

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE
FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO PARASITÁRIAS

Andrezza Rodrigues de Souza

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DE UM NOVO SAL ORGÂNICO
DERIVADO DE TRIAZOL EM *Leishmania amazonensis***

Tese de Doutorado

JUIZ DE FORA, MG

13 de março de 2025

ANDREZZA RODRIGUES DE SOUZA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DE UM NOVO SAL ORGÂNICO
DERIVADO DE TRIAZOL EM *Leishmania amazonensis***

Tese de Doutorado do Curso
de Pós- Graduação em
Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Doenças
Infecto- Parasitárias, para
obtenção do Título de Doutora
em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Doenças
Infecto- Parasitárias.

Orientadora:

Dra. Elaine Soares Coimbra

Juiz de Fora,
13 de março de 2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza , Andrezza Rodrigues de .
Estudo da Atividade Antileishmanial de Um Novo Sal Orgânico Derivado de Triazol em Leishmania amazonensis / Andrezza Rodrigues de Souza . -- 2025.
123 p. : il.

Orientador: Prof^a. Dr.^aElaine Soares Coimbra
Coorientadora: Prof^a. Dr.^a. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. Leishmaniose. 2. tratamento. 3. triazol. 4. sal orgânico. 5. apoptose. I. Coimbra, Prof^a. Dr.^aElaine Soares , orient. II. Antinarelli, Prof^a. Dr.^a. Luciana Maria Ribeiro, coorient. III. Título.

ANDREZZA RODRIGUES DE SOUZA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DE UM NOVO SAL ORGÂNICO DERIVADO
DE TRIAZOL EM *Leishmania amazonensis*.**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutora em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia &
Doenças
Infectoparasitárias.

Aprovada em 13 de março de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Elaine Soares Coimbra - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Michele Munk Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Daniela Leite Fabrino

Universidade Federal de São João del-Rei

Profª. Drª. Grasielle de Souza Vieira Tavares

Universidade Federal de Minas Gerais

Juiz de Fora, 11/02/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Soares Coimbra, Professor(a)**, em 14/03/2025, às 07:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Chefe de Departamento**, em 14/03/2025, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Servidor(a)**, em 14/03/2025, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES, Usuário Externo**, em 20/03/2025, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Leite Fabrino, Usuário Externo**, em 03/04/2025, às 08:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2240879** e o código CRC **5C425141**.

Dedico este trabalho
a todos os indivíduos que passam ou
passaram pela experiência de
adoecimento e dor devido à infecção por
leishmania. À medida que os indivíduos
evoluem, também evolui a ciência, em
constante mudanças através de gerações,
em passos lentos, mas com esperança.

Agradecimentos

À minha orientadora, professora Dr^a Elaine Soares Coimbra pela sua dedicação profissional, competência e compartilhamento de seus conhecimentos de uma vida voltada à Ciência, por me abrir as portas de seu laboratório permitindo mais essa etapa no meu desenvolvimento.

Às minhas co-orientadoras Dr^a Luciana R. Antinarelli e Dr^a Rachel R.P.Machado.

Lu, obrigada por gastar seu tempo junto comigo nas bancadas, sua ajuda foi fundamental.

Em especial à minha irmã de alma Rachel R.P.Machado por tudo que você é na minha vida.

Ao meu amigo Ari Lemos, que sempre esteve pronto pra ajudar e é amigo de todas as horas.

À toda a equipe NUPEP que movimenta a máquina com maestria e alegria, vocês são a alma da Universidade.

À nossa querida Cristina, que sempre com muito carinho não poupa esforços para ajudar e desempenha maravilhosamente seu papel profissional, além de ser uma ótima pessoa.

Ao Prof^o Dr. Adolfo Neto pelos incentivos e orientações.

À secretária Fernanda e a coordenadora Prof^a Dr^a Jacy Gameiro.

À CAPES, Fapemig e ao CNPq pelo financiamento.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional.

“...Mas tudo é tão difícil que eu não
vejo a hora disso terminar.....”

(Kiko Zambianchi, 1980)

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas de difícil controle e se apresentam em três formas clínicas: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* spp., sendo transmitidos pelo inseto vetor, flebotomíneo. A quimioterapia atual para leishmaniose enfrenta limitações significativas devido à alta toxicidade, regimes de tratamento prolongados e aumento da resistência do parasita, destacando a necessidade urgente de novas estratégias de tratamentos. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* do sal de derivados de triazol contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como sua citotoxicidade em macrófagos murinos. Além disso, investigar o mecanismo de morte do parasito. A atividade antipromastigota e a citotoxicidade em macrófagos peritoneais foram determinadas pelo método colorimétrico do MTT após 72 horas de tratamento. O efeito antiamastigota foi avaliado em macrófagos infectados com *L. amazonensis* após 72 horas de incubação, corados com Giemsa e contados em microscopia óptica. Os testes para análises do mecanismo de ação foram feitos por meio de diferentes indicadores bioquímicos e celulares de parâmetros de morte celular, por fluorimetria e citometria de fluxo. Adicionalmente, foram analisados a ultraestrutura e a morfologia das promastigotas tratadas com TZDS, em microscopia eletrônica. Os resultados encontrados ressaltaram a importância dos sais de triazóis, pois a forma neutra não mostrou inibição do crescimento do parasita. Porém, o sal derivado de triazol demonstrou índice seletivo promissor (SI = 34,28) e atividade antileishmania ($IC_{50} = 0,13 \mu M$ e $IC_{50} = 2,06 \mu M$ contra formas promastigotas e amastigotas, respectivamente), provando ser mais ativo do que a miltefosina, o medicamento padrão. Em relação ao modo de ação TZDS, este composto induziu alterações mitocondriais significativas no parasita, caracterizadas por um aumento no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), níveis elevados de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) totais e mitocondriais e acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma. O tratamento com sal derivado de triazol também produziu várias alterações ultraestruturais, bioquímicas e celulares nas formas promastigotas, compatíveis com morte celular por apoptose-like, incluindo encolhimento celular e redução no comprimento, bem como exposição de fosfatidilserina no folheto externo da

membrana plasmática e interrupção acentuada do ciclo celular, além de fragmentação de DNA. Apesar do MDC (monodansilcadaverina) positivo e da presença de vacúolos ligados à membrana que se assemelham a estruturas autofagossômicas observadas pela análise TEM, a autofagia não é um processo predominante, com danos mitocondriais graves emergindo como o evento primário que leva à morte do parasito. Esses achados demonstram o potencial antileishmania promissor do sal derivado de triazol, com seu efeito em múltiplos alvos em células de *L. amazonensis*. Além disso, a associação do composto ativo com miltefosina mostrou um efeito aditivo no tratamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis*. No geral, esses resultados destacam o potencial terapêutico do sal avaliado e dão suporte a estudos adicionais para avaliar sua eficácia *in vivo* em um modelo murino de leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose; tratamento; triazol; sal orgânico; apoptose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease that is difficult to control and presents itself in three clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis, caused by more than 20 species of parasites of the genus *Leishmania* spp., transmitted by the insect vector, the sand fly. Current chemotherapy for leishmaniasis faces significant limitations due to high toxicity, prolonged treatment regimens and increased parasite resistance, highlighting the urgent need for new treatment strategies. This study aimed to evaluate the in vitro activity of triazole derivatives against promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, as well as its cytotoxicity in murine macrophages. In addition to investigate the mechanism of parasite killing. antipromastigote activity and cytotoxicity in peritoneal macrophages were determined by the colorimetric MTT method after 72 hours of treatment. The anti-amastigote effect was evaluated in macrophages infected with *L. amazonensis* after 72 hours of incubation, stained with Giemsa and counted by optical microscopy. The tests for analysis of the mechanism of action were performed using different biochemical and cellular indicators of cell death parameters, by fluorimetry and flow cytometry. Additionally, the ultrastructure and morphology of promastigotes treated with TZDS were analyzed by electron microscopy. The results found highlighted the importance of triazole salts, since the neutral form did not show inhibition of parasite growth. However, the triazole-derived salt demonstrated a promising selective index (SI = 34.28) and antileishmanial activity (IC₅₀ = 0.13 μM and IC₅₀ = 2.06 μM against promastigote and amastigote forms, respectively), proving to be more active than miltefosine, the standard drug. Regarding the TZDS mode of action, this compound induced significant mitochondrial alterations in the parasite, characterized by an increase in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), elevated levels of total and mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS), and accumulation of lipid bodies in the cytoplasm. Treatment with triazole salt also produced several ultrastructural, biochemical, and cellular alterations in the promastigotes, consistent with apoptosis-like cell death, including cell shrinkage and reduction in length, as well as exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of the plasma membrane and marked cell cycle arrest, in addition to DNA fragmentation. Despite the positive MDC (monodansylcadaverine) and the presence of membrane-bound vacuoles resembling

autophagosomal structures observed by TEM analysis, autophagy is not a predominant process, with severe mitochondrial damage emerging as the primary event leading to parasite death. These findings demonstrate the promising antileishmanial potential of the triazole-derived salt, with its effect on multiple targets in *L. amazonensis* cells. Furthermore, the association of the active compound with miltefosine showed an additive effect in the treatment of macrophages infected by *L. amazonensis*. Overall, these results highlight the therapeutic potential of the evaluated salt and support further studies to evaluate its in vivo efficacy in a murine model of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; treatment; triazole; organic salt; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de LC e LV (WHO, 2024).....	27
Figura 2 - Estágios morfológicos da Leishmania spp. (A) promastigota; (B) amastigota.....	30
Figura 3 - Morfologia esquemática de promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i> sp. alinhadas ao eixo anterior com estruturas principais indicadas.....	31
Figura 4 - Ciclo de vida da Leishmania spp.....	32
Figura 5 - Flebotomíneos vetores das leishmanioses. (A) <i>Phlebotomus papatasi</i> (ECDC, 2020). (B) <i>Lutzomyia longipalpis</i> (OPAS, 2024).....	33
Figura 6 - Visão geral da contribuição das vesículas extracelulares (EVs) na patogênese da leishmaniose. Na infecção por <i>L. braziliensis</i> , as vesículas derivadas do parasito aumentam a resposta pró-inflamatória ao estimular os macrófagos. Estes aumentam a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α após a infecção. Em quadro de co-infecção, macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> geram vesículas que podem intensificar a resposta imune, agravando a doença.....	37
Figura 7 - Manifestações clínicas mais comuns da LTA: LC (A), LCM (B), LCD (C) e LV (D e E).	44
Figura 8 - Estrutura química da alquilfosfocolina miltefosina de primeira geração e bioisómeros não clássicos racionalizados	56
Figura 9 - Estruturas dos derivados alquil-1,2,3-triazol e seus sais.....	57
Figura 10 - Desenho experimental. Esquema resumido as etapas dos ensaios experimentais. O composto foi testado inicialmente em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e em seguida a citotoxicidade destes compostos foi avaliada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com objetivo de direcionar os testes na em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Através desses resultados podemos calcular o IS do composto e, a partir daí, realizar o estudo do modo de ação em alvos celulares importantes para o parasito.....	59

Figura 11 - Atividade antipromastigota de <i>L. amazonensis</i> do TZDS . Para atividade antipromastigota usou-se a concentração de 2×10^6 células/ml, tratados com TZDS. A expressão dos resultados foi feita pela comparação com o controle sem a adição do composto, em porcentagem de inibição de células viáveis pelo teste colorimétrico do MTT, após leitura em espectrofotômetro (Multiskan) a 570nm. O programa GraFit 5 foi usado para calcular a concentração inibitória (CI ₅₀), que representa a concentração que inibe 50% do crescimento celular. A droga de referência utilizada foi a miltefosina.....	74
Figura 12 - Citotoxicidade do TZDS em macrófagos peritoneais Para o teste de citotoxicidade usou-se a concentração de 2×10^6 células/ml, tratados com TZDS. A expressão dos resultados foi feita pela comparação com o controle sem a adição do composto, em porcentagem de inibição de células viáveis pelo teste colorimétrico do MTT. com leitura em espectrofotômetro (Multiskan) a 570nm.....	75
Figura 13 - Atividade do TZDS em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> . Macrófagos murinos infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> na relação 1:10 (macrófago/parasito), port x tempo de interação. Após o tratamento de 72 horas, as células foram fixadas e coradas com GIEMSA. O efeito antiparasitário do composto foi avaliado a partir da contagem dos amastigotas dentro dos macrófagos, com a contagem de 200 células/lamínula.....	76
Figura 14 - Atividade do TZDS em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> Experimento 1: Macrófagos murinos infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , Microscopia óptica, aumento 100x. Coloração de GIEMSA.	78
Figura 15 - Alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZDS. Promastigotas foram tratadas com 0,13 e 0,26 μ M do TZDS e após 6 horas e 24 horas foram marcadas com JC-1. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria nos pares de filtros de 485/528 nm e 540/600nm.....	80

<p>Figura 16 - Produção de ROS em promastigotas tratadas com o composto TZDS. Os parasitos foram tratados com o composto TZDS nas concentrações de 0,13 e 0,26 μM por 6 horas e 24 horas e os níveis de ROS foi avaliado pela incubação com a sonda fluorescente H₂DCFDA. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fluorímetro de microplacas utilizando os comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. Os valores de intensidade de fluorescência foram expressos como unidade de fluorescência arbitrária (u.a.). H₂O₂ foi utilizado como controle positivo.....</p>	81
<p>Figura 17 - Níveis de superóxido em promastigotas tratadas com TZDS. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> foram tratadas com TZDS (0,13μM e 0,26μM) por 6 e 24 horas a 25 °C. Os parasitas foram então marcados com MitoSOX e a intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorômetro a 540/600 nm de excitação/emissão.</p>	82
<p>Figura 18 - Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto TZDS. Os parasitos foram tratados com o composto com TZDS (0,13 e 0.26μM) por 24h. Miltefosina foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.....</p>	83
<p>Figura 19 - Análise da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZDS. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> foram tratados ou não-tratados com 0,13μM e 0,26μM TZDS durante 24 horas e a exposição de fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a marcação simultânea com as sondas fluorescentes Anexina V-FITC e PI. Em (A) Controle negativo (B) Promastigotas tratadas com miltefosina na concentração de 44μM (controle positivo) (C) Promastigotas tratado com 0,13μM TZDS (D) Promastigotas tratados com 0,26μM TZDS.....</p>	85

Figura 20 - Análise do ciclo celular dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com TZDS. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> foram tratadas com 0,13 e 0,26µM do composto por 24 horas e, em seguida, foram permeabilizadas com etanol 70%, marcadas com PI e o conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo. Um total de 10000 eventos foram analisados. Os histogramas foram obtidos utilizando-se o programa de computador FlowJo Versão 10. (A) Análise do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular (B) Percentual de células em cada fase do ciclo celular.....	87
Figura 21 - Análise da fragmentação do DNA em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com TZDS. Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> foram tratados com TZDS por 24 horas.....	88
Figura 22 - Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto TZDS. Os parasitos foram tratados com o composto com TZDS (0,13 e 0.26µM) por 24 horas e a integridade da membrana plasmática foi avaliada através da marcação com PI.....	89
Figura 23 - Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com TZDS. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> foram tratadas com 0,13µM e 0,26µM do TZDSpor 24 horas e, em seguida foram marcadas com MDC e a intensidade de fluorescência foi quantificada por fluorimetria.....	90
Figura 24 - Determinação dos níveis de ROS em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com TZDS. Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> foram tratados ou não-tratados com diferentes concentrações do composto TZDS por 72 horas e marcados com a sonda fluorescente H ₂ DCFDA. A intensidade de fluorescência foi avaliada por fluorimetria no par de filtro de 485/528nm.	91
Figura 25 - Avaliação da produção de NO em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com TZDS. Macrófagos foram infectados com <i>L. amazonensis</i> e incubados com diferentes concentrações do TZDS. Após 72 horas, os níveis de nitrito foram quantificados pelo método de Griess. Estímulo = Como controle positivo:macrófagos infectados e estimulados com LPS + INF-γ.	92

- Figura 26 - Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a 0,13 μ M em promastigotas de *L. amazonensis*. a) Controle demonstrando parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Interação com o solvente orgânico DMSO, sem alterações na morfologia dos parasitos..... 93
- Figura 27 - Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a 0,13 μ M em promastigotas de *L. amazonensis*. a) Células exibindo várias alterações visíveis. Vacúolos (seta) contendo material amorfo, vacúolos com perfis membranosos (ponta de seta preta) e um grande vacúolo (asterisco) no centro contendo estruturas membranosas e material amorfo são observados. Gotículas lipídicas densas em elétrons (LD) também estão presentes. (b, c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar (FP) são evidentes. O núcleo parece não afetado. Em (c), o cinetoplasto é observado dentro de uma mitocôndria alterada. (d) Mitocôndrias inchadas (estrela) foram visualizadas. (e) Em maior ampliação, um grande vacúolo contendo vacúolos menores com perfis membranosos (ponta de seta preta), assemelhando-se a um autofagossomo, foi observado..... 94
- Figura 28 - Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a 0,26 μ M em promastigotas de *L. amazonensis*. (a) Vacúolos (seta) contendo material amorfo e gotículas lipídicas elétrons-densas do inglês lipid droplets (LD) foram observados. Numerosos perfis reticulares e vacúolos agrupados (dentro do quadrado) também são evidentes. (b) O cinetoplasto está localizado dentro de uma mitocôndria danificada. Parece haver uma associação entre vacúolos menores e um vacúolo maior, com diferenças estruturais observadas onde as membranas das duas organelas estão em estreita proximidade (ponta de seta branca). Vacúolos com perfis membranosos (ponta de seta preta) também estão presentes. (c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar, flagellar pocket (FP) são evidentes. (d, e, f) Além das alterações descritas anteriormente, perfis membranosos na superfície externa de diferentes células (estrela) foram observados..... 95

Figura 29 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Promastigotas de *L. amazonensis*. tratadas com TZDS (a) Controle demonstrando diferentes parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Interação com o solvente orgânico DMSO, sem alterações na morfologia dos parasitos. (c, d) Efeito do TZDS em 0,13µM. Células com morfologia arredondadas (seta) e com leve rugosidade na membrana. (e, f) Efeito do TZDS em 0,26µM. Note o brotamento de estruturas semelhantes a vesículas (cabeça de seta) em diferentes regiões do corpo do parasito..... 98

Figura 30 - Resumo esquemático dos resultados para pesquisa de mecanismos de ação do composto TZDS. Nas concentrações (0,13 e 0.26µM) 1x e 2x IC₅₀, houve surgimento de corpúsculos lipídicos, hiperpolarização de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA, formação de vacúolos autofágicos, aumento da produção de ROS, parada do ciclo celular, exposição de fosfatidilserina..... 105

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais espécies <i>Leishmania</i> encontradas em humanos. Adaptado de WHO (2010).....	46
Quadro 2 - Resumo dos medicamentos utilizados para as leishmanioses.....	54
Tabela 1 - Valores IC ₅₀ em promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , CC ₅₀ em macrófagos e o índice de seletividade do TZDS...	77
Tabela 2 - Determinação da concentração inibitória fracionárias (FICs) e classificação da natureza da interação: ^a CI ₅₀ = Concentração inibitória para 50% do crescimento parasitário. ^b FIC ₅₀ = Concentração inibitória fracionária para 50% do crescimento parasitário. ^c ΣFIC ₅₀ = soma dos FICs. Associação do TZDS com a miltefosina em diferentes proporções (4:1, 3:2, 2:3 e 1:4). Os resultados obtidos a partir de 3 experimentos independentes em duplicata. A média geral ΣFIC classifica a natureza da interação em: sinergismo, (ΣFIC ≤ 0,5), aditivo (ΣFIC entre > 0,5 e ≤ 4) e (antagonismo ΣFIC > 4).....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AmfB	Anfotericina B
AmfD	Anfotericina deoxicolato
AmfL	Anfotericina lipossomal
ATP	Adenosina trifosfato
APCS	Do inglês: <i>Antigen Presenting Cells</i>
BHI	Do inglês: <i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
BOD	Do inglês: <i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda bioquímica de Oxigênio)
CC50	Concentração Citotóxica para 50% da população de células
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CDC	Do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CI50	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular
DCF	2', 7' – diclorofluoresceína
DMSO	Dimitelsulfóxido
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EUA	Estados Unidos da América
FCCP	Carbocianeto-4-(trifluorometoxi)-Fenilhidrazona
FICS	Concentração Inibitória Fracionada
Gp63	Glicoproteína 63
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ DCFD	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
IL	Interleucina
IS	Índice de seletividade
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCPC	Leishmaniose cutânea pós calazar

JC-1	5,5-,6,6-tetrachloro-1,1_,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
Log	Logarítimo
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MDC	Monodansilcadaverina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MM	Massa molecular
MTK	Mitotracker
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mTOR	Do inglês: mammalian target of rapamycin
Mr	Receptor de manose
O_2^-	Superóxido
OH^\cdot	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das nações unidas
OPAS	Organização Pan Americanas de saúde
PBS	Do inglês: <i>Phosphate buffer Solution</i> (Solução tampão de fosfato)
P-gp	Glicoproteína – P
pH	Potencial de hidrogeniônico
RNA	Do inglês: <i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	Do inglês: <i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
Sb (III)	Antimonial trivalente
Sb(V)	Antimonial pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema de informações de notificações e agravos

SUS	Sistema único de saúde
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling
TZD	1,2,3-triazole Triazol Derivative
TZDS	triazole-derived salt
TGF- β	Do inglês: <i>Transforming Growth Factor</i> – β (Fator de crescimento transformador - β)
Th	Do inglês: T helper
TLR 4	Do inglês: <i>Toll Like Receptor 4</i> (Receptores semelhantes a Toll - 4)
TS2	Dissulfeto de tripanotiona
T(SH)2	di-hidrotripanotiona
WHO	World health organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Epidemiologia	26
1.2 O parasito <i>Leishmania</i> spp.....	29
1.3 Patogêneses.....	34
1.4 Mecanismo de morte em <i>Leishmania</i> spp.....	38
1.6 Manifestações Clínicas das leishmanioses.....	42
1.7 Diagnóstico das leishmanioses.....	47
1.8 Tratamento das Leishmanioses.....	49
1.9 Sais Orgânicos.....	54
2 OBJETIVOS	57
2 1 Objetivo geral.....	57
2 2 Objetivos específicos.....	57
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1.1 Obtenção e diluição dos compostos	60
3 1 2 Cultivo dos parasitos.....	60
3.1.3 Manutenção da infectividade das cepas.....	60
3.1.4 Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	61

3.1.5 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	62
3.1.6 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L.amazonensis</i>	62
3.1.7 Determinação do índice de seletividade (IS).....	63
3.1.8 Efeito da associação do TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com <i>L.amazonensis</i>	64
3.1.9 Determinação das concentrações inibitórias fracionária (FICs) e classificação da natureza da interação	65
3.2 Ensaio de modo de ação do composto TZDS sobre promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	65
3.2.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com os TZDS.....	65
3.2.2 Avaliação dos níveis da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas e amastigotas tratadas com o composto selecionado.....	66
3.2.3. Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas e amastigotas tratadas com o composto TZDS.....	67
3.2.4 Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	67
3.2.5 Avaliação do ciclo celular em promastigotas e amastigotas de <i>L.amazonensis</i> PH8 tratadas com TZDS.....	68
3.2.6 Avaliação da exposição da fosfatidilserina em promastigotas de <i>L.amazonensis</i> PH8.....	68
3.2.7 Avaliação da formação de vacúolos autofágicos.....	68
3.2.8 Quantificação dos níveis de ROS em macrófagos murinos infectados com <i>L.amazonensis</i>	69
3.2.9 Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas de <i>L.amazonensis</i> tratadas com TZDS.....	69

3.2.10 Análise ultraestrutural dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com TZDS por Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura (MET e MEV).....	71
3.3 Análise Estatística.....	72
4 RESULTADOS	72
4.1.1 Estudos <i>in vitro</i> da atividade antileishmanial e da citotoxicidade de TZDS em células de mamíferos	72
4.1.2 Estudos do modo de ação antileishmanial de TZDS.....	79
4.1.3 Análise morfológica em Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.....	92
4.1.4 Estudos da associação do TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	97
5 DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXO I	122
ANEXO II	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As leishmanioses são um conjunto de manifestações clínicas infecciosas, não contagiosas, causadas por espécies de protozoários unicelulares, flagelados, da família *Trypanosomatidae*, parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* spp., transmitidos por insetos e que acometem mamíferos domésticos e silvestres, além do homem (Gurel; Tekin; Uzun, 2020).

Epidemiologicamente, as leishmanioses estão em 99 países, em todos os continentes. sendo as áreas de maior risco (Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria). (WHO, 2025). Estando entre as doenças tropicais negligenciadas (neglected tropical disease - NTD) e de difícil controle, a estimativa é de 60-90 mil novos casos por ano, mesmo com subnotificações o número de infectados anual pode chegar a aproximadamente 1,7 milhões, desses uma porcentagem adoecem e entre 20-30 mil evoluem a óbito, principalmente quando não tratados (WHO 2024).

Em relação ao continente Americano, as leishmanioses são prevalentes em 18 países, distribuída desde o Sul do Estados Unidos até a Argentina, disseminada principalmente em países tropicais e subtropicais, no Brasil está presente em quase todos os estados, o Ministério da Saúde registra uma média de 21 mil novos casos de LTA e 3.500 mil novos casos de LVA, com aumento da letalidade de 7,1% em 2012.e 31% em 2020 (Brasil, 2024) A figura 1 ilustra a distribuição da leishmanioses tegumentar e visceral mundialmente (OPAS, s.d., WHO, 2024).

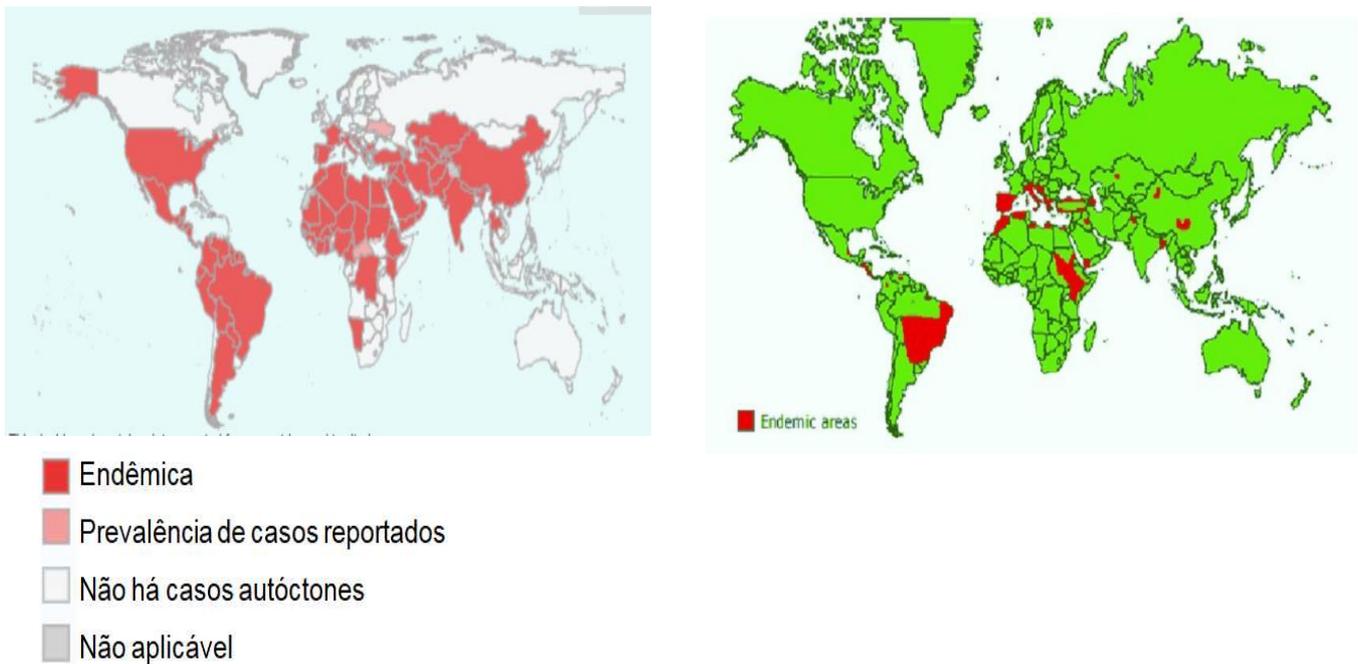


Figura 1: À esquerda encontra-se ilustrada a distribuição da Leishmaniose Tegumentar (modificada de WHO, 2024). À direita encontra-se ilustrada a Distribuição da Leishmaniose visceral (WHO 2003) com áreas endêmicas marcadas em vermelho.

Dos dois grandes grupos de manifestações clínicas das leishmanioses, a tegumentar é a mais frequente, e nas Américas é registrada desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina – exceto Chile e Uruguai – com aproximadamente 13.000 casos no Brasil em 2023, estando a maioria concentrada na região Norte do país, especialmente no Pará (Brasil, [S.D.] a; Brasil, [s.d.] b). Por sua vez, 90% dos casos de leishmaniose visceral registrados na América Latina ocorrem no Brasil, com 1.567 casos registrados em 2023, sendo a maioria concentrada na região Nordeste, especialmente Maranhão e Ceará (Brasil, [s.d.] c; Brasil, [s.d.] d). Ressalta-se também que nas últimas décadas tem sido observado aumento da letalidade de 4% ao ano (Cota, 2021); sendo que um dos fatores apontado como aumento do índice de letalidade para LV é a baixa escolaridade, o que implica em baixo nível socioeconômico e difícil acesso ao sistema de saúde. Cria-se, portanto, um círculo vicioso entre a doença e a pobreza (Okwor e Uzonna, 2016).

Descrita como uma deficiência brasileira por profissionais de saúde

pública no Brasil, as informações epidemiológicas são feitas por uma coleta de dados ineficiente, conseqüentemente não produzem fundamentação para tomada de decisões em saúde pública. Além de deixar de mapear a distribuição e não acompanhar a evolução da doença, o que permitiria apontar o surgimento de resistência parasitária, melhorando a biovigilância pelos profissionais de saúde envolvidos na luta contra as doenças negligenciadas (Brasil, [s.d.]; Herwaldt, 1998; Simon, 2012;).

É relevante considerar as implicações sociais dessa doença que, além do estigma social produzido pelas manifestações clínicas, causa também a perda de 1,6 milhões de DALYs (*Disability-Adjusted Life Years*) (Vos *et al.*, 2020). Um DALY representa a perda do equivalente a um ano de saúde plena. Os DALYs para uma doença ou condição de saúde são a soma dos anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura e dos anos vividos com incapacidade devido a casos prevalentes da doença ou condição de saúde numa população (WHO, 2024).

Observa-se desde 1980, uma expansão das leishmanioses na distribuição geográfica, de pontos focais em regiões rurais para uma urbanização, que se associa à pobreza, pelas condições de moradia que facilitam o desenvolvimento do inseto vetor ou pela má nutrição, o que favorece o desenvolvimento das manifestações clínicas e sua gravidade. (Alvar, Yactayo e Bern, 2006; Vos *et al.*, 2020, Werneck, 2007).

A doença onera famílias financeiramente, contribuindo para a pobreza dos indivíduos acometidos. Embora a terapêutica das leishmanioses frequentemente seja oferecida gratuitamente pelo sistema público de saúde em países emergentes, a maioria dos doentes reside em áreas de difícil acesso a esses serviços, o que demanda o empenho de suas reservas para arcar com o tratamento e aumenta as chances de abandono do tratamento, contribuindo também para o desenvolvimento de formas resistentes e novas disseminações (Alvar, Yactayo e Bern 2006; Montaner-Agoiti, Llobat, 2023). Além disto, a medicação atualmente disponível é limitada a poucos fármacos, os quais apresentam efeitos colaterais graves e contra-indicações, dificultando ainda mais o controle das leishmanioses.

Evidências pré-históricas, analisadas por biologia molecular, relatam a existência das leishmanioses através de amostras arqueológicas, e permitem identificar e estimar a origem do parasito *Leishmania* spp e seus ancestrais desde o período Pré-Cambriano. A datação pela paleoparasitologia relaciona a história evolutiva do parasito com seus vetores e seus hospedeiros, gerando teorias mais plausíveis e também melhorando a análise filogenética. O encontro das duas formas parasitárias amastigotas, além das promastigotas em ambar confirmam o ciclo de vida digenético e ainda a relação com os hospedeiros. Alguns poucos relatos históricos de feridas semelhantes às encontradas nas leishmanioses e a presença de DNA mitocondrial de leishmania em múmias egípcias confirmam a existência das leishmanioses desde as primeiras migrações humanas (Novo, 2016; Steveriding, 2017).

Associada a fatores sociodemográficos, tais como, deslocamento populacional, crescimento urbano desordenado, superpopulação, falta de assistência médica, baixa renda e má nutrição (Sasidharan and Saudagar, 2021; WHO, 2023). Também, tem merecido destaque as mudanças climáticas derivadas das ações humanas no planeta, visto que as doenças transmitidas por insetos foram as que mais se elevaram entre as doenças infecto-parasitárias (Mendes *et al.*, 2016).

Ameaças emergente e outros agravantes, no aumento da importância das leishmanioses e da gravidade de casos, incluem-se a tendência à urbanização das infecções, a imunossupressão ou imunocomprometido associada ou não a co-infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV), a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) a ausência de vacinas eficazes para humanos, a resistência parasitária em algumas regiões, mudanças climáticas, a permanência de hospedeiros infectados não tratados, sobretudo cães (Sasidharan and Saudagar, 2021).

1.2 O parasito *Leishmania* spp

O parasito *Leishmania* spp. pertence ao Reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. Apresenta ciclo de vida dimórfico e heteroxênico. Durante a alternância entre o hospedeiro invertebrado e o hospedeiro vertebrado, o parasito desenvolve-se no intestino do inseto vetor apresentando o estágio morfológico denominado promastigota, evoluindo de um estágio não-infectivo (fase logarítmica de crescimento) para outro altamente infectivo (fase estacionária, metacíclica); já no hospedeiro vertebrado, no citoplasma das células fagocíticas de mamíferos, dentro do vacúolo parasitóforo, desenvolve-se e apresenta o estágio morfológico denominado amastigota (Figura 2A e B) (CDC, 2024).

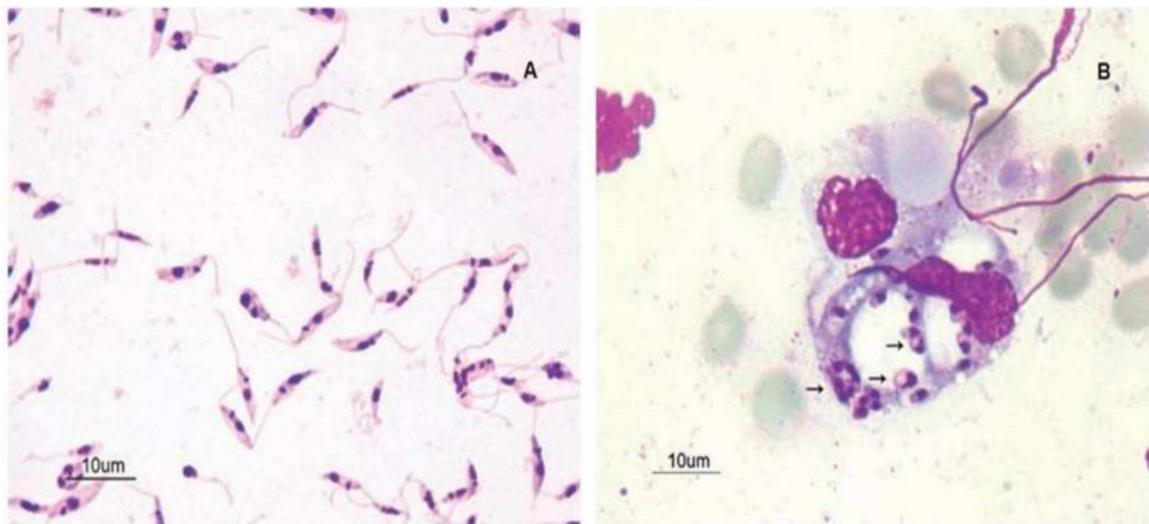


Figura 2- Estágios morfológicos de *Leishmania*. (A) promastigota; (B) amastigota. Fonte: OPAS (2024).

Os dois estágios morfológicos retêm a mesma configuração celular básica de outros microrganismos unicelulares, entretanto, apresentam o cinetoplasto, característica da Classe Kinetoplastida. O cinetoplasto é uma região da mitocôndria, única e ocupa parte do corpo celular do parasito, onde se encontra uma grande massa de DNA extranuclear que corresponde a 30% do DNA do parasito

denominado de DNA mitocondrial ou DNA do cinetoplasto (kDNA) (Fidalgo e Gille, 2011). Sua localização é anterior ao núcleo e ao flagelo, o qual faz parte do corpo basal (Figura 3).

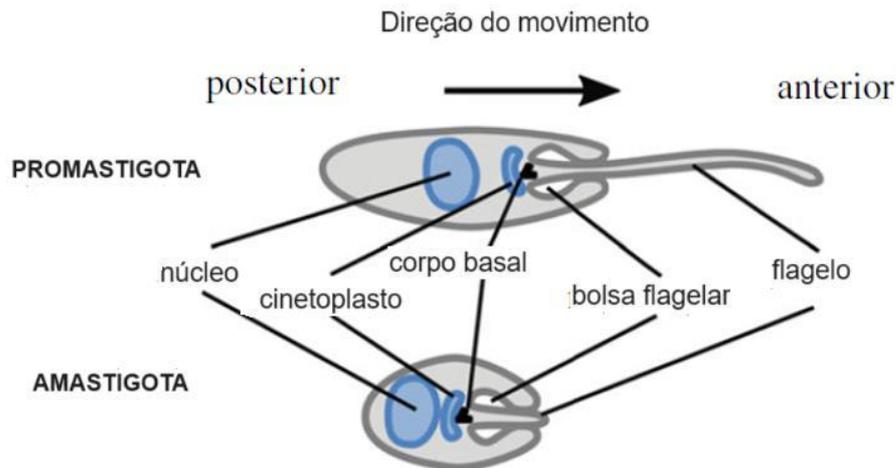


Figura 3- Morfologia esquemática de promastigota e amastigota de *Leishmania* sp. alinhadas ao eixo anterior com estruturas principais indicadas. Adaptado de Sunter e Gull (2017).

A forma amastigota é pequena, com 3-5 μm , arredondada e apresenta um flagelo curto e internalizado na bolsa flagelar (Dostálová e Volf, 2012). Já a promastigota metacíclica, forma infectante para os mamíferos, mede de 5 a 8 μm , é alongada, com um flagelo longo e livre, o qual confere intenso movimento a este estágio biológico (Bates e Rogers, 2004).

Com grande diversidade de espécies, quantidade indefinida e análise filogenética controversa, as espécies são morfologicamente indistinguíveis, e o gênero *Leishmania* é constituído por um grupo monofilético composto por três subgêneros *L.(Leishmania)*, *L.(Viannia)* e *L.(Sauroleishmania)* (Fraga *et al.*, 2010). Para os taxonomistas, a distinção entre as espécies em *Leishmania* spp é complicada e a filogenia molecular deve ser associada a estudos de genética de população, uma abordagem sistemática incluindo análises multilocus constitui uma

forma de estudos taxonômicos de *Leishmania* (Cupolillo, 2014).

Independente da espécie de *Leishmania*, o ciclo biológico é alternado entre dois hospedeiros: o hospedeiro invertebrado, inseto vetor e o hospedeiro vertebrado, o qual inclui mamíferos, dentre eles o ser humano. As fêmeas do hospedeiro invertebrado são infectadas, no momento que ingerem sangue de mamíferos contendo as amastigotas. No ambiente intestinal do inseto as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas com alta capacidade de replicação e, por metaciclogênese, essas promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas, conforme o esquematizado na figura 4, com flagelo maior que o apresentado anteriormente, as quais migram para a probóscida do inseto, podendo infectar outros mamíferos a partir de novo repasto sanguíneo (Granato, 2024).

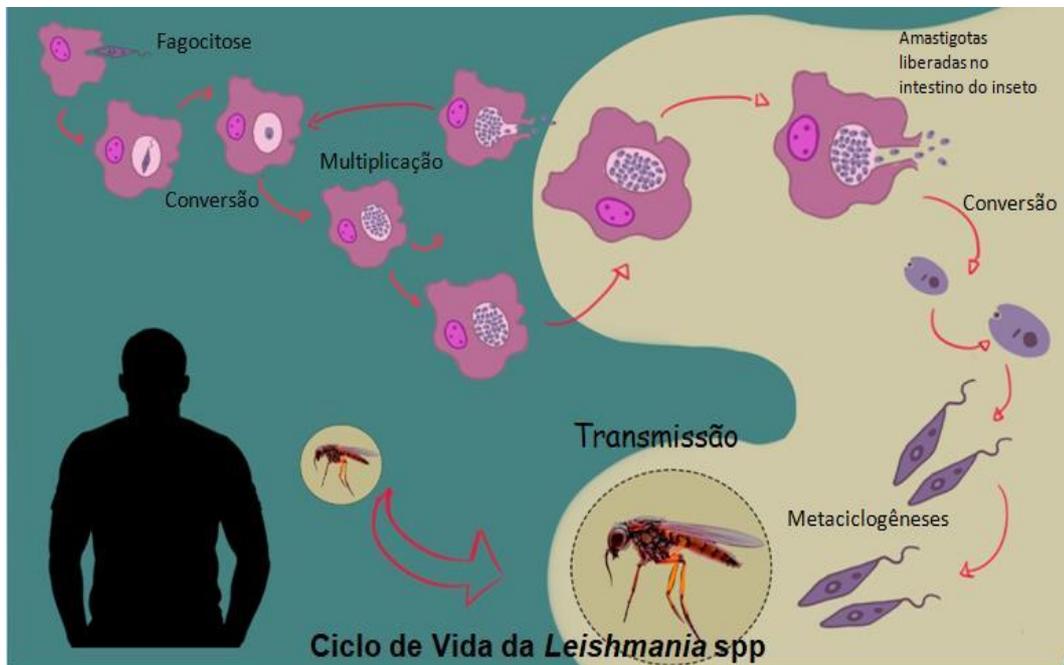


Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Fonte: própria autora, digitalizado por Guilherme Rodrigues (2025).

A infecção tem início a partir da inoculação do parasito na pele do hospedeiro vertebrado pelas fêmeas de flebotomíneos (inseto vetor ou transmissor),

sendo esse também o hospedeiro invertebrado (CDC, 2024). Há uma relação de preferência pelo tipo de hospedeiro quanto a obtenção de sangue entre algumas espécies de flebotomíneos, sendo que outras não apresentam preferência. Também é observada uma relação de preferência pelo tipo *Leishmania* spp em relação à espécie de flebotomíneos (Hall, 2020; Mcconville, 2007).

Os flebotomíneos são os vetores naturais da *Leishmania* spp, pertencendo a Ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), conhecidos no Brasil como “mosquito-palha”, “cangalha”, “birigui” ou “mosquito pólvora”. São pequenos (menores que 3 mm), de cor castanho-claro, corpo coberto com pêlos longos e finos e asas lanceoladas (Figura 5). Com voo curto, silencioso e em pequenos pulos, com atividade crepuscular e noturna (Bates e Rogers, 2004; OPAS, 2024). Tanto fêmea quanto macho se alimentam de fontes naturais de açúcares, vegetais como néctar, melado ou frutas, porém as fêmeas adultas, se alimentam também de sangue. O açúcar é fonte energética para o parasito e afeta seu desenvolvimento dentro do trato digestivo do inseto. As espécies tropicais do inseto completam seu ciclo de vida durante todo o ano, e o processo de reprodução pode ocorrer pela deposição de ovos em ambientes úmidos ricos em matéria orgânica, não necessitando de água. O controle de vetores é considerado uma das estratégias fundamentais para redução das leishmanioses (OPAS, 2024).

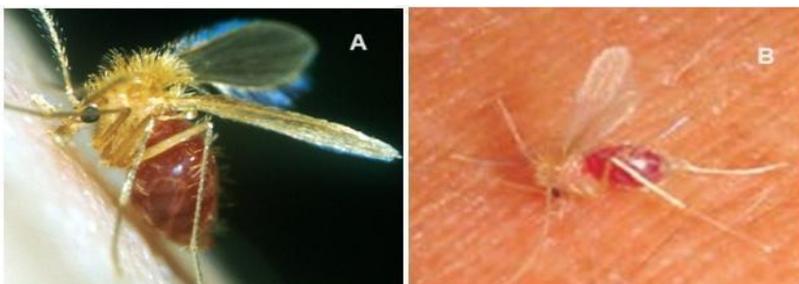


Figura 5- Flebotomíneos vetores das leishmanioses. (A) *Phlebotomus papatasi* (ECDC, 2020). (B) *Lutzomyia longipalpis* (OPAS, 2024).

A saúde ambiental está diretamente relacionada com a disseminação do

vetor, mudanças climáticas como inundações e aumento de temperaturas otimizam o processo de reprodução do inseto. Além disso, a introdução de animais infectados e não tratados combinam fatores como alta densidade de vetores e de picadas, condições estas encontradas em áreas endêmicas (ECDC, 2024) .

1.4 Patogênese

Após a inoculação do parasito, transpassando a barreira epidérmica, as promastigotas metacíclicas e as substâncias pró-inflamatórias contidas na saliva do vetor, desencadeiam no local, uma resposta inflamatória aguda, com envolvimento de fatores séricos e células da resposta imune inata (Berman *et al.*, 1981; Podinovskaia e Descoteaux, 2015).

A interação inicial entre parasito e sistema imune do hospedeiro vertebrado é um momento crucial, as promastigotas extracelulares poderão ser destruídas no local pela resposta imune inata resultando na resolução da infecção, ou progredirem se ligando a quaisquer células que expressem receptores para o reconhecimento de glicoproteínas (gp) e glicolipídios na membrana plasmática do parasito, primeiramente os granulócitos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) residentes ou os quimio atraídos, sendo a fagocitose portanto, o principal mecanismo de endocitose via pseudópodes, apesar de já terem sido descritos vias não fagocíticas (Podinovskaia e Descoteaux, 2015; Sunter, 2017).

Os macrófagos, fagócitos profissionais, são as principais células hospedeiras para a *Leishmania* e uma gama de receptores podem levar ao englobamento de promastigotas, por interações diretas ou indiretas (Berman *et al.*, 1981) tais como receptor endocítico de manose, receptor de lectina do tipo C, membros da família do receptor Toll-like ou ainda vias opsonização, com envolvimento de C3 e C3bi – CR1 e CR3, fibronectina e proteína C reativa também participam do processo de fagocitose de promastigotas (Roy *et al.*, 2014;

Podinovskaia e Descoteaux, 2015).

A interação do flagelo do parasito com o macrófago libera fatores de sobrevivência intracelular e modulam a biogênese do fagossomo, inibindo fatores pró-inflamatórios, como descrito por Podinovskaia e Descoteaux, 2015, além da conversão de promastigotas em amastigotas, adaptativamente, as leishmanias, previnem-se da fusão dos lisossomas ao vacúolo fagocítico, retardam a maturação do fagossomo, ganhando tempo para a conversão em amastigotas, sendo estas, mais resistentes às hidrolases ácidas. Adicionalmente, desenvolveram mecanismos enzimáticos de evasão, se protegendo dos danos causados pelo intenso metabolismo oxidativo, de produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) a triparedoxina, a tripanotiona redutase e a triparedoxina peroxidase desempenham um papel na defesa contra agentes químicos e estresse oxidativo, reduzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os hidroperóxidos à água e álcool. Mantendo baixos os níveis de H_2O_2 e diminuindo o estresse oxidativo (kumar *et. al*, 2019; De Muylder, 2011).

Neste sentido, as superóxidos dismutase e suas isoformas (SOD) produzidas pelo parasito, também conferem defesa aos antioxidantes, convertendo os superóxidos O_2^- - em oxigênio e H_2O_2 , esses mecanismos enzimáticos também estão relatados como mecanismos moleculares de resistência aos fármacos (Moncada-Dias, 2024).

Já a imunomodulação induzida pelo parasito, pode ocorrer pela perturbação da via mTOR, uma via central de regulação de diversos processos metabólicos, essa alteração induz um estado anti-inflamatório nos macrófagos por diminuir a produção de interleucina 12 (IL-12), ROS e óxido nítrico (NO) e aumentar a produção de IL-10 e TGF-beta (Kumar *et. al*, 2019).

Outros artifícios para a subversão de respostas do hospedeiro e estabelecimento de um ambiente favorável à leishmania, incluem: (i) as alterações na conformação de MHCII dificultando o reconhecimento de células T, (ii) adiamento

do processo de indução de apoptose do macrófago, (iii) modulação do processo de migração do macrófago, (iv) e o sequestro de nutrientes em suprimento de suas necessidades (Mesquita, 2020). Além disso, em estudo revisional recente, foi destacado o papel das vesículas extracelulares no processo de escape do protozoário às respostas do hospedeiro humano (Pinheiro *et. al*, 2024).

As vesículas extracelulares desempenham um papel crucial na evasão da *Leishmania* do sistema imunológico do hospedeiro, carregando cargas como GP63 (a leishmanolisina, uma protease presente na superfície do parasito, capaz de hidrolisar proteínas próprias e do hospedeiro, um importante fator de virulência) e fator de alongamento 1α e proteínas de controle do ciclo celular como a HSP, representando também, importante fator de virulência, que varia entre espécies e com as cepas de *Leishmania* (Ibarra-Meneses *et al.*, 2023; Tano *et al.*, 2022). Essas proteínas podem atingir o citosol da célula hospedeira e inibir a sinalização do IFN- γ , ao mesmo tempo que prejudicam a expressão de fatores microbicidas como NO e TNF- α (Silverman e Reiner, 2011).

Na espécie *L. braziliensis*, macrófagos estimulados com vesículas extracelulares apresentaram produção aumentada de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α após a infecção, sugerindo um papel das vesículas extracelulares na exacerbação das respostas inflamatórias. Por outro lado, a inibição da secreção das vesículas extracelulares reduziu a produção de citocinas e as taxas de infecção, indicando o envolvimento das vesículas extracelulares na patogênese da leishmaniose (Peixoto *et al.*, 2023).

A contribuição das vesículas extracelulares na patogênese da leishmaniose por *L. braziliensis* é mostrada na figura 6 , bem como sua contribuição no processo de exacerbação em coinfeções com *L. amazonensis*.

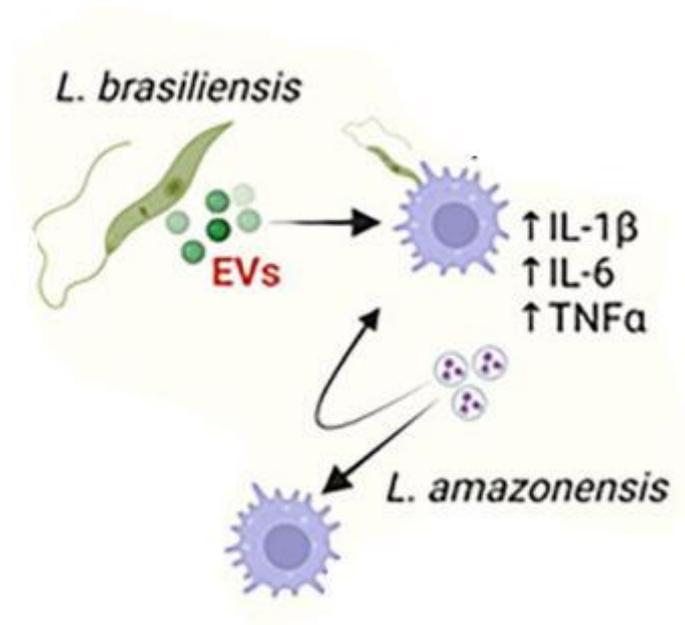


Figura 6 - Visão geral da contribuição das vesículas extracelulares (EVs) na patogênese da leishmaniose. Na infecção por *L. brasiliensis*, as vesículas derivadas do parasito aumentam a resposta pró-inflamatória ao estimular os macrófagos. Estes aumentam a produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α após a infecção. Em quadro de co-infecção, macrófagos infectados por *L. amazonensis* geram vesículas que podem intensificar a resposta imune, agravando a doença (adaptado de Pinheiro, 2024).

O macrófago atua então na patogênese, mas também serve de nicho para a reprodução do parasito. Nesta célula, as amastigotas se proliferam por divisões binárias simples até serem liberadas para o meio extracelular, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, em vesículas apoptóticas, essas amastigotas são novamente fagocitadas e repetidamente esse processo de propagação estabelece a infecção e a patogênese (Gurel; Tekin; Uzun, 2020). Assim, a ferramenta de entrada de amastigotas em novas células também envolve a fagocitose (Wanderley *et al.*, 2006).

Outras células, além de macrófagos, também são capazes de abrigar o parasito, tais como neutrófilos (Peters *et al.*, 2008), células dendríticas (Kautz-Neu *et al.*, 2012), adipócitos (Mendes *et al.*, 2022.), miócitos e melanócitos (Lainson e Strangways-Dixon, 1963).

Em relação ao perfil de resposta imune construído na leishmaniose, nota-se que a imunidade adaptativa é basicamente mediada por linfócitos TCD4, em sua polarização nos subtipos Th1 ou Th2. A resposta imune relacionada a um bom prognóstico para as leishmanioses é o perfil Th1, caracterizada pela produção de IL-2 pelas APCs que induzem as células T a produzirem INF- γ , TNF- α e linfotóxina, que por sua vez induzem a ativação policlonal de linfócito B juntamente com o potencial microbicida de produção de ROS e NO, e consequente destruição do patógeno intracelulares (Baltazar, 2022).

A presença de um perfil Th1 inicial não é garantia de resolução da infecção, esse padrão pode ser regulado por citocinas anti-inflamatória IL-10, como descrita anteriormente, desencadeando a desativação a resposta antileishmanial e o estabelecimento da infecção, à medida que se aumenta a carga parasitária e consequentemente aumenta o estímulo antigênico. Iniciando uma redução de IL-2, aumento de IL-10 e TGF- β estabelecendo assim, um padrão de imunossupressão, que progride para perda de INF- γ em estágios mais graves. Esse perfil imunológico na patogênese das leishmanioses indica um estado descrito como exaustão de linfócitos T, ausência de resposta dessas células com produção diminuída de INF- γ e de granzima B, tanto para TCD4 quanto para TCD8 desconfigurando a imunidade adquirida, sendo esse um prognóstico ruim de suscetibilidade do hospedeiro e sobrevivência do parasita (Costa-da-Silva, 2022; Mesquita, 2018).

1.5 Mecanismos de morte em *Leishmania* spp

Como descrito anteriormente, uma batalha é travada entre parasito e hospedeiro mamífero, e nesta, o parasito luta com diferentes recursos para sua sobrevivência frente às também diferentes estratégias de combate do hospedeiro. Mas, sendo a morte um evento certo para qualquer ser vivo e, nesse caso, desejado pelos hospedeiros mamíferos em relação ao parasito, é relevante discorrer sobre as formas de morte celular que acometem o parasito em estudo, a *Leishmania* spp.,

afinal, a busca por ativos contra o parasito é uma busca pela morte do mesmo (Antinarelli *et al*, 2015; Chagas *et al*, 2022).

Uma célula pode morrer de várias formas. O vasto conhecimento dos mecanismos de morte celular atuais, abrem novas perspectivas para a ciência. Categorizados em apenas dois tipos básicos e distintos por muito tempo, necrose ou apoptose, estudos atuais evidenciam outros tipos de morte celular. Atualmente estão descritas como formas de morte celular programadas a apoptose, a necroapoptose, e a piroptose; sendo que a necrose ficou então caracterizada como morte descontrolada da célula, havendo ainda evidências de sobreposição das vias de morte por apoptose, necrose e autofagia (D'arcy, 2019). A elucidação de vias complexas, estímulos indutores, mecanismos morfológicos e moleculares mostram-se importantes, enfatizando que existem mecanismos específicos para cada uma dessas vias, assim como existem também compartilhamentos de componentes e características comuns (Hassan *et al.*, 2014).

A necrose é um padrão de morte celular relacionada principalmente a situações patológicas e a fatores externos, físico, químico ou biológico que produzem injúria irreversível para a célula, gerando necrose e indução de processo inflamatório local. Há um inchaço das organelas e aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática e extravasamento de enzimas lisossomais, com a integridade da membrana plasmática comprometida, mas inicialmente não há fragmentação de DNA internucleossomal nesta via (Hassan *et al.*, 2014). O controle genético do processo de necrose foi evidenciado em vários estudos, o que muda a ideia de uma morte acidental ou descontrolada (Berghe *et al.*, 2014; Vandenabeele *et al.*, 2010).

Em protozoários, assim como em metazoários, a morte por necrose também já foi descrita, incluindo o comprometimento das funções das mitocôndrias, alterações dos níveis de cálcio, seguido por excessiva produção de ROS e diminuição da produção de ATP (Lüder *et al.*, 2010; Menna-Barreto *et al.*; 2009).

A apoptose, por sua vez, está envolvida em inúmeros processos fisiológicos e patológicos, e a falha das vias apoptóticas vem sendo cada vez mais associada a patologias, como neoplasias, doenças neurodegenerativas e doenças imunológicas. Sendo caracterizada por uma sequência de eventos enzimáticos em cascatas que terminam em fragmentos celulares envoltos por membranas, a apoptose nesse sentido é contrária à necrose, uma vez que não ativa as vias inflamatórias, e o corpo apoptótico é então eliminado pelos fagócitos (D'arcy, 2019; Hassan, 2014; Obeng, 2021).

Em protozoários, a apoptose apresenta um papel fundamental na sobrevivência e manutenção do ciclo de vida e está implicada na regulação de processos celulares distintos, como o desenvolvimento parasitário no hospedeiro mamífero e inseto vetor, diferenciação celular, resposta ao estresse e modulação da resposta imune do hospedeiro. Exercendo um papel fundamental no ciclo de vida do parasito, a apoptose em protozoários ocorre em promastigotas incapazes de migrarem para a faringe da fêmea de flebotomíneo, as quais entram em morte celular programada dentro do inseto vetor. Também, as formas amastigotas intracelulares controlam o número de parasitos por apoptose, diminuindo os estímulos de resposta imunológica do hospedeiro (D'arcy, 2019; Shaha, 2006).

A leishmaniamimetiza fenotipicamente o processo de apoptose, pela exposição da fosfatidilserina (PS), nas duas formas celulares, tanto para promastigotas, quanto em amastigotano momento da invasão de células do hospedeiro. A exposição da PS ocorre em fase inicial da apoptose, por uma alteração de membrana plasmática dependente de caspase, causada pela clivagem de translocases fosfolipídicas. Estando na superfície, resultam em estímulos para a ativação de macrófagos, os receptores de PS dos fagócitos desencadeiam, por sua vez, através de enzimas acopladas ou de produção de citocinas, a regulação de um perfil imunológico anti-inflamatório ou imunossupressor (Wanderley, 2013; Wanderley; 2020).

Diversas alterações morfológicas e bioquímicas classicamente encontradas em células apoptóticas de metazoários não foram ainda descritas e, por isso, tem sido referida por alguns autores como *apoptose-like*. Três vias diferentes são descritas para induzir a apoptose: i) a via extrínseca da apoptose, por sinal via receptor; ii) a via perforina granzima e iii) a via intrínseca ou mitocondrial (D'arcy, 2019). A partir da última, os sinais gerados por vários agentes de morte celular convergem por acionarem os reguladores de morte mitocondrial.

A apoptose em tripanosomatídeos ocorre igualmente pela ativação de proteases semelhantes às caspases e nucleases. Evidências genéticas dessa similaridade permitem considerá-las como metacaspases, produzindo regulação negativa da diferenciação e do ciclo celular, bolhas na membrana plasmática, redução citoplasmática, condensação da cromatina, degradação nucleossômica, resultando então em corpos apoptóticos (Gannavaram; Debrabant, 2012; Lüder *et al.*, 2010).

É vital o bom funcionamento mitocondrial em parasitos cinetoplastídeos e, um componente fundamental desse bom funcionamento é a cadeia respiratória ou transportadora de elétrons. O ensaio de bloqueio experimental de alguns complexos da cadeia respiratória em promastigotas estão associados à apoptose do parasito. Sinais gerados por indutores de apoptose convergem em algum ponto para as mitocôndrias, perturbam o potencial de membrana, e uma hiperpolarização de membrana mitocondrial precede o aumento da produção de superóxidos (Mukherjee, 2002; Mehta, 2004).

A dinâmica montagem, desmontagem e reaproveitamento de moléculas celulares só agora é vista, também, como forma de homeostase celular, considerada anteriormente como mecanismo de morte por auto destruição de seus componentes, a chamada autofagia ocorre pela auto destruição seletiva, e o entendimento de formas para acelerar ou retardar esses processos coloca esse tipo de morte celular como uma estratégia de manipulação para ciência, prolongando ou não a vida da célula. O que levou à geração de um novo conceito biológico, o de mecanismo de

sobrevivência celular, e só quando não há mais conserto a célula evolui para a morte (Fioravante, 2010).

Mecanismos característicos de autofagia em metazoários também estão presentes em protozoários, incluindo formação de corpúsculos membranares citoplasmáticos, organelas vesiculares ácidas, presença de autofagossomas, acompanhados pela preservação de membrana plasmática, ausência da fragmentação do DNA e independência da ativação das caspases-like (Brennad, *et al.* 2012).

Nesse sentido, o processo de morte celular do parasito participa, inevitavelmente, do desencadeamento das manifestações clínicas nos hospedeiros mamíferos susceptíveis, uma vez que, em seu ciclo de vida, a leishmania se utiliza de recursos deste evento para regulação da própria população no interior do macrófago, mas também para facilitar o processo de fagocitose por novas células fagocítica, que culminarão no processo de morte celular do hospedeiro, com sequencial resposta inflamatória e surgimento de sinais e sintomas (Brennad, *et al.* 2012; Fioravante, 2010).

1.6 Manifestações clínicas das Leishmanioses

As leishmanioses podem ocorrer de forma inaparente, ou seja, sem manifestações clínicas mas, ocasionalmente com presença de anticorpos específicos, ou ainda de forma sintomáticas, baseada nos fatores relacionados às diferentes espécies do parasito, mesmo não sendo de maneira absoluta, o que nos leva a crer que, os fatores relacionados ao a resposta imune do hospedeiro contribuem de maneira mais decisiva para a evolução da doença (Colmenares *et al.*, 2002; Vasconcelos, 2018).

Independente do fato de o protozoário se utilizar de células do sistema

fagocítico mononuclear para realizar sua multiplicação celular e destruir essas células, as respostas imunológicas levam às diferentes categorias fenotípicas em ambas leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (Colmenares *et al.*, 2002; Scott e Novais, 2016).

Na LTA, o desencadeamento dos diferentes tipos estará relacionada ao padrão de resposta imune do hospedeiro e à espécie infectante (Scott e Novais, 2016). Classicamente, a LTA pode ser dividida em: i) Leishmaniose Cutânea (LC) com lesões não ulceradas únicas ou múltiplas na pele (Figura 7A); ii) Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM) com comprometimento das mucosas nasal, oral, faringe e laringe (Figura 7B) e iii) Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) caracterizada por nódulos intradérmicos, normalmente não ulcerados e localizados por toda a pele (Figura 7C). Na leishmaniose visceral (LV) (Figura 7D e E), ocorre comprometimento principalmente de baço, fígado e medula óssea, sendo considerada a forma mais grave de leishmaniose, podendo ser fatal se não tratada, uma vez que produz significativo imunocomprometimento (WHO, 2019).

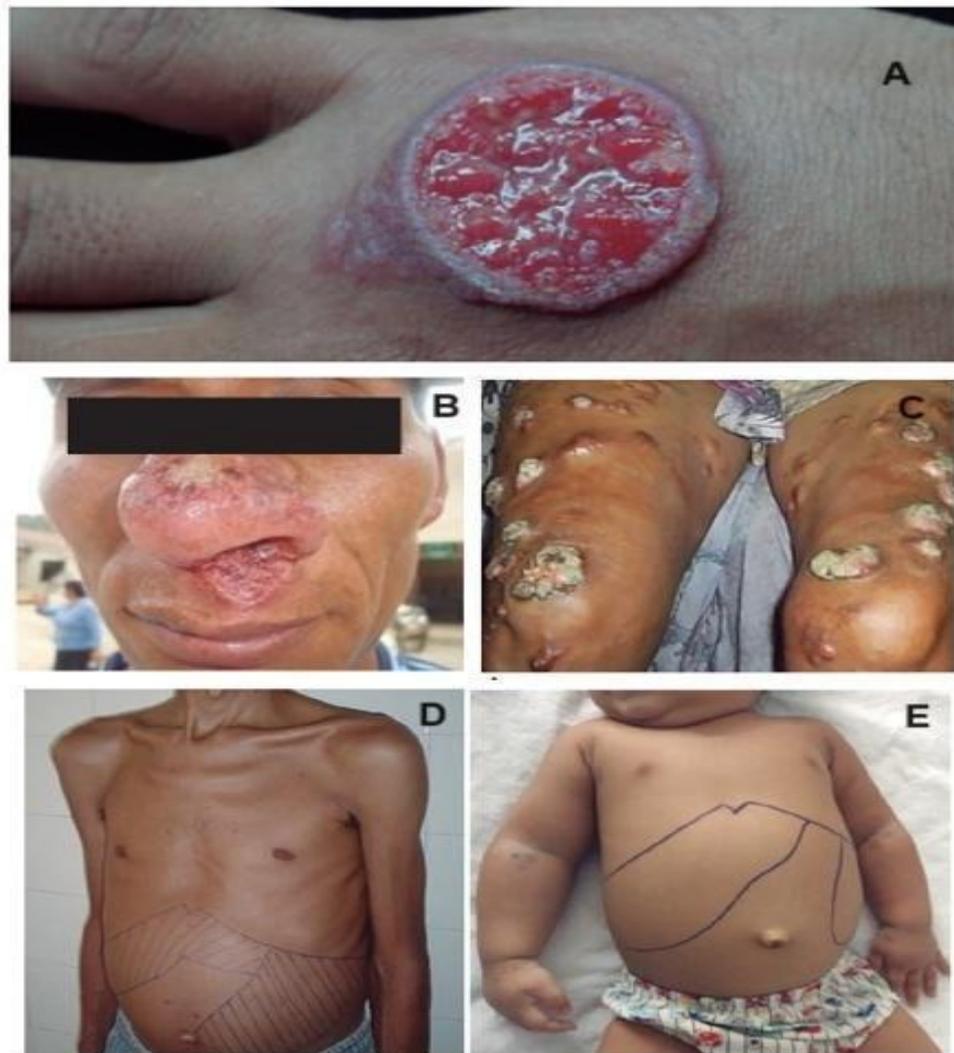


Figura 7- Manifestações clínicas mais comuns da LTA: LC (A), LCM (B), LCD (C) e LV (D e E). Fonte: OPAS (2024).

Geralmente a lesão primária é única, papulosa, não supurativa, arredondada e bem delimitada, aparece no local da picada do inseto, em algumas semanas, progride para lesões pruriginosa, supurativas, ainda arredondada, com bordas vermelhas repleta de parasitos.

Durante a fase aguda do processo infeccioso, ocorre uma significativa elevação da carga parasitária a partir dos repetidos ciclos multiplicativos realizados pelas amastigotas nas células do sistema fagocítico mononuclear. Este período dura meses, podendo ocorrer resolução do quadro clínico por tempo indeterminado, com remissão das lesões cutâneas, entretanto, após um ano, aproximadamente, nova

manifestação clínica da leishmaniose pode se estabelecer, reinfecções cutâneas ou ulcerações desfigurantes acometendo pele e mucosas da face, evoluindo portanto para a forma LCM, por disseminação hematogênica e linfática e resposta imune exacerbada, todas as espécies capazes de desencadear LTA podem ocasionar LCM tal, como *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. (Viannia)* subgênero incluindo *LV braziliensis*, *panamensis*, *guianensis* (Brasil, 2017).

Outra forma clínica, rara, de maior gravidade e que ocorre após a fase aguda, principalmente associada a infecção por *L. amazonensis*, produz quadros de LCD devido à uma anergia do hospedeiro, na qual a deficiência de resposta imune celular aos antígenos leishmaniais permite a intensa proliferação do parasito e sua disseminação (Barral e Barral-Netto, 2009). A coinfeção Leishmania-HIV aumenta a probabilidade de o paciente desenvolver LCD, com altas taxas de mortalidade (Lindoso, 2016; WHO, 2023).

Em relação às espécies capazes de produzir um quadro de LV, no geral são encontradas *L. infantum* (ou *L. chagasi*, nas Américas, região do Mediterrâneo, partes oeste e central da África) e *L. donovani* (Índia e leste da África) (WHO, 2010). Todo o curso da doença se mostra grave, visto que, essas espécies, apresentam tropismo visceral e potencial para produzir, rapidamente, significativa depleção da imunidade (Costa *et al.*, 2023; Gautam *et al.*, 2014). A *L. amazonensis* apresenta-se em um amplo espectro de casos clínicos na América do Sul, estando relacionada à todas as formas clínicas de leishmaniose em humanos (Aleixo *et al.*, 2006; Barral *et al.*, 1991) assim como notada em caninos com casos clínicos de LV (Governador Valadares – MG, Bauru – SP, Cambé – PR, Araçatuba) (Sanches *et al.*, 2016, Valdívia *et al.*, 2017). Neste contexto, é relevante citar que a espécie *L. amazonensis*, apesar de relacionada à LTA, pode também estar relacionada à etiologia de LV, como sugerido por alguns autores (Barral, 1991; Herwaldt, 1999). Mesmo com a necessidade de maiores pesquisas, principalmente pela dificuldade da classificação taxonômica, essas informações evidenciam a importância desta espécie e sugerem que o agente etiológico da LV no Brasil não está limitado apenas à *L. (L.) infantum chagasi* mas também a inclusão de *L. (L.) amazonensis* (Badaró,

1988, Sanches *et al.* 2016). O quadro 1 resume as principais espécies de *Leishmania* encontradas em humanos.

QUADRO 1 - Principais espécies de *Leishmania* encontradas em humanos.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
Mundo		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. shawi</i>	
			<i>L. naiffi</i>	
			<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

Os cães domésticos representam reservatórios cruciais em áreas onde ocorre transmissão de *L. infantum* (Miró *et al.*, 2008), nas quais a alta prevalência da infecção canina está associada ao alto risco da doença humana (Baneth *et al.*, 2008; Werneck, *et al.*, 2007). A estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde é a eutanásia de cães infectados, visto que o tratamento não é curativo (Brasil, 2014), embora tenha sido considerada questionável (Costa, 2011.), a estratégia menos aceitável em nível comunitário (Dantas-Torres *et al.*, 2019). e a mais rejeitada (De Almeida *et al.*, 2023).

A leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC) representa um desafio para o controle das leishmanioses (Gedda *et al.*, 2020). Ocorre em áreas onde a LV por *L. donovani* é endêmica, isto é, Índia e leste da África (WHO, 2010), seis meses após o quadro de LV, embora cerca de 15% ocorra sem LV prévia (Gedda *et al.*, 2020). Na

Índia, a LCPC se manifesta como lesões papulonodulares (polimórficas) e na África, como lesões hipomelanóticas (Chatterjee *et al.*, 2020). Embora não represente uma ameaça à vida, tem grande impacto socioeconômico (Mukhopadhyay, *et al.*, 2014) e afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes (Pal *et al.*, 2017).

Neste sentido, é relevante considerar que o tratamento se inicie o quanto antes, e para isso é imperativo que o diagnóstico seja também definido o quanto antes.

1.7 Diagnóstico das Leishmanioses

Em termos diagnósticos, clinicamente é preciso diferenciar as leishmanioses de outras doenças, tais como, hanseníase, tuberculose cutânea, leucemia, esquistossomose, entre outras. Desta forma, apesar da existência de métodos diagnósticos baseados no encontro de anticorpos anti-*Leishmania*, o encontro do parasito constitui padrão ouro entre os métodos diagnósticos, visto que em fase inicial das leishmanioses, ou em estado de anergia da LCD, ou ainda, devido à imunodepressão presente na LV, a síntese de anticorpos pode ser baixa ou ausente, resultando em falsos negativos (Brasil, 2014; Brasil, 2017).

O teste imunocromatográfico rk39, foi incorporado ao SUS em 2009, como alternativa aos testes sorológicos de imunofluorescência, na tentativa de se agilizar o diagnóstico de LV, pela facilidade de execução, por não demandar de aparatos laboratoriais sofisticados, mas um fracasso na estratégia de distribuição dos testes, foi revelada pela demora de diagnóstico, demora de início de tratamento e aumento do número de mortes por LV. Entre a década de 2007-2017 (Cota, 2021).

Dados epidemiológicos da OPAS, indicaram que 86,2% dos casos de LC e LM diagnosticados nas Américas, entre 2017-2022 foram feitos por exames laboratoriais. Sendo que somente 70% dos países endêmicos participantes do

programa, incluindo o Brasil, atingiram a meta, de pelo menos 80% dos casos terem diagnóstico laboratorial. Já para a meta de diagnóstico laboratorial de 95% dos casos de LV, apesar de se manter a média ao longo dos anos, de 87,8% dos casos, o Brasil e a Argentina não atingiram os 95% (OPAS, 2024). Esses dados indicam a necessidade de se rever e modificar o acesso ao diagnóstico laboratorial.

As técnicas empregadas no diagnóstico parasitológico que buscam a presença das amastigotas, se baseiam na obtenção de amostras por punção de linfonodos, ou a partir de biópsias dos bordos das lesões típicas da LC, ou ainda a partir dos nódulos não ulcerados, quando diante de uma LCD. Essas amostras seguem para coloração específica com Giemsa. Assim, diante do encontro do parasito, será possível definir que a moléstia em questão é um tipo de leishmaniose, porém, não será possível definir a espécie infectante, exceto em casos de uso de ensaios moleculares, tais como a PCR (OPAS, 2024).

Os métodos que investigam a presença de antígenos, ou materiais genéticos representam importante ferramentas no processo diagnóstico e a sorologia, ainda que não seja soberana neste processo, contribui significativamente para o diagnóstico, apontando o tempo de infecção aproximado (Akhoundi, 2017; WHO, *et al.*, 2019).

Dados do SINAN indicam uma progressiva substituição de exames parasitológicos por exames sorológicos, como testes rápidos, uma vez que outros testes invasivos são abordagem demoradas que adiam o início do tratamento e aumentam a letalidade.

Como dito anteriormente, a classificação taxonômica é de bastante relevância, visto que a espécie de *Leishmania* sp. envolvida, associada ao perfil de resposta imune do hospedeiro, determina a forma clínica e a evolução da infecção, uma vez que sua virulência, resistência aos tratamentos existentes, preferências por insetos vetores e localização geográfica contribuem de forma direta (Colmenares, 2002). Essa diferenciação entre as espécies pode ser feita por métodos moleculares,

análises iso-enzimáticas ou por anticorpos monoclonais, análises genômicas o que causa discussões e novas propostas taxonômicas (Akhoundi, 2017). Sendo particularmente importante nas Américas, onde as manifestações clínicas e as respostas terapêuticas variam consideravelmente (WHO, 2010).

1.8 Tratamentos das Leishmanioses

Na ausência de uma vacina eficaz e comercialmente disponível para humanos (Kaye *et al.*, 2023), a terapêutica medicamentosa é o artifício disponível, o qual deve levar em conta a associação das evidências clínicas aos resultados dos exames, bem como dados epidemiológicos, para se sugerir o tipo de leishmaniose presente (Brasil, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2010), o tratamento deve ser iniciado apenas após confirmação diagnóstica, e consecutivamente a estratificação da gravidade clínica e fatores individuais são critérios para a seleção do tratamento, idade, sexo, doenças pré-existentes, gravidez são fatores que determinam a escolha.

Dois antimoniais pentavalentes estão disponíveis: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, administrados por via intravenosa ou intralesional no caso de leishmaniose cutânea. Os mecanismos de ação desses medicamentos envolve vários processos: -Infiltram nas células onde as amastigotas se replicam, inibem enzimas essenciais para o metabolismo dos parasitas, como a glicólise e a produção de ATP. podem gerar estresse oxidativo, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), (Cordeiro, 2020; Haldar, 2011).

Além de agirem diretamente sobre os parasitas, os antimoniais também podem influenciar a resposta imunológica do hospedeiro, ajudando a aumentar a capacidade do sistema imune em combater a infecção, porém os efeitos adversos

são os mais graves quando comparamos com outros tratamentos disponíveis, estes incluem anorexia, vômito, náusea, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, dor de cabeça, gosto metálico e letargia. O percentual de indivíduos com LV tratados com antimoniato de meglutimina passou de 74% em 2007 para 47% em 2017 (Cota, 2021; Roberts, 1998;).

A anfotericina B (AmpB), no Brasil, é medicamento de primeira escolha em LC localizada, comumente causa febre alta, rigidez, calafrios, tromboflebite, além de nefrotoxicidade. Com efeitos adversos reduzidos nas formulações lipídicas como AmpB lipossomal e custos reduzidos, após a OMS estabelecer acordo com fabricante, foi incorporada ao tratamento de LV pelo SUS em 2007, diminuindo gradativamente o percentual de indivíduos tratados com antimonias e aumentando o número de indivíduos tratados com anfotericina B lipossomal, de 10% em 2007 para 30% em 2017, mas não foi possível verificar o impacto esperado na disponibilidade progressiva de anfotericina B lipossomal e a redução de letalidade em LV (Brasil, 2017; Cota, 2021; Frézard, 2022). Infelizmente, recentemente Ferreira e colaboradores, 2024 isolaram de paciente com LCD e HIV, no Brasil, uma cepa de *L. amazonensis* que apresentou resistência a anfotericina B confirmada *in vitro* e *in vivo*.

Administrada por via preferencialmente intravenosa, a pentamidina tem seu uso limitado por efeitos adversos graves como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal. A paromicina, um antibiótico aminoglicosídico intramuscular com formulação tópica disponível para leishmaniose cutânea, tem como efeito adverso comum dor moderada no local da infusão (Haupt, 2009) .

Então os antimoniais pentavalentes são medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral, com AmpB e pentamidina como medicamentos de segunda escolha. As formulações lipídicas de AmpB, miltefosina e paromicina têm sua terapêutica e eficácia variáveis nas áreas endêmicas A monoterapia deve ser limitada apenas às formulações lipossomais de AmpB. A

associação medicamentosa é recomendada para evitar resistência e reduzir os efeitos adversos em virtude da menor dose necessária, o que aumenta a vida útil do medicamento e favorece a adesão ao tratamento, respectivamente (Ferreira *et al*, 2024; WHO, 2010).

A OMS determina que o tratamento deve seguir diretrizes regionais (WHO, 2010). Nas Américas, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomenda uso intralesional de antimoniais pentavalentes ou miltefosina para o tratamento de LC como primeira escolha. A forma mucosa ou mucocutânea deve ser tratada preferencialmente com antimoniais pentavalentes por via intravenosa com eventual uso de pentoxifilina oral. A LV deve ser tratada com AmpB lipossomal endovenosa (OPAS, 2024).

No Brasil, o antimoniato de meglumina é utilizado como primeira escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar, podendo ser administrado por via endovenosa ou intralesional. A pentamidina, administrada por via intramuscular ou endovenosa, é recomendada como primeira escolha no tratamento da LCD e nas infecções causadas por *L. guyanensis*. Como segunda escolha, tem-se a AmpB administrada por via endovenosa na forma de desoxicolato de anfotericina ou AmpB lipossomal. No caso de pacientes com idade a partir de 50 anos, insuficiência renal, cardíaca e hepática, transplantados renais, a AmpB lipossomal é o medicamento de primeira escolha (Brasil, 2017; Goodwin, 1995).

Dados de 2007 a 2017 para análise de desigualdades da letalidade por UFs, apontam que a substituição gradativa de antimoniais pentavalentes para tratamento com anfotericina B lipossomal aumentou em 4% ao ano o número de óbitos por LV (COTA, 2021). Taxas essas, que em 2022 tiveram aumento de 27% comparado a 2017 (OPAS, 2023).

A LCD deve ser tratada em centros de referência em virtude de sua gravidade e difícil resposta terapêutica, sendo a pentamidina empregada como medicamento de primeira escolha para as LCD (Brasil, 2017).

A associação de antimoniato de meglumina e pentoxifilina, antimoniato de meglumina isoladamente ou AmpB lipossomal são as recomendações de primeira escolha para o tratamento de LC, seguidas de AmpB na forma de desoxicolato ou pentamidina. A pentoxifilina é empregada em associação com o antimoniato de meglumina, para a LC atuando como adjuvante com função imunomoduladora (Brasil, 2017; Trinconi, 2014).

Para o tratamento da LV no Brasil, a primeira escolha é o antimoniato de meglumina. Vale ressaltar o seu efeito cardiovascular (distúrbios de repolarização, com inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTC) como principal efeito adverso (Brasil, 2014).

A AmpB deve ser utilizada em casos de resposta insatisfatória ao antimoniato de meglumina e em pacientes de grupos prioritários nos quais o tratamento com antimoniato de meglumina não é recomendado, tais como crianças, gestantes, pacientes com mais de 50 anos, pacientes imunossuprimidos, transplantados, pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca. Apesar de ser o medicamento leishmanicida mais potente disponível comercialmente, seus efeitos adversos são inúmeros e frequentes, com destaque para complicações renais (declínio da filtração glomerular e hipopotassemia) e flebite em decorrência de sua toxicidade para as células endoteliais (Brasil, 2014; MISHRA, 2007; Tempone, 2011).

O tratamento da LCPC depende da gravidade do caso e emprega AmpB na forma de deoxicolato e miltefosina (Índia) e antimoniato pentavalente ou AmpB lipossomal em casos sem cura espontânea ou com lesões desfigurantes (África) (WHO, 2010).

De acordo com a OMS, na coinfeção Leishmania-HIV, desoxicolato de AmpB ou formulações lipídicas devem ser considerados como medicamentos de primeira escolha, enquanto os antimoniais pentavalentes deve ser usados apenas

em áreas sem resistência significativa e quando formulações lipídicas da AmpB não estão disponíveis ou são inacessíveis (WHO, 2010). Nas Américas, a determinação da OPAS é que o tratamento da LV em pacientes imunocomprometidos seja feito com AmpB lipossomal (OPAS, 2022). No Brasil, a terapêutica das leishmanioses em pacientes portadores de HIV não difere do preconizado para os pacientes imunocompetentes, sendo empregados os antimoniais pentavalentes como primeira escolha e AmpB como segunda (Brasil, 2014).

Além dos acima citados, tem-se a miltefosina, um medicamento oral, utilizado inicialmente como antitumoral, em seguida disponibilizado para os tratamentos em leishmanioses LMC e LV em todo o mundo. Aprovado tardiamente no Brasil em 2014, e incluída somente para o tratamento da leishmaniose tegumentar em humanos, quando já se relatava resistência parasitária em países como Índia, Nepal e Bangladesh, após uma década de uso (Machado *et al.*, 2020; Sindermann, 2006). Apesar da existência de possibilidades terapêuticas, devido a sua eficácia ainda considerável, problemas relevantes estão relacionados a miltefosina, como uma significativa toxicidade, levando a efeitos secundários graves; tais como efeitos colaterais gastrointestinais, hepáticos e renais, a teratogenicidade limita sua aplicação clínica a mulheres na idade fértil (Berman, 2015; Roatt, 2020).

Seguindo uma tendência de tratamento para outros tipos de infecções, a terapia multidrogas também vem sendo aplicada para as leishmanioses, principalmente LV. Uma variação abrangente de combinações entre esses medicamentos, suas doses e tempo de tratamento podem ser reportadas em diferentes regiões geográficas, conseqüentemente os resultados também variam bastante (Sundar, 2001; Sundar, 2018). O quadro 2 resume os tratamentos de base, seus efeitos colaterais e alguns mecanismos de ação dos compostos.

Quadro 2: Resumo dos medicamentos utilizados para as leishmanioses, seus mecanismos de ação e de resistência, principais efeitos colaterais e vias de administração

Medicamento	Modo de ação	Principais efeitos colaterais	Mecanismo de resistência	Via de administração
Antimoniais pentavalentes	Inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos	Dores articulares, musculares, cefaleia, fadiga, náuseas, alterações cardiovasculares, alterações pancreáticas, supressão hematopoética e insuficiência renal, morte súbita.	Diminuição da absorção e da atividade da droga; inativação da alteração do complexo alvo-droga; sequestro da droga em compartimentos intracelulares; aumento do reparo aos danos e da tolerância; extrusão	Intramuscular, Endovenosa ou subcutânea (intralesional)
Anfotericina	Ligação aos esteróis da membrana do parasito e mudança na sua permeabilidade seletiva para K ⁺ e Mg ²⁺	Febre, náuseas, anorexia, leucopenia, falha renal, problemas cardíacos	Extrusão, aumento da produção de lipídios ou outras substâncias que se ligam à anfotericina, diminuindo sua atividade.	Endovenosa
Paramomicina	Inibição da biossíntese de proteínas	hepatotóxico, nefrotóxico, dispneia e dores intensas no local da injeção.	Produção de fosfatases ou adenilil transferases, que modificam o antibiótico e o tornam menos eficaz, Efluxo ativo, Alterações no alvo do fármaco: As mutações no RNA ribossômico ou nas proteínas ribossômicas podem reduzir a afinidade da paramomicina pelo seu alvo.	Tópico para LC Parenteral para LV
Medicamento	Modo de ação	Principais efeitos colaterais	Mecanismo de resistência	Via de administração
Pentamidina	Interfere na síntese de DNA e modifica a morfologia do cinetoplasto	hipoglicemia, hiperglicemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, além de causar diabetes Mellitus Dores, náuseas, vômitos, tonturas, mialgia, hipertensão, dor de cabeça	Modificação da permeabilidade de membrana, extrusão, alterações metabólicas e produção de enzimas inativantes ou degradantes.	Parenteral Intramuscular
Miltefosina	Associada com a biossíntese de fosfolipídeos e metabolismo alquilipídico em leishmania	Febre, náuseas, vômitos e diarreia creatinina elevada, teratogenicidade	Diminuição da absorção do fármaco, Modificação de vias metabólicas, ativação de vias de sobrevivência celular	Oral

Adaptado de Kaur e Rajput, 2014.

1.9 Sais orgânicos

Sais orgânicos são líquidos iônicos que apresentam ampla flexibilidade,

com um número de combinações possíveis em torno de 10^{18} , permitindo inferir que quase todas as propriedades desejáveis possam ser combinadas dentro de uma molécula. Marcando o surgimento de Líquidos iônicos para tarefas específicas, a biotecnologia os emprega como alternativas para contornar problemas na indústria farmacêutica tais como toxicidade e solubilidade (Dheer, Singh e Shankar, 2017). Amplamente investigados, os estudos sobre a utilização de sais orgânicos e seus derivados apontam promissoras atividades antivirais (De Lourdes *et al.*, 2014), antitumorais (Teixeira *et al.*, 2019), antibacterianos e antifúngicos (Costa *et al.*, 2023; Ferraz *et al.*, 2020), anti-inflamatórios (Angajala *et al.*, 2016) e antileishmanial (Coimbra, 2016; Ferraz *et al.*, 2022).

Por sua vez, os triazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros com tendência a formar ligações de hidrogênio que aumentam a solubilidade e favorecem a ligação de alta afinidade com alvos biológicos (Dheer, Singh e Shankar, 2017).

Resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de colaboradores dedicados à Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de alternativas para o tratamento das leishmanioses permitiram, via estudo racional de fármacos medicinais, a síntese de bioisósteros não clássicos da miltefosina, na qual substitui-se a fosfocolina pelo grupo funcional 1,2,3-triazol (Figura 8).

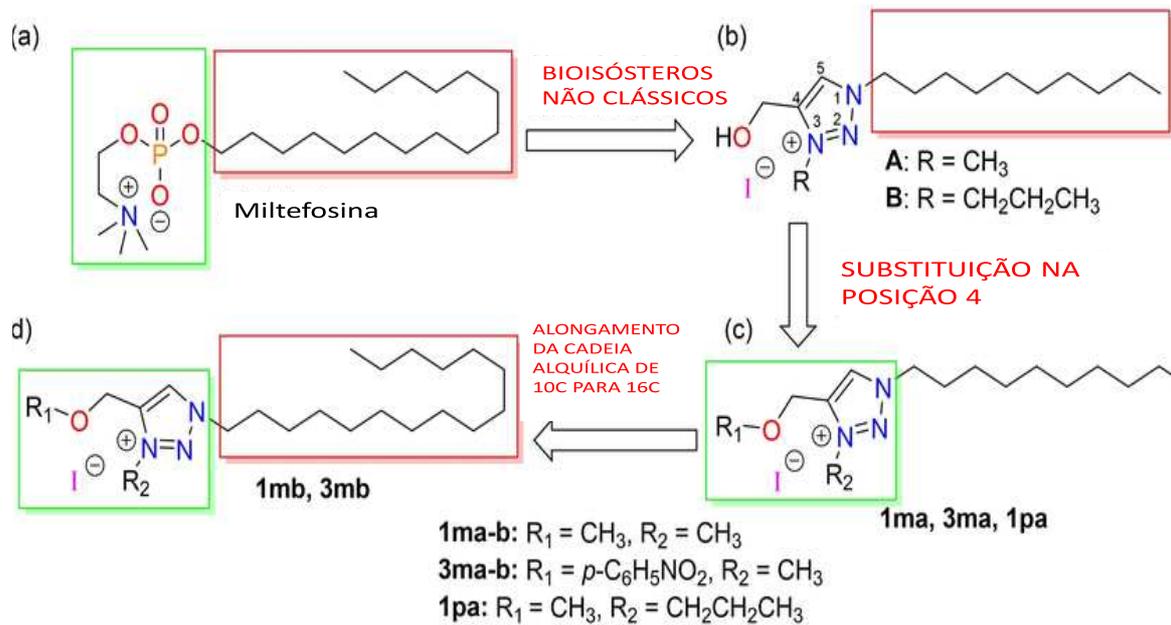


Figura. 8 - Estrutura química da alquilfosfocolina miltefosina de primeira geração e bioisósteros não clássicos racionalizados. Fonte: Paula *et al*, 2024

A alteração estrutural resultou em uma série de compostos com atividade antileishmanial seletiva, com destaque para a molécula dhmtc (composto 1, Figura 9), um derivado 1,2,3 triazol contendo um ânion acetato e uma cadeia com 10 átomos de carbono, que apresentou baixa citotoxicidade para macrófagos murinos e expressiva atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sendo mais ativo que o protótipo miltefosina (Stroppa *et al.*, 2017). Em outro estudo, nosso grupo evidenciou a atividade antileishmanial promissora de um sal triazólico inédito (composto 2, Figura 9) contendo um grupo epóxido funcionalizado na posição 4 do anel triazólico que exibiu atividade promissora em promastigotas (CI_{50} de 3,61 μM) e amastigotas intracelulares (CI_{50} de 7,61 μM) de *L. amazonensis*. Mais recentemente, o mesmo grupo, dando continuidade aos estudos de síntese racional desses bioisósteros, realizou a substituição do grupo epóxido por $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (composto 3, Figura 9) para investigar o impacto desta modificação na atividade biológica e um recente trabalho comprovou sua ação antitumoral para células neoplásicas de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (Paula *et al*, 2024; Pokhodylo, 2013).

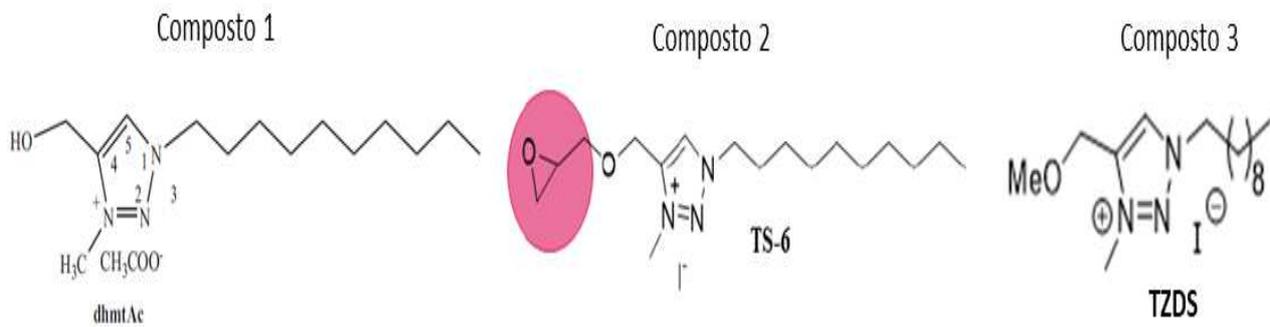


Figura 9- Estruturas dos derivados alquil-1,2,3-triazol e seus sais.

Em consonância com o exposto acima acerca da promissora atividade biológica dos sais triazólicos, o presente trabalho propõe avaliar a atividade antileishmanial do derivado denominado TZDS na espécie *L. amazonensis*, classicamente associada a diferentes manifestações clínicas e posteriormente realizar estudos do modo de ação do composto sobre o parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antileishmanial “*in vitro*” do sal orgânico, denominado TZDS em *L. amazonensis*, assim como a toxicidade em células de mamíferos murinos. Além disso, realizar estudos *in vitro* sobre o modo de ação do composto na indução de morte celular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antileishmanial do composto TZDS em promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar, pelo ensaio de viabilidade, a toxicidade do composto TZDS em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Determinar o índice de seletividade do TZDS;
- Realizar estudos de modo de ação do TZDS em formas promastigotas de *L. amazonensis*, relacionados a estudos de apoptose-*like*, autofagia e necrose;
- Realizar análise ultra estrutural e morfológica de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZDS por meio de microscopia eletrônica;
- Avaliar a ação do TZDS sobre a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar o efeito da associação *in vitro* do TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com intuito de facilitar a visão geral proposta por este estudo, o esquema a seguir resume as etapas experimentais na figura 10 (3.1.1 Desenho experimental).

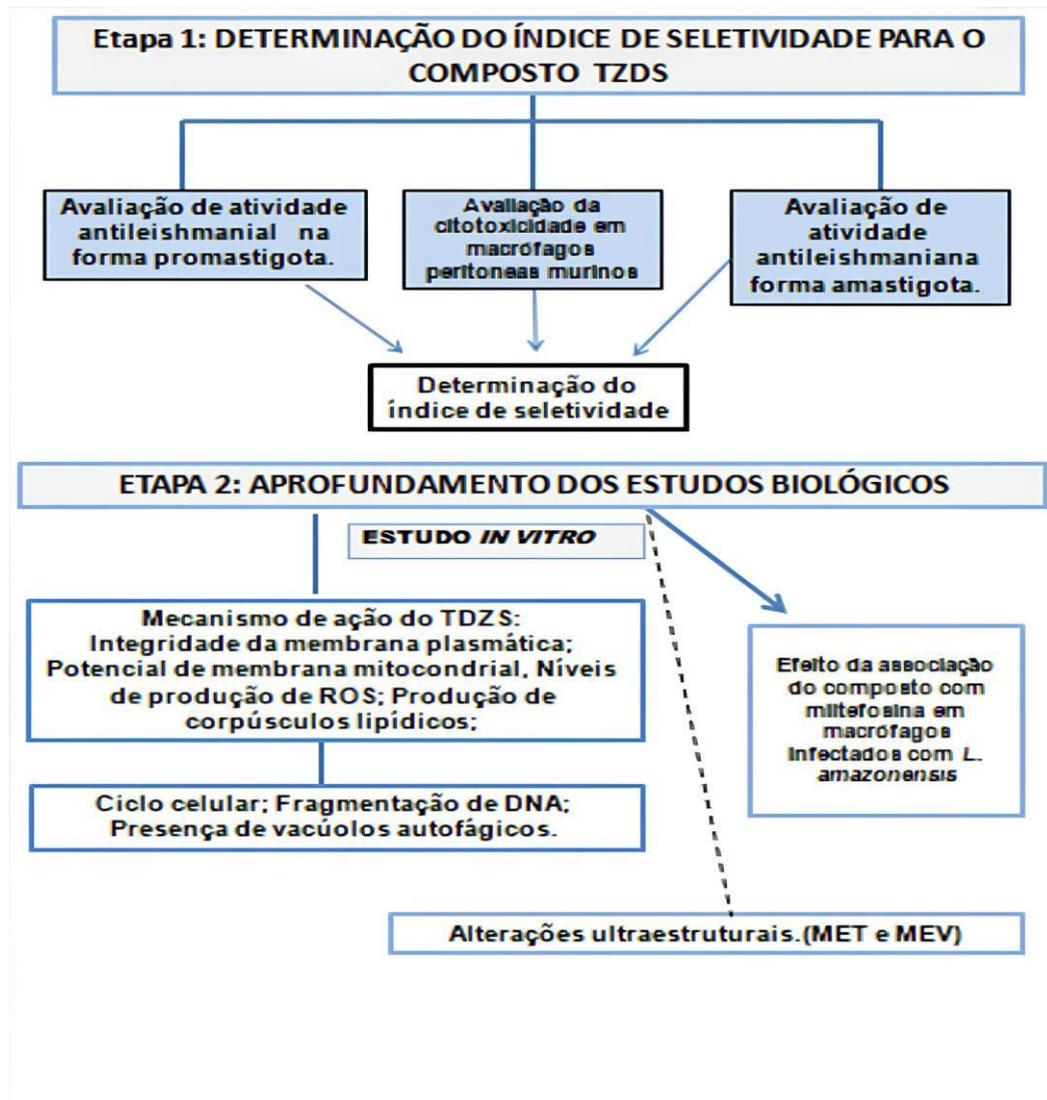


Figura 10: Desenho experimental. O esquema resume as etapas experimentais. O composto foi testado inicialmente em formas promastigotas de *L. amazonensis* e em seguida a citotoxicidade destes compostos foi avaliada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com objetivo de direcionar os testes na em amastigotas de *L. amazonensis*. Através desses resultados podemos calcular o índice de seletividade do composto e, a partir daí, realizar o estudo do modo de ação em alvos celulares importantes para o parasito Fonte: Própria autora.

3.1.1 Etapa 1 - Obtenção e diluição do composto TZDS

O composto TZDS foi obtido após síntese realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adilson David da Silva- SINTBIOLMOL/ICE/UFJF. A solução estoque do TZDS foi preparada diluindo-se as massas em dimetil sulfóxido (DMSO) e obtendo-se uma solução na concentração de 300mM. Esta solução foi mantida sob refrigeração (a 12°C) até o momento do uso. Para execução dos ensaios biológicos, utilizou-se uma solução em uma concentração intermediária de 3mM (DMSO 1%), diluída em PBS estéril. No poço das placas, durante os os ensaios biológicos a concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,03%, que não apresentava toxicidade para os parasitos.

3.1.2 Cultivo do parasito

O cultivo dos promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8 isolada do flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata* em Belém-PA) foi realizado em meio Warren [Meio BHI-Infusão de cérebro e coração bovino (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia), acrescido de hemina (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) e ácido fólico (Sigma- Aldrich Louis, Missouri, EUA)] e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, SP, Brasil) e 0,1% de solução de penicilina 10.000U.I./mL e estreptomicina 10mg/mL (Sigma-AldrichLouis, Missouri, EUA). A manutenção da cultura *in vitro* foi realizada por meio de repiques duas vezes por semana em garrafas para cultivo celular e mantidas a 25°C em estufa de BOD (do inglês Biochemical Oxygen Demand” ou Demanda Bioquímica de oxigênio).

3.1.3 Manutenção da infectividade das cepas

A infectividade da cepa de *L. amazonensis* foi mantida mediante infecção *in vivo* de camundongos BALB/c fêmeas. A infecção ocorreu na pata

traseira com 50 μ L de uma solução contendo 2 x10⁶ promastigotas em fase estacionária de crescimento, em PBS (“Phosphate Buffer Solution”). Após 4-6 semanas, realizou-se punção da pata infectada para isolamento das formas amastigotas. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 009/2018, Anexo I).

3.1.4 Avaliação da citotoxicidade do composto TZDS em macrófagos peritoneais murinos

Camundongos BALB/c fêmeas foram previamente estimulados mediante inoculação intraperitoneal de 2mL de tioglicolato de sódio 3% (108190) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após 72h, o lavado peritoneal foi efetuado para obtenção de pool dos macrófagos por meio da injeção e aspiração de 6mL de solução de Hank’s estéril (H6136) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) no peritônio de cada animal. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Após, a solução retirada do peritônio foi transferida para tubo cônicos e centrifugada a 1200 RPM (centrífuga hermo Fisher Scientific D37520) por 10 minutos, e as células foram suspensas em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) enriquecido com 10% de SFB e 0,5% de penicilina / estreptomicina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para a concentração de 2 x 10⁶ células/mL, plaqueadas em placas de 96 poços (KASVI K12-096), em meio RPMI 1640 e incubadas por 24h em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂), para a adesão dos macrófagos. As placas foram lavadas com PBS estéril, retirando as células não aderidas e foram tratadas com diferentes concentrações do composto TZDS, a partir de diluições seriadas da concentração de 150 μ M. Após o tratamento as placas foram novamente incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, por 72h. Ao fim de 72h, adicionou-se 10 μ L de MTT em cada poço, a 5 mg/mL (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio) (M5655) (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) (Mosmann, 1983) e após 2h, a reação foi interrompida com a adição de

isopropanol /HCl (0,7% de HCl a 10N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de inibição da viabilidade dos macrófagos em relação ao controle (macrófagos incubados em meio de cultura), e a partir destes dados, para cada composto, foi calculado o CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) pelo programa GraFit 5. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 009/2018, Anexo I).

3.1.5 Atividade antipromastigota do composto TZDS.

A atividade antipromastigota foi realizada pelo teste colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico- Sigma- St. Louis, MO, USA). Para tal, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e lançados à razão de 2×10^6 células/ml em uma placa de 96 poços (Sarstedt 83.3924.500), meio de cultura Werren e. Em seguida, o composto foi adicionado em concentrações variadas (100-0,18 μ M).e as placas foram incubados à 25°C em BOD. Após 72h, foi adicionado MTT a 5mg/mL durante 4h a 25°C. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de isopropanol/HCl (0,7% de HCl a 10N) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia) a 570nm. A expressão dos resultados foi convertida em porcentagem de inibição de crescimento dos promastigotas em relação ao controle negativo (promastigotas não tratadas). O programa GraFit 5 (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K.) foi usado para calcular a concentração inibitória (CI₅₀) do composto, que representa a concentração que inibe 50% do crescimento celular. A droga de referência utilizada foi a miltefosina.

3.1.6 Atividade do composto TZDS em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Os ensaios foram realizados com macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*. após obtenção do lavado peritoneal dos camundongos BALB/c, estimulados previamente estimulados com 2mL de caldo tioglicolato a 3%, 72h antes do lavado peritoneal, os mesmos foram lavados em 6mL de solução de Hanks, contados em câmara de Neubauer e colocados para aderir em placas de 24 poços por 24 h, em lamínula de vidro, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF à 33°C, 5% de CO₂. Após este tempo, os macrófagos foram colocados para interagir com os promastigotas na relação 1:10 (macrófago/parasito), durante 4h, em meio suplementado com 10% de soro bovino fetal à 33°C, 5% CO₂. Após a lavagem com PBS para retirada dos promastigotas que não entraram nas células, o composto TZDS diluído em PBS foram adicionados nas concentrações seriadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125µM). Após 72h de tratamento, as células foram fixadas com etanol, coradas com Giemsa e desidratadas em acetona/xilol, na sequência: acetona 100%, acetona 90% / xilol 10%, acetona 50% xilol 50%, acetona 10% xilol 90% e xilol 100%. As lâminas foram montadas e o efeito antiparasitário do produto sintético foi avaliado a partir da contagem das amastigotas dentro dos macrófagos, com a contagem de 200 células/lamínula, em microscopia óptica, com aumento de 1000x. Foram realizados três experimentos independentes e cada teste foi feito em duplicata. Controle negativo (células sem tratamento) e controle positivo (células tratadas com miltefosina – droga de referência) foram incluídos. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle sem tratamento. O CI₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos intracelulares, foi determinado utilizando o programa GraFit 5 (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K.).

3.1.7 Cálculo do índice de seletividade

O Índice de Seletividade (IS) do TZDS foi calculado pela razão entre a

toxicidade *in vitro* (CC₅₀) e a atividade em promastigotas ou amastigotas intracelulares (CI₅₀). Compostos com valores de IS superiores a 10,0 são indicativos de maior toxicidade para o parasito do que para macrófagos. Por outro lado, compostos com IS inferiores a 10,0 são considerados mais tóxicos para a célula hospedeira (Inácio *et al.*; 2013).

3.1.8 Etapa 2 - Efeito da associação do TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c previamente inoculados intraperitonealmente com 2mL de meio tioglicolato 3%. Em seguida, o número de células utilizadas foi ajustado para a concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 0,5% de solução penicilina/estreptomicina e incubados por 24h em estufa a 33°C com 5% CO₂ (Thermo Scientific, Ohio, USA). Macrófagos aderentes foram infectados com promastigotas de na razão 10:1 e colocados para interagir por 4h em estufa a 33°C com 5% CO₂. Em seguida, cada poço foi lavado duas vezes com 300µL de PBS estéril para retirada dos promastigotas não fagocitados. Posteriormente, cada poço foi novamente plaqueado com meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e antibiótico, e os macrófagos infectados foram tratados com TZDS diluído conforme o item 3.1.1, em combinação com a miltefosina em diferentes proporções (4:1, 3:2, 2:3 e 1:4) e incubados em estufa a 33°C com 5% CO₂. Após 72h de tratamento, os macrófagos infectados foram lisados com 200µL de água deionizada estéril para liberar as amastigotas intracelulares e transferidos para microplaca negra de 96 poços. Macrófagos não-infectados foram também lisados com 200µL de água deionizada estéril e utilizados como branco. Os valores de intensidade de fluorescência foram quantificados em fluorímetro de microplaca (FLx800, BioTek Instruments, Inc) utilizando o comprimento de excitação de 540 nm e 600 nm de emissão.

3.1.9 Determinação das concentrações inibitórias fracionárias (FICs) e classificação da natureza da interação

As FICs e o somatório das FICs (Σ FICs) foram calculadas da seguinte forma: FIC da TZDS = IC₅₀ da TZDS em combinação/IC₅₀ da TZDS isolada. A mesma equação foi aplicada à miltefosina, Σ FICs = FIC TZDS + FIC miltefosina. Uma média geral do Σ FIC foi calculada para cada combinação e usada para classificar a natureza da interação da seguinte forma: sinergismo, definido quando a média Σ FIC $\leq 0,5$, aditivo quando a média Σ FIC $> 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo quando a média Σ FIC > 4 (Odds, 2003)

3.2 Ensaios de modo de ação do composto TZDS sobre promastigotas de *L. amazonensis*

3.2.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Promastigotas tratadas com o composto TZDS na concentração de 0,13 μ M e 0,26 μ M (referente ao valor de 1x e 2x o CI₅₀ após 72h de tratamento) foram incubadas em garrafas de cultura contendo meio werren, por 6h ou 24h, em BOD a 25°C, em seguida, foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas em 1200 RPM por 10min, lavadas com PBS, ressuspensas em 1mL de solução de Hank's na concentração de 5 x 10⁶ promastigotas/mL e incubadas no escuro, à 37°C com o corante JC-1 (10 μ g/mL, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) por 30 minutos. O marcador JC-1 é um corante de carbocianina catiônico, que se acumula no interior da mitocôndria em condições normais do $\Delta\Psi_m$, formando desta maneira o J-agregado, que emite fluorescência vermelha. Em mitocôndrias danificadas, onde o $\Delta\Psi_m$ é baixo, o JC-1 em baixas concentrações apresenta-se como monômeros, e emitem fluorescência verde.

Logo após a incubação, as células foram lavadas 3x em PBS e ressuspendidas em 1mL de solução de Hank's. Em seguida, transferiu-se 200 µL da suspensão para uma placa negra com 96 poços e de fundo transparente e a leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800) com os comprimentos de onda de excitação/emissão 485/528nm (fluorescência verde) e 485/600nm (fluorescência vermelha). Para o controle positivo tratou-se as promastigotas com 5µM de FCCP (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) por 10min a 25°C (Antinarelli *et al.*, 2015). Poços com ausência do composto foram usados como controle negativo.

3.2.2 Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo parasito

Para avaliar a produção de ROS pelo parasito, foram usadas promastigotas, em fase exponencial de crescimento, incubadas em garrafas de cultura contendo meio werren, tratadas com o composto TZDS a 0,13µM e 0,26µM por 6 e 24h a 25°C, em BOD. Em seguida, as células foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1500RPM por 10 minutos e lavadas 2x com PBS, sua concentração foi ajustada a 2×10^7 promastigotas/mL. Para determinar a produção de EROS total foi utilizada a sonda H₂DCFDA (D399) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). O H₂DCFDA é um marcador não fluorescente, que quando em presença de esterases intracelulares e ROS exibe um produto fluorescente (de acordo com indicações do fabricante). A incubação foi realizada a 20µM por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob proteção da luz. O controle negativo foi feito sem a adição do composto. A leitura ocorreu em fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528nm (Antinarelli *et al.*, 2015). Para quantificar o superóxido mitocondrial, foi empregado o indicador MitoSOX Red (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Em resumo: Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) foram tratadas com TZDS

(0,13 μ M e 0,26 μ M) por 6h e 24h a 25 °C. As células foram marcadas com indicador MitoSOX Red a 5 μ M e incubadas durante 20 min. Promastigotas incubadas com antimicina A (10 μ M) e miltefosina (22 μ M) foram utilizadas como controle positivo. A intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) a 540/600nm de excitação/emissão, respectivamente (Glanzmann, *et al*; 2021).

3.2.3 Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas

A formação de corpos lipídicos em citoplasma de promastigotas tratadas com TZDS a 0,13 μ M e 0,26 μ M, foi avaliada com a utilização de um corante lipofílico Nile Red, as células foram lavadas 2x com PBS, ajustadas à concentração de 10×10^6 promastigotas/mL e incubadas com o corante (19123) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) a 10 μ g/mL, por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob proteção de luz. A miltefosina, foi utilizada como controle positivo na concentração de 22 μ M. Poços sem adição de compostos foram utilizados como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528nm (Mendes *et al.*, 2016).

3.2.4 Avaliação da integridade da membrana plasmática

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 cels/mL) em fase logarítmica de crescimento foram tratadas com TZDS a 0,13 μ M e 0,26 μ M por 24 horas a 24°C e incubados com iodeto de propídeo (PI) a 40 μ g/mL por 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. A fluorescência foi analisada com o auxílio de um fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 540nm de emissão e 600 nm de excitação. O controle negativo foi feito com poços contendo parasitos não tratados e como controle positivo, utilizou-se parasitos aquecidos a 65°C por 10 minutos (Antinarelli *et al.* 2015).

3.2.5 Análise do ciclo celular

Baseando-se na CI_{50} encontrada nos ensaios com promastigotas, foi preparada uma suspensão de promastigotas na concentração de 1×10^7 células/mL, foram tratadas com TZDS a $0,13\mu\text{M}$ e $0,26\mu\text{M}$ por 24h a 24°C em garrafas de culturas. Em seguida, foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 1mL de etanol 70% e mantidas a -20°C durante 1h. Foram incubadas com $1\mu\text{g/mL}$ de Ribonuclease A (Sigma-Aldrich) por 1h a 37°C . Após esta etapa, as amostras foram incubadas com PI (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de $1.0\mu\text{g/mL}$ por 20 minutos em temperatura ambiente. Os dados foram adquiridos no citômetro FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipado com software DIVA (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (Ribeiro *et al.* 2013).

3.2.6 Avaliação da exposição de fosfatidilserina

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) foram incubadas por 24h com TZDS a $0,13\mu\text{M}$ e $0,26\mu\text{M}$. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e uma suspensão de 5×10^6 promastigotas foram lavados uma vez com PBS e incubadas com $1 \mu\text{L}$ de anexina V-FITC (Invitrogen, Molecular Probes) por 20 minutos no escuro. Após, foi adicionado PI na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ e as células foram incubadas no escuro por 15 minutos. Células submetidas à miltefosina na concentração de $44\mu\text{M}$ foram utilizadas como controle positivo. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipado com software DIVA (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (Stroppa *et al.*, 2017).

3.2.7 Avaliação da formação de vacúolos autofágicos

Promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento na concentração de (1×10^7 células/mL) foram incubadas em meio werren, em garrafas de cultura, e tratadas com TZDS nas concentrações de $0,13\mu\text{M}$ e $0,26\mu\text{M}$ do CI_{50} por 24 horas a 24°C . Após o tempo de incubação, promastigotas foram centrifugados, lavados com PBS e marcados com $100\mu\text{M}$ de monodansilcadaverina (MDC) por 1 hora à 37°C para a marcação dos vacúolos autofágicos e analisadas no fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 335nm (excitação) e 460nm (emissão). Como controle positivo utilizou-se promastigotas em fase estacionária (Stroppa *et al.*, 2017).

3.2.8 Avaliação da fragmentação do DNA em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZDS.

Promastigotas em fase exponencial de crescimento, foram ajustadas para a concentração de 10×10^6 células/mL. e tratadas com o TZDS por 24h. Após o tratamento, a concentração foi ajustada para 1×10^7 /mL. Em seguida fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a 4°C ; lavadas por 3x com PBS, permeabilizadas com Triton X 100 0,2% e citrato de sódio 0,1% em PBS por 10 minutos e lavadas novamente. As células foram ressuspensas em $20\mu\text{l}$ da solução TUNEL (terminal deoxy nucleotidyl transferase –mediated d-UTP nick and labeling), (Roche) que consiste na incorporação do nucleotídeo 12-dUTP, acoplado à sonda FITC, à extremidade 3'OH do DNA. ($2\mu\text{L}$ da enzima e $18\mu\text{L}$ da solução de marcação) e incubadas por 1h a 37°C , em câmara úmida. Sob a proteção da luz. O controle positivo foi realizado em promastigotas tratadas com solução de DNase $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão Tris/HCL 50mM pH 7,5 por 10 minutos a 25°C ; Para o controle negativo não foi adicionada a enzima. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (CytoFLEX (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) e os dados foram analisados com o software CytExpert (Beckman Coulter).

3.2.9 Quantificação dos níveis de ROS em macrófagos murinos infectados

com *L. amazonensis*

A cultura de macrófagos peritoneais murinos foi obtida como descrito anteriormente. Em seguida, uma suspensão de 1×10^6 cels/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e antibiótico foi incubada em placas de 96 poços em estufa a 37°C com 5 % de CO₂. A infecção dos macrófagos ocorreu na proporção de 10:1 (10 promastigotas de *L. amazonensis* para 1 macrófago) por 4h. As placas foram lavadas 4x com PBS, e o composto TZDS foi adicionado em diferentes concentrações (100-6,25µM). Como controle positivo, utilizou-se H₂O₂ na concentração de 4mM. Após 72h de tratamento, o meio foi descartado, as células foram lavadas 1 vez com PBS e incubadas com a sonda fluorescente H₂DCFDA na concentração final de 20µM por 30 minutos no escuro em estufa a 37°C com 5% CO₂. A intensidade de fluorescência foi medida em fluorímetro de microplacas (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) utilizando os comprimentos de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes, em cada um dos três foram realizados em duplicata interna.

3.2.10 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

A produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados por 72h de tratamento com TZDS foi dosada indiretamente através da quantificação dos níveis de nitrito (NO_2^-), subproduto estável da oxidação do NO, utilizando o método de Griess (Green *et al.*, 1982). Em resumo: 50µL do reagente de Griess constituído de 1% de sulfanilamida (Vetec, Brasil) diluída em 2,5% H₃PO₄ (Vetec, Brasil) e 0,1% de Dihidrocloridrato de naftilenodiamina (NEED) (Sigma-Aldrich, Brasil) diluída em 2,5% H₃PO₄ foram adicionados em 50µL do sobrenadante da cultura de

macrófagos infectados em microplacas de 96 poços. A curva padrão de nitrito foi obtida por diluição seriada de Nitrito de Sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a partir de 200 μ M até 0,098 μ M e, como branco da reação, utilizou-se água deionizada. O conteúdo de nitrito foi quantificado por extrapolação da curva padrão de nitrito de sódio. Os valores de absorbância foram quantificados em 540nm utilizando leitor de microplacas (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) utilizando os comprimentos de excitação de 540nm e emissão de 528nm.

A concentração de nitrito contida em cada amostra foi determinada de acordo com a reta de regressão linear, obtida a partir da curva padrão de NaNO₂. Como controle positivo foi utilizado 1 μ g/mL de LPS com 1ng/mL de INF- γ , obtido de sobrenadante de células L1210. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes.

3.3 Etapa 3 Análise ultraestrutural dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZDS por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (MET e MEV)

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Victor do Valle Midlej, Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Para o preparo do material para microscopia eletrônica procedeu-se da seguinte maneira: Microscopia eletrônica de varredura (MEV): promastigotas foram tratados com TZDS (0,13 e 0,26 μ M) por 24 h. Após o tratamento, os promastigotas foram lavados com PBS e fixados em 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 60 min. Eles foram então pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, secas usando CO₂, revestido com uma espessa camada de ouro e analisado com um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390, Tóquio, Japão). Os ensaios foram realizados em três experimentos

independentes, cada em triplicado (Antinerelli *et al.*, 2023).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET): promastigotas foram tratados com TZDS (0,13 e 0,26 μM) por 24 h. Após o tratamento, os promastigotas foram lavados com PBS e fixados em 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 60 min. Eles foram então pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio e 0,8% ferrocianeto de potássio. Após, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, incorporadas em resina Epon, seccionadas em fatias ultrafinas (60-70 nm), e coradas com 5% de acetato de uranila e 0,2% de citrato de chumbo. As seções foram examinadas com um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Tóquio, Japão). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, cada um em triplicado (Chagas, 2022).

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA). Os dados foram comparados por análise de variância teste One-way-ANOVA com pós-teste de Dunnett. Valores de p menores que 0,0001 (***) , 0,001 (**) e 0,01 (*) foram considerados estatisticamente significativos

4 RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados foram recentemente publicados no periódico *Chemico-Biology Interactions* (Souza *et al.*, 2025).

4.1.1 Etapa 1 - Estudos *in vitro* da atividade antileishmanial e da citotoxicidade de TZDS em células de mamíferos

Os resultados obtidos acerca da avaliação *in vitro* da atividade antileishmanial de um composto, um sal orgânico derivado de 1,2,3-triazol, denominado TZDS são apresentados a seguir. Os resultados apresentados demonstram que TZDS possui atividade antileishmanial promissora, com seletividade para formas amastigotas de *L. amazonensis* e baixa toxicidade para macrófagos murinos. Além disso, os estudos de modo de ação indicam que a disfunção mitocondrial e o aumento na produção de ROS são mecanismos potenciais pelos quais o composto induz a morte celular no parasito. A seguir, uma avaliação detalhada e algumas questões aprofundadas.

Em relação à atividade do composto contra promastigotas de *L. amazonensis*, foi evidenciada expressiva atividade após 72h de tratamento, com redução significativa do crescimento parasitário nas concentrações de 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M, respectivamente (Figura 11). O CI_{50} obtido foi de 0,13 μ M, sendo 169 vezes mais ativo que a droga de referência, miltefosina. O CI_{90} foi também calculado e o valor obtido foi de 2.62 μ M (Tabela 1). As concentrações inibitórias de 50% (valores de IC_{50}) foram calculadas por métodos não lineares regressão usando o software GraFit versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, Reino Unido), usando equação seguinte: $y=14,177 \ln(x)+81,95$; $R^2=0,9417$; enquanto y representa a porcentagem de inibição, e (x) representa o logaritmo natural da concentração do composto.

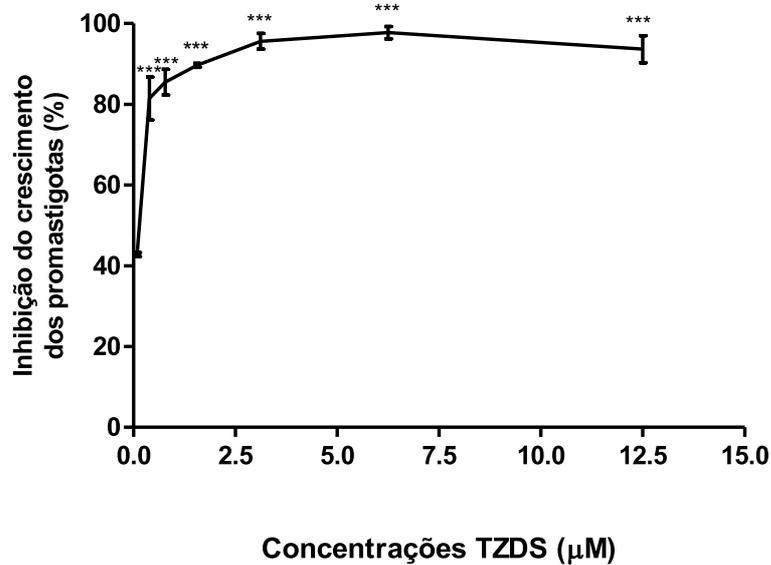


Figura 11: Atividade antipromastigota do TZDS Para atividade antipromastigota usou-se a concentração de 2×10^6 células/mL, tratados com TZDS. A expressão dos resultados foi feita pela comparação com o controle sem a adição do composto, em porcentagem de inibição de células viáveis pelo teste colorimétrico do MTT, após leitura em espectrofotômetro (Multiskan) a 570nm. O programa GraFit 5 foi usado para calcular a concentração inibitória (CI_{50}), que representa a concentração que inibe 50% do crescimento celular. A droga de referência utilizada foi a miltefosina.

A citotoxicidade do composto na célula hospedeira foi avaliada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, que foram tratados com diferentes concentrações do composto e avaliados pelo método colorimétrico com MTT. A partir destes ensaios, foi possível verificar que o composto apresentou baixa citotoxicidade para a célula hospedeira após 72h de tratamento com CC_{50} de $70,62\mu\text{M}$ (Figura 12).

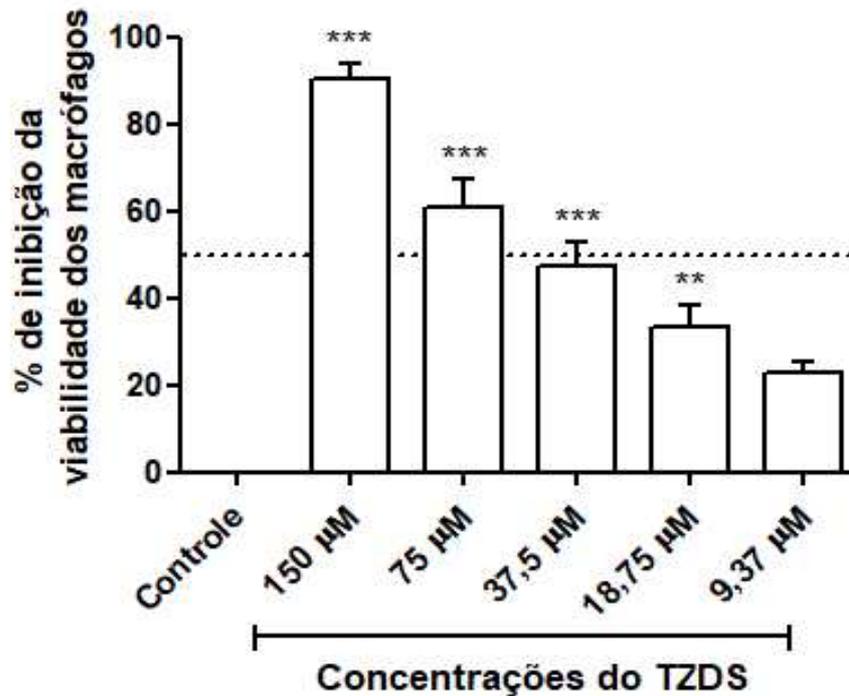


Figura 12 Citotoxicidade do TZDS em macrófagos peritoneais não infectados. Para o teste de citotoxicidade usou-se a concentração de 2×10^6 células/mL, tratados com TZDS. A expressão dos resultados foi feita pela comparação com o controle sem a adição do composto, em porcentagem de inibição de células viáveis pelo teste colorimétrico do MTT, com leitura em espectrofotômetro (Multiskan) a 570nm. O programa GraFit 5 foi usado para calcular a concentração citotóxica de (CC_{50}), que representa a concentração que inibe 50% do crescimento celular. Controle: macrófagos não tratados.

Quanto à atividade do composto em cultura de macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, tratados com TZDS, fixados e corados por Giemsa. Os resultados obtidos (Figura 13), demonstraram que o composto apresentou uma atividade expressiva com CI_{50} de $2,06\mu M$, com CI_{50} menor do que o da miltefosina ($CI_{50}=10,07\mu M$). O CI_{90} calculado para o composto foi de $9,74\mu M$. O composto precursor, um derivado triazolólico neutro foi também avaliado e foi inativo em ambos os estágios evolutivos de *L. amazonensis* avaliados ($CI_{50} >100\mu M$). As concentrações inibitórias de 50% (valores de IC_{50}) foram calculadas por regressão não linear usando o software GraFit versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, Reino Unido), usando a seguinte equação:

$y=26,33$ em $(x)+30,234$; $R^2=0,978$; enquanto y representa a porcentagem de inibição, e em (x) representa o logaritmo natural da concentração do composto.

Dessa forma, o Índice de Seletividade (IS) do composto foi determinado, sendo este obtido a partir da razão entre o CC_{50} para macrófagos e o CI_{50} para o parasito, refletindo a ação seletiva do composto para o parasito em relação à célula hospedeira. Como ficou evidenciado na tabela 1, foi possível verificar que o composto TZDS apresenta atividade antileishmanial de elevada seletividade (IS=34,28) em especial contra a forma amastigota, a qual corresponde à forma clinicamente importante, quando comparado ao IS para a mesma forma do parasito, quando submetido à miltefosina (IS=12,33).

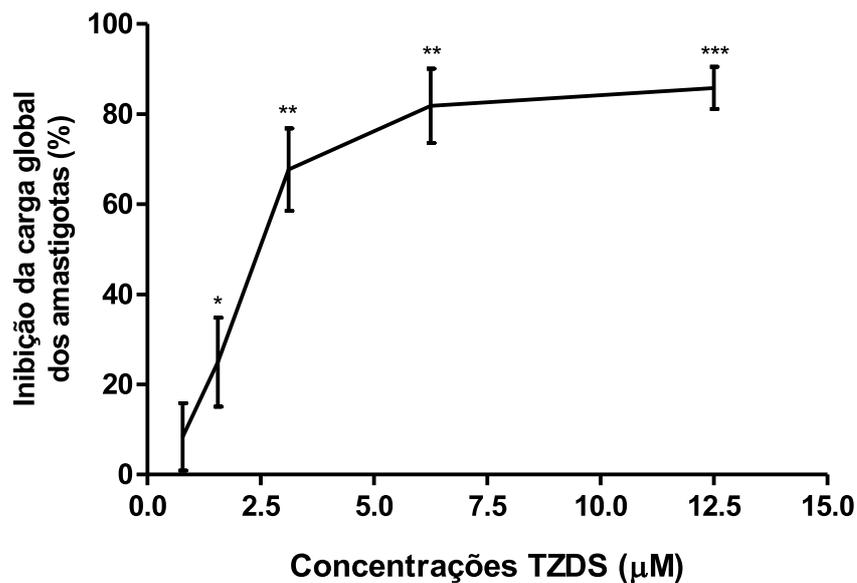


Figura 13: Atividade do TZDS em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na relação 1:10 (macrófago/parasito). Após o tratamento de 72h, as células foram fixadas e coradas com Giemsa. O efeito antiparasitário do composto foi avaliado a partir da contagem das amastigotas dentro dos macrófagos, com a contagem de 200 células/lamínula, microscópio óptico com aumento de 1000x.

Tabela 1: Atividade antileishmanial, citotoxicidade e índice de seletividade dos derivados triazólicos.

Composto	Estrutura Química	Promastigotas	Macrófagos	Amastigotas	Índice de Seletividade (IS) ^c
		IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	IC ₅₀ (μM) ^a	
TZD*		>100	>100	>100	-
TZDS**		0,13 ± 0,086	70,62 ± 2,72	2,06 ± 0,42	34,28
Miltefosina		22,00 ± 0,5	131,90 ± 3,9	10,70 ± 4,0	12,33

^aConcentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos. ^bCC₅₀: Concentração que inibe 50% da viabilidade dos macrófagos. ^cConcentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos. ^dI.S.=Índice de Seletividade foi calculado pela razão entre CC₅₀ para macrófagos e IC₅₀ para amastigotas

A figura 14 ilustra a redução do número de amastigotas após tratamento com TZDS quando comparado com o controle não tratado, comprovando o efeito deste composto em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

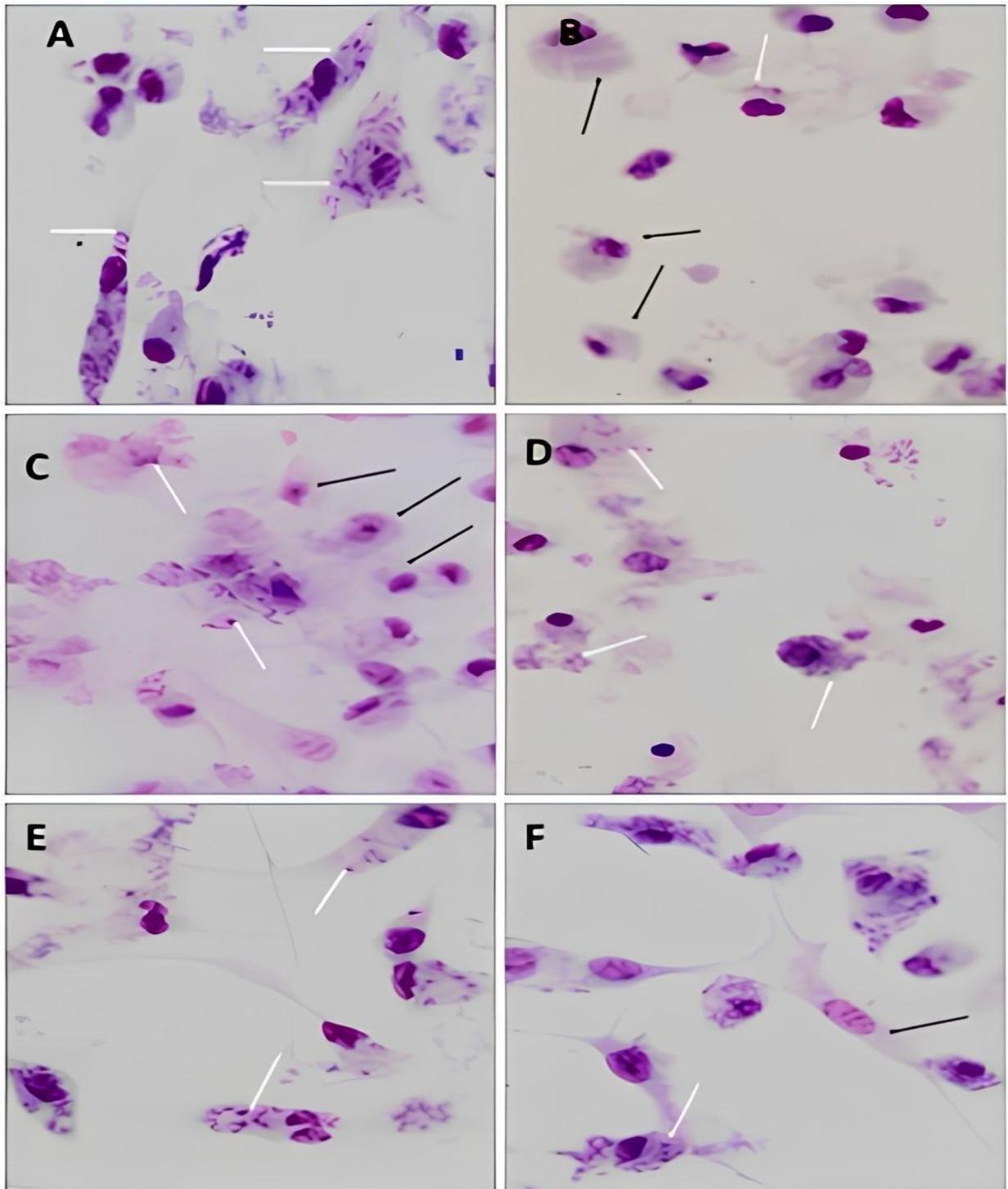


Figura 14: Macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis*. Microscopia Óptica, aumento 1000x, Coloração de Giemsa, Em A= controle, B= TZDS em 12,5 μ M, C=TZDS em 6,25 μ M, D=TDZS 3,12 μ M, E=TDZS 1,15 μ M, F= TDZS em 0,78 μ M. Amastigotas dentro de macrófagos (setas brancas) e macrófagos não infectados (setas pretas), magnificância de 1000X.

4.1.2 Estudos do modo de ação antileishmanial de TZDS

Tendo em vista a expressiva atividade antileishmanial do TZDS em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, associado à baixa toxicidade em macrófagos murinos e expressiva seletividade contra as formas amastigotas intracelulares (Índice de Seletividade = 34,28), o composto foi selecionado para os estudos de investigação sobre seu modo de ação, cujos resultados obtidos encontram-se descritos abaixo.

Os estudos iniciais acerca do(s) mecanismo(s) de morte do parasito, desencadeado pela molécula, foram direcionados para a mitocôndria, visto que a mitocôndria em tripanossomatídeos ocupa 80% do citoplasma, pela sua importância na sobrevivência do parasito por ser uma organela relacionada à indução de morte celular (Fidalgo; Gille, 2011; Menna-Barreto; De Castro, 2014).

As desregulações de voltagem de membranas celulares estão associadas a disfunções fisiológicas cruciais. Aproximadamente 10% dos medicamentos aprovados pela FDA, tem como alvo canais iônicos dependentes de voltagens (Huang, Pan e Yan 2024). A disfunção mitocondrial em protozoários têm sido classicamente avaliada a partir da alteração, levando à hiperpolarização ou despolarização do $\Delta\Psi_m$. A análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o derivado triazol foi realizada mediante a incubação com o marcador fluorescente JC-1 (corante catiônico).

Os resultados obtidos por fluorimetria (figura 15) demonstraram um aumento do $\Delta\Psi_m$ nas primeiras 6 horas de aproximadamente 14% em ambas as concentrações do TZDS avaliadas em comparação com as células controle. Promastigotas incubadas com o desacoplador de cadeia respiratória, FCCP, tiveram redução no $\Delta\Psi_m$ de 93,10% e a miltefosina diminuiu o $\Delta\Psi_m$ em 78,05%.

Após 24h de tratamento os resultados demonstram níveis máximos de hiperpolarização $\Delta\Psi_m$ 88,67% e 207,93% nas concentrações de 0,13 μM e 0,26 μM , respectivamente. Promastigotas incubados com o desacoplador de cadeia respiratória, FCCP, tiveram uma redução do $\Delta\Psi_m$ de 78,75%. FCCP e miltefosina tiveram redução no $\Delta\Psi_m$ de 82,52% e 79,80%, respectivamente.

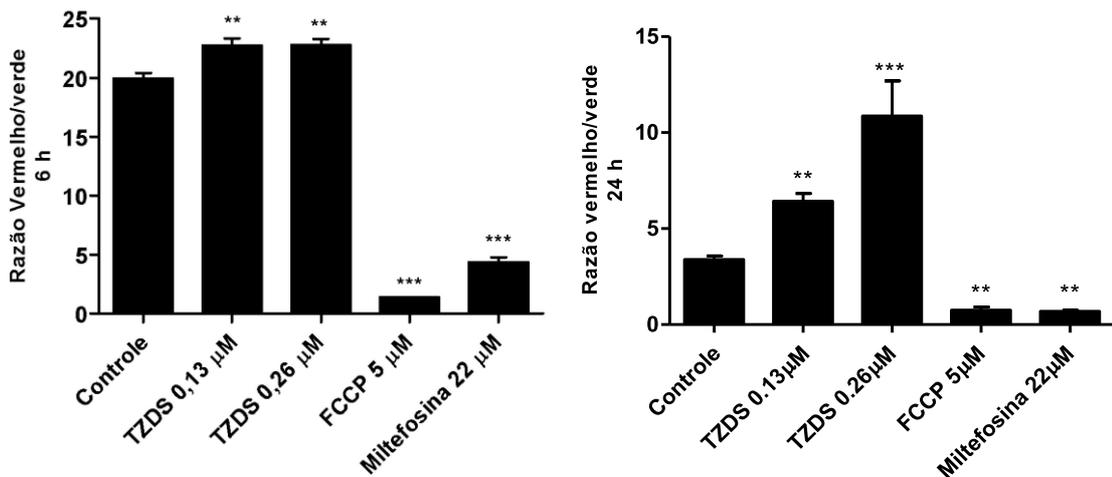


Figura 15: Alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZDS. Promastigotas foram tratados com 0,13 e 0,26 μM do TZDS e após 6h e 24h foram marcadas com JC-1. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria nos pares de filtros de 485/528 nm e 540/600nm. $P < 0,001$ (***) , diferença significativa comparada com o controle negativo. Os dados foram expressos como a média de pelo menos dois experimentos independentes, realizados cada um, em duplicata.

Para avaliar os níveis intracelulares de ROS após tratamento com TZDS, utilizou-se as sondas H_2DCFDA e MitoSOX para medir EROS total e mitocondrial, respectivamente. O H_2DCFDA é oxidado na presença de radicais de espécies reativas de oxigênio para formar 2',7'-diclorofluoresceína altamente fluorescente. Em relação ao MitoSOX, uma vez dentro da mitocôndria, é oxidado pelo superóxido gerado pela cadeia transportadora de elétrons e produz fluorescência vermelha. Assim, a análise da produção total e mitocondrial de ROS foi realizada às 6h e 24h após o tratamento com TZDS pelo método

fluorimétrico

Níveis elevados de EROS foram observados em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZDS. O tratamento com a molécula induziu a um aumento nos níveis de ROS de 123,91% e 100,62% após tratamento com as concentrações de 0,13 μ M e 0,26 μ M do composto. O aumento na produção de EROS após incubação com antimicina A e miltefosina foi de 284,24% e 150,31%, respectivamente (Figura 16).

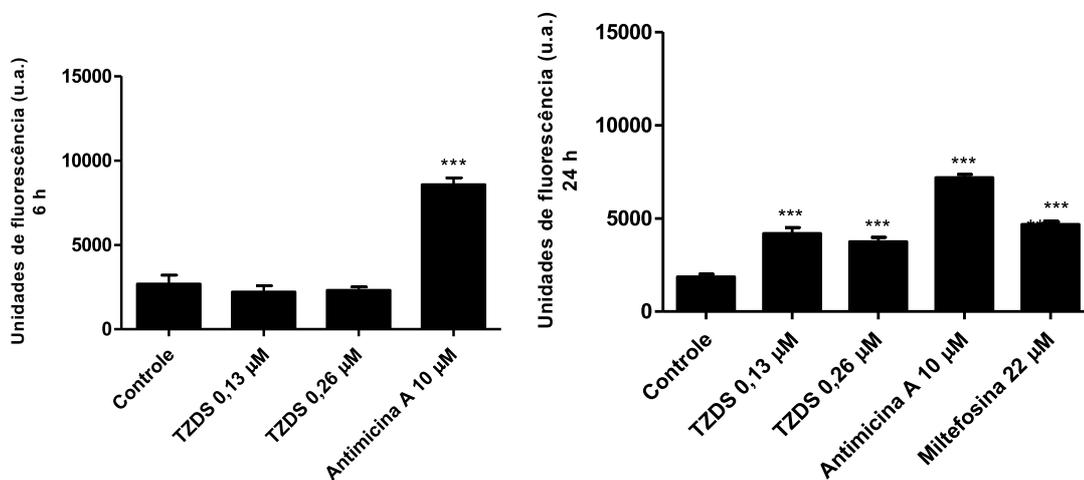


Figura 16: Produção de ROS em promastigotas tratadas com TZDS. Promastigotas tratadas com TZDS 0,13 e 0,26 μ M por 6 e 24h foram avaliadas quanto aos níveis de ROS pela sonda fluorescente H2DCFDA. A fluorescência foi quantificada em um fluorímetro de microplaca usando comprimentos de onda de 485/528 nm. Os valores foram expressos como unidades de fluorescência arbitrárias (au). Antimicina A (10 μ M) e miltefosina (22 μ M) foram utilizadas como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 5.0 utilizando análise de variância (One-way ANOVA) acompanhada de pós-teste de Dunnett: P<0,01 (**) e P<0,001 (***)

A Figura 17 mostra o efeito do TZDS nos níveis dos radicais mitocondriais superóxido. Após 6h de incubação com TDZS, os níveis de radicais superóxido foram semelhantes aos do grupo controle. Em contrapartida, após 24h de tratamento, o TDZS aumentou a produção de superóxido em aproximadamente 89,35% e 30,8% (a 0,13 μ M e 0,26 μ M, respectivamente), quando comparado com o controle não tratado. O tratamento com miltefosina (22 μ M) provocou um aumento do produto superóxido de 29,83%. Antimicina A (a

10 μ M), utilizada como controle positivo, levou a um aumento de cerca de 359,93%.

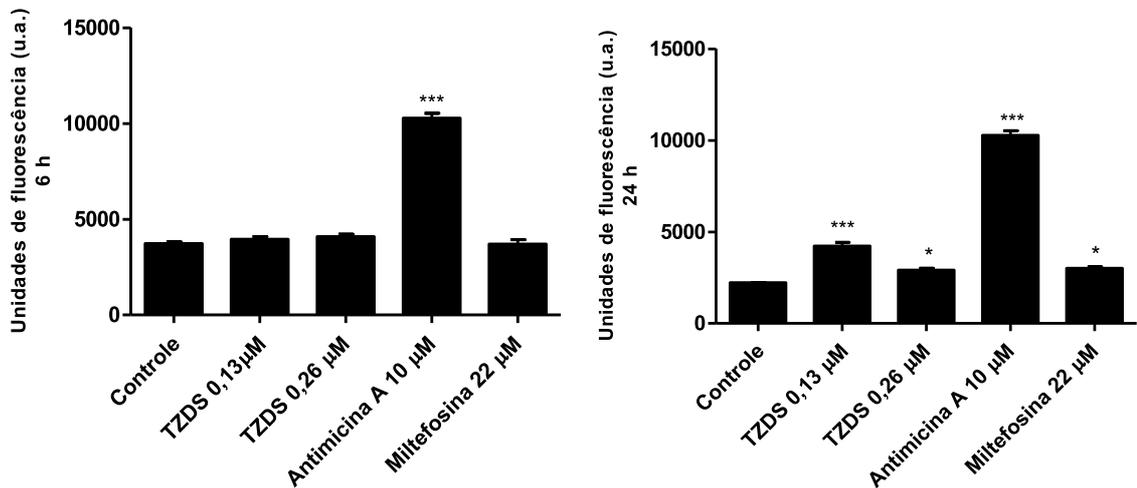


Figura 17: Níveis de superóxido em promastigotas tratadas com TZDS. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com TZDS (0,13 μ M e 0,26 μ M) por 6 e 24h a 25°C. Os parasitas foram então marcados com MitoSOX e a intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorômetro a 540/600nm de excitação/emissão. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnet: P<0,05 (*) e P<0,001 (***).

O principal sítio responsável pela produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) intracelular é a cadeia respiratória mitocondrial (Mena-Barreto; de Castro, 2014; Fidalgo; Gille, 2011;). Um efeito direto do estresse mitocondrial desencadeado pelo colapso do potencial mitocondrial é a geração excessiva de ROS, que induz a oxidação de macromoléculas essenciais como proteínas, DNA e lipídios, desencadeando um acúmulo de danos irreversíveis em estruturas celulares que são incompatíveis com a sobrevivência do parasito. Observa-se uma hiperpolarização do $\Delta\Psi_m$ acompanhada da formação de ROS, em 24 horas após o tratamento e um aumento no $\Delta\Psi_m$ após 6h de tratamento, enquanto que os níveis de ROS permaneceram inalterados em 6h de tratamento.

Após verificação da disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento com TZDS, analisou-se se esse efeito estava associado à formação de corpos lipídicos. Os corpos lipídicos são estruturas dinâmicas encontradas no citoplasma

celular sob condições de homeostase (Lee *et al.* 2013). Entretanto, uma exacerbação na formação dessas estruturas tem sido observada sob condições de disfunção mitocondrial induzida por drogas (Antinarelli *et al.* 2023; Chagas *et al.* 2022). Dessa forma, o possível efeito do composto na formação de corpos lipídicos foi investigado por incubação com o corante fluorescente Nile Red; e de fato, o tratamento com composto TZDS a 0,13 μ M ou 0,26 μ M resultou num aumento na intensidade de fluorescência de 76,53% e 66,23%, respectivamente, quando comparado ao controle não tratado. Miltefosina (22,0 μ M) também aumentou os níveis de corpos lipídicos em 85,48% (Figura 18).

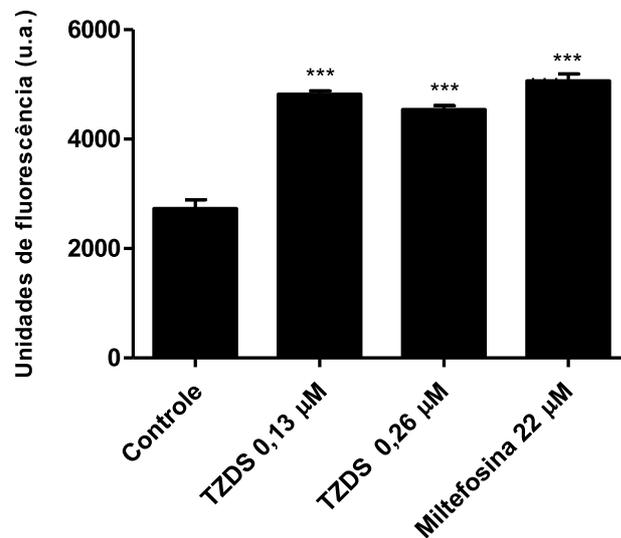


Figura 18: Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto TZDS. Os parasitos foram tratados com o composto com TZDS (0,13 e 0,26 μ M) por 24h. Miltefosina foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0 usando análise de variância (One way ANOVA) e as diferenças estatísticas acessadas pelo pós teste de Dunnett: P< 0,01 (**) e P< 0,001 (***) .

Após a evidência de que a mitocôndria é um alvo farmacológico do composto, alguns eventos bioquímicos e celulares relacionados a esses processos de morte celular foram investigados (Smirlis *et al.*, 2010). Dentre estes processos, a morte celular programada conhecida como apoptose em metazoários, ou também referida como apoptose *like* em protozoários como

Leishmania spp, (Basmacıyan, Azas e Casanova, 2018).

Desta forma, para avaliar a indução de morte por apoptose-like, a exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática foi avaliada através de dupla marcação com Anexina V-FITC e PI. Promastigotas tratados com TZDS nas concentrações de 0,13 e 0,26 μ M exibiram um aumento na porcentagem de parasitos em processo de apoptose inicial (anexina V +, PI -) de 3,02 vezes e 2,44 vezes, respectivamente, e apoptose tardia (anexina V +, PI +) de 10,4 vezes e 7,42 vezes, respectivamente, em relação ao controle não-tratado. Um aumento na porcentagem dos parasitos em processo de necrose (anexina V -, PI +) foi também observado após tratamento com TZDS (Figura 19). Em promastigotas tratadas com miltefosina, usada como controle positivo, o aumento observado foi de 5,3, 9,9 e 23,8 vezes na população de parasitos em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, respectivamente.

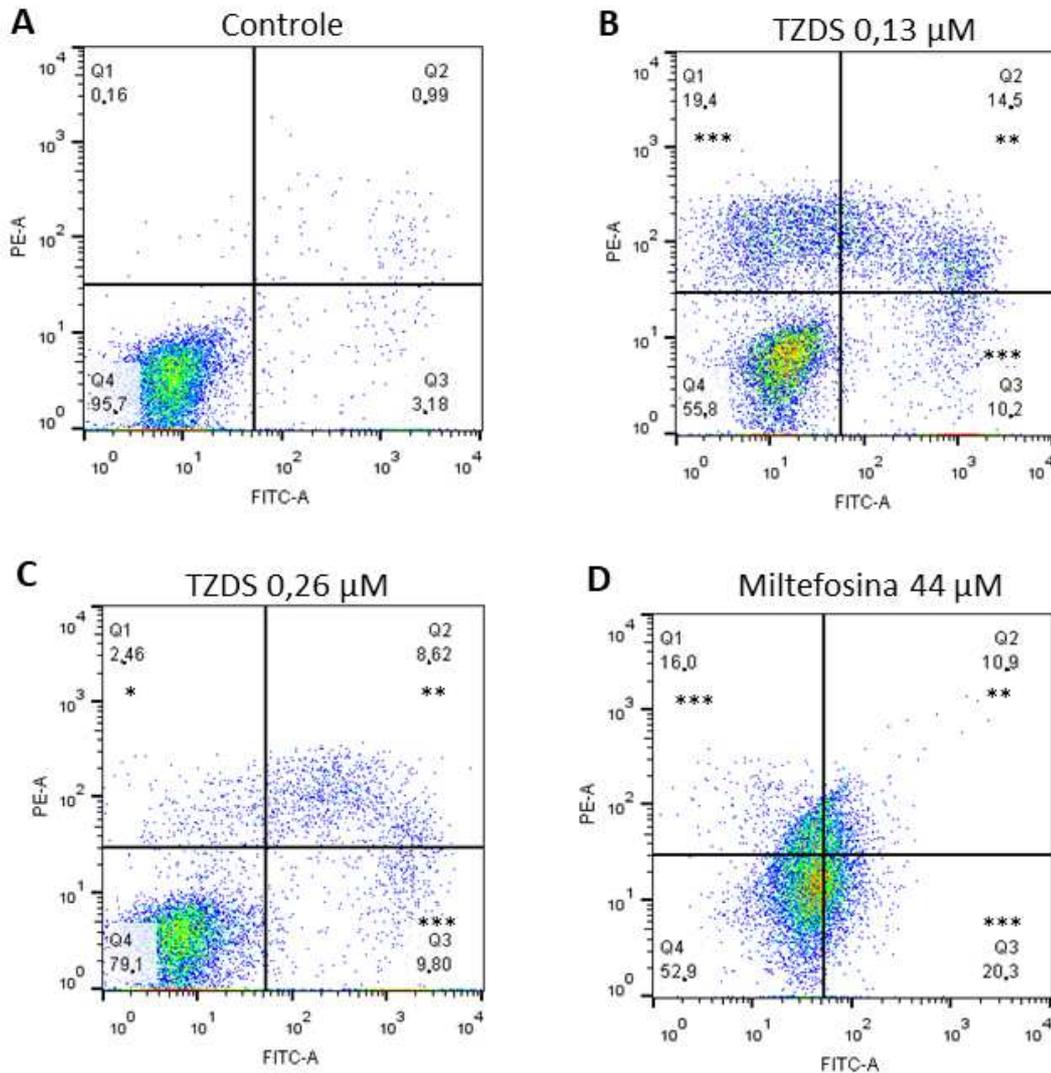


Figura 19 Análise da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZDS. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados ou não-tratados com 0,13 μ M e 0,26 μ M TZDS durante 24h e a exposição de fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a marcação simultânea com as sondas fluorescentes Anexina V-FITC e PI. Em **(A)** Controle negativo **(B)** Promastigotas tratadas com miltefosina na concentração de 44 μ M (controle positivo) **(C)** Promastigotas tratado com 0,13 μ M TZDS **(D)** Promastigotas tratados com 0,26 μ M TZDS. Os dot plots foram obtidos utilizando-se o programa de computador FlowJo Version V10.

Uma vez observada a exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática em promastigotas tratados com TZDS, foram avaliados também possíveis alterações no ciclo celular destas formas biológicas do parasito.

Assim, no intuito de distinguir e verificar o efeito do tratamento com TZDS no ciclo celular, foi utilizado o PI , seguida da análise pela citometria de fluxo. Como pode ser verificado na figura 20, numa análise superficial dos histogramas, já é possível considerar que o tratamento com TZDS foi relevante na alteração do ciclo celular.

Promastigotas tratadas com o composto, em ambas as concentrações testadas (0,13 μ M e 0,26 μ M), tiveram um aumento nas células na fase sub G0 de 23,67% e 14,1%, enquanto no controle negativo, as células nesta fase foram apenas 5,12% da população. Esses resultados indicam que promastigotas tratados com TZDS estão com DNA fragmentado em processo de morte celular programada. Também se observou um aumento de células na fase G0, com consequente aumento de células que estão em fase S, mostrando que o composto além de induzir uma morte celular que leva à clivagem ou degradação de DNA, também induz a parada celular na fase S, reduzindo a capacidade da célula de sintetizar esse DNA e conduzido à morte do parasito. Os resultados obtidos para miltefosina, utilizada como controle positivo, também demonstram um aumento de células principalmente na fase subG0, que irá levar, conseqüentemente, a uma redução da população de células nas demais fases do ciclo celular. Dessa forma, os parasitos tratados com miltefosina não conseguiram replicar seu DNA na fase S, e muito menos realizar a mitose celular, que aconteceria em G2 (Figura 20).

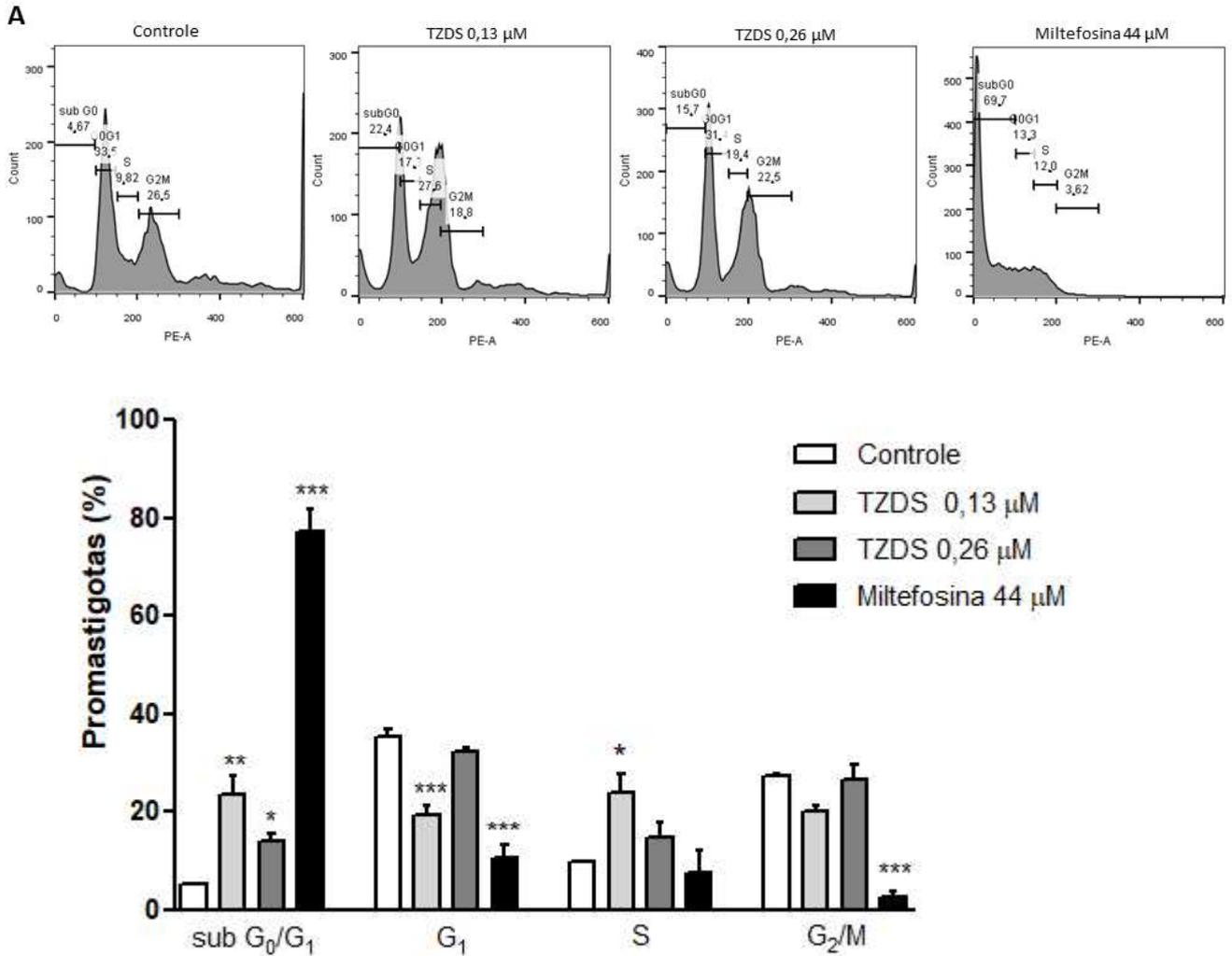


Figura 20: Análise do ciclo celular dos promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com TZDS. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 0,13 e 0,26 μM do composto por 24h e, em seguida, foram permeabilizadas com etanol 70%, marcadas com PI e o conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo. Um total de 10000 eventos foram analisados para cada experimento. Os histogramas foram obtidos utilizando-se o programa de computador Flow Jo Versão 10. **(A)** Análise do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular **(B)** Percentual de células em cada fase do ciclo celular. O experimento foi realizado três vezes em triplicata sendo a figura representativa de 1 experimento independente. $P < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,1$ (*), diferença significativa comparada com o controle negativo.

Para confirmar se o tratamento dos promastigotas com TZDS induzia fragmentação do DNA foram realizados ensaios da técnica do TUNEL. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que o tratamento com TDZS a 0,13 e 0,26 μM aumentou significativamente a coloração das células com

TUNEL em cerca de 26,72 e 29% em relação ao controle (9,81%). Para DNase (5µg/mL), utilizada como controle positivo, o aumento observado foi de 20,37% (Figura 21).

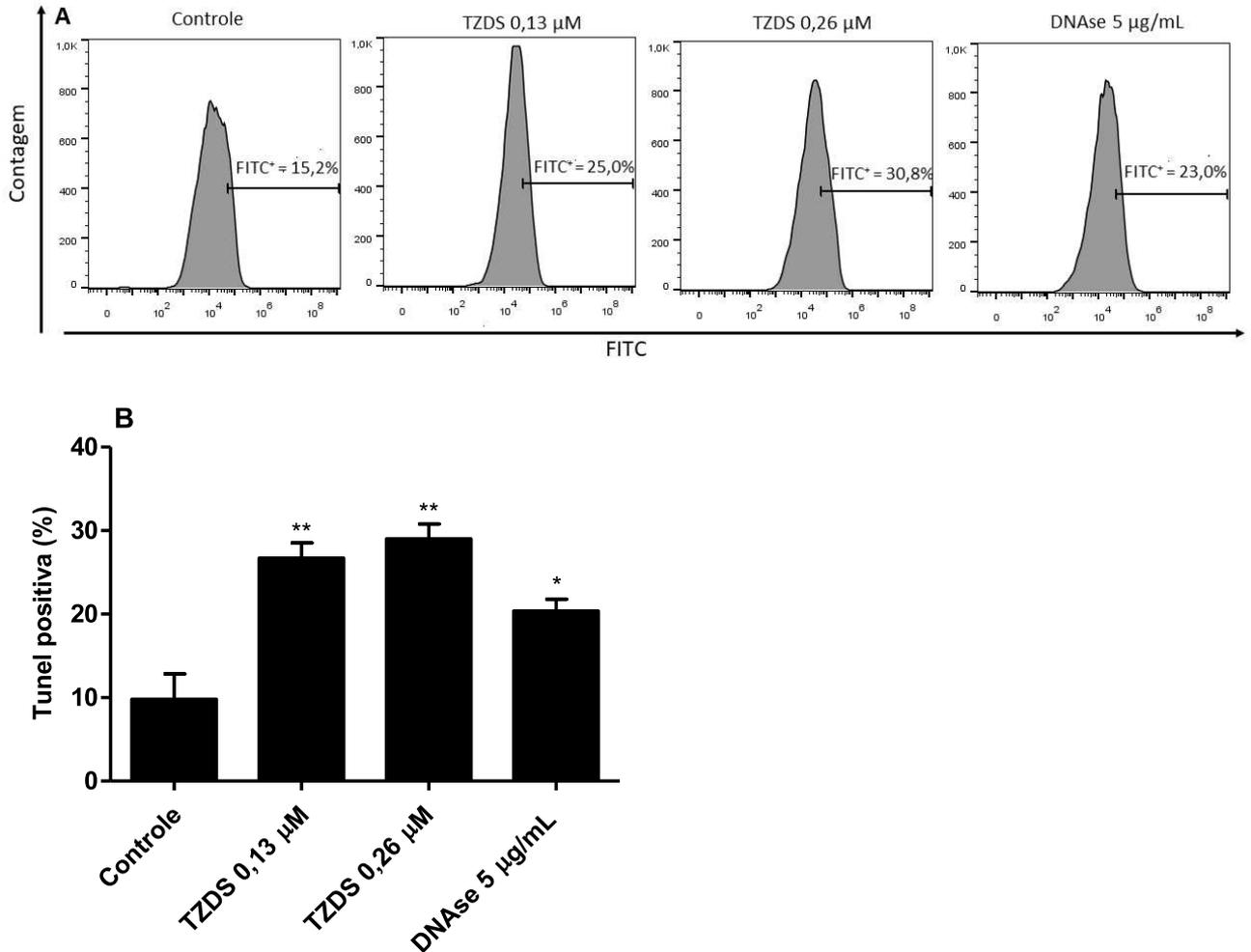


Figura 21: Análise da fragmentação do DNA em promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com TZDS. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram tratados com TZDS por 24 h. Após esse tempo, as células foram incubadas com o kit TUNEL e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos da fragmentação de DNA induzida por TDZS. (B) Células positivas TUNEL representadas como um gráfico de barras. A DNase foi usada como controle positivo. $P < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), diferença significativa em relação ao controle não tratado.

No intuito de avaliar se o mecanismo de ação do TZDS envolve ruptura da membrana plasmática, evento associado à morte celular por necrose, realizou-se a marcação com iodeto de propídeo (PI). No entanto, os resultados apresentados na figura 22 mostraram que a integridade da membrana plasmática

dos promastigotas permaneceu inalterada após 24h de exposição ao composto, não indicando interferência do composto sobre a integridade da membrana plasmática do parasito.

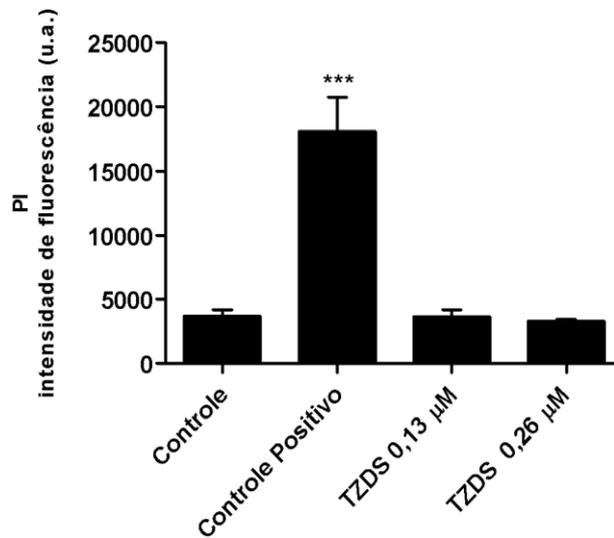


Figura 22: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto TZDS. Os parasitos foram tratados com o composto com TZDS (0,13 e 0.26µM) por 24h e a integridade da membrana plasmática foi avaliada através da marcação com PI. Parasitos aquecidos a 60°C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 utilizando análise de variância (One way ANOVA) acompanhada de pós teste de Dunnett: P< 0,0001 (***)

Foi também avaliada a possível ocorrência de morte por autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZDS. Para isso foi realizada a marcação com MDC, um marcador para vacúolos autofágicos e as amostras foram avaliadas por fluorimetria. Assim, foi observado um aumento na intensidade de fluorescência para MDC na maior concentração avaliada (0.26µM), sugerindo a indução de morte por autofagia nos parasitas. Como esperado, promastigotas em fase estacionária e miltefosina, utilizada como controle positivo, também induziram a formação de vacúolos autofágicos (Figura 23).

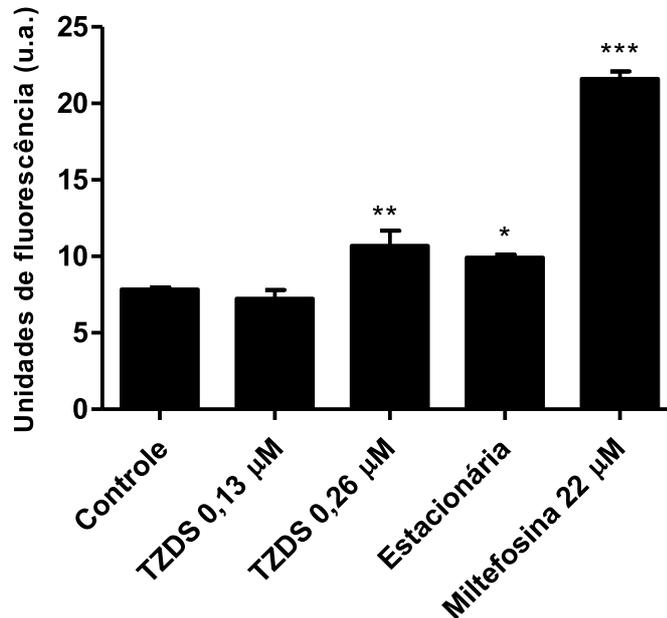


Figura 23: Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de *L. amazonensis* com TZDS. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 0,13µM e 0,26 µM do TZDS por 24h e, em seguida foram marcadas com MDC e a intensidade de fluorescência foi quantificada por fluorimetria. $P < 0,001$ (***), diferença significativa comparada com o controle negativo. Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Após o conjunto de dados obtidos com as formas promastigotas, tentou-se explorar o efeito de TZDS nas formas intracelulares de *L. amazonensis*, mesmo sabendo que os resultados obtidos estariam associados à célula hospedeira. Inicialmente, visto o estresse oxidativo observado após o tratamento das formas extracelulares, objetivou-se também verificar se a atividade antimastigota poderia estar relacionada à ativação de mecanismos oxidativos na célula hospedeira tratada.

Os resultados mostraram que não houve alteração, estatisticamente significativa, nos níveis de ROS em nenhuma das concentrações usadas, excluindo a produção de ROS associada ao efeito antileishmanial em macrófagos infectados. Entretanto, como esperado, os macrófagos infectados respondem à estimulação com H_2O_2 com aumento na produção de ROS (Figura 24).

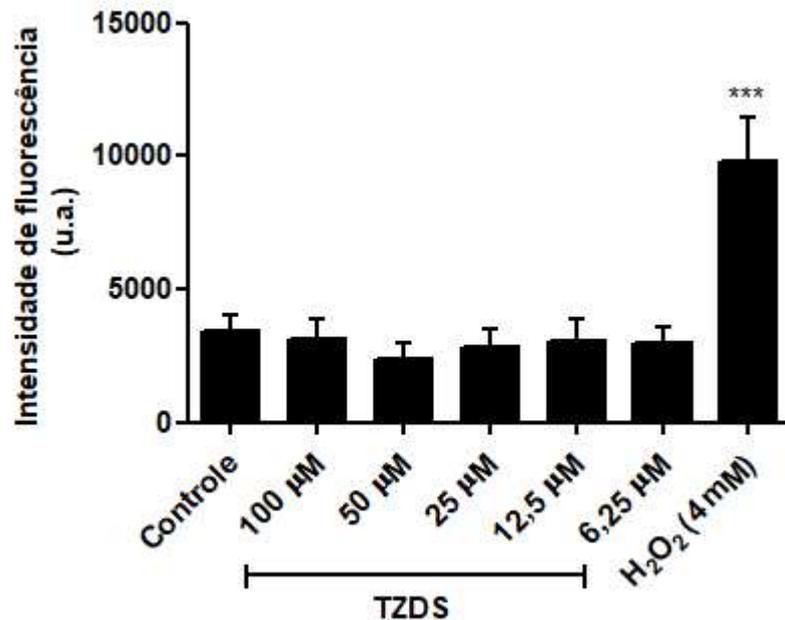


Figura 24: Determinação dos níveis de ROS em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com TZDS. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados ou não-tratados com diferentes concentrações do composto TZDS por 72h e marcados com a sonda fluorescente H₂DCFDA. A intensidade de fluorescência foi avaliada por fluorimetria no par de filtro de 485/528nm. P<0,001 (***) , diferença significativa comparada com o controle negativo. Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Adicionalmente, foi verificado se o efeito antileishmanial poderia estar relacionado à produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados. Entretanto, como pode ser verificado na figura 25, não houve alteração nos níveis de nitrito em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com TZDS. Ao contrário, o tratamento inibiu a produção de nitrito nas maiores concentrações, excluindo associação da atividade antileishmanial à produção de NO.

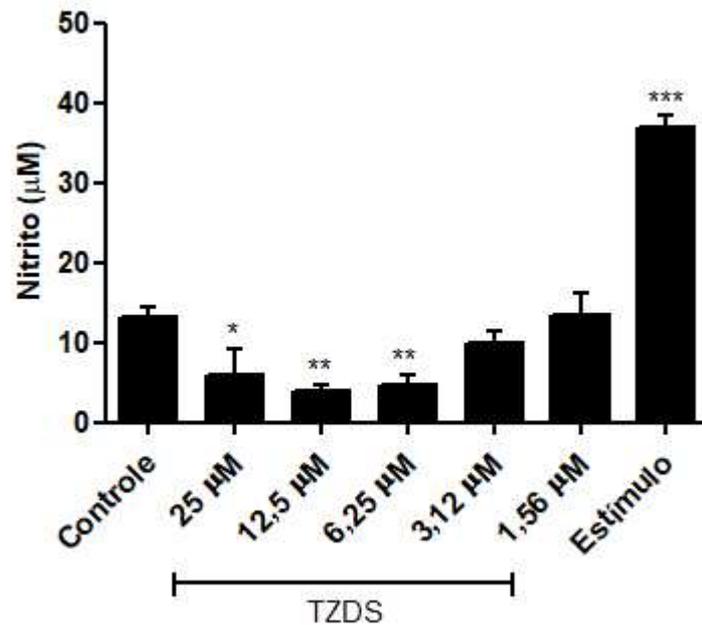


Figura 25: Avaliação da produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com TZDS. Macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* e incubados com diferentes concentrações do TZDS. Após 72h, os níveis de nitrito foram quantificados pelo método de Griess. Estimulo = Como controle positivo: macrófagos infectados e estimulados com LPS + INF- γ . P<0,0001 (***) , diferença significativa comparada com o controle de macrófagos infectados. NS: Diferença não significativa entre os grupos. Os dados foram expressos como a média de pelo menos dois experimentos independentes.

4.1.3 Análise ultraestrutural pela MEV e MET.

Após o tratamento com TZDS nas concentrações de uma vez o IC50 e duas vezes o IC50, as promastigotas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). As análises por MET para os grupos controles e DMSO não evidenciaram nenhuma alteração ultraestrutural (figuras 26a e 26b). Para análise por MET promastigotas tratadas com TZDS a 0,13µM exibiram várias alterações visíveis (Figura 27 A - E). Vacúolos contendo material amorfo, vacúolos com perfis membranosos e um grande vacúolo no centro contendo estruturas membranosas e material amorfo são observados. Gotículas lipídicas eletrodensas do inglês lipid droplets (LD) também estão presentes. (b, c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar (FP) são evidentes. O núcleo parece

não ser afetado. Em (c), o cinetoplasto é observado dentro de uma mitocôndria alterada. (d) Mitocôndrias inchadas (estrela) são visualizadas. (e) Em maior ampliação, um grande vacúolo contendo vacúolos menores com perfis membranosos, assemelhando-se a um autofagossomo, é observado.

As alterações ultraestruturais observadas após tratamento com TZDS a 0,26 μ M foram demonstradas na Figura 26. Em 26 (a) Vacúolos contendo material amorfo e gotículas lipídicas eletrondensas do inglês lipid droplets (LD) são observados. Numerosos perfis reticulares e vacúolos agrupados também foram evidentes. (b) O cinetoplasto localizado-se dentro de uma mitocôndria danificada. Parece haver uma associação entre vacúolos menores e um vacúolo maior, com diferenças estruturais observadas onde as membranas das duas organelas estão em estreita proximidade. Vacúolos com perfis membranosos também estão presentes. (c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar, flagellar pocket (FP) são evidentes. (d, e, f). Além das alterações descritas anteriormente, perfis membranosos na superfície externa de diferentes células são observados.

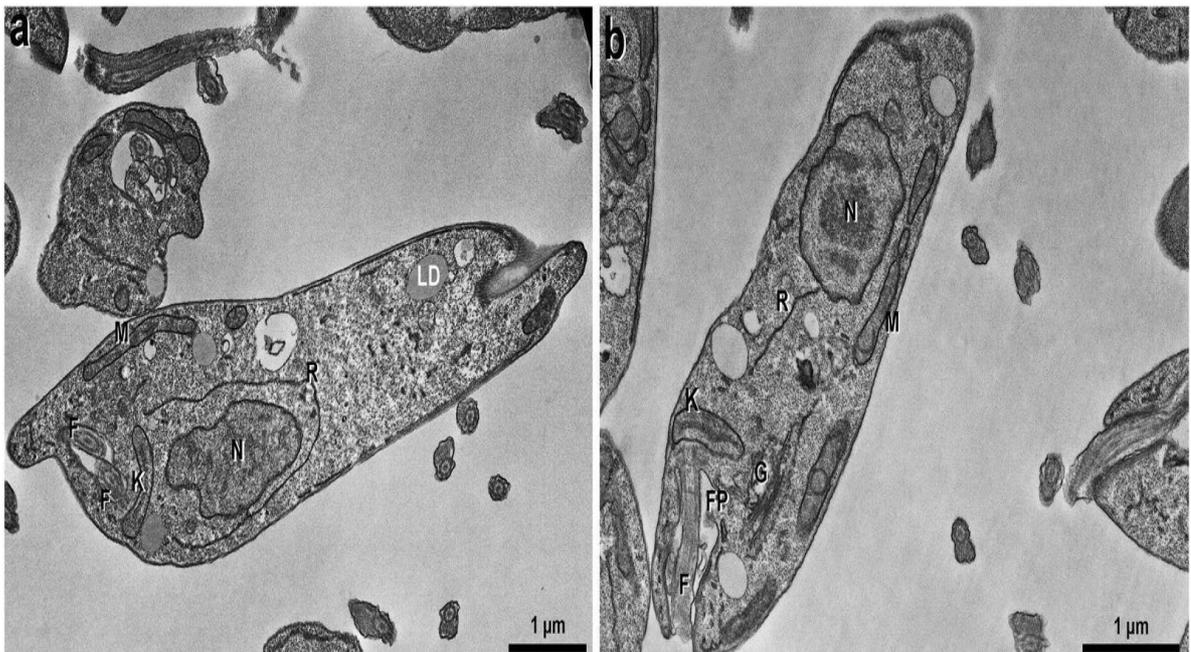


Figura 26: (Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a $0,13\mu\text{M}$ em promastigotas de *L. amazonensis*. a) Controle demonstrando parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Interação com o solvente orgânico DMSO, sem alterações na morfologia dos parasitos.

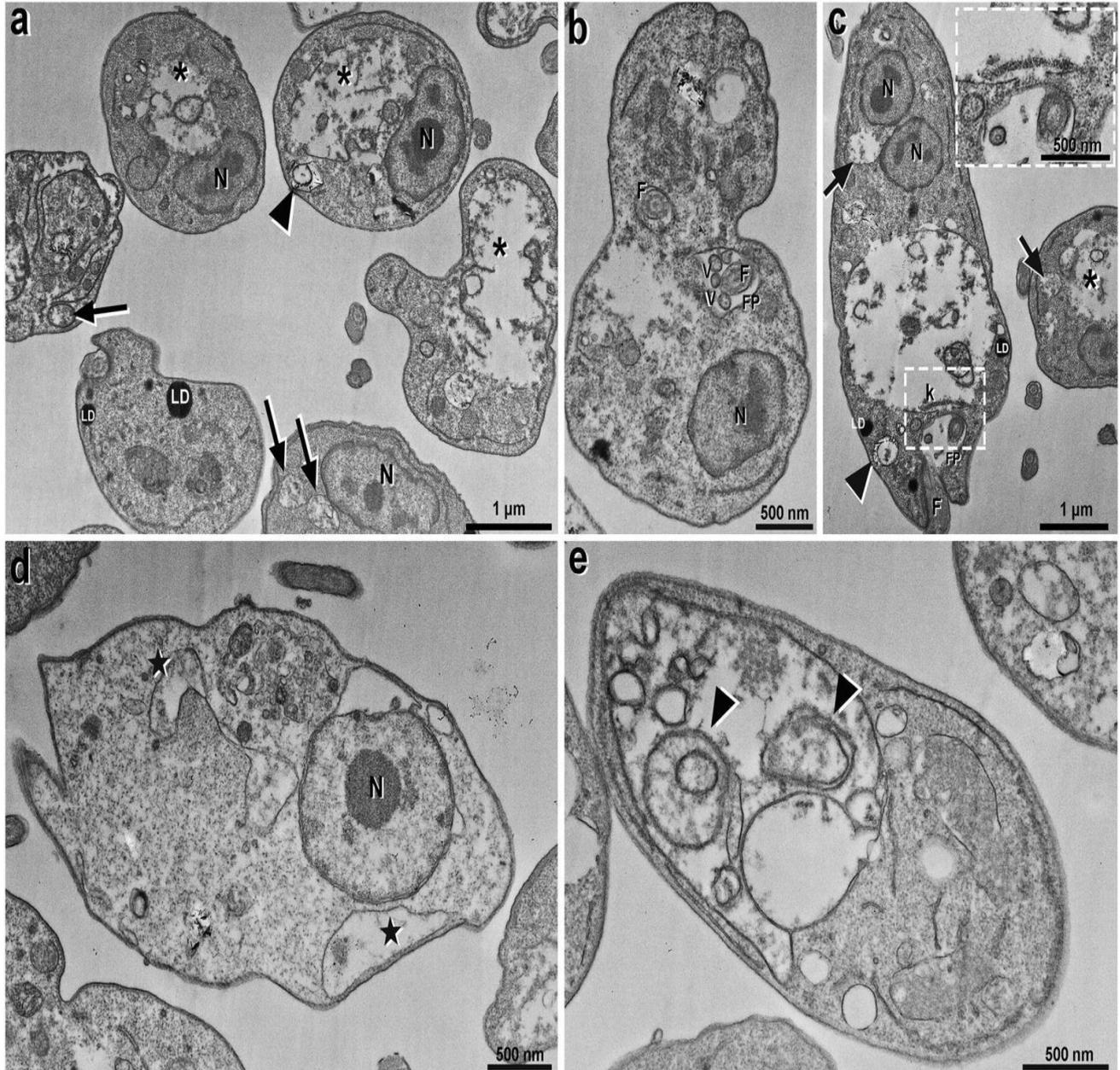


Figura 27: Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a $0,13\mu\text{M}$ em promastigotas de *L. amazonensis*. (a) Células exibindo várias alterações visíveis. Vacúolos (seta) contendo material amorfo, vacúolos com perfis membranosos (ponta de seta preta) e um grande vacúolo (asterisco) no centro contendo estruturas membranosas e material amorfo são observados. Gotículas lipídicas densas em elétrons (LD) também estão presentes. (b, c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar (FP) são evidentes. O núcleo parece não afetado. Em (c), o cinetoplasto é observado dentro de uma mitocôndria alterada. (d) Mitocôndrias inchadas (estrela) foram visualizadas. (e) Em maior ampliação, um grande vacúolo contendo vacúolos menores com perfis membranosos (ponta de seta preta), assemelhando-se a um autofagossomo, foi

observado.

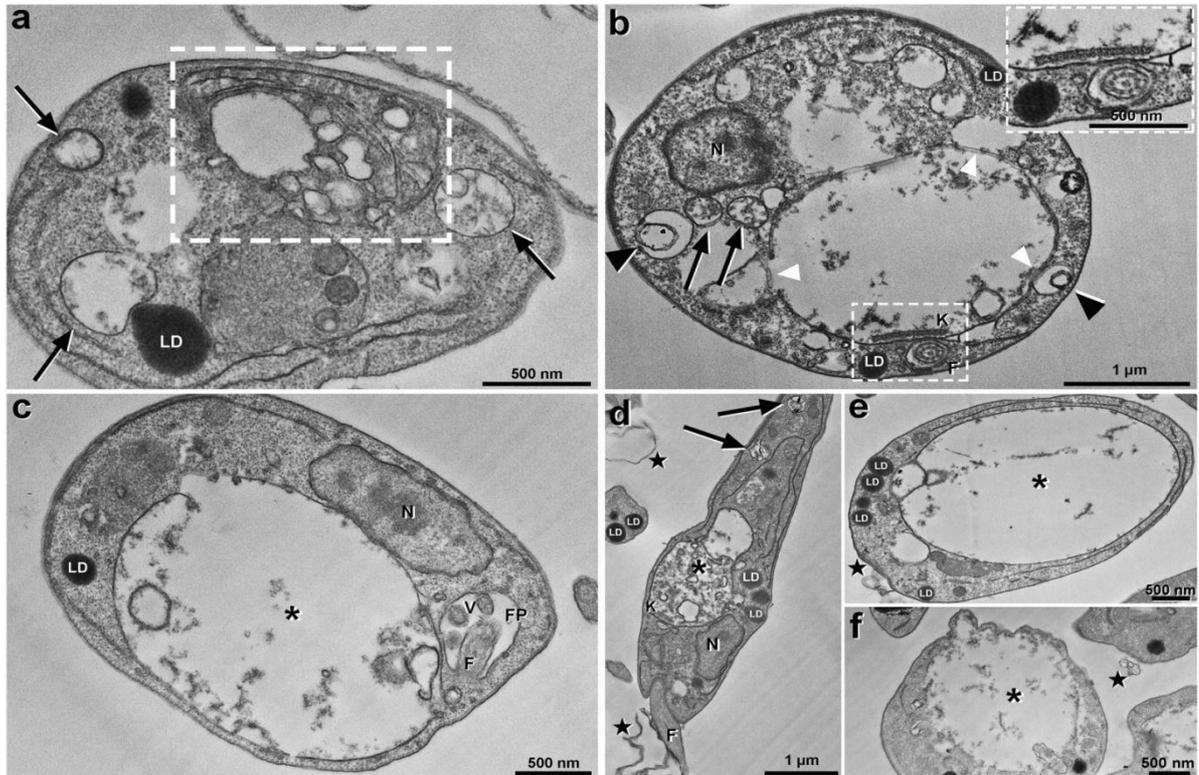


Figura 28: Análise ultraestrutural dos efeitos de TZDS a $0,26\mu\text{M}$ em promastigotas de *L. amazonensis*. (a) Vacúolos (seta) contendo material amorfo e gotículas lipídicas elétrondensas do inglês lipid droplets (LD) foram observados. Numerosos perfis reticulares e vacúolos agrupados (dentro do quadrado) também são evidentes. (b) O cinetoplasto está localizado dentro de uma mitocôndria danificada. Parece haver uma associação entre vacúolos menores e um vacúolo maior, com diferenças estruturais observadas onde as membranas das duas organelas estão em estreita proximidade (ponta de seta branca). Vacúolos com perfis membranosos (ponta de seta preta) também estão presentes. (c) Estruturas vesiculares (V) na bolsa flagelar, flagellar pocket (FP) são evidentes. (d, e, f) Além das alterações descritas anteriormente, perfis membranosos na superfície externa de diferentes células (estrela) foram observados.

As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com TDZS em promastigotas de *L. amazonensis* foram analisadas por MEV e as imagens foram apresentadas na figura 29. O tratamento com TZDS induziu diferentes alterações morfológicas nos parasitos, como rugosidade da membrana plasmática, encolhimento celular e redução no comprimento (Fig. 29-C-F). Células tratadas com TZDS $0,26\mu\text{M}$ apresentaram estruturas semelhantes a vesículas brotando em diferentes regiões do corpo do parasito (Fig. 29-E-F). Os controles evidenciaram promastigotas em sua morfologia alongada típica (Fig. 29-A-B).

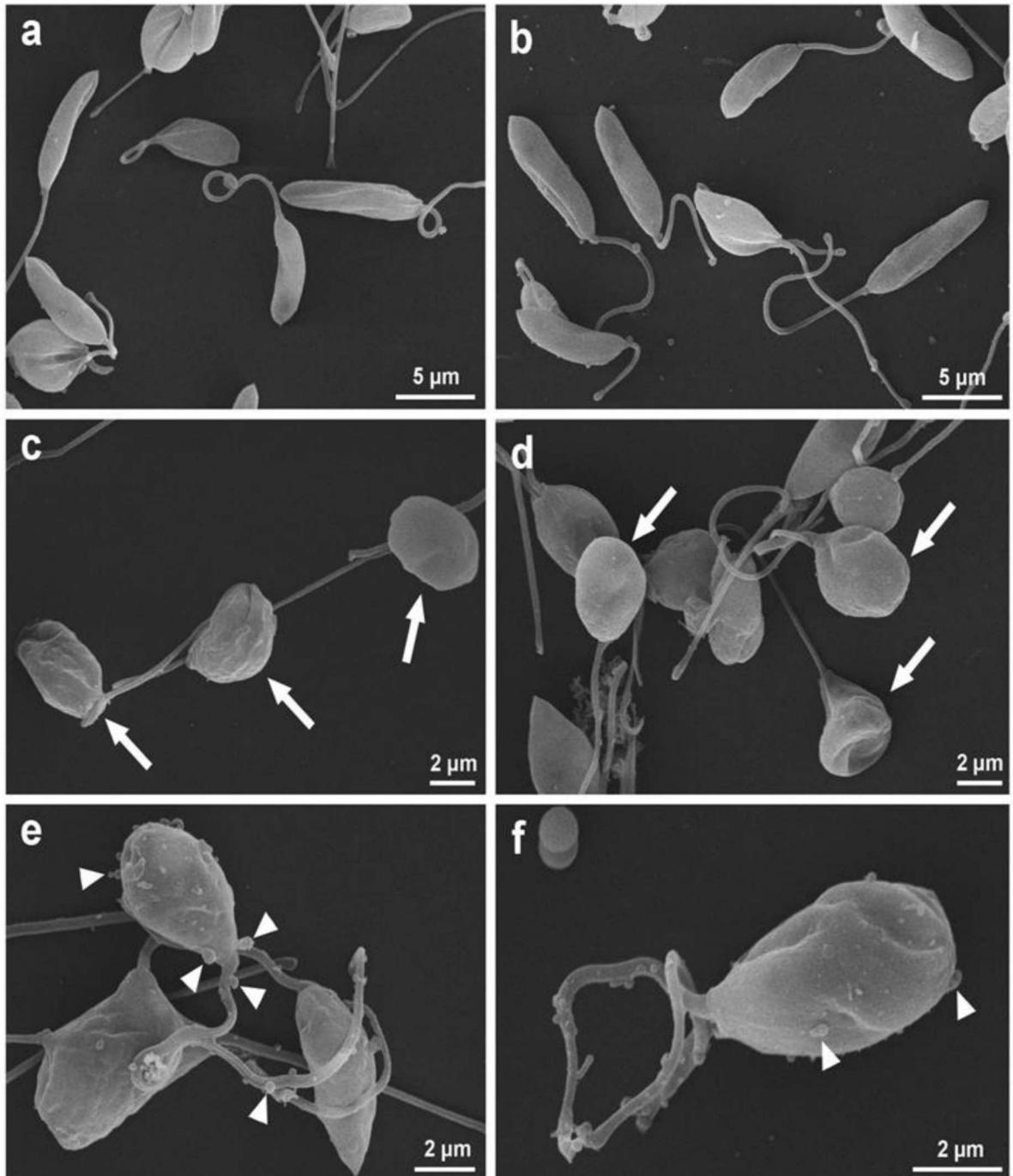


Figura 29: Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Promastigotas de *L. amazonensis*. tratadas com TZDS (a) Controle demonstrando vários parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Interação com o solvente orgânico DMSO, sem alterações na morfologia dos parasitos. (c, d) Efeito do TZDS em 0,13 μM . Células com morfologia arredondadas (seta) e com leve rugosidade na membrana. (e, f) Efeito do TZDS em 0,26 μM . Nota-se o brotamento de estruturas semelhantes a vesículas (cabeça de seta) em diferentes regiões do corpo do parasito.

4.1.4 Estudos da associação do TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Foram avaliados os efeitos da associação do TZDS com miltefosina no tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Com base nos valores obtidos de concentração inibitória fracionária (ΣFIC_{50}) calculada para cada esquema de associação testado, a combinação do TZDS com miltefosina mostrou ser uma interação aditiva, com valores ΣFIC_{50} variando de 1,31 a 3,63 μ M. Além disso, o CI_{50} do TZDS associado foi menor do que o CI_{50} do composto isolado em todos os esquemas de associação avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Associação da TZDS com miltefosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Proporção de associação	Associação						ΣFIC_{50}^c
	IC_{50}^a μ M		FIC_{50}^b				
	TZDS	Miltefosina	TZDS	Miltefosina	TZDS	Miltefosina	
4	1	1,39 (1,18-1,63)	4,22 (3,60-4,96)	0,67	2,96	3,63	
3	2	1,16 (1,02-1,33)	9,44 (8,24-10,87)	0,56	0,75	1,31	
2	3	0,7 (0,61-0,81)	12,80 (11,10-14,76)	0,34	1,02	1,36	
1	4	0,36 (0,31-0,41)	17,30 (14,94-20,04)	0,17	1,38	1,55	

Determinação da concentração inibitória fracionárias (FICs) e classificação da natureza da interação: ^a CI_{50} = Concentração inibitória para 50% do crescimento parasitário. ^b FIC_{50} = Concentração inibitória fracionária para 50% do crescimento parasitário. ^c ΣFIC_{50} = soma dos FICs. Associação do TZDS com a miltefosina em diferentes proporções (4:1, 3:2, 2:3 e 1:4). Os resultados obtidos a partir de 3 experimentos independentes em duplicata. A média geral ΣFIC classifica a natureza da interação em sinergismo, ($\Sigma FIC \leq 0,5$) aditivo (ΣFIC entre $> 0,5$ e ≤ 4), antagonismo ($\Sigma FIC > 4$)

5 DISCUSSÃO

Sais de triazol previamente sintetizados pelo grupo têm mostrado resultados promissores contra câncer e leishmanioses, geralmente apresentando grupos $-\text{CH}_2\text{OH}_3$ ligados à posição 4 do anel triazol (Ramos *et al.*, 2022; Stroppa *et al.*, 2017; Souza-Fagundes *et al.*, 2018). Nos compostos apresentados neste trabalho, este grupo é substituído por $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ para investigar o impacto desta substituição na atividade biológica. Os compostos TZD e TZDS foram testados anteriormente contra o câncer de mama, e o TZDS mostrou-se promissor devido ao seu efeito pronunciado contra células tumorais MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 6,4 \mu\text{M}$) e sua capacidade de inibir o desenvolvimento do tumor em ensaios clonogênicos (Paula *et al.*, 2024).

Aqui, pela primeira vez, a ação antileishmanial *in vitro* do TZDS foi investigada contra a *L. amazonensis*. *Leishmania amazonensis* é uma espécie que assume particular importância médica, sendo associada a manifestações clínicas notavelmente diversas, incluindo leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (DCL), além das formas mais graves com resposta precária ao tratamento, como a leishmaniose cutânea difusa anérgica (ACDL) e, menos frequentemente, leishmaniose mucosa e visceral (Carneiro, Peters, 2023; Silveira *et al.*, 2004).

O TZDS demonstrou alta eficácia contra *L. amazonensis*, mas sua atividade contra outras espécies do gênero *Leishmania* (como *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*) ainda precisa ser investigada. Testes adicionais podem determinar se o composto tem um amplo espectro de ação ou se sua eficácia é espécie-específica. Diferenças na bioquímica mitocondrial e na resistência ao estresse oxidativo entre as espécies podem influenciar a resposta ao TZDS (Sundar, 2018).

O composto TZDS exibiu um efeito significativamente melhorado nas

formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* quando comparado ao seu precursor não iônico, TZD. A atividade melhorada do TZDS, quando comparado ao seu precursor não iônico, é provavelmente devido à presença do triazólio catiônico que apresenta alta variabilidade estrutural e pode formar interações eletrostáticas com componentes aniônicos na membrana celular (Song *et al.*, 2023). A formação do sal orgânico é essencial para a atividade contra a leishmaniose. Estudos anteriores (Chagas *et al.*, 2022; Meinel *et al.*, 2020; Stroppa *et al.*, 2017) mostraram que, enquanto o triazol neutro era inativo, seu derivado de sal exibia atividade promissora contra a leishmaniose. Essa observação foi consistente com os resultados demonstrados no nosso trabalho, reforçando a importância da formação de sal para melhorar a eficácia do composto.

Além disso, o TZDS apresentou-se mais destrutivo para os parasitas intracelulares do que para os macrófagos com índice de seletividade (IS ~ 34), sendo este valor maior do que o do fármaco padrão, miltefosina (IS ~ 12). Apesar do IS ser considerado como um dos parâmetros mais relevantes para a seleção de novos fármacos com atividade em *Leishmania* spp, diferentes critérios têm sido utilizados quanto a sua definição quantitativa. Para alguns autores (Fonseca-Silva *et al.*, 2016; Gervazoni *et al.*, 2018) quando $IS \geq 10$ indica que o composto não foi tóxico para os parasitos. Para outros autores, um IS maior que 20 é considerado adequado para seleção de novos fármacos (Araújo *et al.*, 2019). Por outro lado, alguns artigos compararam o SI encontrado e o SI do medicamento de referência (Bilbao-Ramos *et al.*, 2020; Robledo *et al.*, 2022). É importante destacar que o TZDS cumpre satisfatoriamente o índice de seletividade, independentemente da referência utilizada.

Embora o Índice de Seletividade (IS) sugira um perfil seguro in vitro, testes em modelos animais são essenciais para avaliar a toxicidade sistêmica, a biodisponibilidade, o metabolismo e possíveis efeitos adversos do composto. Estudos in vivo podem revelar interações do TZDS com sistemas fisiológicos, potencial hepatotoxicidade, nefrotoxicidade ou imunomodulação que não são

evidentes em cultura celular (Pawar, 2023).

Considerando os resultados promissores com TZDS, foi decidido investigar detalhadamente os efeitos biológicos, visando identificar os mecanismos envolvidos na morte celular do parasito induzida pelo composto. Então, inicialmente nossos estudos foram focados na investigação dos distúrbios mitocondriais e suas consequências, visto que esta organela pode ser apontada como um dos reguladores mais importantes envolvidos na morte celular de parasitos tripanosomatídeos como *Leishmania* spp. (Fidalgo; Gille, 2011; Menna-Barreto; De Castro, 2014). Diferentes das células de mamíferos, os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria e, portanto, a sobrevivência e proliferação dos mesmos dependem do funcionamento adequado dessa organela para desempenhar vários processos metabólicos essenciais, incluindo a geração da energia necessária na forma de trifosfato de adenosina (ATP).

Neste estudo, as promastigotas tratados com TZDS apresentaram hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, a qual foi detectada 6 horas após a adição do fármaco e sustentada em 24 horas de tratamento. O $\Delta\Psi_m$ é essencial para a manutenção e regulação da função fisiológica da cadeia respiratória, e variações significativas no $\Delta\Psi_m$ esgotam a energia das células com subsequente morte do parasito.

A hiperpolarização mitocondrial pode ser um evento transitório antes do colapso total da mitocôndria, estudos em tempos mais longos poderiam esclarecer se o $\Delta\Psi_m$ continua aumentando, se há um colapso subsequente e se isso está associado a uma perda da integridade mitocondrial, liberação de pró-apoptóticos ou cessação completa da atividade respiratória. Ensaios adicionais com tempos de incubação superiores a 24h, acompanhados por marcadores de apoptose, poderiam fornecer essas respostas (Rokitskaya *et al.*, 2019).

Para avaliar a possível indução da formação de ROS em resposta ao TZDS, o ROS foi avaliado no início (6h) e no final (24h) após o tratamento. Nenhuma alteração nos níveis de ROS foi detectada após 6 horas de tratamento, no entanto, um aumento significativo na geração de ROS ocorreu após 24 horas de tratamento. Portanto, nossos resultados revelaram que a hiperpolarização do $\Delta\Psi_m$ é um evento que ocorre principalmente na mitocôndria, sendo implicado no desencadeamento do acúmulo de ROS.

Alterações semelhantes foram observadas em *Leishmania* tratada com outros sais de triazolio (Baldissera *et al.*, 2023; Chagas *et al.*, 2021; Figarella *et al.*, 2015). Outros estudos sobre os sais de triazóis, sugerem que o efeito eletrônico mitocondrial mais forte dos sais de 1,2,3-triazólico em células tumorais se correlacionou com seu efeito protonofórico, exibindo uma atividade de desacoplamento pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial (Rokitskaya *et al.*, 2019).

É plausível que a hiperpolarização observada possa caracterizar uma maior atividade mitocondrial, resultante de um maior fluxo através da cadeia de transporte de elétrons que pode ser responsável pelo aumento de radicais de oxigênio encontrados. De acordo com os dados da literatura, a hiperpolarização do potencial da membrana mitocondrial com consequente aumento na produção de ROS é um evento tipicamente observado em resposta à inibição do complexo I da cadeia respiratória. Certamente, tanto a diminuição de $\Delta\Psi_m$ quanto a hiperpolarização culminam na morte celular do parasita, demonstrando a importância da manutenção de $\Delta\Psi_m$ adequado para a sobrevivência desses parasitas (Baldissera *et al.*, 2023; Mehta, Saha, 2004).

Em seguida, foram explorados se a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo afetavam o funcionamento de outras organelas e estruturas indispensáveis à sobrevivência do parasita. Sabe-se que a geração excessiva de ROS desencadeada pela disfunção mitocondrial pode levar à oxidação lipídica, causando

perturbações no metabolismo lipídico dos parasitas (Scariot *et al.*, 2017). Corpos lipídicos são organelas dinâmicas responsáveis pelo armazenamento de lipídios neutros como triacilglicerol e ésteres de colesterol no citoplasma celular sob condições homeostáticas, sendo que dentre as várias funções, tem o papel de servir como fontes de energia de ácidos graxos e depósitos de colesterol (Lee *et al.* 2013). Entretanto, a formação excessiva dessas estruturas é característica de suprir necessidades energéticas em condições de estresse como as geradas pela disfunção mitocondrial induzida por drogas (Almeida-Souza *et al.*, 2020; Antinarelli *et al.* 2023; Chagas *et al.* 2022). De fato, um aumento dos níveis de lipídios neutros após o tratamento com TZDS foi detectado por fluorimetria, o que também foi corroborado por imagens de MET que mostraram a presença dessas estruturas no citoplasma de promastigotas. Assim, a exacerbação na formação dessas organelas pode estar ligada a uma tentativa de proteger a célula contra o estresse oxidativo causado pelo mau funcionamento mitocondrial (Lee *et al.* 2013, Henne *et al.* 2018).

Para uma melhor compreensão dos efeitos do TZDS em promastigotas de *L. amazonensis*, características dos mecanismos de morte celular foram então avaliadas. Alterações morfológicas em parasitas tratados com TZDS foram evidentes na análise MEV, a qual revelou intensas alterações morfológicas em parasitas, como rugosidade da membrana plasmática, encolhimento celular e redução no comprimento. Processos semelhantes de desorganização citoesquelética foram descritos na literatura após exposição a medicamentos, incluindo derivados de triazóis. Essas alterações morfológicas foram associadas à perda da integridade citoesquelética desencadeada por um sinal apoptótico (Aureliano *et al.*, 2018; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2010).

A ocorrência de morte celular também pode ser reconhecida no nível da membrana celular pela perda de assimetria da membrana plasmática. Essas modificações da membrana do parasita são geralmente detectadas pela externalização de fosfolipídios aniônicos para a superfície celular, principalmente moléculas de fosfatidilserina (PS) que se translocam para o exterior da membrana

celular como uma característica apoptótica precoce. Então, a marcação com anexina V-FITC permite que se ligue à fosfatidilserina (PS). Ao associar também o iodeto de propídio (PI), é possível detectar células com permeabilidade de membrana alterada, indicativa da ocorrência de estágios tardios de apoptose ou mesmo necrose. Em relação aos resultados, o tratamento com TZDS induziu principalmente apoptose-*like* (seja precoce ou tardia) em vez de necrose. Esse forte efeito na membrana plasmática pode ser devido às interações eletrostáticas do sal de triazólio com componentes aniônicos na membrana do parasita. As propriedades protonofóricas do cátion triazólio são críticas para transportar prótons através das membranas lipídicas para exercer sua ação biológica (Rokitskaya *et al.*, 2019).

Compostos derivados da estrutura triazol já foram associados à interrupção do ciclo celular em *Leishmania* spp. Corroborando com esses resultados, foi verificado que o tratamento com TZDS também promoveu alterações significativas no ciclo celular em promastigotas, induzindo um aumento expressivo na proporção de células na fase sub G0/G1, seguido pela diminuição da subpopulação na fase G1 e aumento da subpopulação na fase S, com consequente inibição na síntese de DNA que influencia negativamente o crescimento do parasita. O TZDS pode estar interferindo na atividade das DNA polimerases, impedindo a síntese de novo DNA. Outra possibilidade é a inibição da topoisomerase I ou II, enzimas responsáveis por aliviar o superenrolamento do DNA durante a replicação. O acúmulo de células na fase sub GO/G1 do ciclo celular é um forte indício da presença de células com DNA fragmentado, uma marca registrada do processo de morte celular por apoptose. Associada à análise do ciclo celular, o dano nuclear irreversível causado pela degradação do DNA foi reafirmado pelo ensaio TUNEL (Scariot *et al.*, 2017, Stroppa *et al.*, 2017).

Também foram avaliados se a autofagia poderia ser induzida diretamente pelo efeito do TZDS em parasitas. Na autofagia, a homeostase celular é mantida pela degradação de proteínas e organelas danificadas em uma tentativa de remodelar/remover constituintes celulares anormais. Em condições de estresse celular, incluindo a presença de agentes farmacológicos, a autofagia atua como um

mecanismo de sobrevivência celular, mas também pode desencadear a morte celular se for exacerbada. Por sua vez, o composto gerou vacúolos autofágicos em parasitas detectados pelo aumento da fluorescência na coloração MDC. Além disso, outra indicação clara de que o processo autofágico está ocorrendo é o aparecimento de estruturas semelhantes a autofagossomos por imagens MET.

Dados anteriores da literatura envolvendo a ação antileishmania de moléculas de triazol revelaram a capacidade deste grupo funcional em desencadear a morte celular por apoptose e autofagia, o que pode gerar um efeito sinérgico em parasitas (Scariot *et al.*, 2017, Stroppa *et al.*, 2017). Por exemplo, o cetoconazol tem sido relacionado à morte celular induzida por apoptose, bem como à exacerbção da autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* (Nunes *et al.*, 2022). As moléculas de triazol acopladas à ergosterona apresentaram alguns fenótipos semelhantes à apoptose, especialmente a exposição à fosfatidilserina, dano ao DNA que foi mediado pelo aumento da autofagia (Figarella *et al.*, 2015). Recentemente, Basmacıyan e colegas (2018) evidenciaram que a miltefosina, um indutor clássico de apoptose semelhante em *Leishmania* spp., inicia o processo de morte celular por meio da formação precoce de vacúolos autofágicos que culminam, após estresse prolongado, no desencadeamento da morte celular apoptótica (Basmacıyan *et al.*, 2018).

Baseado nestes resultados, a hipótese para a atividade antileishmanial está mais relacionada aos efeitos diretos do composto sobre o parasito, induzindo inicialmente alterações do potencial de membrana, do que a ação de ativação de mecanismos oxidativos de destruição pelos macrófagos infectados, visto que não foram encontrados ROS e NO em quantidades estatisticamente significantes em cultura macrófagos infectados com *L. amazonensis*, tratados com TZDS. A figura 30 resume os resultados encontrados nos ensaios de esclarecimento dos mecanismos de ação do composto TZDS em promastigotas *L. amazonensis*.

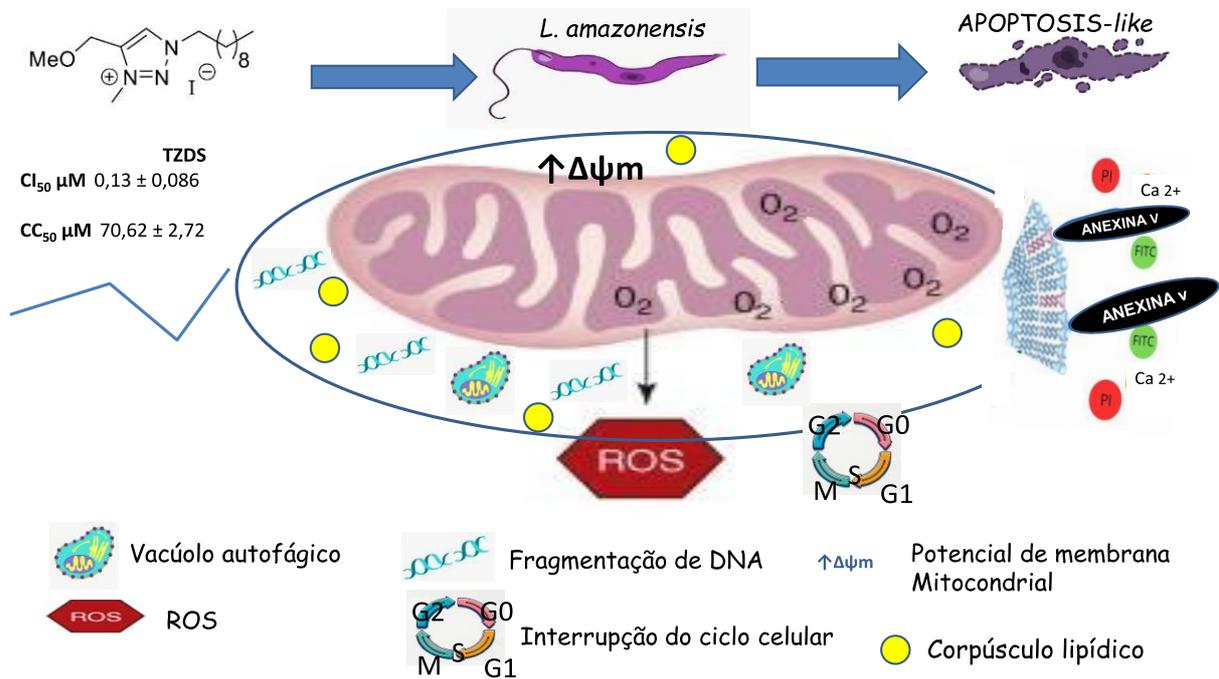


Figura 30: Resumo esquemático dos resultados para pesquisa de mecanismo de ação do composto TZDS. Nas concentrações de Uma vez o IC₅₀ e duas vezes o IC₅₀, houve surgimento de corpúsculos lipídicos, hiperpolarização de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA, formação de vacúolos autofágicos, aumento da produção de ROS, parada do ciclo celular, exposição de fosfatidilserina. Software powerpont. Fonte própria autora.

A associação terapêutica de fármacos tem sido considerada uma abordagem promissora para melhorar a eficácia dos tratamentos de monoterapia, reduzindo a toxicidade, os efeitos colaterais e a resistência aos fármacos (Antinerelli *et. al.*, 2015; OPAS, 2022). Assim, para incrementar a ação antileishmania do TZDS, foi também avaliado o efeito de sua combinação com miltefosina. Estes resultados demonstraram efeito aditivo entre TZDS e miltefosina em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, demonstrando o aumento do potencial antileishmanial do TZDS. Esses resultados são relevantes, pois mesmo efeitos aditivos em associações medicamentosas podem representar melhora significativa nas condições clínicas dos pacientes quando doses reduzidas de cada fármaco podem atingir o mesmo resultado terapêutico, além de limitar a toxicidade e os efeitos colaterais, e reduzir a chance de resistência aos fármacos (Sun *et al.*, 2016; Triconi *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o composto TZDS apresenta atividade antileishmanial promissora, com alta seletividade para o parasito, especialmente contra a forma amastigota, a forma clinicamente relevante. Os estudos de modo de ação indicam que o composto atua por múltiplos mecanismos, incluindo disfunção mitocondrial e indução de morte principalmente por apoptose-*like*. Esses resultados encorajam a continuidade dos estudos para avaliar a eficácia *in vivo* do TZDS no tratamento da leishmaniose em modelos murinos de infecção por *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, MOHAMMAD *et al.* *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects of Med*, v. 57, p. 1-29, 2017.

ALEIXO J.A.; *et al.* Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Jan;100(1):79-82. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.06.025. Epub 2005 Sep 29. PMID: 16198385.

ALMEIDA, R.P. *et al.* Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in balb/c mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(2), 1996, p. 178-184.

ALMEIDA-SOUZA F.; *et al.* 1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole Compounds Induce Ultrastructural Alterations in *Leishmania amazonensis* Promastigote: An in Vitro Antileishmanial and in Silico Pharmacokinetic Study. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 18;21(18):6839.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ANGAJALA, K. K *et al.* Synthesis, anti-inflammatory, bactericidal activities and docking studies of novel 1, 2, 3-triazoles derived from ibuprofen using click chemistry. *SpringerPlus*, v. 5, p. 1-15, 2016.

ANTINARELLI, L. M.R; *et al.* DIAS, R. M.; SOUZA, I.O.; LIMA, W. P.; GAMEIRO, J.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. 4- Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents. *Chemical Biology & Drug Design*, v.86, p.704-714, 2015.

ANTINARELLI, L.M.R.; *et al.* Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: Induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v.195, p.78-86, 2018.

ANTINARELLI, L.M.R *et al.* Exploring the repositioning of the amodiaquine as potential drug against visceral leishmaniasis: The *in vitro* effect against *Leishmania infantum* is associated with multiple mechanisms, involving mitochondria dysfunction, oxidative stress and loss of cell cycle control *Chemico-Biological Interactions* v 1 February 2023, p 110333

ARAÚJO, I.A.C; *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2019 Apr;199:67-73. doi: 10.1016/j.exppara.2019.02.013.

AURELIANO, D.P.; *et al.* Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Sep; 23:1-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.005.

BADARÓ R. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina -Bahia 1934-1989. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 21:159-164, Out-Dez, 1988. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821988000400001>

BALDISSERA, F.G; *et al* Imidazolium salts as an alternative for anti-*Leishmania* drugs: Oxidative and immunomodulatory activities. *Front Immunol.* 2023 Jan 17;13:1096312. doi: 10.3389/fimmu.2022.1096312.

BALTAZAR, FABIO NAVARRO. Otimização de novos candidatos a fármacos para Leishmaniose Visceral Canina – TESE DE DOUTORADO — 2022 - <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/06/1436553/tese-de-doutorado-fabio-navarro-baltazar-fabio-navarro.pdf>

BANETH, G.A.D. *et al.* Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BASMACIYAN, L.; *et al* Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. *Microbial Cell*,v. 5, p. 404-417, 2018.

BARRAL A, *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 May;44(5):536-46. doi: 10.4269/ajtmh.1991.44.536. PMID: 2063957.

BARRAL, ALDINA; BARRAL-NETTO, MANOEL. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia*, n. 79, 2009.

BATES, P. A.; ROGERS, MATTHEW, E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current molecular medicine*, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BERMAN, JONATHAN D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of infectious diseases*, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, JONATHAN, D.; FIORETTI, THOMAS B.; DWYER, DENNIS M. *In vivo* and *in vitro* localization of *Leishmania* within macrophage phagolysosomes: Use of Colloidal Gold as a Lysosomal Label 1. *The Journal of Protozoology*, v. 28, n. 2, p. 239-242, 1981.

BERMAN, JONATHAN. Miltefosine, an FDA-approved drug for the 'orphan

disease', leishmaniasis. Expert opinion orphan drugs, v. 3, n. 6, p. 727-735, 2015.

BERGHE, V.T; *et al* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Feb;15(2):135-47. doi: 10.1038/nrm3737. PMID: 24452471.

BILBAO-RAMOS, PABLO *et al*. Evaluating the potential of ursolic acid as bioproduct for cutaneous and visceral leishmaniasis. Molecules, v. 25, n. 6, p. 1394, 2020.

BRASIL, CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar, 2018.

BRENNAND, A; RICO, E; MICHELS, P.A. Autophagy in trypanosomatids. Cells. 2012 Jul 27;1(3):346-71. doi: 10.3390/cells1030346. PMID: 24710480; PMCID: PMC3901119.

_____, Ministério da Saúde. Distribuição da Leishmaniose Tegumentar. [s.d.]a. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica> Acesso 07 abr 2024.

_____, Ministério da Saúde. Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2022. [s.d.]b. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica/arquivos/lt-casos.pdf> Acesso 07 abr 2024.

_____, Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. [s.d.]c. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral> Acesso 07 abr 2024.

_____, Ministério da Saúde. Casos de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2022. [s.d.]d. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-casos.pdf> Acesso 07 abr 2024.

_____, Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento De Vigilância Das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2017.

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

CARNEIRO, M.B.; PETERS, N.C; The paradox of a phagosomal Lifestyle: How Innate Host Cell-*Leishmaniaamazonensis* Interactions Lead to a Progressive Chronic Disease. *Front Immunol.* 2021 Sep 7;12:728848. doi:[10.3389/fimmu.2021.728848](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728848).

CDC. Leishmaniasis: Biology. Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acesso 15 mar 2024.

CHAGAS, *et al.* Functionalized 1,2,3-triazolium salts as potential agents against visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2022.

CHATTERJEE, MITALI *et al.* Immune responses in post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology*, v. 65, n. 6, p. 452-460, 2020.

COIMBRA, ELAINE SOARES *et al.* Sal de 1,2,3 - Triazol como produto antiparasitário, INPI, n.BR 1020160139902. Brazil; 2016.

COLMENARES, MARIA *et al.* Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. S3-S7, 2002.

COSTA, CARLOS HENRIQUE NERY. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 232-242, 2011.

COSTA, F.M.S.; *et al* Fluoroquinolone-Based Organic Salts (GUMBOS) with Antibacterial Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 15714. <https://doi.org/10.3390/ijms242115714>

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. v. 7, n. 54, p. 16, 2022.

COTA, G.; ERBER, A.C; SCHERNHAMMER, E.; SIMÕES, T.C, (2021) Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. *PLoS Negl Trop Dis* 15(7): e0009567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009567>

CORDEIRO, L.V; *et al.* A resistência aos antimoniais pode levar ao aumento da virulência *Leishmania* spp.? *Revista Interdisciplinar em Saúde, Cajazeiras*, 7 (único): 577-593, 2020, ISSN: 2358-7490

CUPOLILLO, E., BOITÉ, M.C., and PORROZZI, R. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 39-51. ISBN 978-85-7541-568-9.

<https://doi.org/10.7476/9788575415689.0003>.

DANTAS-TORRES, FILIPE *et al.* Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerging infectious diseases*, v. 25, n. 12, p. 1, 2019.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.

DE ALMEIDA, M. M.C. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: scenarios and challenges for the surveillance and control. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, v. 52, n. 1, p. 1-10, 2023.

DE LOURDES, G. F. M. *et al.* Design, synthesis, and antiviral activity of new 1 H-1, 2, 3-triazole nucleoside ribavirin analogs. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, p. 1501-1511, 2014.

DE MUYLDER, G.; *et al.* A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, e 1253, 2011.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 30-54, 2017.

DOSTÁLOVÁ, ANNA; VOLF, PETR. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, v. 5, p. 1-12, 2012.

FERREIRA B.A. , *et al.*. Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: In vitro and in vivo characterization of a Brazilian clinical isolate. *PLoS Negl Trop Dis.* 2024 May 20;18(5):e0012175. doi: [10.1371/journal.pntd.0012175](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012175).

FERRAZ, RICARDO *et al.* Synthesis and antibacterial activity of ionic liquids and organic salts based on penicillin G and amoxicillin hydrolysate derivatives against resistant bacteria. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 221, 2020.

FERRAZ, RICARDO *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Amphotericin B Formulations Based on Organic Salts and Ionic Liquids against *Leishmania infantum*. *Antibiotics*, v. 11, n. 12, p. 1841, 2022.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharmaceutical research*, v. 28, p. 2758-2770, 2011.

Figarella K, *et al.* Ergosterone-coupled triazol molecules trigger mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and acidocalcisomal Ca²⁺ release in *Leishmania mexicana* promastigotes. *Microb Cell.* 2015 Dec 11; 3(1):14-28. doi: [10.15698/mic2016.01.471](https://doi.org/10.15698/mic2016.01.471).

FIORAVANTE, C. Autofagia para a sobrevivência. *Biologia Celular, Pesquisa Fapesp*, 2010.

FONSECA-SILVA, F.; *et al* (2016) Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004442. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004442>

FRAGA, J. *et al*. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2): 238-245, 2010.

FRÉZARD, FRÉDÉRIC *et al*. Liposomal amphotericin B for treatment of leishmaniasis: from the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 99, 2022.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, n. 95, p. 1-9, 2012.

GAUTAM, SHALINI *et al.*. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 2, p. 290-299, 2014; COSTA, Carlos HN *et al.*. From infection to death: An overview of the pathogenesis of visceral leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 7, p. 969, 2023.

GLANZMANN, N.; *et al* Synthesis and biological activity of novel 4-aminoquinoline/1,2,3-triazole hybrids against *Leishmania amazonensis* *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141 (2021) 111857

GEDDA, MALLIKARJUNA RAO *et al*. Post kala-azar dermal leishmaniasis: A threat to elimination program. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 7, p. e0008221, 2020.

GERVAZONI, L.F.O; GONÇALVES-OZÓRIO, G.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. (2018) 2'-Hydroxyflavanone activity *in vitro* and *in vivo* against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 12(12): e0006930. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006930>

GOODWIN, L. G. Pentostam®(sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 3, p. 339-341, 1995.

GRANATO, JULIANA DA T. Efeito Antileishmanial de Derivados de Hidrazonas e Estudos do Modo de Ação Com Foco Na Mitocôndria de *Leishmania Amazonensis*. 2022 146f, Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação Em Ciências Biológicas Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, Universidade Federal De Juiz De Fora., Juiz De Fora, 2022.

GUREL, M. S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clinics in Dermatology*, v. 38, n. 2, p. 140–151, mar. 2020.

GREEN, L.C., *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982 Oct; 126(1):131-8. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. PMID: 7181105.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S.. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*, v. 2011, 2011.

HALL, A.R.; BLAKEMAN, J.T.; EISSA, A.M.C. Glycan–glycan interactions determine *Leishmania* attachment to the midgut of permissive sand fly vectors Update policy:https://doi.org/10.1039/rsc_crossmark_policy2020.

HASSAN, MEHER and MANSOOR, SIMEEN (2014) "Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*: Vol. 38: No. 1, Article 7. <https://doi.org/10.3906/tar-1212-4>

HASSAN, M.; *et al* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:150845. doi: 10.1155/2014/150845. Epub 2014 Jun 12. Retraction in: *Biomed Res Int.* 2020 Aug 28; 2020:2451249. doi: 10.1155/2020/2451249. PMID: 25013758; PMCID: PMC4075070.

HENNE, W.M.; REESE, M.L.; GOODMAN, J.M. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO J.* 2018 Jun 15;37(12):e98947. doi: 10.15252/embj.201898947. Epub 2018 May 22. Erratum in: *EMBO J.* 2019 May 2;38(9):e101816. doi: 10.15252/embj.2019101816.

HERWALDT, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* (London, England), 354(9185), 1191–1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2).

HOUP, E. R.; CHAUDHRY, O, CHAPTER 83 - PROTOZOAN AND HELMINTHIC INFECTIONS, *Pharmacology and Therapeutics*, W.B. Saunders, 2009, pag1171-1186, ISBN 9781416032915, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3291-5.50087-1>.

HUANG, J., PAN, X. & YAN, N. Biologia estrutural e farmacologia molecular de canais iônicos dependentes de voltagem. *Nat Rev Mol Cell Biol*(2024). <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00763-7>

IBARRA-MENESES AV, *et al* Identification and analysis of the DNA content of small extracellular vesicles isolated from *Leishmania* parasites. *STAR Protoc.* 2023 Apr 21;4(2):102248. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102248. Epub ahead of print. PMID: 37087735; PMCID: PMC10160803.

INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. *In vitro* and *in vivo* effects of (-)-epigallocatechin 3- o -gallate on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 10, p. 1993–1996, 25 out. 2013.

JIMÉNEZ-RUIZ, A; *et al* Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors*. 2010 Nov 9;3:104. doi: 10.1186/1756-3305-3-104

KAUTZ-NEU, KORDULA *et al*. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Medical microbiology and immunology*, v. 201, p. 581-592, 2012.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania* University Avenue, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Lanarkshire G12 8Q, U, B. *Journal of Parasitology Research* 2014, v: 2014, url={<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:7288742>}

KAYE, PAUL M. *et al*. Vaccine value profile for leishmaniasis. *Vaccine*, v. 41, p. S153-S175, 2023.

KUMAR, G. ADITYA *et al*. *Leishmania donovani* internalizes into host cells via caveolin-mediated endocytosis. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12636, 2019.

LAINSON, R.; STRANGWAYS-DIXON, J. *Leishmania mexicana*: the epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 57, n. 4, p. 242-265, 1963.

LEE, S.J.; *et al* Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:327167.

LINDOSO, J.A.L. *et al*. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. *HIV/AIDS-Research and Palliative Care*, p. 147-156, 2016.

LÜDER, C. G.; *et al* Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasites and vectors*, v. 3, n. 116, p. 1-11, 2010.

MACHADO, P. L. R. *et al*. Double-blind, randomized trial to evaluate miltefosine and topical granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil. *Clin Infect Dis* v. 73, n. 7, p. e2465–e2469, 2020.

MEHTA, A., AND SHAHA, C. (2004). Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J BiolChem*. 2004 Mar 19; 279(12):11798-813. doi: 10.1074/jbc.M309341200.

MEINEL, R.S.; *et al* Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. Chem Biol Interact. 2020 Jan 5;315:108850.

MENDES, BRUNO *et al*. Causative agents of American tegumentary leishmaniasis are able to infect 3T3-L1 adipocytes *in vitro*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 12, p. 824494, 2022.

MENDES, E. A.; *et al* C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Chemico-biological interactions, v. p. 256, 16-24, 2016. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015211.03992015>) .

MENNA-BARRETO, R.F.; *et al* (2009) The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med 47:644-53.

MENNA-BARRETO, R.F.; DE CASTRO, S.L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. BioMed Res. Int., v. 2014, p. 1-14, 2014.

MESQUITA, I.; *et al*. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis, Citokine, Volume 112, p 16-20, 2018.

MESQUITA, I.; *et al*; The absence of HIF-1 α increases susceptibility to *Leishmania donovani* infection via activation of BNIP3/mTOR/SREBP-1c Axis. Cell Rep. 2020 Mar 24;30(12):4052-4064.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.098. PMID: 32209468.

MISHRA, MOHAN *et al*. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. The Lancet, v. 340, n. 8830, p. 1256-1257, 1992.

MIRÓ, G.; *et al* Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 2008 Aug;24(8):371-7. doi: 10.1016/j.pt.2008.05.003. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18603476.

MCCONVILLE, M. J; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis, International Journal for Parasitology, Volume 37, Issue 10, 2007, Pages 1047-1051, ISSN 0020-7519, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(07\)00216-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(07)00216-0). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907002160>).

MONCADA-DIAZ MJ, *et al* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Leishmania* spp. Pathogens. 2024 Sep 27;13(10):835. doi: 10.3390/pathogens13100835.

MONTANER-ANGOITI, E., LLOBAT, L. Is leishmaniasis the new emerging

zoonosis in the world?. *Vet Res Commun* 47, 1777–1799 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, D. *et al.* Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends in parasitology*, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2014.

MUKHERJEE, S.B.; *et al* Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24717-27. doi: 10.1074/jbc.M201961200. Epub 2002 Apr 30. PMID: 11983701.

NOVO, S.P.; *et al.* The process of leishmania infection - disease and new perspectives of paleoparasitology. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2016;58:45. doi: 10.1590/S1678-9946201658045. Epub 2016 May 24. PMID: 27253747; PMCID: PMC4880002.

NUNES, D.C.O.S.; *et al* Mitochondrial dysfunction on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induced by ketoconazole: insights into drug mode of action. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022 Apr 29;117:e210157. doi: 10.1590/0074-02760210157.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):1. doi: [10.1093/jac/dkg301](https://doi.org/10.1093/jac/dkg301).

OKWOR, IFEOMA; UZONNA, JUDE. Social and economic burden of human leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 94, n. 3, p. 489, 2016.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. MANUAL OF PROCEDURES FOR LEISHMANIASIS SURVEILLANCE AND CONTROL IN THE REGION OF THE AMERICAS, 2^a ed. 2024.

_____, Organização Pan-Americana da Saúde, s.d. Leishmaniose. Disponível em <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose> Acesso 07 abr 2024.

_____, Organização Pan-Americana da Saúde. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em <https://doi.org/10.37774/9789275725030>

OPAS. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Núm. 12 (Dezembro de 2023) 2024:14 p

PAL, BIPLAB *et al.* Assessment of quality of life in patients with post kalaazar dermal leishmaniasis. *Health and quality of life outcomes*, v. 15, p. 1-7, 2017.

PAULA, W.T. ; *et al.* Synthesis and Evaluation of New 1,2,3-triazole Alkyl Derivatives and Their Salts Against Breast Cancer Cells. *ChemistrySelect*, v. 9, p. 40613, 2024.

PEIXOTO, F. C.; *et al* (2023). Leishmania braziliensis exosomes activate human macrophages to produce proinflammatory mediators. *Frontiers in Immunology*, 14, 1256425.

PETERS, NATHAN C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PINHEIRO, A.A.S.; *et al* Potential of extracellular vesicles in the pathogenesis, diagnosis and therapy for parasitic diseases. *J Extracell Vesicles*. 2024 Aug;13(8):e12496. doi: 10.1002/jev2.12496. PMID: 39113589; PMCID: PMC11306921.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals -Braz. J. Biol. 81(4)Oct-Dec 2021• <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437> [linkcopy](#)

PAWAR, B.; *et al* Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Chapter 1 - Understanding pharmacotoxicology, Essentials of Pharmatotoxicology in Drug Research, Academic Press, v1, p, 1-28, 2023. ISBN 9780443158407, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15840-7.00025-7>.

PODINOVSKAIA, MARIA; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.

POKHODYLO, NAZARIY; SHYYKA, OLGA; MATIYCHUK, VASYL. Synthesis of 1, 2, 3-triazole derivatives and evaluation of their anticancer activity. *Scientia Pharmaceutica*, v. 81, n. 3, p. 663-676, 2013.

RAMOS JP, *et al* Acute toxicity and antitumor potential of 1,3,4-trisubstituted-1,2,3-triazole dhmtAc-loaded liposomes on a triple-negative breast cancer model. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2022 Sep;355(9):e2200004. doi: [10.1002/ardp.202200004](https://doi.org/10.1002/ardp.202200004).

RIBEIRO, G. A.; *et al.* LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 789-799, 2013.

ROATT, B.M., *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8965–8977 (2020).

<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

ROBLEDO, S.M.; *et al* Therapeutic Efficacy of Arnica in Hamsters with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* and *L. tropica*. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jun 22;15(7):776. doi: 10.3390/ph15070776.

ROKITSKAYA, T.I.; *et al* Carborane derivatives of 1,2,3-triazole depolarize mitochondria by transferring protons through the lipid part of membranes. *BiochimBiophys Acta Biomembr*. 2019 Mar 1;1861(3):573-583.

ROY, SAPTARSHI *et al*. Integrity of the actin cytoskeleton of host macrophages is essential for *Leishmania donovani* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1838, n. 8, p. 2011-2018, 2014.

SANCHES, L.C.; *et al* Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal*, v. 25, n. 4, p. 465-469, set./dez. 2016.

SASIDHARAN, S., SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitol Res*120, 1541–1554 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>

SCARIOT, D.B; *et al* Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Front Microbiol*. 2017 Feb 21;8:255. doi: 10.3389/fmicb.2017.00255.

SCOTT, PHILLIP; NOVAIS, FERNANDA O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar; 123(3):233-44. PMID: 16778307.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. S17-S20, 2006.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis With Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2004) 99(3):239–51. doi: /S0074-02762004000300001 doi:

10.1590/S0074- 02762004000300001

SILVERMAN, J.M. AND REINER, N.E. (2011), Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*, 13: 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>

SIMON, O.I.; *et al* Mapeamento global de doenças infecciosas *Phil. Trans. R. Soc. B* 368:20120250 <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0250>

SMIRLIS, D.; *et al* Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors*. 2010 Nov 17;3:107.

SOUZA-FAGUNDES, E.M. *et al*. Correlation of structural features of novel 1,2,3-triazoles with their neurotoxic and tumoricidal properties. *Chemico-Biological Interactions* 291 (2018) 253–2.

Song J, Lv J, Jin J, Jin Z, Li T, Wu J. Research advances on the bioactivity of 1,2,3-triazolium salts. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 27;24(13):10694. doi: 10.3390/ijms241310694.

STEVERDING D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017 Feb 15;10(1):82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5. PMID: 28202044; PMCID: PMC5312593.

STROPPIA, PEDRO H.F. *et al*. Effect of 1, 2, 3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 12, p. 3034-3045, 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, v. 7, v.1-10, 2018.

SUNDAR, Shyam *et al*. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. *Clinical Infectious Diseases*, v. 45, n. 5, p. 556-561, 2007.

SUNDAR, SHYAM. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001.

SUNTER, JACK; GULL, KEITH. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

STEVERDING D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017 Feb 15;10(1):82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5. PMID: 28202044; PMCID: PMC5312593.

SUN, W.; SANDERSON, P. E.; AND ZHENG, W. (2016). Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov. Today* 21, 1189–1195. doi: 10.1016/j.drudis.2016.05.015

TEIXEIRA, SÓNIA *et al.* A novel approach for bisphosphonates: ionic liquids and organic salts from zoledronic acid. *Chem Med Chem*, v. 14, n. 20, p. 1767–1770, 2019.

TEMPONE, A.G.; OLIVEIRA, C.M.; BERLINCK, R.G.S. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. *Planta Medica*, v. 77, n. 6, p. 572–585, abr. 2011.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; AND ULIANA, S. R. (2014). Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2608–2613. doi: 10.1128/AAC.01315-13

TANO, F.T.; *et al.* Proteome and morphological analysis show unexpected differences between promastigotes of *Leishmania amazonensis* PH8 and LV79 strains. 2022, PLoS ONE 17(8): e0271492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271492>

VALDIVIA HO, *et al* Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci Rep.* 2017 Jan 16;7:40804. doi: 10.1038/srep40804. PMID: 28091623; PMCID: PMC5238499.

VANDENABEELE P.; *et al* Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Oct;11(10):700-14. doi: 10.1038/nrm2970. Epub 2010 Sep 8. PMID: 20823910.

VASCONCELOS, J.M.; GOMES, C.G.; SOUSA, A. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento, *Rev. Bras. de Análise Clínica*, 2018.

VOS, THEO *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 2020.

WANDERLEY, J.L.M. *et al.* Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 2006.

WANDERLEY, JLM, DAMATTA, RA & BARCINSKI, MA Apoptotic mimicry as a

strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. *Cell Commun Signal* 18, 10 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0482-8>

WERNECK, G. L. *et al.* Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 135, n. 2, p. 195-201, 2007.

WHO, 2025 Leishmaniasis Appears in: Neglected tropical diseases
Disponível em <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em 03 março 2025.

WHO, 2024. Disability-adjusted life years (DALYs). Disponível em <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/158> Acesso 09 abr 2024.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniasis. GENEVA: WHO; 2010.

WHO. (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acesso em: 02 fev. 2024.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). website—Leishmaniasis: fact sheets. 2023. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acesso 10 abr 2024.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Pan American Health Organization, 2019. Acesso em: 31 mar. 2024.

ANEXO I – Parecer CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 08/05/2018, analisou o protocolo nº.009/2018 intitulado "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra e colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato a ser realizado no período de 01/01/2019 a 31/12/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 24 fêmeas de Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério Localizado no Centro de Biologia da Reprodução(CBR) no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 009/2018 - CEUA about "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c" under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of Ayla das Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 08/05/2018. For the development of this research 24 mice of lineage BALB/C (24 females) of 4-6 week old, will be delivered as requested in the period period of 01/01/2019 to 12/31/2021. The Project will be performed at Biology Reproduction Center located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 09 de Maio de 2018.

Vice-coordenadora
CEUA

Coordenadora
CEUA

ANEXO II – Parecer CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 007/2018 – CEUA sobre "Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, referentes aos lotes 2019,2020 e 2021", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 108 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviado justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

CERTIFICATE

We certify that protocol no. 007/2018 - CEUA on "Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of synthetic or natural compounds in peritoneal macrophages of BALB / c mice, for lots 2019,2020 and 2021", research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra Ayla collaboration of Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) of PRÓ- REITORIA DE PESQUISA / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research, 108 females will be used, being a BALB / c isogenic mouse of 4-6 weeks, a project to be carried out in the laboratory located at the Institute of Biological Sciences Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, according to and will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year, provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

Vice-coordenadora
CEUA

Coordenadora
CEUA