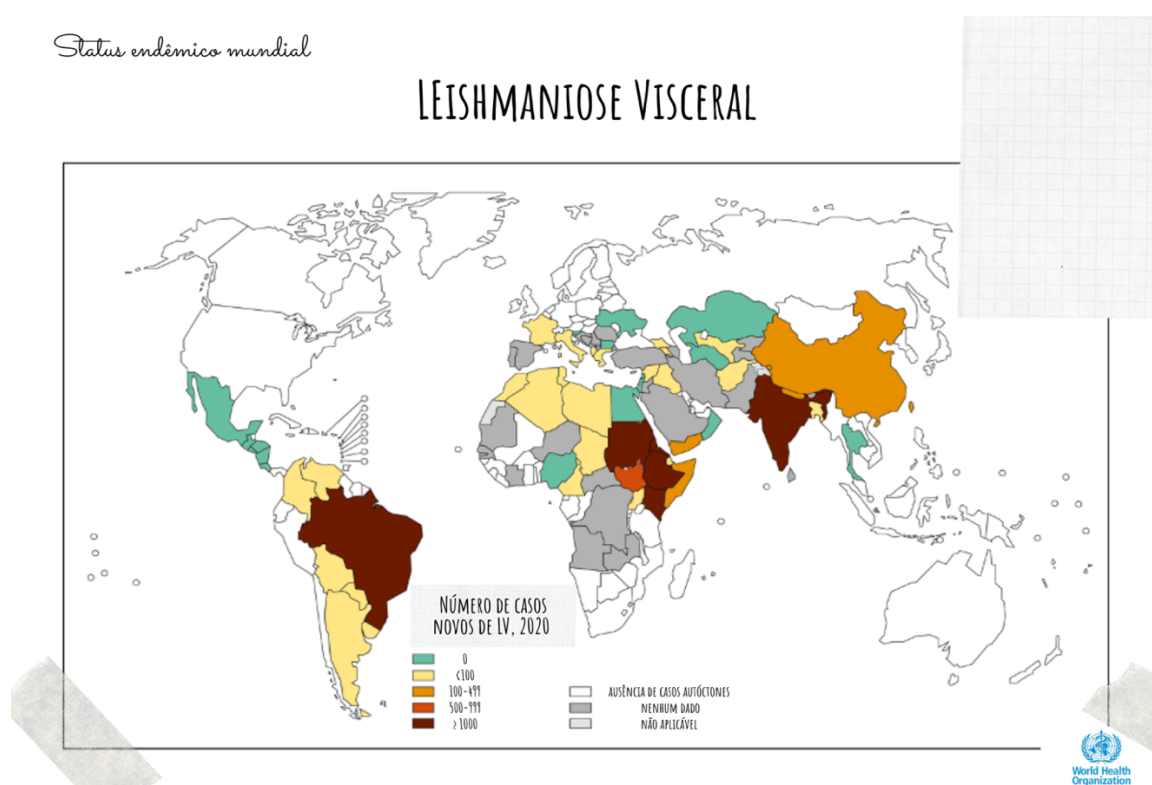
Nas Américas, no período entre 2000-2020 foram notificados um total de 1.067.759 casos de LC e a leishmaniose mucocutânea (LCM), com uma média anual de 53.387 casos, figura 7, A. O Brasil destacou-se entre os países com maior número de notificações com 16.432 casos, em 2020 (OPAS, 2021a; SINAN, 2022a). No mesmo ano, a região Centro-Oeste apresentou 2.844 casos (SINAN, 2022a). O Estado do Mato Grosso do Sul (MS) apresentou 84 casos de LC, sendo que 20 casos foram notificados na capital Campo Grande (SINAN, 2022a).

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 75 países, portanto estima-se que aproximadamente 600 milhões de pessoas estão em áreas com risco de adquirir a doença. A

incidência anual é bastante preocupante, entre 50.000-90.000 novos casos (DNDI, 2022a; WHO, 2022).

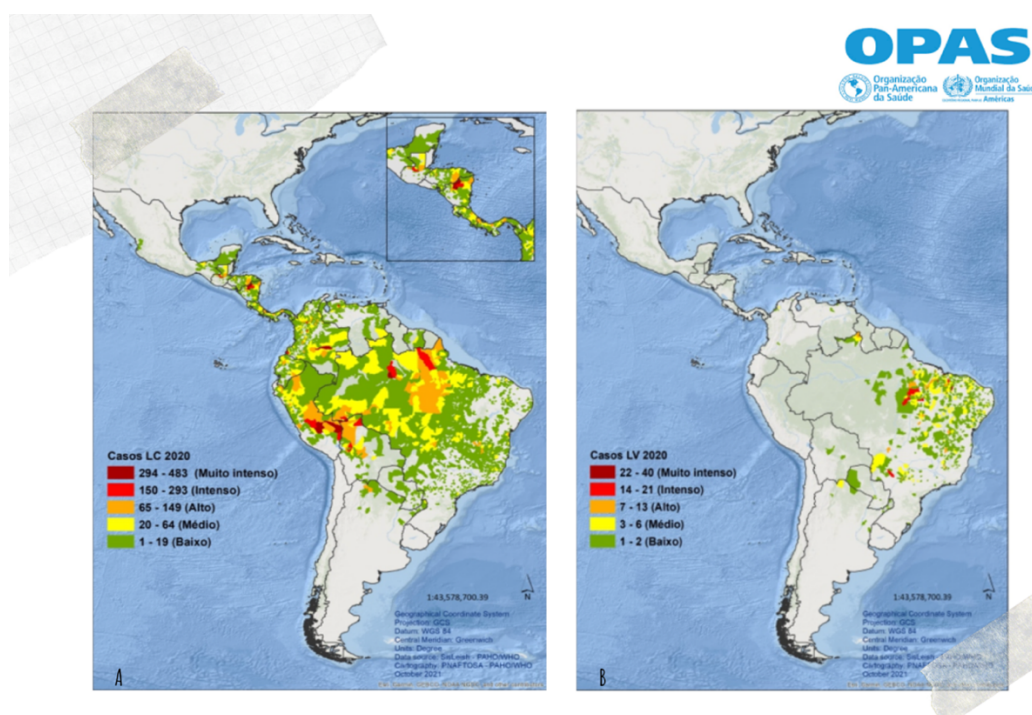
Em 2020, 90% dos novos casos notificados ocorreram no Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Iêmen, sendo as crianças o grupo mais afetado pela doença, representando 50-70% dos casos, (Figura 6), (WHO, 2022).

Figura 16. Número de casos notificados de LV no mundo, em 2020.



Fonte: Adaptado pela autora de WHO, 2022.

Figura 17. (A) Casos de leishmaniose cutânea e mucosa e de (B) leishmaniose visceral na região das Américas em 2021.



Fonte: Adaptado pela autora de (OPAS, 2021b).

Nas Américas, entre os anos de 2001-2020 foram notificados 67.922 casos de LV, com média de 3.400 casos anuais. Deste total de casos, 97% (1.933 casos) foram notificados no Brasil (Figura 7, B) (OPAS, 2020a; SINAN, 2022b).

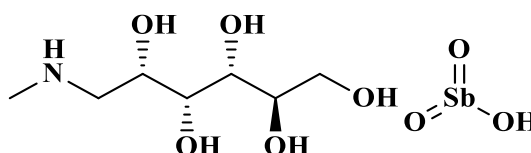
No Brasil a doença acomete aproximadamente 3.500 pessoas anualmente, e estima-se que para cada caso humano existam 200 cães infectados. No estado do Mato Grosso do Sul (2001 a julho de 2020) foram confirmados 1.741 casos e 124 óbitos pela doença (SES/MS; BOGIANI; OLIVEIRA, 2020). Entre 2014 e 2020 a cidade de Campo Grande, capital do Estado do MS, apresentou 451 casos com taxa de transmissão considerada intensa de 85,8%, (Figura 8), (SES/MS; BOGIANI; OLIVEIRA, 2020). Em 2020, o Brasil apresentou 1.908 casos notificados; a região Centro-Oeste 153 casos; o Estado do Mato Grosso do Sul 89 casos; e a capital Campo Grande 66 casos de LV (SINAN, 2022b).

Os antimoniais trivalentes (Sb^{+III}) como o tártaro emético, tartarato de potássio e antimônio, e o tartarato de sódio foram os primeiros fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses (HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019). Apesar da eficácia, estes fármacos apresentavam problemas relacionados a reduzida estabilidade das soluções, administração exclusivamente endovenosa, elevada ação no sistema muscular e, principalmente elevada toxicidade cardíaca.

Antimoniais pentavalentes

Os efeitos adversos dos antimoniais trivalentes incentivaram o uso dos antimoniais pentavalentes (Sb^{+V}), pois estes permanecem em maior quantidade no plasma, e são mais rapidamente excretados, o que diminui a toxicidade para o paciente em tratamento. Os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de antimônio de sódio (Pentostan[®], GlaxoSmithKline) e o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime[®], Sanofi-Aventis), são utilizados como fármacos para o tratamento das leishmanioses, figura 19 (HALDAR; SEN; ROY, 2011; REITHINGER *et al.*, 2007). No Brasil, apenas o Glucantime[®] é fornecido pelo Ministério da Saúde para tratamento através do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2017).

Figura 19. Estrutura química do antimoniato de *N*-metilglucamina.



Antimoniato de *N*-metilglucamina

Fonte: Autora

Os esquemas terapêuticos apresentam doses que variam de 10-20 mg/kg/dia e a administração pode ser através de via endovenosa, intramuscular ou ainda intralesional para LC (BRASIL, 2017; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O tratamento é realizado em ambiente hospitalar, por um período de 20-30 dias (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Entre os efeitos adversos dos antimoniais pentavalentes estão dor de cabeça, febre, tosse, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, tontura, e fadiga. Esses fármacos ainda podem causar problemas gastrointestinais, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e dor no local da injeção, que dificultam a adesão do paciente ao tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A cardiotoxicidade relacionada ao seu uso também é outro efeito adverso, sendo descritas alterações dose-dependentes no eletrocardiograma (ECG), arritmias, e taquicardia ventricular, tornando fundamental o acompanhamento e avaliação de ECG ainda que não existam fatores de risco cardíaco associados (RIJAL *et al.*, 2003). Com o objetivo de minimizar a toxicidade dos antimoniais, na literatura são encontrados estudos buscando o desenvolvimento de formulações que possibilitem melhor biodisponibilidade do fármaco (ESCRIVANI *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2013; ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi elucidado completamente, no entanto, os primeiros relatos na literatura sugerem a inibição da via da glicólise e a interferência no processo de beta-oxidação dos ácidos graxos reduzindo os níveis intracelulares de ATP do parasito (BERMAN; WADDELL; HANSON, 1985; HERMAN; GALLALEE; BEST, 1987).

Outra possibilidade seria a formação de complexos entre o Sb^{+V} e alguns nucleotídeos, inibindo a enzima topoisomerase do parasito, alterando o seu metabolismo e consequentemente promovendo a ação antiparasitária. As topoisomerases participam de processos importantes, como o ciclo celular e a diferenciação celular, sendo estas essenciais para a manutenção da homeostase do DNA nestes eventos (NO, 2016; VOS *et al.*, 2011). Devido as possíveis diferenças entre as topoisomerases presentes nos parasitos e nos hospedeiros vertebrados, estas são consideradas um alvo molecular de interesse para a pesquisa de novos fármacos com potencial antileishmania (REGUERA *et al.*, 2019).

O mecanismo mais discutido considera que os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos, sendo a atividade antileishmania dependente da biotransformação, através da redução do antimônio pentavalente (Sb^{+V}) em antimônio trivalente (Sb^{+III}) no interior dos fagócitos em condições de pH ácido. O Sb^{+III} ativa o estresse oxidativo e aumenta a concentração intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}) consequentemente induzindo a apoptose celular (ARULEBA *et al.*, 2020; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Outra hipótese é a possibilidade de o antimônio promover a redução dos níveis de tripanotona no parasito através da inibição da enzima tripanotona redutase (TR), expondo os parasitos as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelos macrófagos (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). A TR é uma enzima presente em parasitos da família *Trypanosomatidae*, fundamental para a manutenção da vida de parasitos do gênero *Leishmania*, pois como permanecem em sua forma reduzida atuam em defesa do estresse oxidativo promovido pelo hospedeiro durante a infecção.

Ainda são descritas a inibição do ácido cítrico e glicólise pela inibição da adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (KOFF; ROSEN, 1994); inibição da enzima superóxido dismutase, promovendo um aumento de radicais superóxido como meios para a ação leishmanicida (CHAI *et al.*, 2005; RAYCHAUDHURY *et al.*, 2005).

A resistência dos parasitos aos antimoniais é um problema emergente que limita a utilização destes fármacos em algumas áreas endêmicas, sendo a Índia um exemplo (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2017). O principal mecanismo de resistência dos antimoniais pentavalentes está relacionado ao efluxo de fármaco e a consequente diminuição da concentração do fármaco no parasito, mediada pela aquagliceroporina (AQP1) (GOURBAL *et al.*, 2004; MARQUIS *et al.*, 2005) principal rota de entrada no antimônio.

Além disso, como anteriormente mencionado, a tripanotona é uma enzima presente nos parasitos do gênero *Leishmania*, responsáveis pelos grupos tióis presentes no parasito. Assim é descrito que cepas resistentes ao antimônio apresentam níveis elevados de tióis, devido a uma amplificação de genes envolvidos na síntese da glutatona e poliaminas, que são componentes da tripanotona (MONTE-NETO *et al.*, 2011).

12.2 O QUE É O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS?

O reposicionamento de fármacos é uma abordagem que tem como objetivo encontrar novas aplicações para fármacos já disponíveis no mercado. Com isso o processo de descoberta de novas entidades químicas e suas aplicações é acelerado partindo de substâncias sintetizadas e elucidadas, com rota sintética estabelecida, e ainda com estudos de farmacocinética e segurança realizados previamente (DEOTARSE *et al.*, 2015; LANGEDIJK *et al.*, 2015).

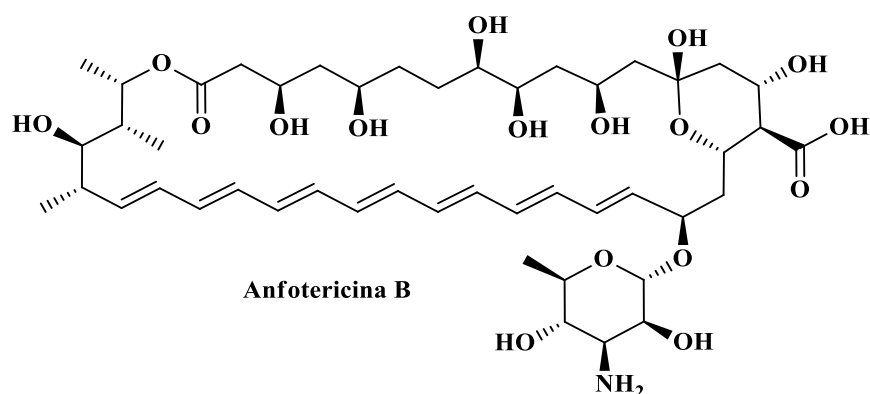
Alguns dos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são resultado do reposicionamento de fármacos pois foram reposicionados em relação a atividade biológica original como anticâncer (miltefosina), antibacteriana (paromomicina), antifúngica (anfotericina B) (ANDRADE NETO *et al.*, 2018).

12.3 ANFOTERICINA B

A anfotericina B é um antibiótico macrocíclico poliênico de amplo espectro com ação antifúngica, isolado da bactéria *Streptomyces nodosus*, e com ação antileishmania, figura 20. No Brasil, o fármaco está disponível como desoxicolato de anfotericina B e na formulação lipossomal (Ambisome®) (SEIFERT *et al.*, 2011).

Por apresentar administração intravenosa, devido a baixa absorção pelo trato gastrointestinal, a mesma deve ser realizada em ambiente hospitalar, dificultando a adesão ao tratamento. A dose usualmente utilizada é de 1mg/kg por 20 dias (SUNDAR *et al.*, 2001, 2007).

Figura 20. Estrutura química da Anfotericina B.



Fonte: Autora

Apesar de sua utilização apresenta efeitos adversos como náusea, vômitos, febre, perda de peso, nefrotoxicidade (DERAY, 2002; MACHADO-SILVA *et al.*, 2015) entre outros. A toxicidade relacionada ao uso da anfotericina B tem relação com a capacidade de ligação com o colesterol presente nas membranas das células humanas (GOTO; LINDOSO, 2010; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Com o objetivo de minimizar a nefrotoxicidade foi desenvolvida a formulação lipossomal da anfotericina B (Ambisome[®]) tornando-se um fármaco indicado pela OMS para o tratamento das leishmanioses em diversas regiões do mundo (WHO, 2022). Apesar desta formulação promover melhor biodisponibilidade, eficácia e redução da toxicidade renal relacionada a infusão, ainda apresenta certa toxicidade e apresenta um elevado custo, sendo este último um fator limitante para o acesso ao tratamento em muitos locais (WHO, 2022).

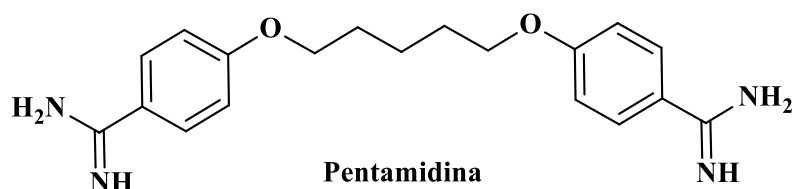
O mecanismo de ação está relacionado com a sua afinidade ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania*, promovendo a desorganização e alteração na permeabilidade de membrana, formação de poros, que consequentemente resulta na entrada de íons e outros metabólitos provocando desequilíbrio iônico e a morte celular (KIP *et al.*, 2018; TIWARI *et al.*, 2018).

Em relação a resistência dos parasitos a anfotericina B, foram descritas alterações na composição de membrana celular envolvendo os esteróis; no metabolismo de tióis; e nas proteínas transportadoras dependentes de ATP (MWENECHANYA *et al.*, 2017; PURKAIT *et al.*, 2012).

12.4 PENTAMIDINA

A pentamidina ou isetionato de pentamidina, é uma diamina aromática com um *linker* (grupo ligante central) contendo cinco átomos de carbono, figura 21. Apesar de apresentar atividade antileishmania, apresenta uso limitado devido a elevada toxicidade cardíaca e para o trato gastrointestinal (WHO, 2022).

Figura 21. Estrutura química da pentamidina.



Fonte: Autora

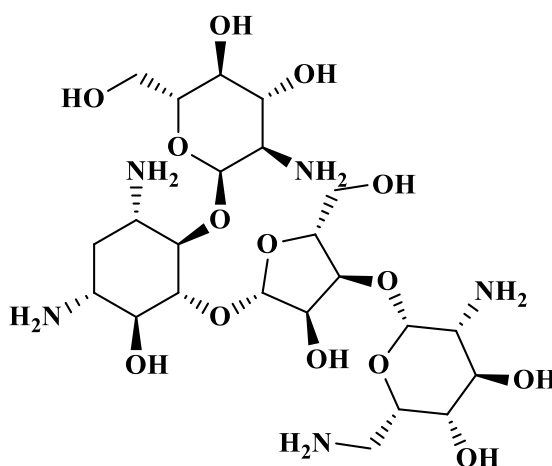
O esquema terapêutico é realizado com administração intravenosa ou intramuscular, com a dose de 2-4 mg/kg/dia por 7-10 dias ou três vezes por semana por um período de 3-4 semanas com 10-12 injeções (WHO, 2022). Entre os efeitos adversos observados são descritas mialgias, náuseas, cefaleia, hipotensão, diabetes mellitus, miocardite, arritmias, nefrotoxicidade e dor intensa no local da injeção (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Existem algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação da pentamidina como: ligação com o Kdna (DNA do cinetoplasto) inibindo a topoisomerase provocando dano ao DNA e interrupção do ciclo celular do parasito; inibição do sistema de transporte de membrana com a inibição de receptação de poliaminas relacionadas ao controle bioquímico e fisiológico das células; fragmentação do DNA do cinetoplasto mitocondrial; inibição da glicólise; ou ainda através da inibição da enzima S-adesilmetionina descarboxilase promovendo a alteração do potencial de membrana mitocondrial e causando a morte do parasito (FRANCO; SCARONE; COMINI, 2018; GOTO; LINDOSO, 2010).

12.5 PAROMOMICINA

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro (Figura 22), isolado de bactérias do gênero *Streptomyces rimosus*, que através da abordagem de reposicionamento de fármacos torna-se utilizada para o tratamento das leishmanioses.

Figura 22. Estrutura química da paromomicina.



Paromomicina

Fonte: Autora

O esquema terapêutico é realizado com doses de 12-20 mg/kg/dia por via intramuscular ou intravenosa para LV e LC respectivamente, por um período de 21-28 dias e ainda por via tópica para LC (WHO, 2022). Os principais efeitos adversos são náusea, dor abdominal, disfunção hepática, ototoxicidade e nefrotoxicidade (MATOS *et al.*, 2020; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; NO, 2016).

Alguns estudos estão investigando a utilização tópica de paromomicina-gentamicina para leishmaniose cutânea como estratégia no tratamento (DNDI, 2019).

Os mecanismos de ação propostos envolvem a ligação com a subunidade ribossomal 30S causando danos no processo de síntese proteica (através da ligação com RNA, erro na leitura no RNA mensageiro e inibição na reciclagem de ribossomos), promovendo alterações na fluidez ou permeabilidade da membrana do parasito, e também danos na mitocôndria (por meio de enzimas glicolíticas, cadeia respiratória, condensação nuclear, fragmentação do DNA) resultando na morte do parasito (CHAWLA *et al.*, 2011; HALDAR; SEN; ROY, 2011; MATOS *et al.*, 2020).

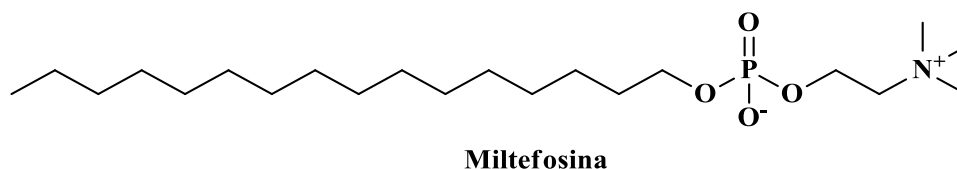
A literatura mostra que a resistência dos parasitos a paromomicina tem relação com modificações nas cepas de *Leishmania* (SHAW *et al.*, 2019) e ainda foi relado que a proteína

quinase cálcio dependente pode ser considerada um biomarcador de resistência aos parasitos (BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

12.6 MILTEFOSINA

A miltefosina é uma alquilfosfocolina (hexadecilfosfocolina, Figura 23) com aplicação inicial antitumoral, para metástases cutâneas em carcinomas mamários. É o único fármaco administrado por via oral para o tratamento das leishmanioses (OPAS, 2019; WHO, 2022).

Figura 23. Estrutura química da miltefosina.



Fonte: Autora

A dose indicada é de 1,5-2,5 mg/kg/dia por 28 dias, podendo ser associada a administração de anfotericina B e paromomicina. Os efeitos adversos associados ao tratamento são toxicidade gastrointestinal, hepática e renal. Além disso, apresenta propriedades teratogênicas e por isso não é indicada para crianças, mulheres em idade fértil sujeitas a/ou com interesse em engravidar ou gestantes (DORLO *et al.*, 2012, p. 201; PALIĆ; BEIJNEN; DORLO, 2022).

Existem hipóteses em relação ao mecanismo de ação envolvendo principalmente alterações na sinalização celular e a apoptose. Entre elas o possível efeito no metabolismo de lipídeos, envolvendo a alteração de componentes da membrana do parasito; a indução do apoptose celular devido a exposição a espécies reativas de oxigênio promovendo condensação nuclear, fragmentação do DNA e perda de volume celular; efeitos na mitocôndria envolvendo a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e inibição do citocromo C-oxidase (relacionado a apoptose) (MARINHO *et al.*, 2011); e ainda efeitos imunomodulatórios (equilíbrio Th1 e Th2; regulando a sinalização intracelular para manutenção da sobrevivência celular, aumento de receptores e resposta interferon-gama (IFN- γ), fator de ativação de macrófagos, contribuindo de forma adicional para a atividade antileishmania (DORLO *et al.*, 2012).

É possível que a resistência dos parasitos ao tratamento com miltefosina tenha relação com a cepa em questão, e ainda com alterações no sistema proteico responsável pelo transporte celular do fármaco, devido a uma inativação em alguma subunidade proteica de interesse ou ainda promovendo a diminuição na concentração do fármaco no parasito (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2002; SHAW *et al.*, 2016).

Tabela 3. Resumo dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, mecanismos de ação principais, vantagens e desvantagens.

Fármacos	Mecanismo de ação mais discutido*	Vantagem	Desvantagem /Toxicidade	Referências
<i>Antimoniais pentavalentes</i>	Pró-fármaco Inibe a tripanotiona redutase Aumenta as EROs Inibe a biosíntese de macromoléculas nas formas amastigotas	Baixo custo	Tratamento longo; Dor no local da injeção, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade; resistência dos parasitos ao fármaco	(FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; HALDAR; SEN; ROY, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; NO, 2016; REGUERA <i>et al.</i> , 2019; RIJAL <i>et al.</i> , 2003; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004)
<i>Anfotericina B (desoxicolato)</i>	Forma complexos com o ergosterol da membrana do parasito promovendo aumento de permeabilidade e resulta em morte celular	Alta eficácia primeira linha de tratamento em casos de resistência aos antimoniais	Toxicidade renal dose-dependente; 15-30 dias de infusão IV lenta com tratamento de 4-6 horas/dia; instável em temperaturas elevadas	(DERAY, 2002; GOTO; LINDOSO, 2010; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; MACHADO-SILVA <i>et al.</i> , 2015; SEIFERT <i>et al.</i> , 2011; SUNDAR <i>et al.</i> , 2001, 2007)
<i>Anfotericina B (Lipossomal)</i>	Liberação do fármaco na célula alvo (macrófagos infectados) promovendo a morte dos parasitos	Menos nefrotóxica que a anfotericina B	Alto custo; armazenamento especial com controle de temperatura; febre durante a infusão	(KIP <i>et al.</i> , 2018; TIWARI <i>et al.</i> , 2018; WHO, 2022)
<i>Miltefosina</i>	Modula os receptores de superfície de membrana; interfere no metabolismo dos parasitos; apoptose celular; inibe a citocromo C-oxidase	Administração por via oral; segura para pacientes com coinfeção (HIV-LV)	Originalmente um fármaco anticâncer; teratogênica em teste animal; alto custo; toxicidade do TGI; nefrotoxicidade	(DORLO <i>et al.</i> , 2012; MARINHO <i>et al.</i> , 2011; OPAS, 2019; PALIĆ; BEIJNEN; DORLO, 2022; WHO, 2022)
<i>Paromomicina</i>	Ligação a subunidade 30 S ribossomal; interfere na biossíntese de proteínas; altera o potencial de membrana do parasito	Baixo custo	Neurotoxicidade e ototoxicidade; eficácia variada conforme a região	(CHAWLA <i>et al.</i> , 2011; HALDAR; SEN; ROY, 2011; MATOS <i>et al.</i> , 2020; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; NO, 2016; WHO, 2022)

<i>Pentamidina</i>	Inibição da enzima topoisomerase e inibição do processo de transcrição interferindo no ciclo celular	Efetiva quando usada em associação com outro fármaco	Efeitos no TGI, hipotensão, miocardite e diabetes mellitus	(FRANCO; SCARONE; COMINI, 2018; GOTO; LINDOSO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011)
--------------------	--	--	--	--

Legenda. EROs: espécies reativas de oxigênio; IV: via de administração intravenosa; HIV-LV: infecção concomitante de vírus da imunodeficiência humana e leishmaniose visceral; TGI: trato gastrointestinal; Citocromo C-oxidase: enzima que atua como ativadora da morte celular programada (apoptose).

Entre as manifestações clínicas das leishmanioses, a leishmaniose tegumentar/cutânea é o foco deste trabalho, e entre os fármacos mencionados anteriormente alguns são utilizados preferencialmente no protocolo de tratamento da LT/LC como descrito na tabela 4, segundo a OPAS (2013) de acordo com o nível de evidência científica (OPAS, 2013).

Tabela 4. Principais protocolos de tratamento descritos pela OPAS para a leishmaniose tegumentar/cutânea, a manifestação clínica de interesse do trabalho.

Fármacos	Via de administração	Dose
<i>Antimoniais pentavalentes</i>	IV, IM	10-20mg/Kg/dia 20 dias
<i>Miltefosina</i>	Oral	1,5-2,5mg/kg por 28 dias
<i>Isetionato de pentamidina</i>	IM	2-4mg/Kg/dia 3 a 4 doses em dias alternados
<i>Anfotericina B lipossomal</i>	IV	2-3mg/Kg/dia
<i>Desoxicolato de anfotericina B</i>	IV	0,7-1mg/Kg/dia
Tratamentos locais		
<i>Termoterapia</i>	Aplicação de calor local com aparelho eletromagnético gerador de ondas de alta	Anestesia local prévia, aplica-se o eletrodo a 50 °C por períodos de 30 segundos, até cobrir toda a área da lesão, de 1 a 3 sessões, com intervalo de 1 semana.
<i>Antimoniais intralesionais</i>	Injeção intradérmica	

Fonte Adaptado da Organização Pan-Americana da Saúde. *Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento*. Washington, D.C.: OPAS; 2013. Disponível em espanhol em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/PAHO-Guia-Leishmaniasis-Américas-2013-Spa.pdf>

Os tratamentos convencionais apresentam limitações como toxicidade, resistência e alto custo destacando a relevância da descoberta de novos candidatos a fármacos, menos tóxicos,

mais seletivos, seguros e eficazes, visando a melhoria da qualidade de vida dos acometidos pelas leishmanioses.

13 NOVA GERAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA LEISHMANIOSES

As limitações relacionadas ao tratamento das leishmanioses ressaltam a importância da pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antileishmania. O *Drugs for Neglected diseases initiative* (DNDi) conduz diversos estudos buscando a descoberta de compostos líderes (*lead compounds*) e novas alternativas para o tratamento de doenças negligenciadas.

No Peru e Colômbia, está em andamento um estudo clínico de fase 2, para LC, com associação de termoterapia (50 °C durante 30 minutos) e miltefosina (2,5 mg/kg/dia durante 21 dias), para análise de eficácia e segurança do tratamento (DNDI, 2019).

Duas novas entidades químicas orais (nitroimidazol DNDi 0690 e oxaborol DNDi 6148) concluíram os estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* e estão submetidas a estudos clínicos de fase 1 e fase 2, com projeção de ensaios de fase 3 em 2022 (DNDI, 2019; SANTANA *et al.*, 2021; WIJNANT *et al.*, 2019). Outra opção estudada é a utilização de um imunomodulador (CPG-D35) com o objetivo de potencializar o tratamento farmacoterapêutico convencional (DNDI, 2019, 2020).

14 DRUG DISCOVERY: A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTILEISHMANIA

“Tudo começa com uma biblioteca de compostos”. *DNDi*

O processo de descoberta de novos fármacos é longo, envolvendo desde as etapas de *design* e planejamento; estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*); ensaios clínicos de fase I, II e III até a revisão dos dados e aprovação para o mercado (Infográfico 1), (FIELD *et al.*, 2017).

Infográfico 1. Processo de drug design.



Fonte: Infográfico elaborado pela autora do trabalho segundo referências citadas.

De uma forma geral, a indústria farmacêutica não apresenta interesse em desenvolver fármacos para o tratamento das doenças consideradas negligenciadas (DTNs), pois considerando o mercado de medicamentos, outras classes farmacológicas mostram-se mais rentáveis, como anti-hipertensivos, antidiabéticos entre outras.

No entanto algumas parcerias no âmbito privado-público, como é o caso do DNDi, tem como foco a busca por novos agentes terapêuticos para as DTNs, incluindo as causadas por parasitos tripanossomatídeos, como as leishmanioses (DNDI, 2022b). Embora existam esforços neste sentido, poucos são os compostos em fase de desenvolvimento/ preparação (do inglês *pipeline*) em estudos clínicos para leishmanioses.

Neste processo de descoberta de novos fármacos antitripanossomatídeos as abordagens mais utilizadas são: as direcionadas ao alvo terapêutico (do inglês *Target-based*) com o desenvolvimento de moléculas otimizadas em relação a sua estrutura química visando maior atividade em enzimas ou proteínas específicas do parasito; a abordagem fenotípica, que envolve a utilização de formas evolutivas do parasito para a avaliação da ação direta dos compostos em ensaios *in vitro*; e o reposicionamento de fármacos já disponíveis no mercado com outra aplicação farmacológica da inicial (FIELD *et al.*, 2017).

Entre as abordagens citadas, a abordagem fenotípica é mais aplicável em nosso contexto acadêmico, destacando a importância da fase de síntese e atividade biológica ocorrerem de forma concomitante.

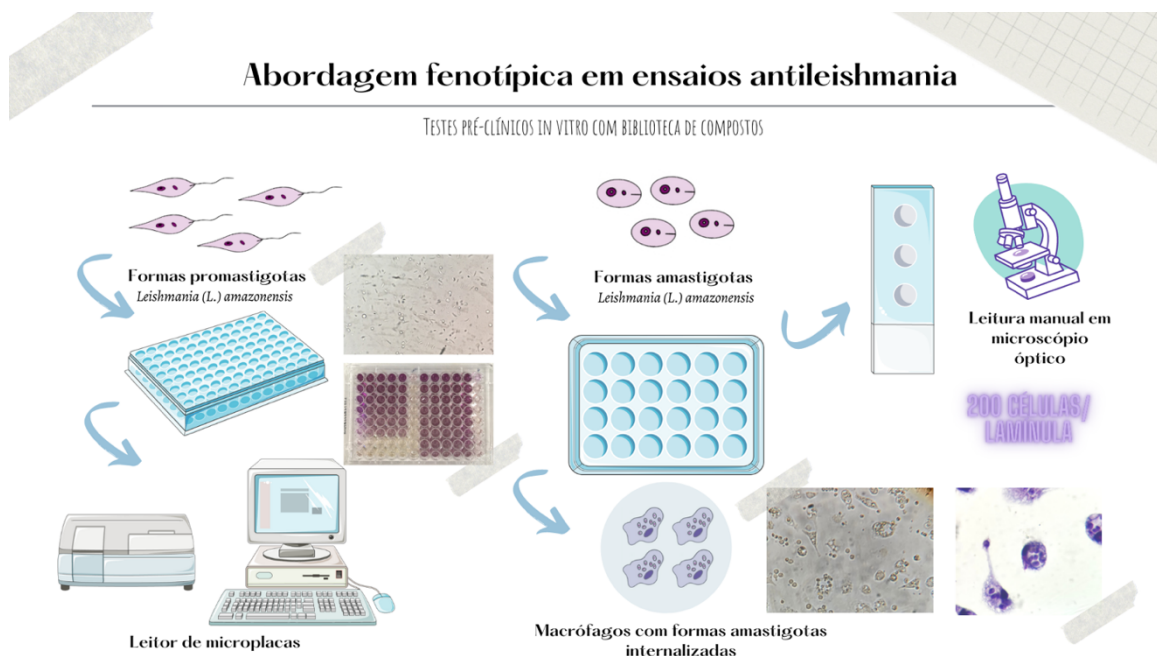
14.1 ABORDAGEM FENOTÍPICA

A abordagem fenotípica permite a descoberta de moléculas através da investigação do espaço biológico, fornecendo informações sobre novas moléculas e sua aplicação biológica, permitindo estudos posteriores sobre alvos terapêuticos e mecanismos de ação, figura 24 (MOFFAT *et al.*, 2017).

O processo de descoberta de novos fármacos (do inglês *drug discovery*) antitripanossomatídeos apresenta algumas limitações. Um deles é a ausência de alvos terapêuticos isolados e validados, que possibilitem ensaios *in vitro* com enzimas. Outro aspecto é a realização de estudos computacionais, que também apresentam suas limitações, para prever possíveis interações com o alvo molecular de interesse, resultaram em muitos casos, na substituição do modelo baseado no alvo-terapêutico (do inglês *target-based drug design*) para a abordagem fenotípica (GILBERT, 2013; GILBERT; LEROY; FREARSON, 2011). Inclusive

diversos compostos com aplicação em DTNs que evoluem para estudos pré-clínicos e clínicos são descobertos por meio desta abordagem (GILBERT, 2013).

Figura 24. Abordagem fenotípica na investigação antileishmania de compostos bioativos.



Fonte: Autora (fotos e desenho dos parasitos); materiais de laboratório obtidos gratuitamente de Smart Servier Medical Art.

A aplicação deste método tem como premissa a triagem de bibliotecas de compostos (do inglês *screening*) já sintetizados combinados com a realização de ensaios biológicos, que permitam obter resultados em diferentes formas do parasito, presentes no seu ciclo de vida. Os ensaios podem ser feitos *in vitro*, com células *ex vivo* cultivadas *in vitro*, e *in vivo* (BRENK *et al.*, 2008). Diante disso, é ressaltada a importância de avaliar e selecionar os resultados encontrados em modelo *in vitro*, para as formas clínicas relevantes ao estudo e doença em questão, antes de avançar para os estudos com modelo *in vivo*.

A abordagem fenotípica aplicada na descoberta de novos compostos atende as possibilidades e também limitações (por exemplo as econômicas) muitas vezes encontradas em grupos de pesquisa das universidades, principalmente aqueles que trabalham com doenças negligenciadas, como as leishmanioses (FIELD *et al.*, 2017; HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019). Neste contexto é observada a evolução nos ensaios antileishmania *in vitro* nas instituições acadêmicas, que antes eram realizados com formas promastigotas e culturas axênicas de formas amastigotas, e agora são avaliados sobre as formas amastigotas intracelulares (com a utilização de macrófagos murinos) ou ainda culturas 3D de esplenócitos

(macrófago nuclear que migra para o baço) infectados permitindo assim uma maior proximidade com manifestação da doença (CALVO-ÁLVAREZ *et al.*, 2015; OSORIO *et al.*, 2011).

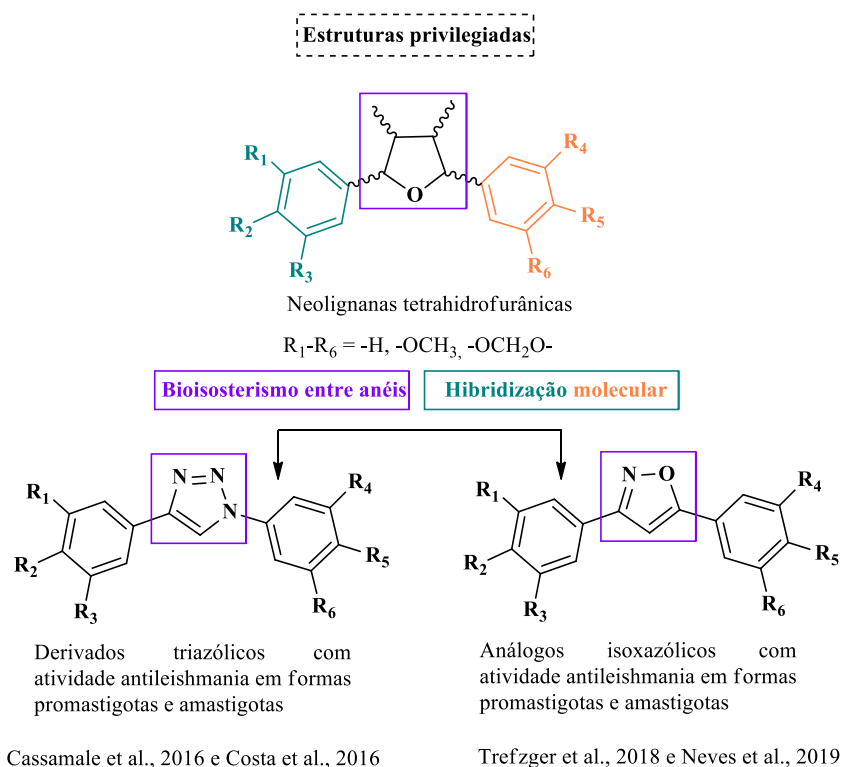
Portanto, o grande desafio da abordagem fenotípica envolve a otimização dos compostos, com base apenas nos resultados dos ensaios biológicos, por isso a importância dos conhecimentos de química medicinal, para que as substituições em grupos ou núcleos estruturais sejam realizadas de forma criativa e também com embasamento nas estratégias de modificação molecular.

14.2 ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR

O bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular que possibilita a substituição de um grupo ou um núcleo químico, de propriedades físico-químicas; arranjo estrutural semelhante; ou ainda atividade biológica semelhante pelo respectivo bioisótero, de forma a observar a atividade biológica e posteriormente realizar um estudo de relação-estrutura atividade (REA) em uma série de compostos. Através do bioisosterismo é possível otimizar estruturas químicas, visando o aumento de seletividade e potência dos análogos, figura 25 (JAYASHREE; NIKHIL; PAUL, 2022; LIMA; BARREIRO, 2005).

A hibridização molecular é outra estratégia de modificação molecular resultado da junção de grupos farmacofóricos de interesse em uma estrutura química. Compostos híbridos tem um grande potencial bioativo podendo apresentar atividade dual ou/e sinérgica potencializando a atividade biológica de interesse (IVASIV *et al.*, 2019; VIEGAS-JUNIOR; BARREIRO; FRAGA, 2007).

Figura 25. Estratégias de modificação molecular, bioisosterismo e hibridização no planejamento de derivados das neolignanas tetrahidrofurânicas de interesse (Veraguensina, Grandisina e Machilina G).



Fonte: Adaptado de TREFZGER *et al.*, 2019 e DAS NEVES *et al.*, 2019).

14.3 A REGRA DOS CINCO: *DRUG-LIKE*

A regra dos cinco de Lipinski é muito utilizada no processo de descoberta de fármacos (do inglês *drug discovery*), para determinar as características inerente de uma molécula considerada um fármaco (do inglês *drug-like*), ou seja, características semelhantes a um fármaco, e descreve algumas propriedades físico-químicas que permitem a projeção da biodisponibilidade oral de novos candidatos a fármacos (LIPINSKI *et al.*, 1997). As propriedades incluem o coeficiente de partição, peso molecular, HBD, HBA, e são diretamente ou indiretamente envolvidos no processo de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), tabela 5. As propriedades podem ser estimadas utilizando softwares ou de forma experimental (MCKERROW; LIPINSKI, 2017).

Tabela 5. Regra dos cinco de Lipinski.

Propriedades	Peso molecular (MW) ^a	HBD ^b	HBA ^c	Log P ^d
	<500 Da	≤ 5	≤ 5	≤ 5

Legenda: a) MW: Peso molecular em daltons b) HBD: grupos doadores de ligação de hidrogênio; c) HBA: grupos aceptores de ligação de hidrogênio; d) Log P: coeficiente de partição determinado por meio de software.

14.4 ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS NO PLANEJAMENTO DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

O termo “estrutura privilegiada” envolve a capacidade de um parte estrutural (do inglês *scaffold*) em apresentar grupos farmacofóricos com possibilidade de ligação aos múltiplos alvos terapêuticos, justificando a diversidade de aplicações biológicas (EVANS *et al.*, 1988; WELSCH; SNYDER; STOCKWELL, 2010).

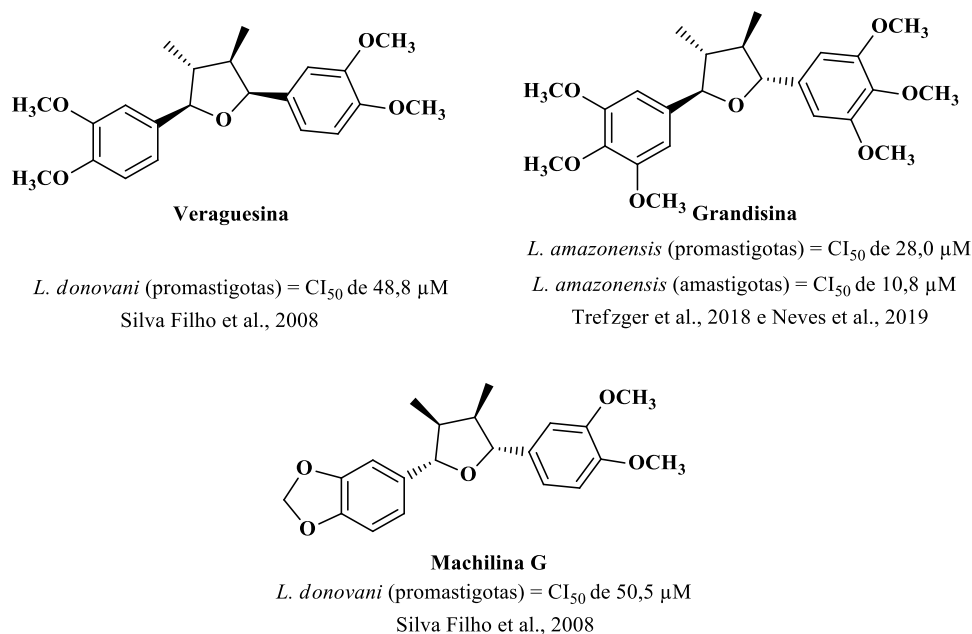
Produtos de origem natural

Os produtos de origem natural (PNs) são considerados estruturas privilegiadas na química medicinal, devido a diversidade de atividades biológicas relacionadas, sendo utilizados muitas vezes como fonte de inspiração para o planejamento de novos compostos sintéticos (MATHUR; HOSKINS, 2017).

As neolignananas são uma classe de metabólitos secundários presentes nos PNs derivados do acoplamento oxidativo de fenilpropanoides. Entre as possíveis atividades biológicas descritas na literatura destacam-se: anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anticâncer, antineurodegenerativa e antiprotozoária (DAS NEVES *et al.*, 2019; SILVA FILHO *et al.*, 2008; TREFZGER *et al.*, 2019; ZÁLEŠÁK; BON; POSPÍŠIL, 2019). São consideradas estruturas complexas, no entanto o baixo peso molecular permite a realização de novas modificações a partir de seu *scaffold* (parte estrutural) privilegiado (ZÁLEŠÁK; BON; POSPÍŠIL, 2019).

Neste contexto são destacadas as neolignananas tetrahidrofurânicas grandisina, veraguensina e machilina G, que apresentam atividade antileishmania comprovada em estudos *in vitro* (Figura 26).

Figura 26. Estrutura privilegiada das neolignanas tetrahidrofurânicas Veraguensina, Grandisina e Machilina G.

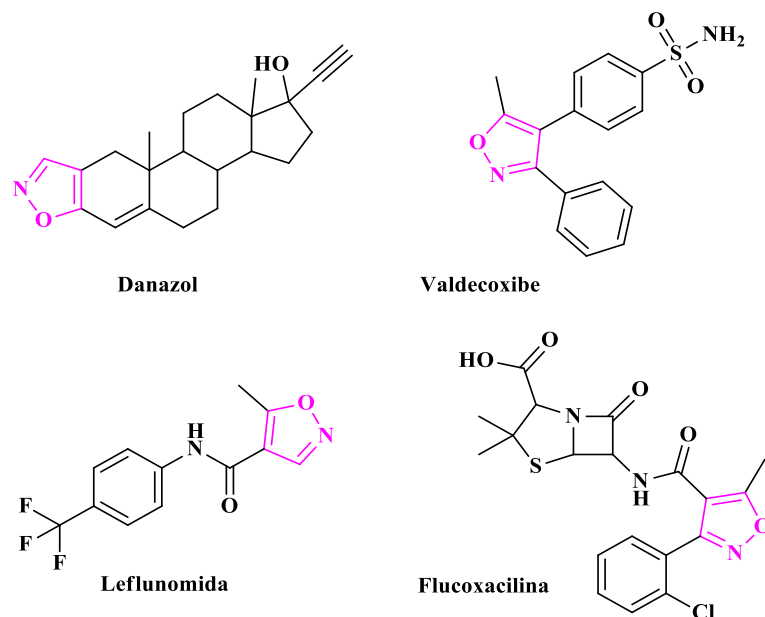


Fonte: elaborado pela autora.

Núcleo heterocíclico e isoxazol

O núcleo heterocíclico é considerado uma estrutura privilegiada e está presente na estrutura química de aproximadamente 85% dos compostos biologicamente ativos e em fármacos disponíveis no mercado (Figura 27) (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020). O núcleo heterocíclico apresenta um grande potencial no desenvolvimento de séries de compostos com atividade antileishmania, como o indol, benzimidazol, imidazol, tiofeno, triazol, oxadiazol, isoxazol, entre outros (KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018; WELSCH; SNYDER; STOCKWELL, 2010; ZHU *et al.*, 2018).

Figura 27. Fármacos disponíveis no mercado farmacêutico contendo o núcleo isoxazol na estrutura química.

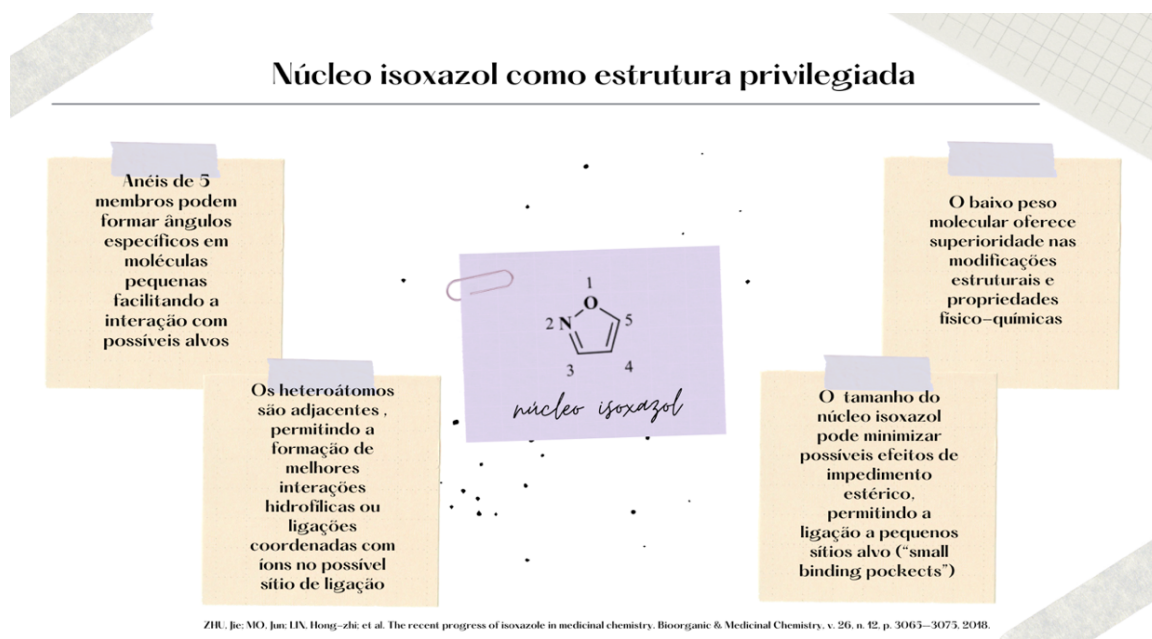


Fonte: elaborado pela autora.

Entre os anéis heterocíclicos, os isoxazóis apresentam cinco membros com átomos de oxigênio e nitrogênio nas posições 1, 2 como constituintes do anel, enquanto as substituições ocorrem nas posições 3, 4 e 5, (Figura 28) (JOULE; MILLS, 2013; KUMAR; JAYAROOPA, 2013) possibilitando a adição de padrões de substituição com a finalidade de obter compostos com maior seletividade, ou seja, com ação seletiva aos parasitos (ZHU *et al.*, 2018).

O núcleo isoxazol é considerado uma parte estrutural importante (do inglês *building blocks*) populares no desenvolvimento de novos fármacos devido ao seu potencial terapêutico como nas atividades antituberculose, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana entre outras (AGRAWAL; MISHRA, 2018). A inclusão do núcleo isoxazol na estrutura química pode promover aumento da eficácia, melhoria nas características farmacocinéticas e menor toxicidade (BARMADÉ *et al.*, 2016).

Figura 28. Núcleo isoxazol como estrutura privilegiada na química medicinal.



Fonte: Autora

A literatura mostra a atividade *in vitro* de análogos contendo o núcleo isoxazol e sua potencialidade como agente antileishmania (DAS NEVES *et al.*, 2019; TREFZGER *et al.*, 2019).

15 BRIEFING DO TRABALHO: PLANEJAMENTO DOS ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS DE INTERESSE E SUA APLICAÇÃO

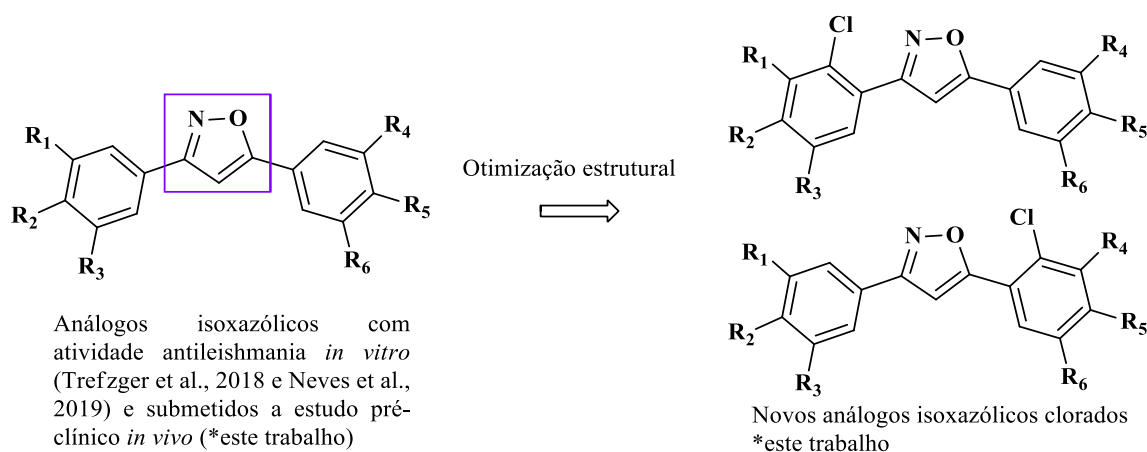
O nosso grupo de pesquisa realiza o planejamento de compostos sintéticos com foco em doenças negligenciadas, sendo a leishmaniose cutânea uma das principais linhas de pesquisa relacionada à atividade biológica. O desenho e planejamento da série de compostos neste trabalho, foi inspirada nas neolignanas tetrahidrofurânicas, veraguensina, grandisina e machilina G.

Por meio de estratégias de modificação molecular como o bioisosterismo e a hibridização molecular, foram sintetizados análogos triazóis a partir do scaffold presente nessas neolignanas (CASSAMALE *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016). Os resultados obtidos no estudo anterior, demonstraram a atividade antileishmania *in vitro* dos triazóis, e despertou o interesse do nosso grupo em investigar se o bioisosterismo entre anéis triazóis e isoxazóis impactaria na atividade biológica.

Os análogos isoxazóis foram considerados mais ativos que os triazóis com atividades excelentes em formas amastigotas intracelulares (DAS NEVES *et al.*, 2019). Com isso, surgiu a pergunta “Será que os análogos mais ativos apresentariam atividade *in vivo*?”

Paralelamente a este estudo, sintetizamos e testamos um análogo clorado desta série de isoxazóis que também se mostrou ativo contra as formas amastigotas intracelulares (Figura 29). Com isso foi possível planejar este trabalho, que apresenta duas etapas: avaliar a atividade *in vivo* dos análogos isoxazóis mais ativos *in vitro* e avaliar a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* da nova série de isoxazóis clorados derivados das neolignan tetrahydrofurânicas.

Figura 29. Planejamento estrutural de novos análogos isoxazóis clorados.



Fonte: Autora.

16 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A triagem primária (do inglês *screening*) de uma biblioteca de compostos ocorre com as formas promastigotas e amastigotas intracelulares (Tabela 6), investigação da citotoxicidade em células, em conjunto com a análise de parâmetros físico-químicos e outros métodos *in silico* que permitam ampliar a compreensão em relação aos compostos testados. A atividade *in vivo* é a próxima etapa, sendo o parâmetro de eficácia estabelecido através da observação da carga parasitária e tamanho da lesão em comparação com o grupo controle infectado e não tratado (CARIDHA *et al.*, 2019).

Tabela 6. Resumo dos protocolos experimentais com as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

	Ensaio		
	Promastigotas		Amastigotas intracelulares
Inóculo	2x10 ⁵		4x10 ⁶
Meio de cultura	Schneider (Sigma-Aldrich®) suplementado 10% penicilina estreptomicina e 20% de soro fetal bovino		RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado 1% penicilina estreptomicina e 20% de soro fetal bovino
Célula	-		Macrófagos peritoneais (1x10 ⁶ células por poço) de camundongos BALB/c
Concentração dos compostos	Diluição seriada	50µg/ml-0,78µg/ml	50µg/ml-0,625 µg/ml
Tempo de tratamento	72 h		24 h
Técnica	MTT (Sigma-Aldrich®), leitura em leitor de microplacas com densidade ótica de 540nm ou 570 nm		Leitura em microscópio ótico de 200 células, indicando a ausência ou presença de formas amastigotas através da contagem
Tempo para resultado	Curto		Longo, difícil

Referências: (DAS NEVES *et al.*, 2019; TREFZGER *et al.*, 2019).

16.1 ASPECTOS RELEVANTES DO MODELO *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro*, com células, tecidos, enzimas, ou organismo isolado são considerados a etapa inicial da triagem (do inglês *screening*) de compostos, permitindo a identificação de candidatos promissores para estudos *in vivo* (CARIDHA *et al.*, 2019).

No processo de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para *Leishmania* spp., é crucial que os mesmos apresentem atividade na forma intracelular do parasito. Com isso, os ensaios *in vitro* com as formas amastigotas intracelulares são fundamentais na determinação da atividade antileishmania de uma série de compostos (CROFT, 2017; LAMOTTE *et al.*, 2017).

Desta forma, um fármaco é considerado ativo quando apresenta capacidade de ultrapassar as membranas, acessar as formas amastigotas que residem em vacúolos parasitóforos no interior dos macrófagos, que é um microambiente ácido (pH aproximado 5,5) e promover a morte dos parasitos por si próprios, por ativação dos macrófagos ou ainda por meio de outros mecanismos de ação desconhecidos (CROFT, 2017; LAMOTTE *et al.*, 2017).

Além disso, um candidato deve apresentar baixa toxicidade para a célula hospedeira, pois a morte prematura dessas células pode sugerir possível atividade tóxica durante ensaios *in vivo* ou clínicos.

No entanto, é importante ressaltar que o comportamento *in vitro* de um composto pode diferir dos resultados obtidos no estudo *in vivo* com modelo animal. Neste caso a complexidade é ainda maior, levando em consideração aspectos como a forma farmacêutica, a via de administração, biodisponibilidade, metabolismo entre outros (MEARS *et al.*, 2015).

Nesse sentido, os estudos *in vitro* representam uma importante ferramenta científica para fornecer informações relevantes no planejamento de futuros candidatos contra a leishmaniose induzida experimentalmente em modelo animal.

16.2 CICLO BIOLÓGICO *IN VITRO*

A atividade antileishmania *in vitro* é avaliada tanto sobre as formas promastigotas como amastigotas de *Leishmania* spp. É possível realizar o isolamento de formas amastigotas de um modelo animal com infecção induzida experimentalmente, como da lesão cutânea. Em seguida, as formas promastigotas podem ser mantidas em meio de cultura específico (como o meio de cultura Schneider), havendo a necessidade da renovação da cultura, semanalmente, pela adição de meio de cultura fresco em uma pequena fração da cultura anterior, este processo é denominado de passagem. Ao realizar as passagens semanais, é adicionado meio de cultura escolhido e uma fração da cultura anterior (BATES, 1994; BUSSOTTI *et al.*, 2018; CARIDHA *et al.*, 2019). Com isso, o número de passagens está relacionado a quantas vezes a cultura foi subcultivada. Este dado é importante pois o extensivo subcultivo das espécies pode diminuir a infectividade das formas promastigotas metacíclicas *in vitro* (BUSSOTTI *et al.*, 2018; CARIDHA *et al.*, 2019).

O ciclo de vida *in vitro* do parasito tem período de 7 dias, ou seja, após o terceiro dia de cultura as formas promastigotas estão na fase log (crescimento exponencial) e a partir do quinto dia iniciam a fase lag (estacionária). É nesta fase que as formas promastigotas apresentam-se em um momento ideal para realização dos experimentos *in vitro* com a infecção de macrófagos e obtenção das formas amastigotas intracelulares (BATES, 1994).

As formas amastigotas ainda podem ser cultivadas como culturas axênicas em condições específicas como o pH 5.5 e temperatura de 37 °C, a partir da cultura de formas promastigotas e assim serem utilizadas para a infecção de macrófagos murinos *in vitro* (AL-BASHIR; RASSAM; AL-RAWI, 1992; CALLAHAN *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

16.3 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM MODELO *IN VIVO*

Os ensaios *in vivo* com modelos animais, têm como princípio a indução de uma condição clínica, neste caso a leishmaniose cutânea, que irão produzir sintomas a serem observados, e tratados com compostos bioativos (MEARS *et al.*, 2015).

Estes estudos, apesar de mais complexos, contribuem para a obtenção de respostas em relação a atividade farmacológica, estudo aprofundado dos parâmetros farmacocinéticos (ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) envolvidos e identificação de outros aspectos não observados nos ensaios *in vitro*, como por exemplo o acompanhamento da lesão e taxa de sobrevivência pós-tratamento. Diante disso, os ensaios *in vivo* são relevantes para que um candidato a fármaco avance nos estudos clínicos, pois permitem a obtenção de informações das possíveis interações com o um sistema biológico antes do teste em humanos, principalmente aqueles relacionados a segurança (CARIDHA *et al.*, 2019; MEARS *et al.*, 2015).

16.4 MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO *IN VIVO*

A escolha do modelo experimental é de extrema importância, de forma que a condição induzida experimentalmente, aproxime-se o máximo do que seria observado no hospedeiro humano (BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

A atividade biológica observada em um modelo animal *in vivo*, não garante a efetividade em ensaios clínicos com humanos (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Isto é decorrente da dificuldade de validação de modelos experimentais, devido a dados incompletos sobre a correlação dos mecanismos entre a doença em humanos e no modelo animal (MEARS *et al.*, 2015).

Em relação as leishmanioses, o modelo animal escolhido depende da cepa de *Leishmania* a ser utilizada e da manifestação clínica de interesse induzida no experimento. As espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são as principais causadoras da LC no Brasil (BRASIL, 2017). A cepa de *L. amazonensis* apresenta maior facilidade para manutenção em cultura e de infecção experimental quando comparada a *L. braziliensis*, demonstrando o predomínio de seu uso como cepa padrão. Além disso, a *L. braziliensis* apresenta melhor resposta em outros modelos como hamsters (*Mesocricetus auratus*) ou em primatas (CUPOLILO *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* para LC utilizam de forma majoritária, roedores como modelo experimental devido a susceptibilidade aos parasitos apresentada por diversas espécies. Diante disso, o uso de animais *inbred* (colônias produzidas por no mínimo vinte gerações de

cruzamentos consanguíneos) permite a obtenção de resultados mais homogêneos em relação as manifestações vinculadas a variabilidade genética em infecções induzidas experimentalmente. Apesar de não apresentar características idênticas a manifestação da doença em humanos, ainda é o modelo mais apropriado disponível para estudo (MEARS *et al.*, 2015).

O modelo tradicional para cura de lesão de pata ou dorso (testes primários para LC) utiliza camundongos BALB/c ou hamsters *Syrian Golden*; camundongos atímicos ou SCID (camundongos com imunodeficiência combinada grave) são utilizados como modelo primário para LV; e cães (modelo secundário LC e LV) (CRUZ-CHAN *et al.*, 2014; PIRMEZ *et al.*, 1988) e primatas não humanos como modelo terciário para LV (como macaco *Rhesus*) (DE CAMPOS *et al.*, 2010; GAMBOA *et al.*, 2008; GOMES-SILVA *et al.*, 2013; MEARS *et al.*, 2015; RIBEIRO-ROMÃO *et al.*, 2014).

O uso de roedores na descoberta de fármacos para LC permite obter informações sobre a resposta de compostos em um modelo *in vivo* de forma preliminar, sendo os estudos com modelo primata não humano mantidos para os estudos finais de segurança e eficácia (MEARS *et al.*, 2015).

A tabela 7 mostra o levantamento de trabalhos na literatura envolvendo a atividade antileishmania *in vivo* com séries de compostos e algumas informações sobre os protocolos experimentais utilizados.

16.5 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo padrão é de 1×10^6 parasitos/ml injetados por via subcutânea. O principal local de administração do inóculo, em estudos de *screening* de fármacos, é no coxim plantar de camundongos, permitindo o acompanhamento do tamanho da lesão semanalmente e da carga parasitária através da metodologia de diluição limitante. Ainda o inóculo pode ser realizado na base da cauda ou orelha dos roedores, sendo neste último possível o estudo da infecção natural, em que a mesma é induzida por meio de flebotomíneos pelo repasto sanguíneo (MEARS *et al.*, 2015).

16.6 LIMITAÇÕES DO ENSAIO *IN VIVO* PARA LC EXPERIMENTAL

As limitações dos estudos *in vivo* com leishmaniose murina experimental são relacionadas ao longo período de incubação para a observação dos resultados, método invasivo de tratamento, elevado custo (devido ao uso de animais, custo para manutenção, materiais para experimento); presença de inflamação e/ou infecções secundárias que interferem na análise da

eficácia em relação ao tamanho da lesão (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006; MEARS *et al.*, 2015).

Ainda assim, é importante ressaltar que o modelo animal é fundamental para os avanços científicos na área de desenvolvimento de novos fármacos para LC fornecendo resultados preliminares sobre os compostos testados.

Tabela 7. Trabalhos contendo ensaios antileishmania *in vivo* em modelo murino experimental.

Referência	Composto	Protocolo	Modelo experimental	N	Cepa	Inóculo	Via de administração do inóculo	Dose	Tempo de infecção	Tempo de tratamento	Controles	Observação
(CROFT; EVANS; NEAL, 1985)	Plumbagina	in vivo	BALB/c fêmeas	-	<i>L. amazonensis</i> (MPRO/BR/72/M1845;LV78)	-	-	CT: SC 16 mg/kg/15 dias CT: 1% tópica 0,02 mL/15 dias	-	-	-	
(FOURNET <i>et al.</i> , 1992)	Derivados de plumbagina	in vivo	BALB/c /8 semanas fêmeas ou machos	8-10	<i>L. amazonensis</i> (IFLA/ BR/67/PH 8)	10 ⁶ amastigotas obtidas de hamsters infectados	SC no coxim plantar direito	CT: Plumbagina: 10 mg/kg/dia 3,3'-biplumbagina: 50 mg/kg/dia 8,8'-biplumbagina: 50 mg/kg/dia Glucantime®: 400 mg/kg/dia	-	1 vez/ dia / 14 dias	Glucantime®	-
(DA CUNHA-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011)	Naftopterocarpanquinona	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas 6 semanas	6	<i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR/77/LTB0016)	2x10 ⁶	SC no coxim plantar direito	SC, intralesional CT: 15 µg/ Kg/dia CT: IP 4,5 mg/Kg/dia CT: oral 4,5 mg/Kg/dia Glucantime® 17 mg Sb ⁵⁺ /kg/dia	-	1 vez/ dia por 5 dias na semana 85 dias - 105 dias	Glucantime®	DL: pata
(DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2014)	Bis-2-hidroxi-1,4 naftoquinonas substituídas	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas – 6 semanas		<i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR /77/LTB0016)	10 ⁵	SC orelha direita	IP: CT ou Glucantime® a 30 µmol/kg dia	-	28 dias	Glucantime®	Orelha, LNd
(SOUZA-SILVA <i>et al.</i> , 2015)	Epóxi lapachona	In vitro In vivo	BALB/c 6-8 semanas		<i>L. amazonensis</i> MHOM/BR/73/ LTB0016)	10 ⁶	SC no coxim plantar esquerdo	Dorso CT: 0,44, 0,09, e 0,02 mM – 0,5 ml/animal.	-	1 injeção/ dia/1 semana	Glucantime®	DL: pata
(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018)	Derivados de oxirane	In vitro In vivo	BALB/c 5-7 semanas		<i>L. amazonensis</i> MHOM/BR/73/ LTB0016)	10 ⁴	SC no coxim plantar esquerdo	Dorso CT: 22,7 mg Sb(V)/Kg/dia 2,27 mg Sb(V)/Kg/dia 0,23 mg Sb(V)/Kg/dia 11,4 mg/Kg/dia, 1,14 mg/Kg/dia e 0,11 mg/Kg/dia	-	-	Glucantime®	DL: pata
(GONÇALVES-OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019)	Oxiranes e antimoniato de N-metilglucamina	in vivo	BALB/c 5-7 semanas	5	<i>L. amazonensis</i> MHOM/BR/73/ LTB0016)	10 ⁵	SC no coxim plantar esquerdo	SC, C: 0,23 mg Sb(V)/Kg/dia 2,27 mg Sb(V)/Kg/dia 22,7 mg de Sb(V)/Kg/dia CT1: 0,23 mg/kg/dia 2,27 mg/kg/dia 22,7 mg/kg/dia CT2: 0,11 mg/kg/dia	6 semanas	Variado	Glucantime®	DL: pata e LNd

								1,14 mg/kg/dia 11,4 mg/kg/dia				
(SOYER <i>et al.</i> , 2019)	Cloroquinolina	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas	8	<i>L.amazonensis</i>	10 ⁶	SC na base da cauda	SC, C: 5 mg/Kg CT: 1 mg/Kg (50µL)	50 dias	1 vez/ dia por 10 dias	Anfo B	DL: tecido infectado, LNd, baço e fígado
(TAVARES <i>et al.</i> , 2019)	Fluoroquinolina	In vivo In vitro	BALB/c fêmeas	8	<i>L.amazonensis</i>	10 ⁶	SC na base da cauda	SC, C: 5 mg/Kg CT: 1 mg/Kg (50µL)	60 dias	1 vez/ dia por 10 dias	Anfo B	DL: tecido infectado, LNd, baço e fígado
(MENDONÇA <i>et al.</i> , 2019)	Naftoquinona incorporada em pluronic®F127 (sistema micelar)	In vivo	BALB/c fêmeas 8 semanas	10	<i>L.amazonensis</i>	10 ⁷	SC na base da cauda	SC, C: 5 e 10 mg/Kg Ambisome® IV: 2 mg/Kg Anfo B IP: 1 mg/Kg Micela, SC: 10 mg/Kg Salina, SC: 50 µL	50 dias	1 vez/ dia por 15 dias	Anfo B Ambisome®	DL: tecido infectado, LNd, baço e fígado
(SOUSA <i>et al.</i> , 2019)	Cloroquinolina	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas	8	<i>L.amazonensis</i> <i>L. infantum</i>	10 ⁶	SC na base da cauda	SC, C: Anfo B 1 mg/Kg CT: 5 mg/Kg	60 dias	1 vez/ dia por 7 dias	Anfo B	DL: tecido infectado, LNd, baço e fígado
(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2019)	Lapachol	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas 8 semanas	6	<i>L.amazonensis</i>	10 ⁶	SC na base da cauda	CT: 25 mg/kg via oral Anfo B: 5 mg/kg IP PBS: via oral	30 dias	1 vez/ dia por 10 dias	Anfo B	DL: tecido infectado, baço e fígado
(PERALTA <i>et al.</i> , 2021)	Eudragit EPO	in vivo in vitro	BALB/c fêmeas		<i>L.amazonensis</i> MHOM/BR/73/M2269	1-2x10 ⁷	SC na base da cauda	Tópico – gel com 2 mg de CT	5 semanas	2 vezes/dia/5 dias na semana/ 22 dias	-	-
(LOZANO <i>et al.</i> , 2021)	Extrato de <i>Prosopis strombulifer</i>	In vivo	BALB/c machos	6	<i>L.amazonensis</i> (MHOM/VE/84/MEL)	10 ⁵	SC no coxim plantar direito	Oral: C: Glucantime® IP por 30 dias, 400 mg/Kg/dia CT: 150 mg/Kg/dia		10 semanas	Glucantime®	-

Legendas: as referências citadas acima foram pesquisadas na base de dados Web of Science com as palavras: in vivo AND antileishmanial activity. Abreviações: (SC) Subcutânea; (CT) composto teste; (C) controle; (IP) intraperitoneal; (IV) intravenoso; (Sb V): antimoniato de *N*-metilglucamina; (Anfo B) anfotericina B; (DL): diluição limitante; (LNd): linfonodo drenante.

CONSIDERAÇÕES

A leishmaniose cutânea é uma doença que limita as condições de vida dos indivíduos acometidos com características psicossociais e econômicas marcantes. Os fármacos disponíveis para o tratamento apresentam efeitos adversos que limitam a adesão a farmacoterapia. Além disso, existe a resistência dos parasitos associada aos fármacos disponíveis ao tratamento.

Com isso é relevante a busca por desenvolver novos fármacos com atividade antileishmania embora o processo de planejamento e descoberta apresente grandes desafios. Assim é ressaltada a importância de estudos de investigação da atividade pré-clínica *in vitro* e *in vivo* de novos compostos com potencial terapêutico contra as leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S.; THEODOR, O. Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 2, p. 203–226, 1957.
- AGRAWAL, N.; MISHRA, P. The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1309–1344, 2018.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AL-BASHIR, N. T.; RASSAM, M. B.; AL-RAWI, B. M. Axenic cultivation of amastigotes of Leishmania donovani and Leishmania major and their infectivity. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 487–502, 1992.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host | Insight Medical Publishing. **Health Science Journal**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1, 2017.
- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. *et al.* HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 692–697, 2010.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. *et al.* Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 853–882, 2003.
- ANDRADE NETO, V. V. *et al.* Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28846>. Acesso em: 2 mar. 2022.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 64, p. 281–289, 2018.

ARAGAO, H. de B. Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brazil-Medico*. [s. l.], v. 1, n. 11, p. 129–130, 1922.

ARAÚJO, I. A. C. *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 199, p. 67–73, 2019.

ARAUJO, A. R. de *et al.* RISK FACTORS ASSOCIATED WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN AN ENDEMIC AREA OF BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 58, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rimts/a/qW66hyN7B5PNqJKnDkFRLvn/abstract/?lang=en>. Acesso em: 22 mar. 2022.

ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. e202–e264, 2016.

ARULEBA, R. T. *et al.* Can We Harness Immune Responses to Improve Drug Treatment in Leishmaniasis?. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1069, 2020.

BARMADE, M. A. *et al.* Medicinal Chemistry Perspective of Fused Isoxazole Derivatives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 26, p. 2863–2883, 2016.

BATES, P. A. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 215–218, 1994.

BENCHIMOL, J. L. *Em: LEISHMANIOSES DO NOVO MUNDO: UMA RÁPIDA INCURSAO HISTÓRICA. EM: MEDICINA E AMBIENTE: ARTICULACAO E DESAFIOS NO PASSADO, PRESENTE E FUTURO*. 1. ed. Belo Horizonte- MG.: Fino traço, 2019. p. 166–186.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 916–920, 1985.

BHATTACHARYA, A. *et al.* Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 722, 2020.

BOUQUET, M. **Du clou de Biskra**. 1887. Tese de Doutorado. - Faculdade de Medicina de Paris, [s. l.], 1887.

BRASIL, M. da S. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar**. , 2017.

BRENK, R. *et al.* Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 435–444, 2008.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

BUSSOTTI, G. *et al.* Leishmania Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.01399-18>. Acesso em: 22 mar. 2022.

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

CALVO-ÁLVAREZ, E. *et al.* Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e0003666, 2015.

CARIDHA, D. *et al.* Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 11, Includes articles from the special issue “Novel therapies for cutaneous leishmaniasis”, pp. 106 - 179, p. 106–117, 2019.

CARINI, A. Leishmaniose de la muqueuse rhino-bucco-pharyngée. **Bulletin de la Société Pathologie Exotique**, [s. l.], v. 4, n. 5, 1911.

CASSAMALE, T. B. *et al.* Synthesis and Antitrypanosomastid Activity of 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole Analogues of Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 27, p. 1217–1228, 2016.

CHAGAS, E. *et al.* Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade morbida do homem na America do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 32, p. 321–389, 1937.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, [s. l.], v. 11, n. 50, p. 221–222, 1936.

CHAI, Y. *et al.* Complexation of antimony (SbV) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-d-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 99, n. 12, p. 2257–2263, 2005.

CHAWLA, B. *et al.* Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin –Susceptible –Resistant *Leishmania donovani*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. e26660, 2011.

COSTA, E. C. *et al.* Antileishmanial Activity and Structure-Activity Relationship of Triazolic Compounds Derived from the Neolignans Grandisin, Veraguensin, and Machilin G. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 802, 2016.

CROFT, S. Design of treatments for cutaneous and visceral leishmaniasis. **Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica**, [s. l.], v. 149, n. 5, p. 220–224, 2017.

CROFT, S. L.; EVANS, A. T.; NEAL, R. A. The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 651–653, 1985.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 399–410, 2006.

CRUZ-CHAN, J. V. *et al.* A canine model of experimental infection with *Leishmania* (L.) mexicana. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 361, 2014.

CUPOLILO, S. M. N. *et al.* Biological behavior of *Leishmania* (L.) amazonensis isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. **Histology and histopathology**, [s. l.], 2003.

DA MATTA, A. Leishmaniose tropica. **Revista Médica de São Paulo**, [s. l.], n. 13, 1910.

DARLING, S. Autochthonous Oriental sore in Panama. **Trans. Roy Soc trop Med & hig**, [s. l.], v. 4, 1910.

DAS NEVES, A. R. *et al.* Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis: A structure-activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 2004–2012, 2019.

DE ARAÚJO, M. V. *et al.* Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 15180–15195, 2014.

DE CAMPOS, S. N. *et al.* Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 149–154, 2010.

DEANE, L. M. História do Instituto Evandro Chagas. Período 1936-1949. In: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição ciências biológicas e medicina tropical. [s. l.], v. 1, p. 53–67, 1986.

DEANE, L. M. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e Transmissores realizados no estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, [s. l.], p. 82–84, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 419–421, 1954.

DEOTARSE, P. P. *et al.* Drug repositioning: a review. **Int. J. Pharma Res. Rev**, [s. l.], v. 4, p. 51–58, 2015.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 49, n. suppl_1, p. 37–41, 2002.

DNDI, D. for N. D. initiative (DNDi). **2019 R&D portfolio in review: Leishmaniasis**. , 2020.

DNDI, D. for N. D. initiative (DNDi). **Boletim informativo da redeLeish**. , 2019. Disponível em: https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2019/08/informativo_redeLEISH_4_portugues.pdf?x65733.

DNDI, D. for N. D. initiative (DNDi). **Leishmaniasis**. , 2022a. Disponível em: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>.. Acesso em: 15 mar. 2022.

DNDI, D. for N. D. initiative (DNDi). **Leishmanioses**. , 2022b. Disponível em: <https://www.dndi.org/doencas/leishmanioses/>.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 151–159, 2001.

DONOVAN, C. The etiology of one of the heterogeneous fevers in India. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 1401, 1903.

DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DRUZIAN, A. F. *et al.* Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. e0003982, 2015.

DUARTE, M. I. S.; BADARÓ, R. da S. **Leishmaniose visceral: calazar**. 5. ed. Sao Paulo: Atheneu, 2015. (Tratado de infectologia). *E-book*. Disponível em: <https://observatorio.fm.usp.br/handle/OPI/35166>. Acesso em: 22 mar. 2022.

DUTTA, A. K. “Kala-azar in British India” em *The Social History of Health and Medicine in Colonial India*. [s. l.], p. 93–112, 2009.

DUTTA, A. K. “Pursuit of medical knowledge: Charles Donovan (1863-1951) on kala-azar in India”. **Journal of Medical Biography**, [s. l.], v. 16, p. 72–76, 2008.

ESCOMEL, E. La espundia. **Bulletin de la Société Pathologie Exotique**, [s. l.], v. 4, n. 7, 1911.

ESCRIVANI, D. O. *et al.* Nano and Microstructured Delivery Systems for Current Antileishmanial Drugs. *Em*: Berlin, Heidelberg: Springer, 2021. (Topics in Medicinal Chemistry). p. 1–37. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/7355_2021_134. Acesso em: 18 mar. 2022.

EVANS, B. E. *et al.* Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2235–2246, 1988.

FERNANDES, F. R. *et al.* Amphiphilic Antimony(V) Complexes for Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 9, p. 4229–4236, 2013.

FIELD, M. C. *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017.

FLU, P. C. Die Aetiologie der in surinam vorkommender sogenannten “Boschyaws” einder der Aleppobeule analogen Erkrankung. **Centralbl. Bakter Parasit**, [s. l.], v. 6, 1911.

FOURNET, A. *et al.* Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. [s. l.], 1992. Disponível em: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/12471>. Acesso em: 8 mar. 2022.

FRANCO, J.; SCARONE, L.; COMINI, M. A. Chapter Three - Drugs and Drug Resistance in African and American Trypanosomiasis. Em: BOTTA, M. (org.). **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. [S. l.]: Academic Press, 2018. (Neglected Diseases: Extensive Space for Modern Drug Discovery). v. 51, p. 97–133. *E-book*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774318300034>. Acesso em: 2 mar. 2022.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GAMBOA, D. *et al.* Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 319–326, 2008.

GIBSON, M. The identification of Kala Azar and the Discovery of *Leishmania Donovan*. **Medical History**, [s. l.], n. 27, 1983.

GILBERT, I. H. Drug Discovery for Neglected Diseases: Molecular Target-Based and Phenotypic Approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 20, p. 7719–7726, 2013.

GILBERT, I. H.; LEROY, D.; FREARSON, J. A. Finding New Hits in Neglected Disease Projects: Target or Phenotypic Based Screening?. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1284–1291, 2011.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. **Parasitology**, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 771–779, 2013.

GONÇALVES-OLIVEIRA, L. F. *et al.* The combination therapy of meglumine antimoniate and oxiranes (epoxy- α -lapachone and epoxymethyl-lawsone) enhance the leishmanicidal effect in mice infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 10, p. 101–108, 2019.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOURBAL, B. *et al.* Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 30, p. 31010–31017, 2004.

GUALANDI, F. da C. **Medicina tropical no Brasil: Evandro Chagas e os estudos sobre a Leishmaniose visceral americana na década de 1930**. 2013. Mestrado - Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, [s. l.], v. 2011, p. 571242, 2011.

HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 118, n. 10, p. 2743–2752, 2019.

HERAVI, M. M.; ZADSIRJAN, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 72, p. 44247–44311, 2020.

HERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in leishmania mexicana amastigotes. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 197–201, 1987.

HOTEZ, P. A New Voice for the Poor. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. e77, 2007.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014.

IVASIV, V. *et al.* Molecular Hybridization as a Tool for Designing Multitarget Drug Candidates for Complex Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 19, p. 1694–1711, 2019.

JAYASHREE, B. S.; NIKHIL, P. S.; PAUL, S. Bioisosterism in Drug Discovery and Development - An Overview. **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1573406418666220127124228>. Acesso em: 7 mar. 2022.

JOGAS JUNIOR, D. Trópicos, ciência e leishmanioses: uma análise sobre circulação de saberes e assimetrias. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 1051–1070, 2017a.

JOGAS JUNIOR, D. Uma doença americana? A leishmaniose tegumentar e a medicina tropical no Brasil (1909-1927). [s. l.], 2017b.

JOGAS-JUNIOR, D. G. Diagnosticos locais, validacoes globais: a genese da Leishmaniose tegumentar Americana como doenca particularizada da America Latina (1909-1918). Em: Medicina e ambiente: articulacao e desafios no passado, presente e futuro. *Em*: 1. ed. Belo Horizonte- MG: Fino traço, 2019. p. 62–79.

JOULE, J.; MILLS, K. **Heterocyclic chemistry at a glance**. 2. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2013.

KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 157, p. 339–367, 2018.

KILLICK-KENDRICK, R. Oriental sore: an ancient tropical disease and hazard for European travelers. **Wellcome History**, [s. l.], v. 43, 2010.

KIP, A. E. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 31, n. 5, Part 1, p. 693–708, 1994.

KUMAR, K.; JAYAROOPA, P. Isoxazoles: Molecules with potential medicinal properties. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 294–304, 2013.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *Em: THE LEISHMANIASSES IN BIOLOGY AND MEDICINE*. [S. l.]: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1–120.

LAISON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, [s. l.], v. 266, p. 628–630, 1977.

LAMOTTE, S. *et al.* The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0005480, 2017.

LANGEDIJK, J. *et al.* Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1027–1034, 2015.

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

LAVERAN, A.; NATTAN-LARRIER, L. Contribution à l'étude de la espundia. **Bulletin de la Société Pathologie Exotique**, [s. l.], v. 5, n. 3, 1912.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, [s. l.], n. 1, 1903.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LINDENBERG, A. A úlcera de Bauru e seu micróbio: comunicação preventiva. **Revista Médica de São Paulo**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 116–120, 1909a.

LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 252–254, 1909b.

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 1, In Vitro Models for Selection of Development Candidates, p. 3–25, 1997.

LOZANO, E. S. *et al.* Therapeutic effect of *Prosopis strombulifera* (LAM) BENTH aqueous extract on a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411021001012>. Acesso em: 8 mar. 2022.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do genero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 4, p. 84–95, 1912.

MACHADO-SILVA, A. *et al.* New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 247–260, 2015.

MACKEY, T. K. *et al.* Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 949–979, 2014.

MARINHO, F. de A. *et al.* Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 106, p. 507–509, 2011.

MARQUIS, N. *et al.* Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 1690–1699, 2005.

MASON, P. **Tropical diseases: a manual of the diseases of warm climates - Digital Collections - National Library of Medicine**. [S. l.], 1898. Disponível em: https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-101584993-bk?_gl=1*1b94vvh*_ga*MzQ3MjU4MzA1LjE2NDU4MTcwMjE.*_ga_7147EPK006*MTY0NzY0MDcyMi4xLjAuMTY0NzY0MDc0Ni4w*_ga_P1FPTH9PL4*MTY0NzY0MDcyMi4xLjAuMTY0NzY0MDc0Ni4w. Acesso em: 18 mar. 2022.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature (Review). **Biomedical Reports**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 612–614, 2017.

MATOS, A. P. S. *et al.* A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 57, p. 101664, 2020.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MCKERROW, J. H.; LIPINSKI, C. A. The rule of five should not impede anti-parasitic drug development. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 248–249, 2017.

MEARS, E. R. *et al.* A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e0003889, 2015.

MENDONÇA, D. V. C. *et al.* In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, p. 779–787, 2019.

MICHELS, P. A. M. *et al.* Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1763, n. 12, Peroxisomes: Morphology, Function, Biogenesis and Disorders, p. 1463–1477, 2006.

MIRANDA, O. G. Leishmaniasis cutânea. Apresentação de casos. **Rev Cub Med Mil**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 51–54, 2007.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MOFFAT, J. G. *et al.* Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 531–543, 2017.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10066, p. 312–325, 2017.

MONGE, M. C. La leishmaniosis Del dermis em Péru, formas clínicas. [s. l.], n. 589, 1913.

MONTE-NETO, R. L. do *et al.* Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. e1167, 2011.

MOREIRA, J. Le bouton endémique des pays chauds observé à Bahia. **Journal des maladies cutanées et syphilitiques**, [s. l.], n. 10, 1895.

MWENECHANYA, R. *et al.* Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0005649, 2017.

NATTAN-LARRIER, L.; TOUIN ET HECKENROTH, F. Sur un cas de Pian- Bois de la Guyane. Ulcère à *Leishmania* de la Guyane. **Bulletin de la Société Pathologie Exotique.**, [s. l.], v. 2, n. 10, 1909.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 13. ed. Atheneu: [s. n.], 2016.

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

OLIVEIRA, L. F. G. *et al.* Antileishmanial Activity of 2-Methoxy-4H-spiro-[naphthalene-1,2'-oxiran]-4-one (Epoxymethoxy-lawson): A Promising New Drug Candidate for Leishmaniasis Treatment. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 864, 2018.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.

OPAS. **Interactive Atlas of Leishmaniasis in the Americas: Clinical Aspects and Differential Diagnosis**. Pan American Health Organization, , 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275721902>.

OPAS. **Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento.** , 2013. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/PAHO-Guia-Leishmaniasis-Americas-2013-Spa.pdf>.

OPAS. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas.** , 2021b. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: 20 mar. 2022.

OPAS. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas.** OPAS, , 2020a. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.

OPAS. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas.** , 2019.

OPAS. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2020.** , 2020b.

ORTEGA, V.; GIORGIO, S.; DE PAULA, E. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 234–248, 2017.

OSORIO, Y. *et al.* Identification of Small Molecule Lead Compounds for Visceral Leishmaniasis Using a Novel Ex Vivo Splenic Explant Model System. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. e962, 2011.

PALIĆ, S.; BEIJNEN, J. H.; DORLO, T. P. C. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 106459, 2022.

PERALTA, Ma. F. *et al.* Efficacy of topical risedronate and risedronate - Eudragit E complex in a model of cutaneous leishmaniasis induced by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e07136, 2021.

PEREZ-VICTORIA, J. M. *et al.* Multidrug Resistance Phenotype Mediated by the P-Glycoprotein-Like Transporter in *Leishmania*: A Search for Reversal Agents. **Current Drug Targets**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 311–333, 2002.

PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PIMENTA, P. F. P. *et al.* Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to the Sandfly Midgut. **Science**, [s. l.], v. 256, n. 5065, p. 1812–1815, 1992.

PIRMEZ, C. *et al.* Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 52–58, 1988.

PURKAIT, B. *et al.* Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 2012.

RABELLO, E. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 3–31, 1925.

RAO, C. Leishmaniose ulcerosa no Amazonas. **Revista Médica de São Paulo**, [s. l.], n. 7, 1910.

RAYCHAUDHURY, B. *et al.* Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 1–8, 2005.

READY, P. D. Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits?. **Journal of Vector Ecology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 17–22, 2011.

REGUERA, R. M. *et al.* DNA Topoisomerases of *Leishmania* Parasites; Druggable Targets for Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 32, p. 5900–5923, 2019.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2011.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists. **Infectious agents and disease**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 143–152, 1995.

RIBEIRO, J. M.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 683–686, 1986.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. *et al.* Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Concentrations. **Infection and Immunity**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/IAI.02083-14>. Acesso em: 7 mar. 2022.

RIJAL, S. *et al.* Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 597–598, 2003.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, [s. l.], n. 2, 1903.

RUIZ, F. A.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Rapid Changes in Polyphosphate Content within Acidocalcisomes in Response to Cell Growth, Differentiation, and Environmental Stress in *Trypanosoma cruzi**. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 28, p. 26114–26121, 2001.

SANTANA, W. *et al.* Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. e2100336, 2021.

SEIDELIN, H. Leishmaniosis and babesiasis in Yucatan. **Ann Trop Med & Parasit**, [s. l.], n. 6, 1912.

SEIFERT, K. *et al.* In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 850–854, 2011.

SES/MS, S. do E. de S. do M. G. do S. (MS); BOGIANI, P. A.; OLIVEIRA, R. O. **Boletim epidemiológico: Leishmaniose Visceral**. SES/MS, , 2020.

SHAW, C. D. *et al.* Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. e00904-19, 2019.

SHAW, C. D. *et al.* In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: genomic and metabolomic characterization. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 1134–1148, 2016.

SILVA FILHO, A. A. *et al.* In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1307–1310, 2008.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. **Int Rev Cytol**, [s. l.], v. 99, p. 119–207, 1986.

SINAN, S. de I. de A. de N. **Leishmaniose tegumentar americana, casos confirmados e notificados no sistema de informação de agravos de notificação**. Ministério da Saúde, , 2022a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 9 mar. 2022.

SINAN, S. de I. de A. de N. **Leishmaniose visceral, casos confirmados e notificados no sistema de informação de agravos de notificação**. , 2022b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 9 mar. 2022.

SOUSA, J. K. T. *et al.* A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, [s. l.], v. 73, p. 101966, 2019.

SOUZA-SILVA, F. *et al.* Epoxy- α -Lapachone Has In Vitro and In Vivo Anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Effects and Inhibits Serine Proteinase Activity in This Parasite. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 1910–1918, 2015.

SOYER, T. G. *et al.* Evaluation of the in vitro and in vivo antileishmanial activity of a chloroquinolin derivative against *Leishmania* species capable of causing tegumentary and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 199, p. 30–37, 2019.

SPLENDORE, A. Buba-Blastomicosi-Leishmaniosi. Nota sopra alcune affezioni framboesiche osservate in Brasile. **Achiv für Schiffs- und Tropen- Hygiene**, [s. l.], n. 15, 1911.

STRONG, R. P. *et al.* VERRUGA PERUVIANA, OROYA FEVER AND UTA: PRELIMINARY REPORT OF THE FIRST EXPEDITION TO SOUTH AMERICA FROM THE DEPARTMENT OF TROPICAL MEDICINE OF HARVARD UNIVERSITY. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 61, n. 19, p. 1713–1716, 1913.

STUART, K. JCI - Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. [s. l.], v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SUNDAR, S. *et al.* Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Response to 15 Daily versus Alternate-Day Infusions. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 556–561, 2007.

SUNDAR, S. *et al.* Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trialCommentary: cost and resistance remain issues. **BMJ**, [s. l.], v. 323, n. 7310, p. 419–422, 2001.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Em*: MAYERS, D. L. *et al.* (org.). **Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1293–1304. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9_29. Acesso em: 2 mar. 2022.

TAVARES, G. S. V. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial activity of a fluoroquinoline derivate against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 191, p. 29–37, 2019.

TEIXEIRA, M. *et al.* A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 88, n. 11, p. 963–968, 2002.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TIWARI, N. *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 26–41, 2018.

TREFZGER, O. S. *et al.* Design, synthesis and antitrypanosomatid activities of 3,5-diaryl-isoxazole analogues based on neolignans veraguensin, grandisin and machilin G. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 313–324, 2019.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 65–92, 1992.

UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Expression and processing of megasome cysteine proteinases during *Leishmania amazonensis* differentiation. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 332–337, 2002.

UN, T. U. N. **The sustainable development goals report 2020.** , 2020. Disponível em: <https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/goal-01/>.

VALE, E. C. S. do; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 421–428, 2005.

VELEZ LOPES, L. La uta es producida por la Leishmania peruviana. **La Crónica Médica de Lima**, [s. l.], n. 582, 1913.

VIANNA, G. Comunicação ao VII Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, Sessão sobre Leishmaniose Cutânea da Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Archivos Brasileiros de Medicina**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 422–431, 1912.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de Leishmania. **Brazil Médico**, [s. l.], v. 25, p. 411, 1911.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

VOS, S. M. *et al.* All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 827–841, 2011.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature Review**, [s. l.], v. 3, p. 430–440, 2002.

WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A.; STOCKWELL, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 14, n. 3, Molecular Diversity, p. 347–361, 2010.

WHO, W. H. O. **Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases. A roadmap for implementation.** , 2012.

WHO, W. H. O. **Control of neglected tropical diseases.** , 2021. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases>.

WHO, W. H. O. **Ending the neglected to attain the sustainable development goals. A road map for neglected tropical diseases 2021-2030.** , 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332421>.

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis.** , 2022. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 15 mar. 2022.

WIJNANT, G.-J. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole DNDI-0690 in Mouse Models of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 63, n. 9, p. e00829-19, 2019.

WRIGHT, J. Protozoa in a case of tropical ulcer (“Delhi sore”). **The Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 472–482, 1903.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani**. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004.

ZÁLEŠÁK, F.; BON, D. J.-Y. D.; POSPÍŠIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 146, p. 104284, 2019.

ZHANG, K. *et al.* Leishmania salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1566–1578, 2005.

ZHU, J. *et al.* The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 3065–3075, 2018.

ANEXO: CERTIFICADO CEUA (COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL)



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Síntese e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de análogos isoxazólicos derivados de neoliganas sobre *Leishmania spp*”, registrada com o nº 1.071/2019, sob a responsabilidade de **Adriano Cesar de Moraes Baroni** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 6ª reunião ordinária do dia 29/08/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/03/2019 a 15/03/2022
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / BALB/c
Nº de animais	266
Peso/Idade	~ 20g / 4 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	UT-Biotério/UFMS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 06 de setembro de 2019.



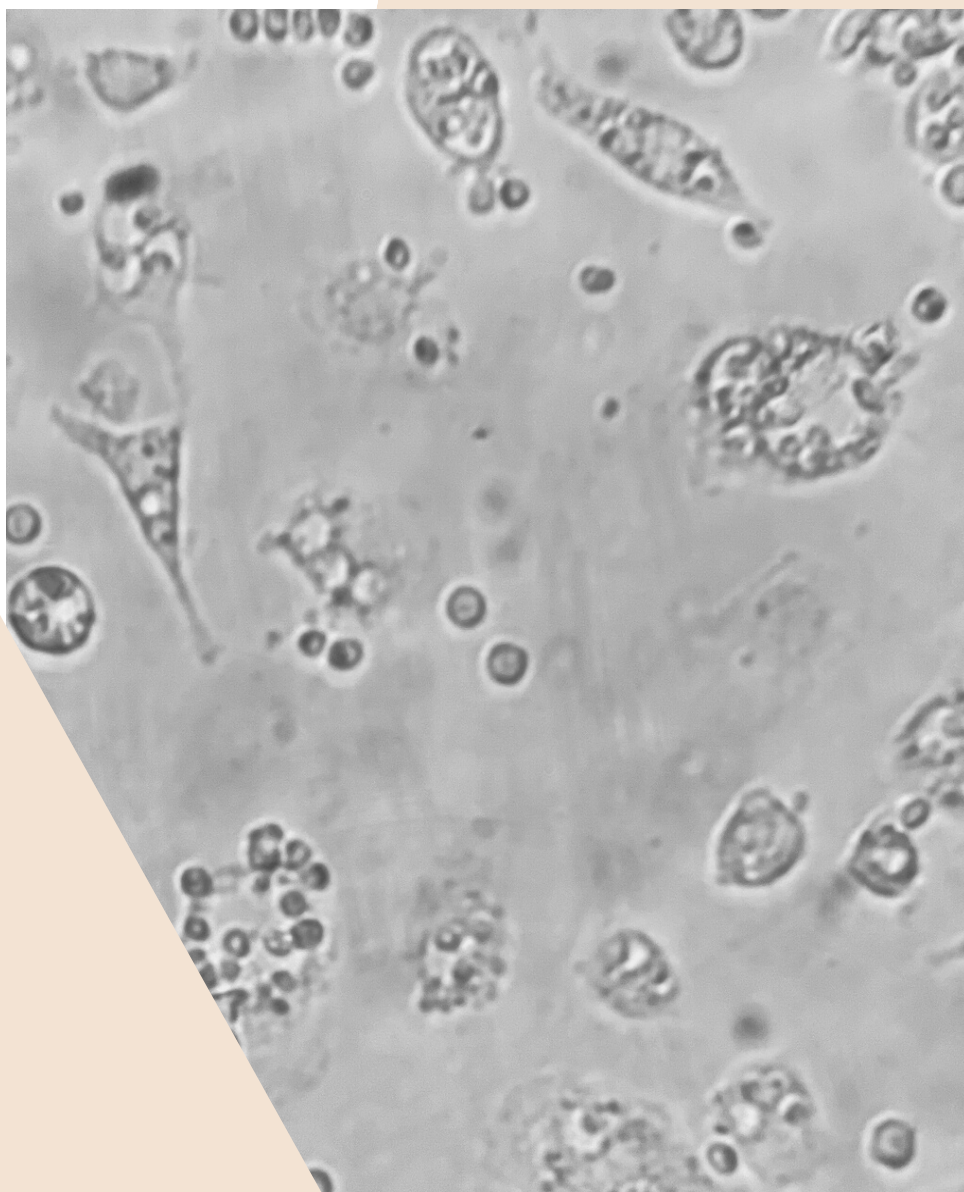
Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Professor do Magisterio Superior**, em 06/09/2019, às 14:42, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

CAPÍTULO 2: ARTIGO 1

CAPÍTULO II

2023

ARTIGO 1



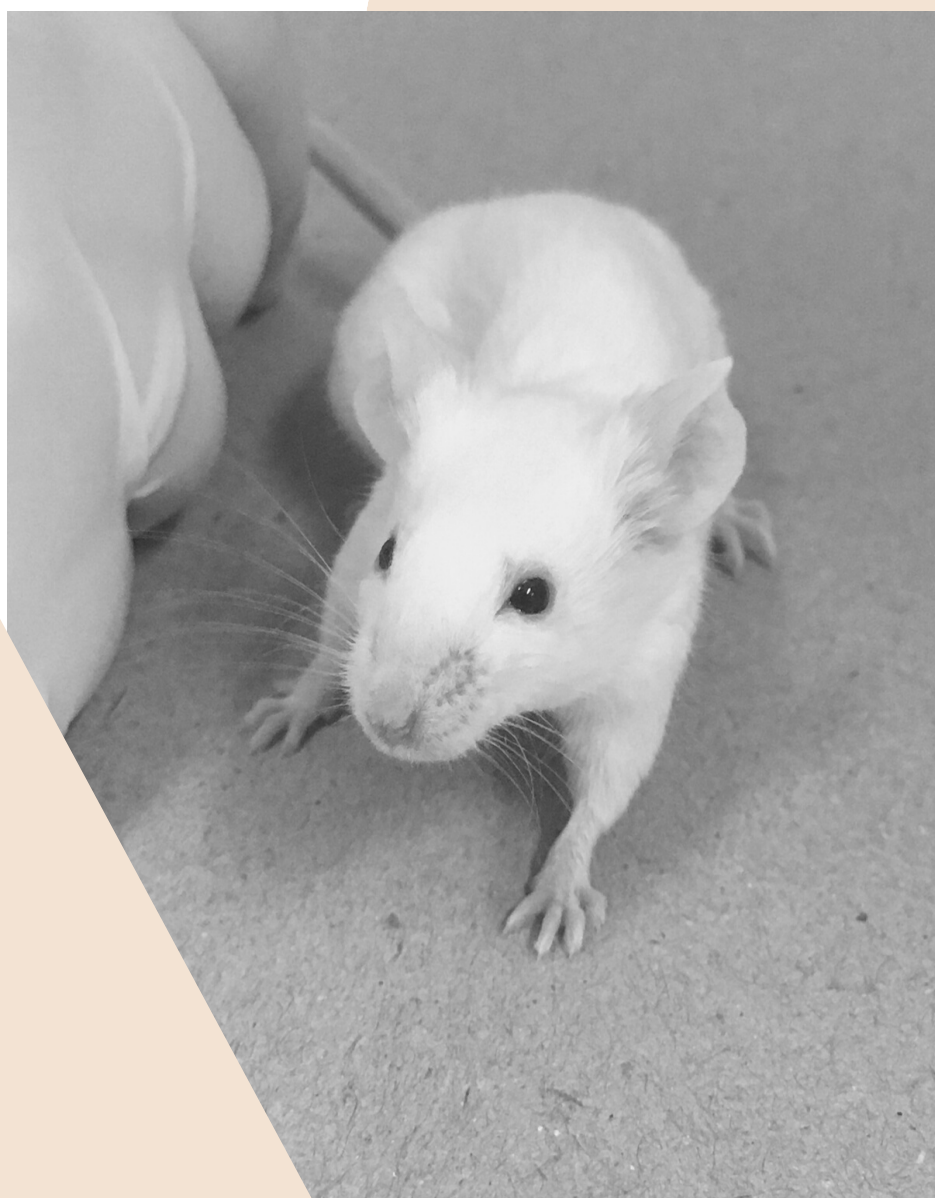
AMARITH RODRIGUES DAS NEVES

CAPÍTULO 3: ARTIGO 2

CAPÍTULO III

JUNHO 2022

ARTIGO 2



AMARITH RODRIGUES DAS NEVES