



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ-UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-PBC



ANDRESSA DALÓLIO VALENTE

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS
DICALCOGENETOS TZ4C E TZ3D ENVOLVIDOS NA MORTE
CELULAR DE *Leishmania amazonensis***

**MARINGÁ
2023**

ANDRESSA DALÓLIO VALENTE

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS
DICALCOGENETOS TZ4C E TZ3D ENVOLVIDOS NA MORTE
CELULAR DE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Francielle Pelegrin Garcia.

**MARINGÁ
2023**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

V154a

Valente, Andressa Dalolio

Avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária dos dicalcogenetos TZ4C e TZ3D envolvidos na morte celular de *Leishmania amazonensis* / Andressa Dalolio Valente. -- Maringá, PR, 2023.

59 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Pelegrin Garcia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

CDD 23.ed. 616.9364

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

ANDRESSA DALÓLIO VALENTE

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS
DICALCOGENETOS TZ4C E TZ3D ENVOLVIDOS NA MORTE CELULAR
DE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração-Biologia celular e molecular) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 19/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Francielle Pelegrin Garcia
Universidade Estadual de Maringá

Dr^a. Débora Botura Scariot
Northwestern University

Prof. Dr. Hélio Volpato
Universidade Estadual do Paraná – Campus Paranavaí

BIOGRAFIA

Andressa Dalolio Valente nascida em 06 de março de 1998, em Paranavaí-PR. É filha de Marlene Dalolio Valente e Luiz Marcos Sanches Valente. Concluiu o ensino médio no Instituto Federal do Paraná- Campus Paranavaí. Graduou-se em Biomedicina pela Universidade Unicesumar de Maringá- Unicesumar em 2020. Especialista em Imaginologia pela Faculdade Uniamérica em 2021. Em 2022 iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) na Universidade Estadual de Maringá. Atualmente, é membro do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (Bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá, onde desenvolve pesquisas que avaliam a atividade antiprotozoário de compostos sintéticos frente *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. Já atuou em pesquisas na área de biologia molecular diagnóstica, no Laboratório de biologia molecular da Unicesumar de 2017- 2020.

Esta dissertação é dedicada ao meu amado tio Paulo Sérgio Sanches Valente, que permanece eternamente em meu coração. Sua partida deixou uma saudade profunda, mas também um imenso desejo de realizar cada um dos objetivos que sonhamos juntos como esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Dando início aos agradecimentos sou grata à Deus, por me guiar e conceder sabedoria e discernimento para seguir em frente com os meus propósitos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço ainda por ter colocado em minha vida tantas pessoas especiais que me ajudaram nessa caminhada:

Meus pais Marlene e Luiz Valente, pela educação e esforços durante toda minha trajetória, minha irmã Larissa Valente, por todo suporte emocional, apoio e carinho durante os dias bons e os difíceis, meu cunhado Edivaldo Junior pelo apoio e cuidado e toda a minha família e amigos, por estarem sempre ao meu lado e por terem sempre feito de tudo para que eu alcançasse todos os meus objetivos, além de me apoiarem e me incentivarem a superar meus limites a cada dia.

A Professora Francielle Pelegrin, por ter aceitado me orientar, por toda paciência, confiança e ensinamentos ao longo desses dois anos que levarei para a vida, grande prazer ter trabalhado em conjunto ao longo desses dois anos.

Aos professores Celso e Tânia Nakamura, por todas as oportunidades concedidas. Além de todos os demais professores que estiveram presentes nesta jornada de pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, pela convivência, ajuda e parceria. Em especial não poderia deixar de agradecer, pela troca de muitas experiências e aprendizados ao decorrer do mestrado, Rian Richard de Farias principalmente por todas as parcerias desenvolvidas, e aos demais, Rodolfo Balbinot, Rayanne Beltrame, Amanda Bakoshi, Luis Yamashita e Renan Nocetti. Além de amigas muito especiais que tive o prazer de conhecer e levarei para a vida: Karine Nunes, Nicoli Benites e Amanda Hinobu.

À Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, aos órgãos financiadores CNPq e CAPES: “O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior, bem como, “O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico”.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, perto ou longe, torceram e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada a todos!

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um resumo, abstract, e um artigo científico com os principais resultados obtidos durante o mestrado. O artigo descreve a avaliação da atividade, citotoxicidade e do mecanismo de ação de duas substâncias sintéticas frente a forma promastigota do protozoário *Leishmania amazonensis*. O artigo científico será submetido a revista *Drug Development Reserch*.

RESUMO

As leishmanioses são ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania* e atingem milhões de pessoas em todo o mundo. São consideradas doenças negligenciadas que afetam principalmente indivíduos em regiões tropicais e subtropicais. Esta doença apresenta diferentes manifestações clínicas dependendo da espécie do protozoário e do estado imunológico do paciente acometido, como cutânea, mucocutânea e visceral. Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento dessa infecção apresentam limitações, como alta toxicidade, reações adversas e longo período de intervenção terapêutica. Inúmeras pesquisas, em diversos modelos experimentais têm buscado desenvolver agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos contra esses protozoários. Nesse sentido, o presente estudo, buscou avaliar a atividade antileishmania de dois novos dicalcogenetos, TZ4C e TZ3D, além de seus possíveis mecanismos de ação em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Ambas as substâncias, TZ4C e TZ3D, apresentaram atividade contra as formas promastigotas (CI_{50} = 2,35 e 12,59 μ M, respectivamente), assim como para as formas amastigotas (CI_{50} = 3,50 e 6,58 μ M, respectivamente). Além disso, as substâncias demonstraram ter seletividade para o parasito quando analisada a sua citotoxicidade em macrófagos J774A-1. Ademais, as análises por microscopia eletrônica e os ensaios de mecanismos de ação investigados nas formas promastigotas com ambas as substâncias demonstraram despolarização mitocondrial. Esse fenômeno, possivelmente conduziu a alterações nos níveis intracelulares de ATP, resultando no aumento de espécies reativas e peroxidação lipídica, o que levou os parasitos ao estresse oxidativo. Adicionalmente, os tratamentos induziram à alterações na integridade da membrana plasmática, acúmulo de corpos lipídicos, alterações no ciclo celular e externalização de fosfatidilserina. Sendo assim, os resultados indicam que TZ4C e TZ3D podem agir provocando no protozoário alterações características de morte celular semelhante a apoptose.

Palavras-chave: Leishmaniose; Dicalcogenetos; Mecanismo de ação; Estresse oxidativo; Apoptose;

ABSTRACT

Leishmaniasis are caused by protozoa of the genus *Leishmania* and affect millions of people worldwide. They are considered neglected diseases that primarily impact individuals in tropical and subtropical regions. This disease presents different clinical manifestations depending on the protozoan species and the immune status of the affected patient, such as cutaneous, mucocutaneous, and visceral forms. The drugs currently available for treating this infection have limitations, such as high toxicity, adverse reactions, and a long therapeutic intervention period. Numerous studies, using various experimental models, have sought to develop more effective and less toxic chemotherapeutic agents against these protozoa. In this context, the present study aimed to evaluate the antileishmanial activity of two new dicalcogenides, TZ4C and TZ3D, as well as their possible mechanism of action in promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Both substances, TZ4C and TZ3D, exhibited activity against promastigote forms ($IC_{50} = 2.35$ and $12.59 \mu\text{M}$, respectively), as well as amastigote forms ($IC_{50} = 3.50$ and $6.58 \mu\text{M}$, respectively). Furthermore, the substances demonstrated selectivity for the parasite when analyzing their cytotoxicity in J774A-1 macrophages. Moreover, electron microscopy analyses and mechanism of action assays investigated in promastigote forms with both substances showed mitochondrial depolarization. This phenomenon possibly led to changes in intracellular ATP levels, resulting in increased reactive species and lipid peroxidation, leading the parasites to oxidative stress. Additionally, the treatments induced changes in plasma membrane integrity, lipid body accumulation, alterations in the cell cycle, and phosphatidylserine externalization. Thus, the results indicate that TZ4C and TZ3D may act by inducing characteristic changes in the protozoan suggestive of cell death similar to apoptosis.

Keywords: Leishmaniasis; Dicalcogenides; Mechanism of action; Oxidative stress; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da substância TZ4C.....	22
Figura 2. Estrutura química da substância TZ3D.....	22
Figura 3. Efeito de TZ4C e TZ3D em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e efeito citotóxico em macrófagos	31
Figura 4. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D	32
Figura 5. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D.....	34
Figura 6. Avaliação do volume celular em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	36
Figura 7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	38
Figura 8. Quantificação dos níveis ATP em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	39
Figura 9. Detecção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	40
Figura 10. Espécies reativas de nitrogênio em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	41
Figura 11. Níveis de peroxidação lipídica em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	42
Figura 12. Avaliação da integridade de membrana celular em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	44
Figura 13. Detecção de corpos lipídicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h.....	46
Figura 14. Análise do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com TZ4C e TZ3D por 72 h.....	47
Figura 15. Avaliação da externalização da fosfatidilserina através de Anexina V-FITC, em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com TZ4C e TZ3D por 72 h	49
Figura 16. Sequência de eventos que contribuíram com a morte celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com TZ4C e TZ3D.	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Atividade antileishmania nas formas promastigota e amastigota (AMA) de *L. amazonensis*, além do efeito citotóxico sobre macrófagos J774A.1.....30
- Tabela 2-** Determinação da atividade hemolítica das substâncias TZ4C e TZ3D em hemácias de carneiro.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCCP	Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitos
CO ₂	Dióxido de carbono
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DCF	2', 7'-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
h	Hora
H2DCFDA	2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP	Iodeto de propídio
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCN	Cianeto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NO	Óxido nítrico
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PMS	Metossulfato de fenazina
Rh123	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute, 1640
SFB	Soro fetal bovino
U.A.	Unidades arbitrárias
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. METODOLOGIA	21
2.1. Cultivo de Parasitos.....	21
2.2 Cultura de células	21
2.3 Substâncias.....	21
2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio antiproliferativo <i>in vitro</i> em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	22
2.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio antiproliferativo <i>in vitro</i> em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	23
2.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774A.1	23
2.7 Determinação da atividade hemolítica	24
2.8 Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	24
2.9 Avaliação das alterações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de transmissão (MET) em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	25
2.10 Avaliação do tamanho celular	25
2.11 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\delta\psi_m$).....	25
2.12 Determinação dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) intracelular.....	26
2.13 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais.....	26
2.14 Determinação de óxido nítrico	27
2.15 Detecção de lipoperoxidação	27
2.16 Avaliação da integridade de membrana plasmática	27
2.17 Determinação de corpos lipídicos	28
2.18 Avaliação do ciclo celular	28
2.19 Determinação da exposição de fosfatidilserina	29
2.20 Análise estatística.....	29
3. RESULTADOS	30
3.1 TZ4C e TZ3D apresentaram atividade antileishmania em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	30
3.2 TZ4C e TZ3D não apresentaram atividade hemolítica	31
3.3 Os tratamentos com ambas as substâncias induziram a alterações na morfologia das formas promastigotas	31
3.4 Os tratamentos com ambas as substâncias induziram a alterações ultraestruturais nas formas promastigotas	33
3.6 Os tratamentos com os dicalcogenetos induziram alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\delta\psi_m$).....	37

3.9 O tratamento com os dicalcogenetos levaram ao aumento de espécies reativas de nitrogênio	41
3.11 TZ4C e TZ3D levaram a perda da integridade de membrana plasmática após 72 h de tratamento.....	43
3.14 Dicalcogenetos levaram a exposição de fosfatidilserina.....	48
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças consideradas endêmicas em 99 países diferentes, e, além disso, são conhecidas como uma das principais doenças infecciosas negligenciadas, sendo apontadas como um problema de saúde pública (OMS, 2022). Elas afetam milhões de pessoas anualmente, havendo relatos de casos em 99 países pertencentes a diferentes continentes: Ásia, África, Europa, América do Norte e América do Sul (MOKNI, 2019; OMS, 2022).

A dificuldade na descoberta de novos medicamentos, além de baixos investimentos de mercado e comercialização, colocam as leishmanioses no cenário das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (BURZA, 2018; CONTATO et al., 2023). As DTNs são um conjunto de doenças com grande impacto sobre a população com baixo poder socioeconômico, estando mais relacionadas às populações marginalizadas, em situação de extrema pobreza e desigualdade social (OMS, 2021; BORTOLETI et al., 2022). Estima-se que elas afetam mais de um bilhão de indivíduos em todo planeta (OMS, 2021).

As leishmanioses são ocasionadas por diferentes espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Esses protozoários são parasitas intracelulares obrigatórios que se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, e são transmitidos através do repasto sanguíneo realizado pelo inseto vetor dos gêneros *Lutzomyia*, comum no novo mundo e *Phlebotomus*, presente no velho mundo (MOKNI, 2019). Estes insetos são dípteros da subfamília *Phlebotominae*, conhecidos por flebotomíneos (AGUIAR; RODRIGUES, 2017). Os reservatórios do protozoário consistem em animais, geralmente roedores ou cães (MOKNI, 2019). Além da transmissão através do flebotomíneo, a doença também pode ser transmitida através de agulhas e seringas contaminadas, transfusão sanguínea, via transplacentária e transplante de órgãos (MURRAY et al., 2005; AKHOUNDI et al., 2016).

O ciclo de vida do parasito inclui as formas promastigotas e amastigotas. As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, e se alojam no intestino médio torácico do flebotomíneo fêmea (LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019). Elas são transmitidas aos hospedeiros durante o processo de repasto sanguíneo e, uma vez inoculadas, migram para órgãos como fígado, baço, medula óssea e linfonodos,

infectando células do sistema fagocítico mononuclear, onde se diferenciam em formas amastigotas (SILVA, 2008). As amastigotas se multiplicam por fissão binária até romperem a célula hospedeira e disseminam-se pelas vias hematogênicas e linfática (LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019). O flebotômíneo não infectado ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado, acaba ingerindo as formas amastigotas, que vão para o trato digestivo do inseto, onde se diferenciam para as formas promastigotas procíclicas, multiplicando-se por divisão binária (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Estas formas procíclicas se diferenciam novamente em formas infectivas metacíclicas, podendo assim infectar um novo hospedeiro mamífero (SILVA, 2008; AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

As manifestações clínicas das leishmanioses são influenciadas pela espécie do parasito causador da infecção, bem como por fatores inerentes ao hospedeiro, como a resposta imune e a resistência do sistema imunológico (GABRIEL et al., 2019). A doença apresenta três manifestações principais: a cutânea, que se manifesta por meio de lesões na pele; a mucocutânea, caracterizada por lesões em mucosas, especialmente no nariz e boca; e a forma visceral, que afeta órgãos, como fígado e baço. Assim, o hospedeiro pode apresentar as lesões clinicamente observáveis como descrito, ou pode ser assintomático (CORPAS et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2022). No continente americano, as principais espécies relacionadas como causadoras da leishmaniose cutânea são a *L. amazonensis* e a *L. braziliensis* (COSER et al., 2020). Já a leishmaniose visceral, é geralmente ocasionada por protozoários das espécies *L. infantum* e *L. donovani* (CORPAS et al., 2020; COSER et al., 2020; OMS, 2020).

Com relação ao tratamento das leishmanioses, desde 1960 os antimoniais pentavalentes são os principais fármacos de escolha (ROMERO; LOPEZ, 2017; SOTO; BERMAN, 2021). Porém, o mesmo apresenta limitações em sua utilização, devido à alta toxicidade, tratamento a longo prazo e efeitos adversos que diminuem a adesão do paciente ao tratamento, o que ocasiona constante recidiva da doença e dificulta a cura (TIWARI et al., 2018). A anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina são fármacos de segunda escolha terapêutica, entretanto estes também apresentam restrições devido seu alto custo e teratogenicidade (ROMERO; LOPEZ, 2017; TIWARI et al., 2018).

Ou seja, as terapias medicamentosas antileishmania atuais apresentam limitações em seu uso, necessitando de novos compostos que sejam eficazes e demonstrem menos

toxicidade (SOTO; BERMAN, 2021). Portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é de extrema necessidade para que esta doença possa ser definitivamente controlada (BURZA, 2018).

Desse modo, substâncias a base de telúrio e selênio tem se destacado como candidatos a agentes farmacológicos, sendo relatados com propriedades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antiprotozoário, entre outras (BANDEIRA, 2019).

Telúrio e selênio são elementos químicos denominados calcogênios. Ambos os elementos apresentam propriedades químicas semelhantes, tais como, seis elétrons em sua camada de valência, tendência para formação de ligações covalentes, além de poder assumir estados de oxidação de -2 a +6 (ZUGMAN, 2022). Embora o telúrio seja um elemento não essencial, ele é encontrado em pequena quantidade em animais e outros micro-organismos, enquanto o selênio pode ser encontrado em minerais na forma de sais inorgânicos (BOYD, 2011). De acordo com ensaios clínicos e laboratoriais, é sabido que os organotelúrios interagem com proteínas do protozoário *Leishmania*, podendo esses compostos serem utilizados para o desenvolvimento de novas quimioterapias contra protozoários desse gênero (BRINDHA; BALAMURALI; KAUSHIK, 2021). O selênio está envolvido em sistemas enzimáticos redox, como a glutationa peroxidase, que desempenha um papel na homeostase das células (VIARO; VIARO; FLECK et al., 2001). Isso pode ser relevante para a sobrevivência e função celular dos protozoários.

A mitocôndria é um alvo fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania, dada a presença de características distintas em comparação com as mitocôndrias de mamíferos. Ela desempenha um papel crucial na geração de radicais livres por meio da cadeia transportadora de elétrons (MENDES et al., 2016). O equilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de compostos oxidantes é essencial. O desequilíbrio desse processo desencadeia um estresse oxidativo, que leva à oxidação de biomoléculas, resultando em um desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al., 2010). Esse desequilíbrio pode representar uma potencial via de indução de morte celular nos parasitos.

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antileishmania das substâncias 1-[4-[(4-acetilfenil)ditelanil]fenil]etanona (TZ4C) e 2-metil-2-[2-[[2-(2-metil,3 dioxolan-2-il)fenil]diselanil]fenil]-1,3-dioxolano (TZ3D) nas duas formas de

L. amazonensis. Além disso, o estudo também buscou investigar as alterações morfológicas e ultraestruturais nas formas promastigotas do protozoário, bem como os possíveis mecanismos relacionados à morte celular induzida por essas substâncias.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo de Parasitos

Promastigotas da cepa *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em garrafas de cultura a 25°C em meio Warren (Infusão Cérebro/Coração adicionado de Hemina e Ácido Fólico, pH 7,2) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB- Nova Biotecnologia, inativado a 56°C, pH 7,4). Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas na fase exponencial de crescimento (48 h).

2.2 Cultura de células

Macrófagos da linhagem J774A.1 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em meio RPMI-1640, acrescido de 10% de SFB e 5000 U mL⁻¹ de penicilina e 5 mg mL⁻¹ de estreptomicina. Para as passagens e os experimentos, as células foram removidas por raspagem utilizando *cell scrapers* e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Para os ensaios com amastigotas intracelulares, essas foram obtidas de macrófagos J774A.1 infectados com promastigotas e cultivados a 34 °C nas mesmas condições de cultivo para macrófagos.

2.3 Substâncias

As substâncias 1-[4-[(4-acetilfenil)ditelanyl]fenil]etanona (TZ4C) e 2-metil-2-[2-[[2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]diselanyl]fenil]-1,3-dioxolano (TZ3D) (Figuras 1 e 2). Foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Leandro Piovan, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e posteriormente foi avaliado o potencial das substâncias em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Após o recebimento das substâncias sintetizadas a base de telúrio e selênio, respectivamente, estas foram preparadas soluções estoque, asépticamente, diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que a concentração de DMSO não excedeu 1% nos experimentos.

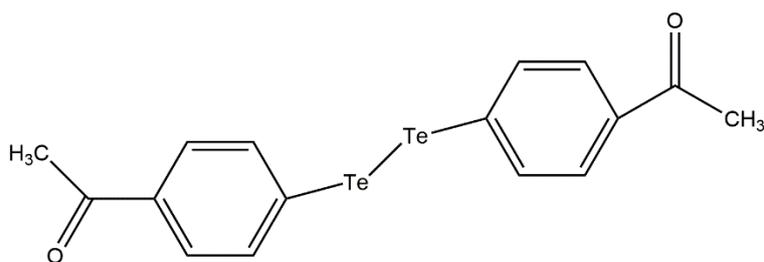


Figura 1. Estrutura química da substância 1-[4-[(4-acetilfenil)ditelanil]fenil]etanona (TZ4C), segundo nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

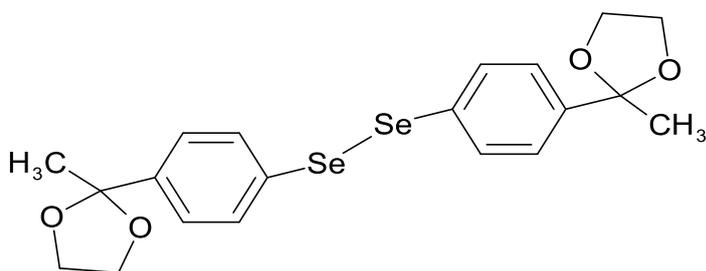


Figura 2. Estrutura química da substância 2-metil-2-[2-[[2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]diselanil]fenil]-1,3-dioxolano (TZ3D), segundo nomenclatura da IUPAC.

2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio antiproliferativo *in vitro* em formas promastigotas de *L. amazonensis*

A técnica foi realizada conforme Fernandes et al. (2021) com adaptações. Para o experimento, foram utilizadas promastigotas 1×10^6 células/mL na fase exponencial de crescimento. Essas foram adicionadas em placa de 96 poços estéril, na presença ou ausência de tratamentos com ambas as substâncias nas concentrações finais de 1, 10, 50 e 100 μM . Como controle positivo foi adicionado ao ensaio a anfotericina B (100 μM). Posteriormente, a placa foi incubada por 72 h a 25 °C. A viabilidade celular foi determinada por meio do método de redução do XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxinilida - Invitrogen), foi utilizado um solução de XTT e PMS (Metossulfato de fenazina) a 1 mg/mL na ausência de luz por 4 h. O princípio do método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tretazólio hidrossolúvel em uma substância de coloração alaranjada, derivada do formazan (SCUDIÉRO et al., 1988). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (leitor

de ELISA Power Wave XS) a 450 nm. A concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear.

2.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio antiproliferativo *in vitro* em formas amastigotas de *L. amazonensis*

Este ensaio foi realizado conforme propõe Miranda et al. (2017), com modificações. Para o experimento, foram utilizadas promastigotas (5×10^6 células/poço) na fase estacionária de crescimento (com 120 horas de cultivo) e macrófagos (5×10^5 células/poço) com 48 h de cultivo. Ambas as células foram adicionadas em placa de 24 poços, sobre lamínulas de vidro redondas estéril, acrescido de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Após incubação por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 34 °C, foram adicionados os tratamentos com TZ4C e TZ3D em diferentes concentrações (0,01, 0,1, 1, 2, e 5 µM). Depois de 48 h a 34 °C e 5% de CO₂, foi realizada a fixação das células com metanol por 20 min e posteriormente, coloração das lamínulas com Giemsa (10%). Após 24 h, foi realizada a preparação de lâminas permanentes com Permount® e posteriormente as células foram analisadas em microscópio óptico para a contagem de 100 macrófagos. Foram contados a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos. O valor de CI₅₀ foi determinado por análise de regressão não linear.

2.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774A.1

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada frente a linhagem de macrófagos J774A.1, por meio da técnica sugerida por Paula et. al (2022), com modificações. Para o experimento, macrófagos (5×10^5 células/mL) em fase exponencial de crescimento, juntamente com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB inativado foram adicionados em placa estéril de 96 poços, incubada por 24 h, a 37 °C e 5% de CO₂, para aderência das células e formação de monocamada. Os tratamentos com ambas as substâncias foram realizados nas concentrações finais de 2, 20, 100 e 200 µM. Posteriormente, esta placa foi incubada por 48 h em estufa nas mesmas condições de cultivo. A viabilidade celular foi determinada utilizando método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) (MOSMANN, 1983), a placa permaneceu no escuro por 4 h e, posteriormente os cristais foram solubilizados em DMSO. Este método consiste na capacidade de um sal tetrazólio, formar cristais

insolúveis de formazan, de coloração arroxeadada por meio da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (leitor de ELISA Power Wave XS) a 570 nm e, por fim, foi determinada a concentração citotóxica de 50% dos macrófagos (CC₅₀) através de regressão não linear.

2.7 Determinação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica das substâncias foi realizada como descrito anteriormente por (WIDMER et al., 2006; EVANS et al., 2013). Uma suspensão a 4% de hemácias de carneiro desfibrinada (Dislab) foi preparada em solução de glicose 5%, e dispensada em microtubos na presença de diferentes concentrações de TZ4C e TZ3D (1, 10, 50 e 100 µM), seguido de incubação a 37 °C e 5% CO₂ por três horas. Completadas as três horas, elas foram centrifugadas a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços e submetido a leitura espectrofotométrica a 540 nm. A máxima lise (controle positivo) e o controle não lisado (controle negativo) foram obtidos substituindo a amostra teste por 1% de Triton X-100 ou glicose 5% na mesma proporção em volume, respectivamente. A porcentagem de hemólise foi determinada de acordo com a equação 1 e expressa como a Concentração Hemolítica de 50% dos eritrócitos (CH₅₀), determinado por regressão não linear.

$$(1) \text{ lise (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. controle negativo}} \right] \times 100$$

2.8 Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para a análise morfológica das formas promastigotas de *L. amazonensis* foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, 1×10⁶ parasitos mL⁻¹ foram tratadas nas concentrações correspondentes ao CI₅₀ e 2×CI₅₀ das substâncias TZ4C e TZ3D por 72 h a 25 °C. Após, as promastigotas foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 24 h. Posteriormente, estas foram aderidas em lamínulas com poli-L-lisina por 1 h. Adiante, as amostras passaram por desidratações com concentrações crescentes de etanol (30-100%), por 10 min em cada etapa. Em seguida, os parasitos foram submetidos ao ponto crítico (Baltec SCD-030) para a secagem, e metalizados com ouro. Para então, serem visualizadas em microscópio

eletrônico de varredura FEI Quanta 250 (SCARIOT et al., 2019). Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B.

2.9 Avaliação das alterações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de transmissão (MET) em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para a avaliação da ultraestrutura dos parasitos foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Formas promastigotas (1×10^6 parasitos mL^{-1}) foram tratadas por 72 h nas concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times \text{CI}_{50}$ das substâncias TZ4C e TZ3D. Posteriormente, estas foram fixadas por solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M), e pós-fixados em uma solução de ferrocianeto de potássio e tetróxido de ósmio por 30 min. As amostras foram então, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%), incluídas em resina epóxi (Polybed® 812) e polimerizadas em estufa a 60 °C por 72 h. Foram realizados em ultramicrotomo, cortes ultrafinos, sendo estes contrastados com acetado de uranila por 20 min e citrato de chumbo por 10 min (PAULA et al., 2020). Em seguida, os parasitos foram observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (JEOL, Japão).

2.10 Avaliação do tamanho celular

Promastigotas tratadas com CI_{50} de TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h foram lavadas e ressuspensas em PBS. Foi utilizado como controle positivo a actinomicina D (20 μM). A leitura e aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Para apresentação dos gráficos foi realizada a aquisição de 30.000 eventos (VOLPATO et al., 2018).

2.11 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\delta\psi\text{m}$)

Para isso, os protozoários (1×10^6 células/ml) foram previamente tratados com CI_{50} de TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h. Em seguida, eles foram centrifugados e lavados com salina 0,9% e marcados com Rh 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 5 mg/mL, seguido de incubação por 15 min no escuro à 37 °C. Após uma lavagem as células foram novamente ressuspensas em salina 0,9%, incubadas por mais 30 min. Como controle positivo foi utilizado CCCP (Sigma-Aldrich) 100 μM . A análise foi então realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA)

(MENNA-BARRETO et al., 2009). A Rh 123 é uma sonda catiônica fluorescente que é captado por células que possuem mitocôndrias ativas. Quando as células mantêm seu potencial mitocondrial intacto, elas retêm o Rh 123 e emitem alta fluorescência. No entanto, uma alteração no potencial de membrana mitocondrial resulta na saída do Rh 123, levando a uma diminuição na fluorescência (MAGALHÃES et al., 2022).

2.12 Determinação dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) intracelular

Promastigotas (1×10^6 células/ml) previamente tratadas com as substâncias TZ4C e TZ3D com CI_{50} por 24 h e 72 h, foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em PBS. Em placas brancas de 96 poços no escuro, foram adicionados 50 μ L de cada tratamento e 50 μ L do kit CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Após 10 min, foi determinado os níveis de ATP através de luminescência (GARCIA et al., 2013). A intensidade de luminescência foi quantificada usando um leitor de microplacas (SpectraMax® L; Molecular Devices, EUA). Foram ainda realizadas contagens das células tratadas e não tratadas em câmara de Neubauer, a fim de compor os resultados expressos nos gráficos. Como controle positivo foi utilizado o cianeto de potássio KCN a 500 μ M (Sigma-Aldrich). Através desse kit, a luciferina é convertida em oxiluceferina na presença de ATP, gerando um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente.

2.13 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

Para a determinação de espécies reativas de oxigênio foram utilizadas promastigotas (1×10^6 parasitos mL^{-1}) tratadas com TZ4C e TZ3D com CI_{50} por 24 h e 72 h. Como controle positivo foi utilizado o H_2O_2 (1 mM). Após o tratamento, as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS 0,01 M (pH 7,2) e em seguida marcadas com H_2DCFDA (Sigma-Aldrich) à 10 μ M por 45 min no escuro (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012). Posteriormente, essas células foram analisadas em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer; Finlândia) nos comprimentos de ondas de excitação de 490 nm e de emissão 535 nm. Realizou-se contagens das células tratadas e não tratadas em câmara de Neubauer, a fim de compor os resultados expressos nos gráficos. O H_2DCFDA (Sigma-Aldrich) é uma sonda não-fluorescente que possui como princípio a clivagem dos grupos acetatos por esterases intracelulares, que são oxidadas por ERO e convertidas em um produto fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) que permite ser quantificado

através de comprimento de onda. Assim é possível determinar a detecção de ERO (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012).

2.14 Determinação de óxido nítrico

Promastigotas (1×10^6 células/ml) tratadas com TZ4C e TZ3D com CI_{50} por 24 h e 72 h foram lavadas, ressuspensas em PBS e incubadas no escuro com o marcador DAF FM DA (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) $1 \mu\text{M}$ por 30 min. Após, houve nova lavagem dos parasitos e, depois de ressuspensos em PBS, os parasitos foram incubados por mais 15 min. A fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) nos comprimentos de onda de excitação de 495 nm e emissão de 515 nm. Posteriormente, realizou-se contagens das células tratadas e não tratadas em câmara de Neubauer, a fim de compor os resultados expressos nos gráficos (LAZARIN BIDÓIA et al., 2016). Como controle positivo foi utilizado o H_2O_2 (1 mM). O marcador DAF-FM DA é internalizado por células ativas e é hidrolisado à DAF-FM pela ação de esterases intracelulares, onde reage com óxido nítrico e forma um composto triazol que é capaz de emitir fluorescência (KOJIMA et al., 1999).

2.15 Detecção de lipoperoxidação

Promastigotas (1×10^6 células/ml) tratadas com CI_{50} de TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h foram lavadas e ressuspensas em PBS. Foi utilizado como controle positivo o H_2O_2 , na concentração de 1 mM, tratado por 1 h. Após, os parasitos foram marcados com DPPP (Difenil-1-pirenilfosfina) (Sigma-Aldrich) $50 \mu\text{M}$ e incubados por 15 min no escuro. As análises foram realizadas em leitor de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia) e, posteriormente, foram realizadas contagens das células tratadas e não tratadas em câmara de Neubauer, a fim de compor os resultados expressos nos gráficos. O DPPP é não fluorescente, ao sofrer oxidação por hidroperóxidos, este gera uma molécula fluorescente capaz de ser quantificada (TAKAHASHI et al., 2001; SCARIOT et al., 2019).

2.16 Avaliação da integridade de membrana plasmática

Promastigotas (1×10^6 células/ml) tratadas com CI_{50} de TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h, foram lavadas e ressuspensas em PBS. A seguir, foram incubadas no escuro com Iodeto de propídeo (IP) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) a $2 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ por 5 min. Como controle positivo do ensaio foi utilizada a Digitonina (Sigma-Aldrich) a $40 \mu\text{M}$. O

rompimento da membrana celular permite que o IP seja internalizado, propiciando sua ligação com os ácidos nucleicos (SCARIOT et al., 2017). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA).

2.17 Determinação de corpos lipídicos

Para a determinação de corpos lipídicos foram utilizadas promastigotas (1×10^6 células/ml) tratadas com as substâncias TZ4C e TZ3D com CI_{50} por 24 h e 72 h. Como marcador, foi utilizado o Vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich) a $10 \mu\text{g/mL}$, como controle positivo foi utilizado o H_2O_2 (1 mM). Promastigotas foram lavadas e ressuspensas em PBS e em seguida, marcadas com vermelho do Nilo por 30 min no escuro (VOLPATO et al., 2015). A leitura foi realizada por Microscopia de Fluorescência (Olympus BX51) e a fluorescência foi determinada em leitor de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia) em um comprimento de onda de excitação e emissão de 485–535 nm, respectivamente. Foram ainda realizadas contagens das células tratadas e não tratadas em câmara de Neubauer, a fim de compor os resultados expressos nos gráficos. O vermelho do Nilo é usado para localizar e quantificar gotículas lipídicas neutras intracelulares em células, não emite fluorescência em solventes polares, porém floresce em ambientes apolares (JARC; PETAN, 2019).

2.18 Avaliação do ciclo celular

Promastigotas (1×10^6 células/ml) foram tratadas nas concentrações referentes ao CI_{50} das substâncias TZ4C e TZ3D por 72 h. Após, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS. As amostras ficaram por 24 h incubadas com metanol a 4°C sob agitação a cada 30 min. Em seguida, foi adicionado IP ($2000 \mu\text{g/mL}$) e $10 \mu\text{L}$ RNAase ($10 \mu\text{g/mL}$). Os parasitos ficaram incubados por 45 min a 37°C . Foi utilizado como controle positivo o taxol a $10 \mu\text{M}$ (MAGALHÃES et al., 2022). A aquisição de dados e análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) sendo adquiridos 30.000 eventos. Foi utilizado para análise dos dados o programa FlowJo 10.8 (Becton-Dicknson, Rutherford, NJ, EUA), empregando a análise de cada estágio celular determinadas pelo modelo Dean-Jett-Fox.

2.19 Determinação da exposição de fosfatidilserina

Promastigotas (1×10^6 células/ml) foram tratadas na concentração referente ao CI_{50} com as substâncias TZ4C e TZ3D por 72 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, ressuspensas em tampão de ligação (124 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES-Na, pH 7,4) e marcadas com anexina V-FITC (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) (STEFANELLO et al., 2014). Como controle positivo foi utilizada a actinomicina D (20 μ M). Após incubação por 15 min foi adicionado IP (2 μ g. mL^{-1}) e as análises foram realizadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Para apresentação dos gráficos foi realizada a aquisição de 30.000 eventos. Para a avaliação, as células positivas apenas para anexina V-FITC foram classificadas como apoptose inicial. Já as células que apresentaram ligação tanto à anexina V-FITC quanto ao IP foram definidas como aquelas em apoptose tardia (KUMAR et al., 2021).

2.20 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo software Prism 8.0.1 27 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 TZ4C e TZ3D apresentaram atividade antileishmania em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

O presente estudo demonstrou que as substâncias TZ4C e TZ3D apresentaram atividade antileishmania promissora, exibindo CI_{50} de 2,35 e 12,59 μM ($0,36 \pm 1,73$) respectivamente, frente a forma promastigota, bem como, CI_{50} de 3,50 e 6,68 μM ($1,09 \pm 1,98$) respectivamente, frente a forma amastigota do protozoário (Tabela 1). Além disso, foi avaliada a citotoxicidade das substâncias sobre macrófagos J774A.1, e elas apresentaram CC_{50} de 16,18 e 57,52 μM ($2,80 \pm 3,96$) para TZ4C e TZ3D, respectivamente. Isso sugere que ambas as substâncias são seletivas para o parasito e possuem menor efeito citotóxico nas células hospedeiras, nesse caso, os macrófagos.

Tabela 1: Atividade antileishmania nas formas promastigotas e amastigotas (AMA) de *L. amazonensis* e efeito citotóxico sobre macrófagos J774A.1.

Substância	Promastigota CI_{50} (μM)	Amastigota CI_{50} (μM)	CC_{50} (μM) Macrófagos J774A.1	Índice de seletividade AMA
TZ4C	$2,35 \pm 0,36$	$3,50 \pm 1,09$	$16,18 \pm 2,80$	4,62
TZ3D	$12,59 \pm 1,73$	$6,68 \pm 1,98$	$57,52 \pm 3,96$	8,61
ANFOTERICINA B	$9,89 \pm 3,84$	-	$37,86 \pm 1,59$	-

Nota: Os resultados foram expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Concentração Inibitória de 50% dos parasitos (CI_{50}). Concentração citotóxica de 50% das células (CC_{50}). O índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão entre CC_{50}/CI_{50} . (-) não determinado.

Adicionalmente, a fim de entender melhor a atividade dos dicalcogenetos, a proliferação celular de formas promastigotas foi avaliada em diferentes tempos de tratamento, como demonstrado pelas curvas de inibição de cada substância (Figura 3). Tanto a substância TZ4C (Figura 3A) quanto TZ3D (Figura 3B) não apresentaram atividade em 24 h de tratamento até a última concentração testada (100 μM), porém, após 48 h, as substâncias se mostraram ativas, com CI_{50} de 23,73 e 70,79 μM ($2,04 \pm 18,2$) respectivamente. Após 72 h de tratamento, ambas as substâncias apresentaram melhor atividade em promastigotas (CI_{50} de 2,35 e 12,59 μM , respectivamente).

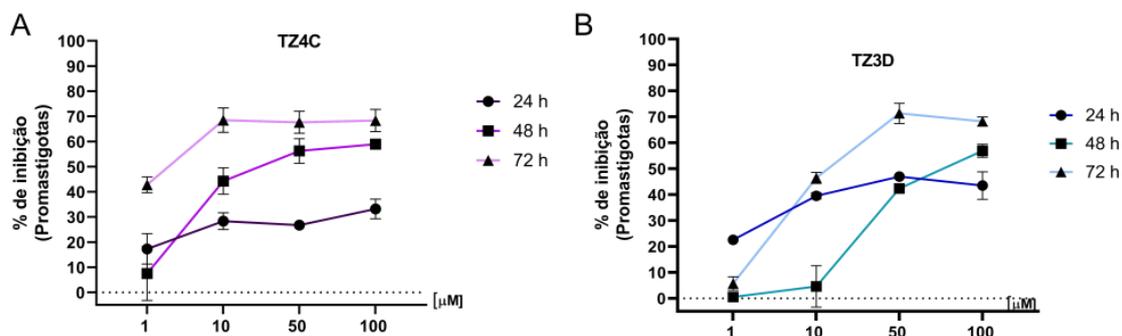


Figura 3. A: Efeito de TZ4C em formas promastigotas de *L. amazonensis*. B: Efeito de TZ3D em formas promastigotas de *L. amazonensis*. As promastigotas foram tratadas com 1, 10, 50 e 100 μM . O tempo de tratamento dos ensaios foi de 24, 48 e 72 h. O gráfico de concentração vs. porcentagem de inibição do crescimento foi plotado a cada dia. Os símbolos representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

3.2 TZ4C e TZ3D não apresentaram atividade hemolítica

Para a confirmação do perfil não citotóxico das substâncias, foi avaliada a atividade hemolítica delas. Como mostrado na (Tabela 2), nenhuma das substâncias apresentaram atividade hemolítica (CH_{50}) até a maior concentração testada (100 μM).

Tabela 2: Determinação da atividade hemolítica das substâncias TZ4C e TZ3D em hemácias de carneiro.

Substância	CH_{50} (μM)
TZ4C	>100
TZ3D	>100

Nota: Os resultados representam a média (DP) de três experimentos distintos. CH_{50} : Concentração Hemolítica para 50% das células. Para análise da atividade hemolítica, utilizou-se como controle positivo, Triton X-100. A maior concentração testada foi de 100 μM .

3.3 Os tratamentos com ambas as substâncias induziram a alterações na morfologia das formas promastigotas

Com o objetivo de avaliar os danos celulares causados pelas substâncias nas formas promastigotas do parasito, realizou-se a análise por MEV. Essa abordagem permitiu identificar mudanças significativas em sua morfologia (Figura 4) em comparação com as promastigotas não tratadas (Figura 4A), que exibem as características típicas do parasito,

como um corpo celular alongado e um flagelo exteriorizado na parte anterior. O tratamento com TZ4C (Figura 4C-D) e TZ3D (Figura 4E-F) induziu alterações como arredondamento do corpo celular, modificações na superfície, extravasamento de conteúdo celular e alterações na morfologia do flagelo. Adicionalmente, as células tratadas com anfotericina B (substância de referência) apresentaram alterações no corpo celular e extravasamento de conteúdo intracelular (Figura 4B).

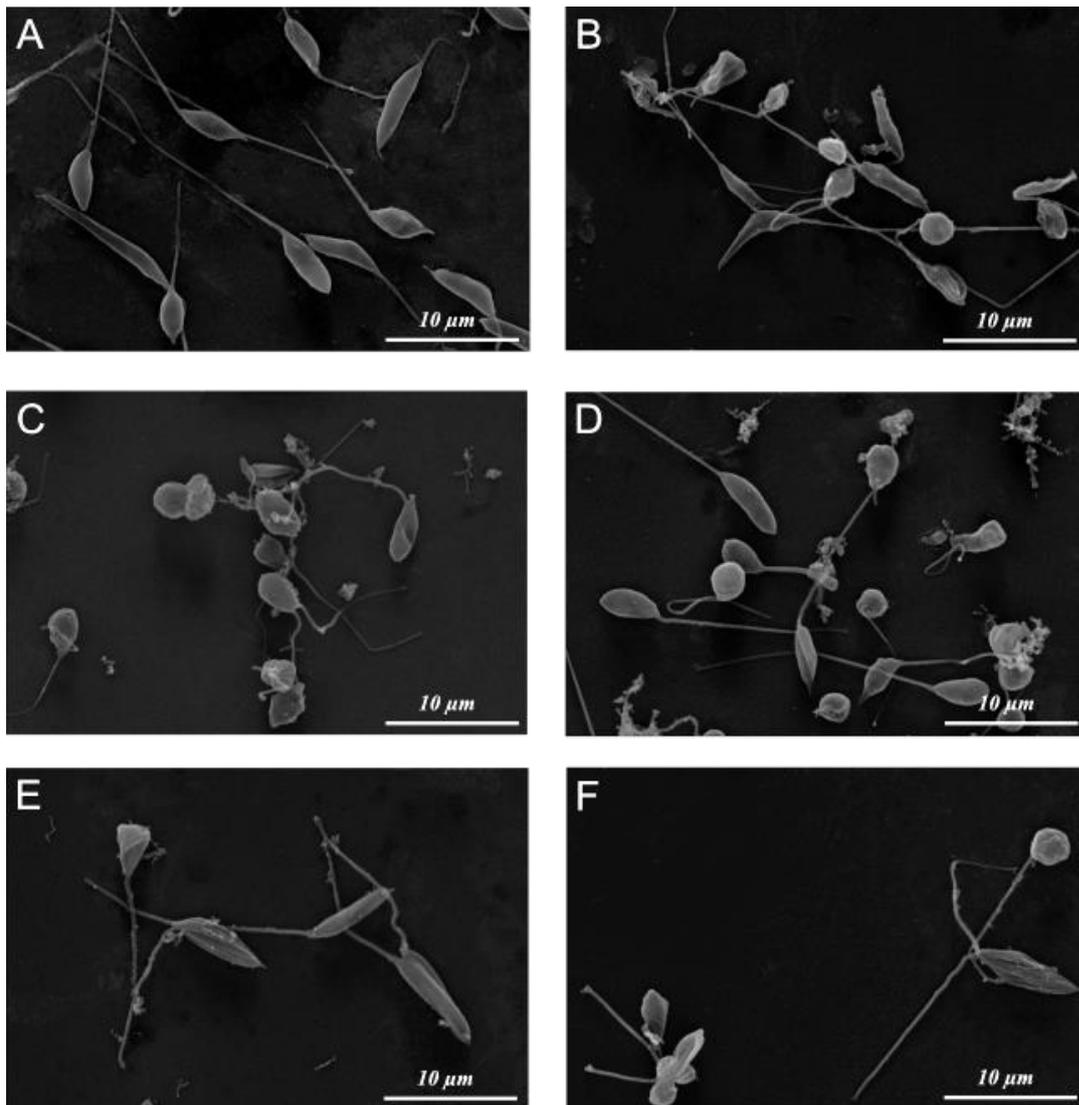


Figura 4. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Alterações morfológicas em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZ4C e TZ3D por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. (A) Promastigotas não tratadas mostrando morfologia normal. (B) Promastigotas tratadas com anfotericina B (9,89 μ M). (C-D) Promastigotas tratadas com 2,35 e 4,7 μ M de TZ4C, respectivamente. (E-F) Promastigotas tratadas com TZ3D, na concentração 12,5 e 25,1 μ M, respectivamente.

3.4 Os tratamentos com ambas as substâncias induziram a alterações ultraestruturais nas formas promastigotas

A análise por MET mostrou que, em comparação com as promastigotas não tratadas (Figura 5A), o tratamento com a substância TZ4C (Figura 5B-D) provocou alterações na ultraestrutura dos parasitos como: formação de vacúolos ao longo do citoplasma, alteração nuclear, como desorganização da cromatina, arredondamento celular e acúmulo de corpos lipídicos. Já o tratamento com a substância TZ3D (Figura 5E-F) provocou presença aumentada de corpos lipídicos, inchaço mitocondrial, desorganização nuclear e perda da integridade da membrana nuclear e na bolsa flagelar.

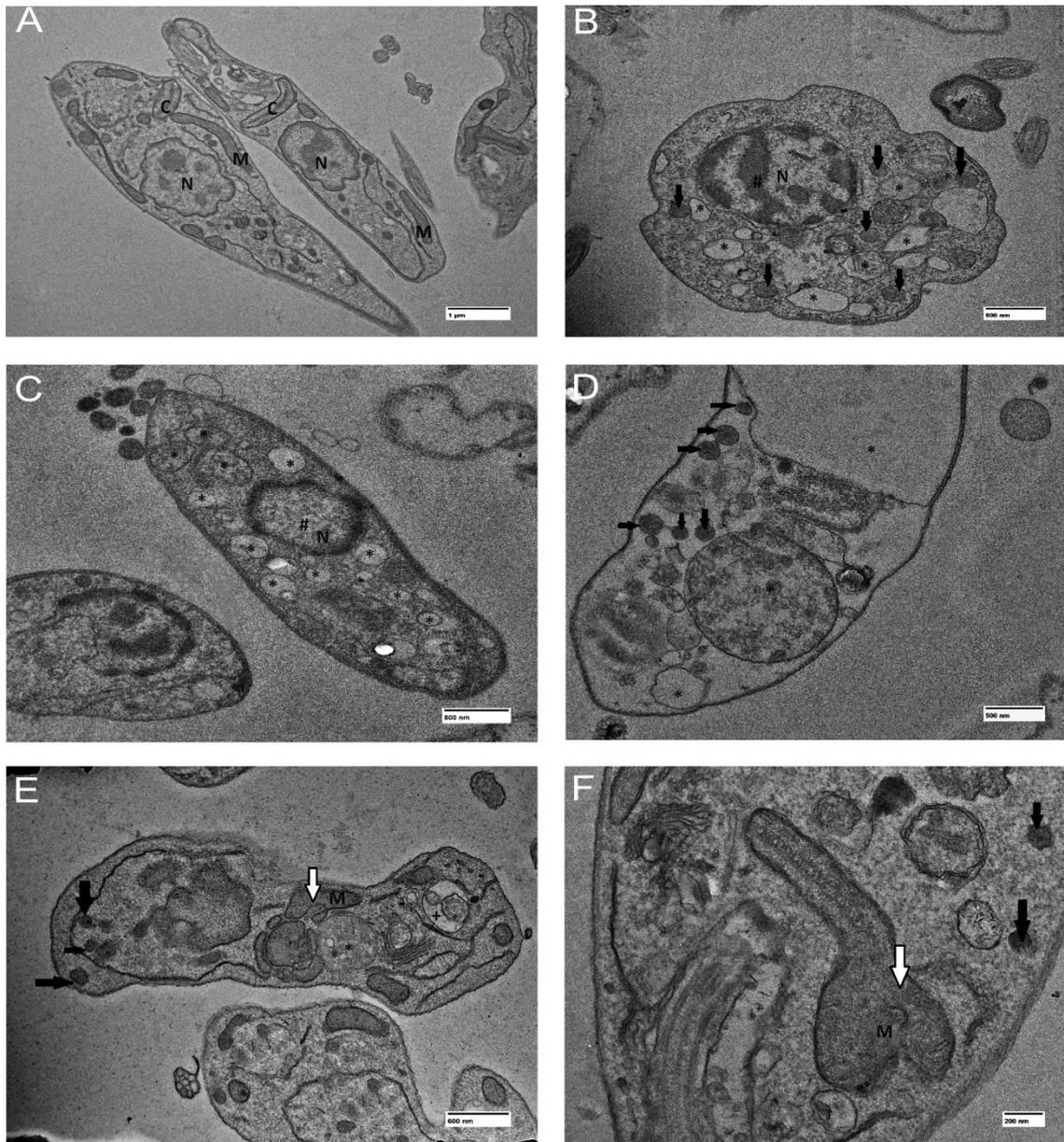


Figura 5. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Alterações na ultraestrutura das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZ4C e TZ3D por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. (A) promastigotas não tratadas mostrando morfologia normal: C: Cinetoplasto; N: Núcleo; M: Mitocôndria. (B-C) tratamento com TZ4C na concentração 2,35 μ M. (D) tratamento com TZ4C a 4,7 μ M: #: Alteração nuclear; Seta preta: Acúmulo de corpos lipídicos; *: Formação de vacúolos; (E-F) tratamento com TZ3D, nas concentrações 12,5 e 25,1 μ M: #: Alteração nuclear; Seta preta: Acúmulo de corpos lipídicos; Seta branca: Inchaço mitocondrial; +: alterações na bolsa flagelar. Barra de escala= 1 μ m (A); 200 nm (F); 200 nm (D); 600 nm (B, E) 800 nm (C);

3.5 TZ4C e TZ3D induziram em promastigota diminuição do tamanho celular após 24 h de tratamento.

O tamanho celular das promastigotas foi avaliado por citometria de fluxo. O tratamento com TZ4C e TZ3D por 24 h foi capaz de induzir uma diminuição no tamanho celular de 26,4 e 41%, respectivamente (Figura 6C-D). Porém, o tratamento com ambas as substâncias não ocasionou diminuição significativa no tamanho celular após 72 h de incubação (Figura 6C-D). Já a anfotericina B em 24 h não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, porém em 72 h houve um aumento no tamanho celular de 69,3%. A actinomicina D (controle positivo) induziu uma diminuição de 68,3% e 64,5% após 24 h e 72 h, respectivamente.

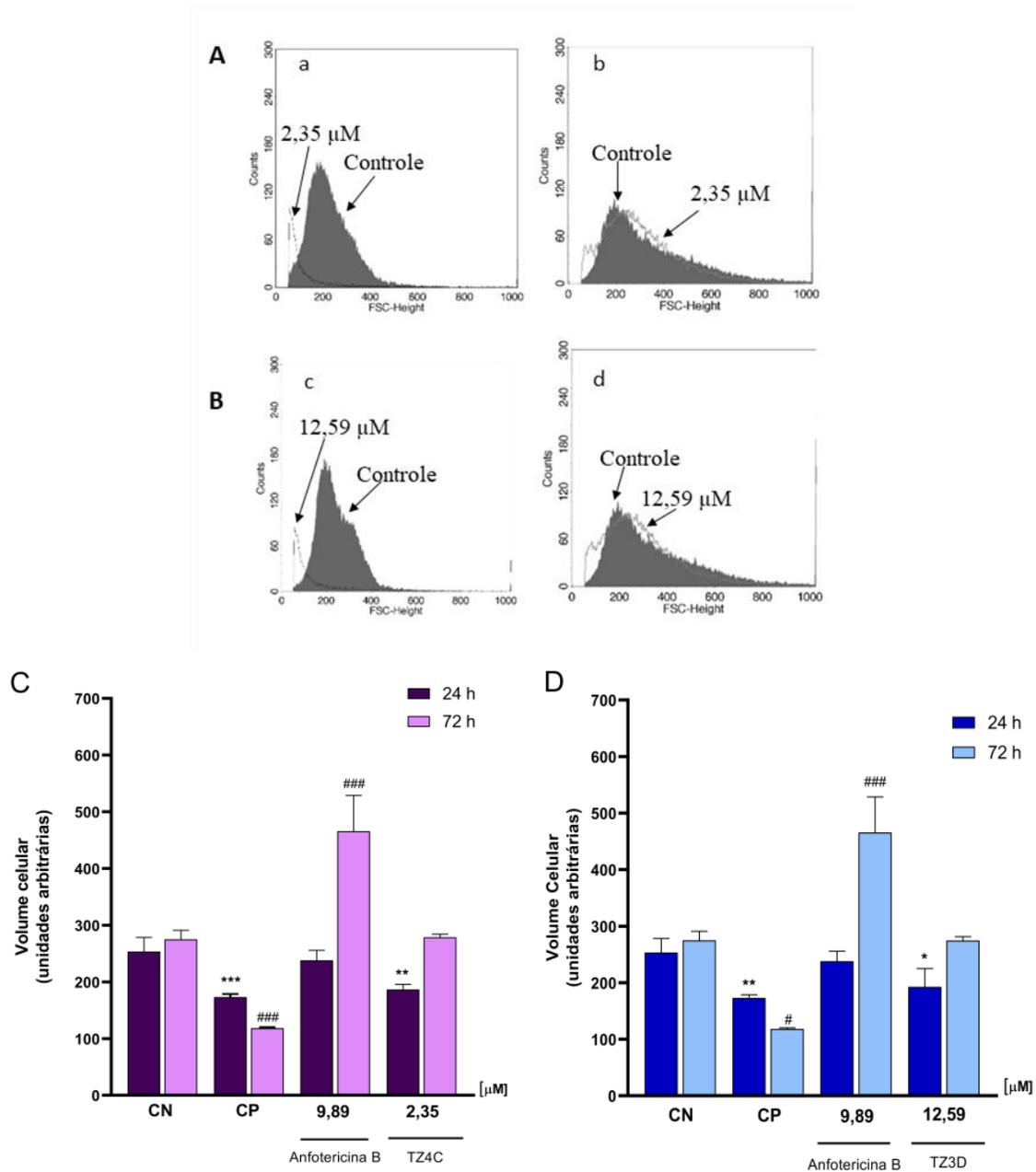


Figura 6. Avaliação do volume celular em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h em concentração correspondente ao CI₅₀. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): Actinomicina D (20 μM). anfotericina B (9,89 μM): substância de referência. (A) Tratamento com TZ4C: (a) histograma após tratamento por 24 h e (b) histograma após tratamento por 72 h. (B) Tratamento com TZ3D: (c) histograma após 24 h de tratamento e (d) histograma após 72 h de tratamento. (C) Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ4C. (D) Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ3D. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de

24 h. #p < 0,05; ##p <0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.6 Os tratamentos com os dicalcogenetos induziram alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\delta\psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por meio de citometria de fluxo, utilizando o marcador Rh 123. Após 24 h de tratamento com TZ4C (Figura 7C) observou-se uma redução da fluorescência de Rh 123 de 82% em promastigotas tratadas com CI_{50} quando comparadas com o controle negativo (protozoários não tratados). Já com 72 h de tratamento, houve uma diminuição da fluorescência de 67% (Figura 7C). Já o tratamento com TZ3D (Figura 7D) resultou em uma diminuição de 89% da fluorescência de Rh 123 em promastigotas tratadas com CI_{50} e, após 72 h de tratamento, houve uma diminuição de 13%. A anfotericina B em 24 h alterou o $\Delta\Psi_m$, diminuindo a fluorescência em 94%, porém, após 72 h de tratamento, promoveu uma redução de 78%. Em comparação, o CCCP (controle positivo) após 24 h de tratamento promoveu uma diminuição na fluorescência de 29,5%, em 72 h houve uma redução de 54% da fluorescência de Rh 123, também causando despolarização mitocondrial.

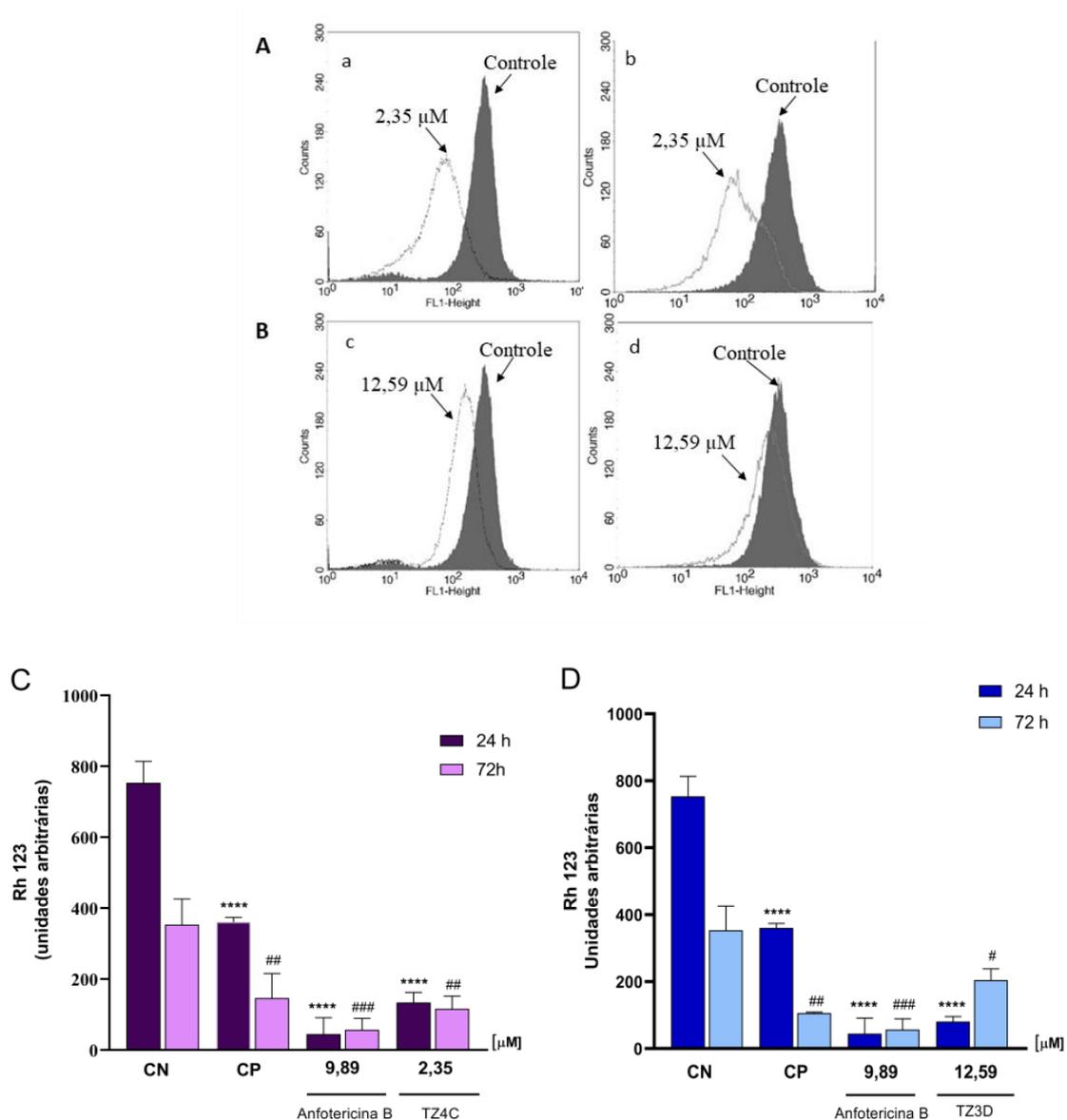


Figura 7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h na concentração correspondente ao CI_{50} , utilizando o marcador Rh 123. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): CCCP (100 μ M). Anfotericina B (9,89 μ M): substância de referência utilizada. (A): tratamento com TZ4C; (a) histograma após tratamento por 24 h (b) histograma após tratamento por 72 h; (B): tratamento com TZ3D; (c) histograma após 24 h de tratamento (d) histograma após 72 h de tratamento. (C): Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ4C; (D) Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ3D. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$;

^{##}p < 0,01; ^{##}p < 0,001; ^{####}p < 0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.7 Os tratamentos induziram alterações nos níveis de adenosina trifosfato (ATP) intracelular

Os níveis de ATP foram medidos após a exposição ao TZ4C e TZ3D, usando o kit CellTiter-Glo®, que é quantificado por luminescência. Foi observado uma diminuição nos níveis de ATP após 24 h de tratamento com TZ4C, com uma redução de 73% nas amostras tratadas na concentração relativa ao CI₅₀. Porém, após 72 h de tratamento, observou-se um aumento na produção de ATP de 154% (Figura 8A). De maneira semelhante, o tratamento com TZ3D por 24 h induziu uma diminuição nos níveis de ATP de 78% na concentração de CI₅₀, entretanto, em 72 h causou um aumento de 333% (Figura 8B). A anfotericina B não apresentou alterações significativas em nenhum dos tratamentos após 24 h e 72 h. Em 24 h e 72 h de tratamento, o KCN (controle positivo) ocasionou uma redução nos níveis de ATP de 89% e 38%, respectivamente.

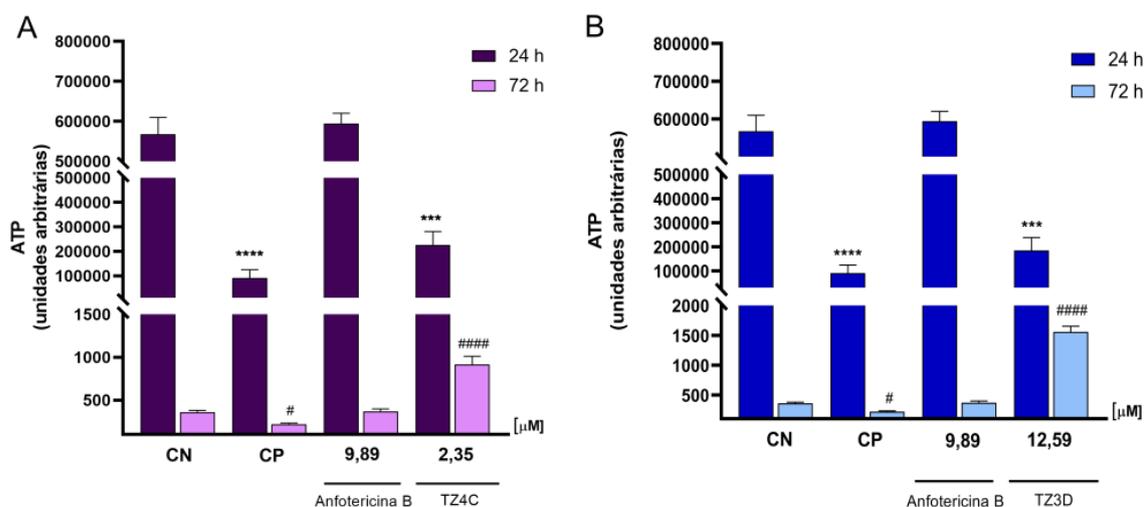


Figura 8. Quantificação dos níveis ATP em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h na concentração correspondente ao CI₅₀, utilizando o kit CellTiter-Glo®. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): KCN (500 µM). Anfotericina B (9,89 µM): substância de referência utilizada. Intensidade da luminescência obtida por luminômetro. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001; ####p < 0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.8 O tratamento com os dicalcogenetos levaram ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

Por meio de fluorimetria foi possível determinar a quantidade de ERO totais presentes nas promastigotas tratadas em comparação com o controle não tratado. A TZ4C só aumentou ERO totais após 72 h de tratamento, com cerca de 434,8% quando tratado com CI_{50} (Figura 9A). Já a TZ3D provocou um aumento de 231,6% após 24 h de tratamento com CI_{50} e, após 72 h houve um aumento de 651% na produção de ERO (Figura 9B). O tratamento com a anfotericina B em 24 h levou a um aumento de 361% em ERO, enquanto em 72 h houve um aumento expressivo de mais de 1000%. Foi ainda possível verificar, que o H_2O_2 (controle positivo) induziu um aumento de espécies reativas de 682,3 e 675,4% em 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente.

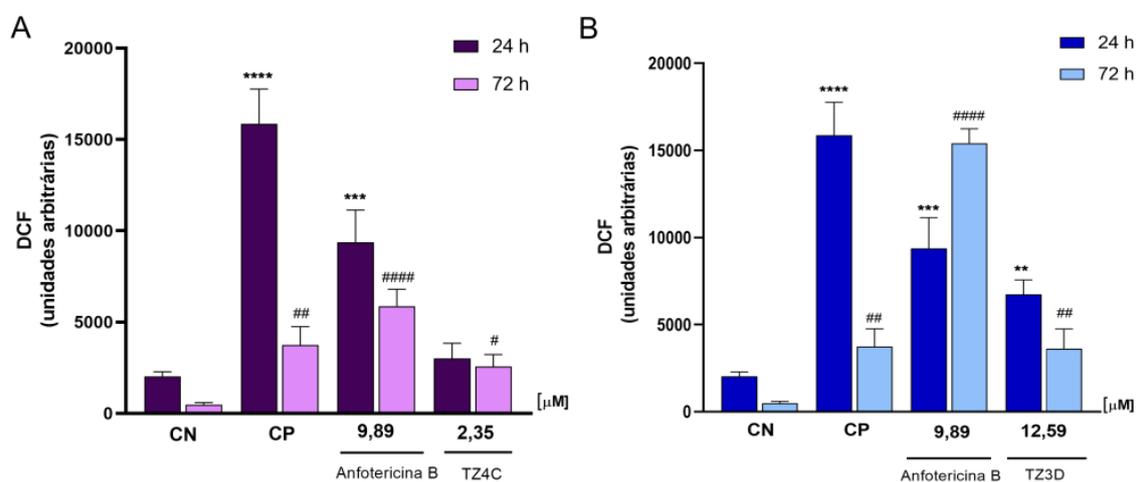


Figura 9. Detecção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C (A) e TZ3D (B) por 24 h e 72 h na concentração correspondente ao CI_{50} utilizando a sonda H_2DCFDA . Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): peróxido de hidrogênio (1mM). Anfotericina B (9,89 μM): substância de referência utilizada. Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.9 O tratamento com os dicalcogenetos levaram ao aumento de espécies reativas de nitrogênio

Foi avaliada a produção de óxido nítrico por meio do marcador DAF-FM a fim de se investigar se os dicalcogenetos estariam induzindo o aumento de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nas promastigotas tratadas. Os resultados mostram que o tratamento com TZ4C na concentração de em 24 h não teve efeito significativo, porém após 72 h, houve um aumento de 28,3 vezes na produção de ERN (Figura 10A). Já o tratamento com TZ3D por 24 h levou a um aumento de 1,4 vezes na produção de ERN e, em 72 h de tratamento, houve um aumento de 19,5 vezes (Figura 10B). O tratamento com a anfotericina B promoveu um aumento de 4,4 e 19,2 vezes em 24 e 72 h, respectivamente, enquanto o controle positivo (H_2O_2) tanto em 24 h quanto em 72 h promoveu um aumento na produção de ERN de 46% e 480%, respectivamente.

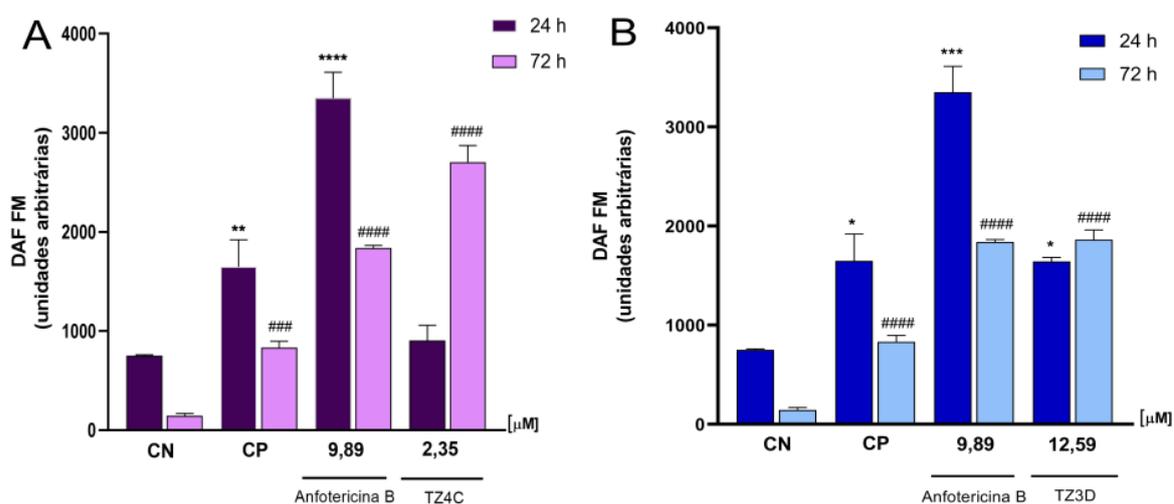


Figura 10. Espécies reativas de nitrogênio em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C (A) e TZ3D (B) por 24 h e 72 h na concentração correspondente ao CI_{50} , utilizando o marcador DAF-FM. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): peróxido de hidrogênio (1mM). Anfotericina B (9,89 μ M): substância de referência utilizada. Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.10 TZ4C e TZ3D aumentaram a produção de lipoperoxidação

Foi analisada a peroxidação lipídica por meio do marcador DPPP. Os tratamentos com TZ4C por 24 e 72 h desencadearam um aumento na peroxidação lipídica de 137,1% e 473,6%, respectivamente, em relação ao controle negativo, na concentração de CI_{50} (Figura 11A). De maneira semelhante, os tratamentos com TZ3D durante 24 e 72 h causaram um aumento de 122,7% e mais de 1000%, respectivamente, após o tratamento com a CI_{50} (Figura 11B). A anfotericina B promoveu um aumento de 345% em 24 h e mais de 1000% em 72 h. Foi ainda evidenciado que o H_2O_2 (controle positivo) induziu um aumento de lipoperoxidação de 108,9 e 502,2% após 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente.

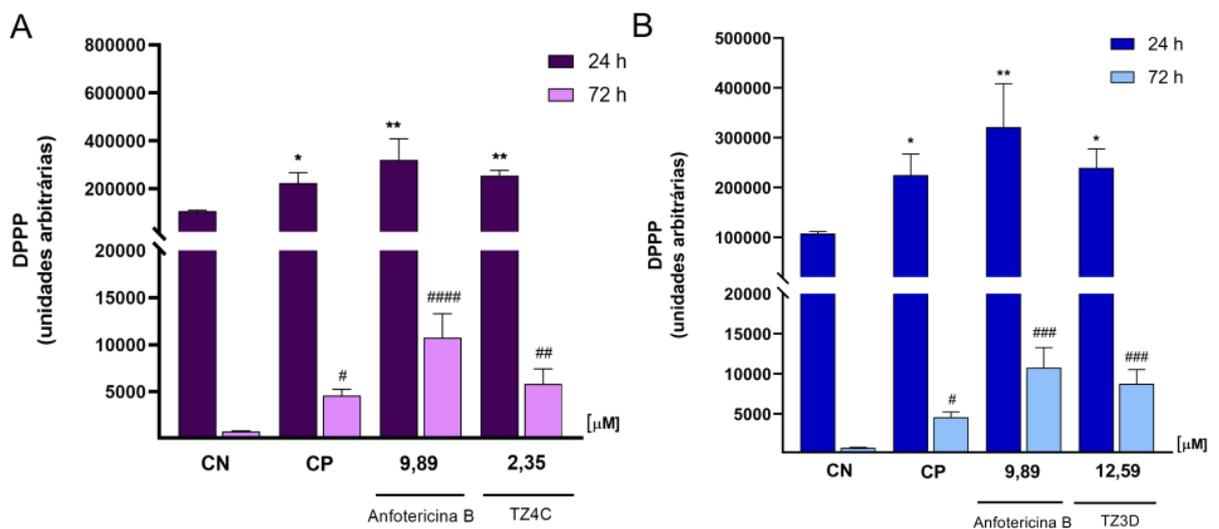


Figura 11. Níveis de peroxidação lipídica em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C (A) e TZ3D (B) por 24 h e 72 h na concentração correspondente ao CI_{50} utilizando o marcador DPPP. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): peróxido de hidrogênio (1mM). Anfotericina B (9,89 μ M): substância de referência utilizada. Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.11 TZ4C e TZ3D levaram a perda da integridade de membrana plasmática após 72 h de tratamento

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o marcador IP e as análises foram realizadas em citômetro de fluxo. Conforme mostram os gráficos de ponto (Figura 12A e B), é possível ver que, em 24 h de tratamento, tanto a TZ4C quanto a TZ3D não foram capazes de afetar a integridade da membrana plasmática, já que não houve aumento na porcentagem de células IP-positivas em comparação com o grupo controle negativo (Figura 12 c-d). Porém, o tratamento com ambas as substâncias por 72 h induziu um aumento na porcentagem de células IP-positivas como visto na (Figura 12 g-h).

Após quantificação, pode-se verificar que esse aumento na intensidade de fluorescência foi de 7,8 e 5,8 vezes maior que o controle não tratado após 72 h de tratamento com a CI_{50} de TZ4C e TZ3D, respectivamente (Figura 12C-D), indicando danos na membrana celular. A anfotericina B induziu um aumento de 26,5 e 38,9 vezes em 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente. Já a digitonina (controle positivo) provocou um aumento de 35,7 e 35,1 vezes, na intensidade de fluorescência após 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente.

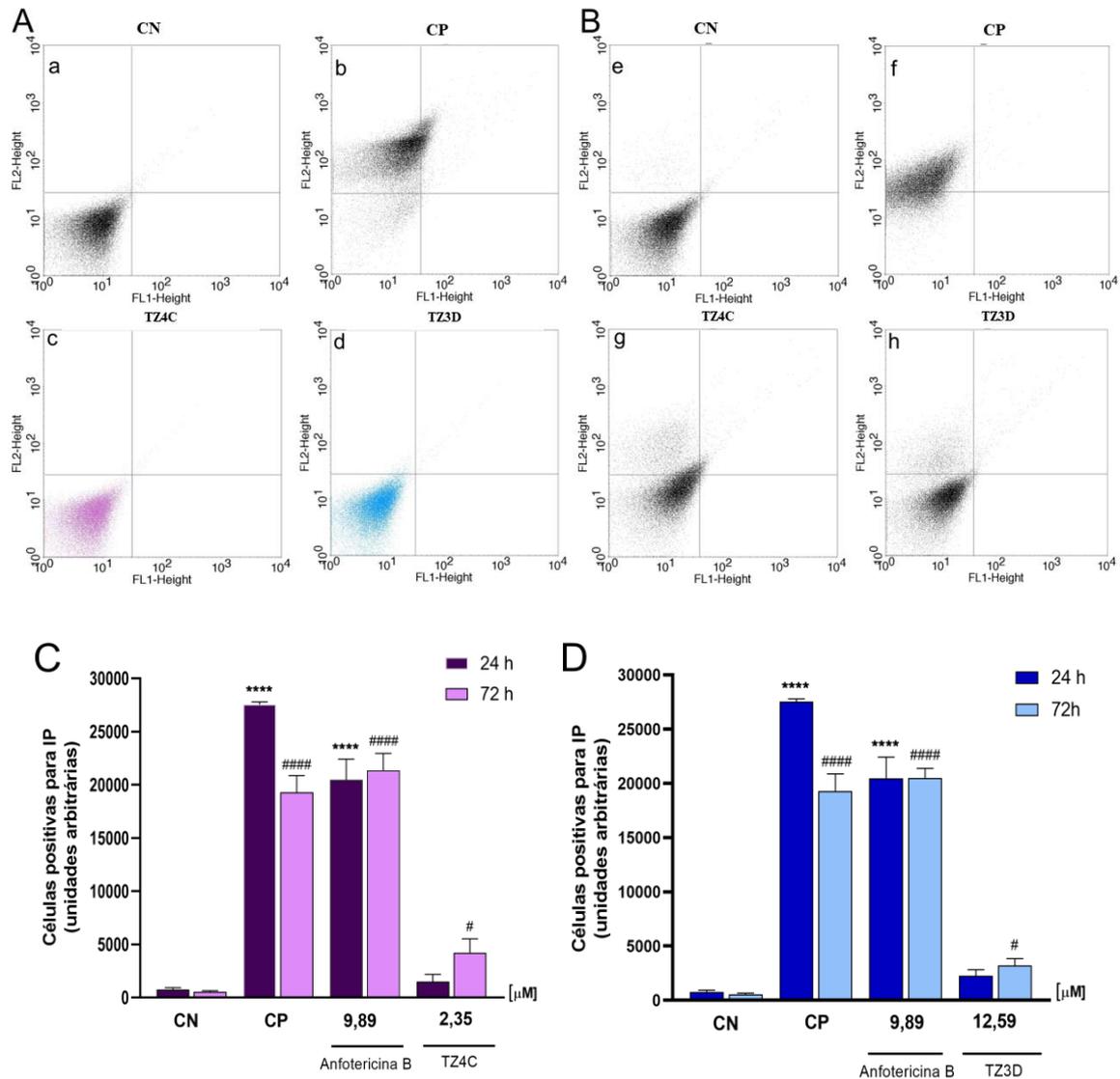


Figura 12. Avaliação da integridade de membrana celular em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} , utilizando marcação com IP. (A) Tratamento por 24 h: (a) histograma representando o controle não tratado (CN); (b) histograma representando controle positivo (CP): Digitonina (40 μ M); (c-d) histograma representando tratamento com TZ4C e TZ3D, respectivamente. (B): tratamento por 72 h; (e) histograma representando controle não tratado (CN); (f) histograma representando controle positivo (CP): Digitonina (40 μ M); (g-h) histograma representando tratamento com TZ4C e TZ3D, respectivamente; (C): Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ4C; (D) Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ3D. Controle negativo (CN): parasitos não tratados. Controle positivo (CP): Digitonina (40 μ M); Anfotericina B (9,89 μ M): substância de referência utilizada. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

<0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. #p < 0,05; ##p <0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.12 TZ4C e TZ3D levaram ao aumento de corpos lipídicos

A avaliação da presença de corpos lipídicos foi realizada por microscopia de fluorescência e fluorimetria utilizando o marcador Vermelho do Nilo. As imagens de microscopia demonstraram a presença de corpos lipídicos aumentados tanto no tratamento com CP (Figura 13C-D), quanto nos tratamentos com TZ4C (Figura 13E-F) e TZ3D (Figura 13G-H). Através da fluorimetria, como mostrado nos gráficos da (Figura 13I e J), foi possível verificar que o tratamento com CI₅₀ de TZ4C proporcionou um aumento de 320,3% e 401,1% na intensidade de fluorescência após 24 e 72 h de tratamento, respectivamente. Já o tratamento com CI₅₀ de TZ3D induziu um aumento de 168% em 24 h e de 588,5% em 72 h de tratamento quando comparado com o controle negativo. A anfotericina B promoveu um aumento de 891,9% e 540,6% em 24 h e 72 h, respectivamente. O H₂O₂ (controle positivo) aumentou a concentração de corpos lipídicos em 308% e 194% após 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente.

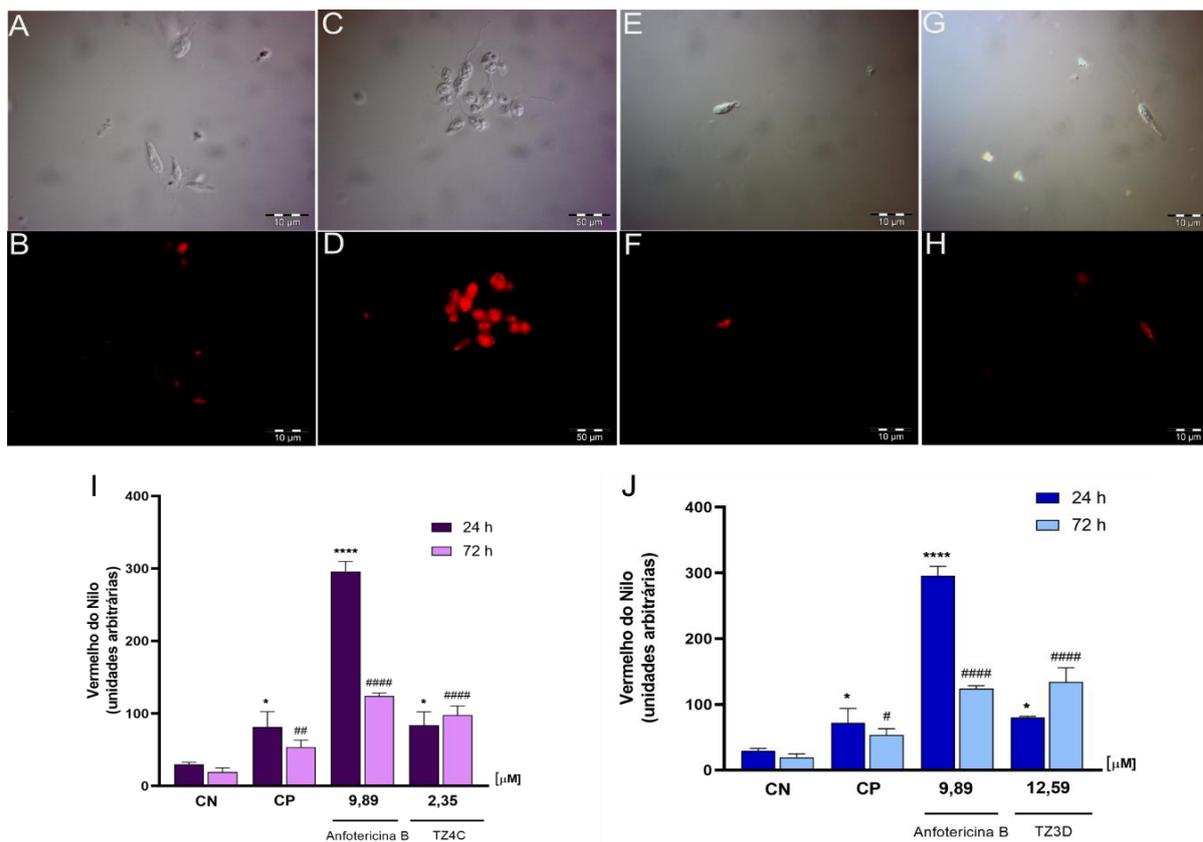


Figura 13. Detecção de corpos lipídicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 24 h e 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} utilizando o marcador Vermelho do Nilo. Imagens de microscopia de fluorescência: (A-B) promastigotas não tratadas; (C-D) promastigotas tratadas com CP: controle positivo, peróxido de hidrogênio (1mM); (E-F) promastigotas tratadas com TZ4C (2,35 μM) por 72 h; (G-H) promastigotas tratadas com TZ3D (12,56 μM) por 72 h. Nas promastigotas tratadas, as imagens sugerem acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma (D, F, H). Barra de escala 50 e 10 μm . Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria: (I) Tratamento com TZ4C; (J) Tratamento com TZ3D. Anfotericina B (9,89 μM): substância de referência utilizada. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.13 TZ4C e TZ3D promoveram parada no ciclo celular

A avaliação do ciclo celular demonstrou que o tratamento com TZ4C e TZ3D após 72 h induziu a um aumento no número de células na fase G_0/G_1 de 26 e 30%, respectivamente (Figura 14B). Entretanto, houve uma diminuição de 30 e 33% no número de células tratadas na fase S, assim como também foi demonstrado uma diminuição no

número de células (10 e 16%, respectivamente) na fase G₂/M. O Taxol (controle positivo) promoveu uma diminuição de 21,5% na população de células na fase S.

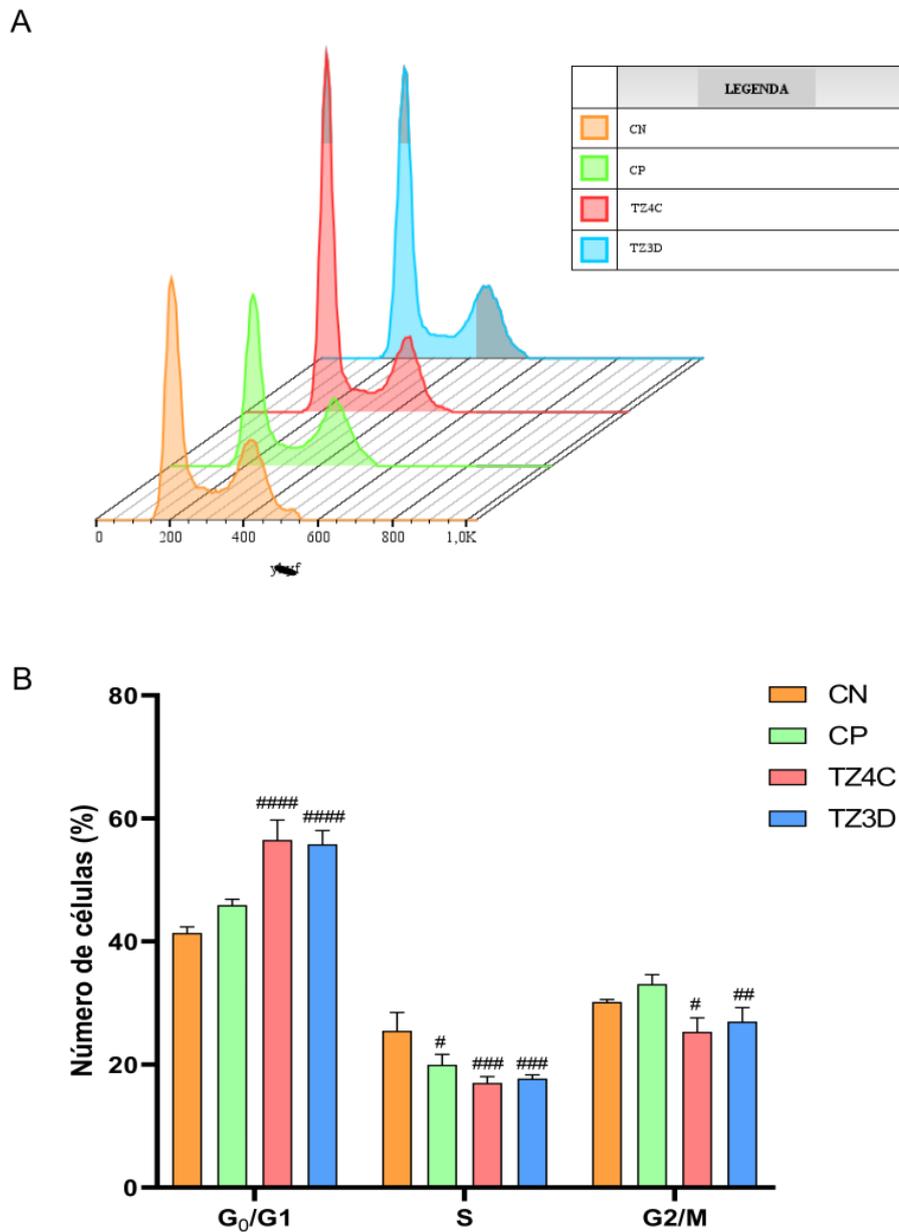


Figura 14. Análise do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TZ4C e TZ3D por 72 h. Os resultados foram expressos (A) histogramas fornecidos pelo programa FlowJo, representando o ciclo celular de promastigotas não tratadas e após tratamento por 72 h. CN: Controle Negativo (laranja); CP: Controle positivo, Taxol 10 μ M (verde). Tratamentos com TZ4C (vermelho) e TZ3D (azul). (B) gráfico de barras, representando a média desvio padrão da porcentagem de promastigotas em cada população, utilizando modelo Dean-Jett-Fox (FlowJo), de três experimentos

independentes* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 24 h. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

3.14 Dicalcogentos levaram a exposição de fosfatidilserina

Para avaliar a externalização da fosfatidilserina, foi utilizado o marcador Anexina V-FITC. Pelo gráfico de pontos (Figura 15A) é possível observar que houve um aumento na porcentagem de células positivas para anexina V após o tratamento de 72 h com CI_{50} de TZ4C e TZ3D, respectivamente.

Após quantificação (Figura 15B), foi possível verificar que houve um aumento de cerca de 537 e 562% na quantidade de células positivas apenas para Anexina (quadrante inferior direito), ou seja, em apoptose inicial, após o tratamento com TZ4C e TZ3D, respectivamente. Adicionalmente, considerando as células marcadas com anexina V e iodeto de propídio (quadrantes superior e inferior direito), ou seja, em apoptose tardia, o aumento no número de células foi de 1122 e 929% quando tratadas com TZ4C e TZ3D, respectivamente. A anfotericina B promoveu um aumento de mais de 1000% na quantidade de células positivas apenas para anexina. Porém, obteve um aumento de 327,8% em células marcadas com anexina V e iodeto de propídio. A actinomicina D promoveu um aumento de 29,4% na quantidade de células positivas apenas para anexina, enquanto promoveu um aumento de 233,5% em células positivas para anexina V e iodeto de propídio.

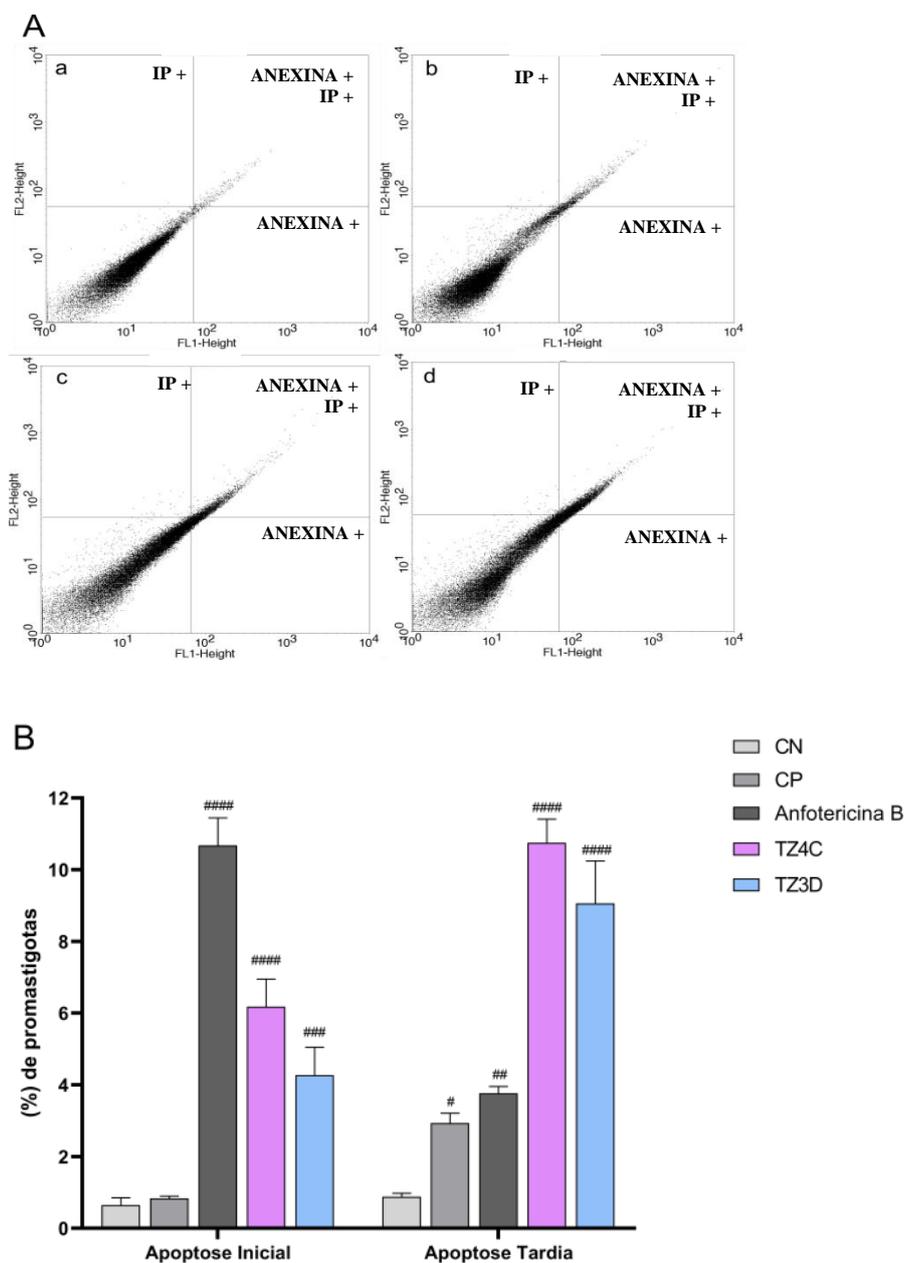


Figura 15. Avaliação da externalização da fosfatidilserina através de Anexina V-FITC, em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com TZ4C e TZ3D por 72 h em concentração correspondente ao CI_{50} (2,35 μ M e 12,59 μ M, respectivamente). Controle negativo (CN): células não tratadas. Controle positivo (CP): Actinomicina D (20 μ M). anfotericina B (9,89 μ M): substância de referência. (A) Gráficos de pontos: tratamento com TZ4C e TZ3D por 72 h; (a) células não tratadas; (b) células tratadas com actinomicina D (20 μ M); (c): tratamento com CI_{50} de TZ4C; (d) tratamento com CI_{50} de TZ3D (B): Intensidade de fluorescência após tratamento com TZ4C e TZ3D * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas em relação ao

grupo controle de 24 h. #p < 0,05; ##p <0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle de 72 h.

4. DISCUSSÃO

As leishmanioses ainda continuam sendo um grave problema de saúde pública mundial, com prevalência de 12 milhões de casos considerando todas as suas manifestações clínicas, além de cerca de 220.000 novos casos de leishmaniose cutânea anualmente (DE MACEDO-SILVA et al., 2022). De acordo com o Ministério da Saúde (2017), no Brasil, entre 1995 e 2014, verifica-se uma média de 25.763 novos casos registrados por ano. Entretanto, apesar da alta incidência, o tratamento atual ainda é ineficaz devido à variadas limitações, dentre elas o alto grau de efeitos adversos, longo período de tratamento e custos elevados (MACHIN et al., 2021).

Adicionalmente, o extenso período de uso dos antimoniais contribuiu para o aumento da resistência dos parasitos ao tratamento. Nesse contexto, a anfotericina B convencional surgiu como uma alternativa terapêutica, porém, sabe-se que ela está associada ao desenvolvimento de problemas renais e hepáticos devido à sua elevada toxicidade (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). Assim, é fundamental a pesquisa por novos compostos com potencial antileishmania. Dado o elevado número de manifestações cutâneas associadas à *L. amazonensis*, esta pesquisa buscou avaliar o potencial antileishmania de duas substâncias inéditas, a base de telúrio e selênio, visando investigar seu efeito sobre esse protozoário.

Os ensaios *in vitro* revelaram que os dicalcogenetos TZ4C e TZ3D demonstraram uma promissora atividade antileishmania, inibindo o crescimento de promastigotas. Em relação à toxicidade em macrófagos J774A1, a TZ4C mostrou-se mais citotóxico do que a TZ3D, entretanto seu índice de seletividade foi melhor (6,89). Além disso, os tratamentos com TZ4C e TZ3D exibiram valores de IS superiores (6,89 e 4,57) quando comparados com a anfotericina B (3,83), que é uma medicação de referência utilizada no tratamento atual, reforçando o potencial terapêutico promissor dessas novas substâncias. Estes resultados corroboram com os achados de Bandeira et al. (2019), que destacaram a atividade de diteluretos (substâncias pertencentes a família dos calcogênios) contra promastigotas de *L. amazonensis*. Ainda, segundo Zugman (2022), estudos com promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* apresentaram uma maior

suscetibilidade a substâncias organoteluradas quando comparadas com as organosseleniladas, o que justifica a melhor atividade de TZ4C frente as formas extracelulares do parasito, uma vez que esta possui átomos de telúrio em sua estrutura.

Em relação à atividade *in vitro* contra as formas amastigotas do protozoário, evidenciou-se a excelente atividade de ambas as substâncias. O tratamento com TZ4C mostrou um CI_{50} de 3,50 μM e foi cerca de 4,6 vezes mais seletiva ao protozoário do que para macrófagos J74A1. Já o tratamento com TZ3D demonstrou CI_{50} de 6,68 μM , o que representa uma redução de quase 50% no CI_{50} em comparação com sua atividade nas formas promastigotas. Apesar de TZ4C ter se mostrado mais ativa contra as formas amastigotas, a substância TZ3D apresentou uma promissora seletividade (8,61), destacando-se, já que a forma amastigota é a encontrada no organismo dos mamíferos. Com base nisso, sugere-se que substâncias contendo selênio podem desempenhar um papel importante na eliminação das formas amastigotas deste protozoário. Zugman (2022) também relata a atividade de substâncias a base de selênio frente a formas amastigotas de *L. infantum*, confirmando o potencial dessas substâncias contra as formas intracelulares de protozoários do gênero *Leishmania*.

Com relação à avaliação da capacidade hemolítica das substâncias, ambas demonstraram ausência de hemólise até a maior concentração testada, reforçando a baixa toxicidade apresentada por elas. Martinez (2022) sugere que a avaliação da atividade hemolítica é importante para complementar a avaliação da toxicidade das substâncias, uma vez que essa atividade pode acarretar na ação de lise nos eritrócitos, o que limitaria a utilização de um potencial futuro fármaco, administrado via endovenosa.

Visto o potencial antileishmania dos dicalcogenetos, a presente pesquisa buscou avaliar os mecanismos de ação de TZ4C e TZ3D envolvidos na morte das formas promastigotas deste protozoário. Primeiramente, os protozoários foram analisados por MEV e MET e as micrografias mostraram evidentes alterações tanto na morfologia, quanto na ultraestrutura dos parasitos tratados com ambas as substâncias, como arredondamento do corpo celular, formação de vacúolos no citoplasma, acúmulo de corpos lipídicos, alterações nucleares, como desorganização e rompimento da membrana nuclear, e inchaço mitocondrial.

O arredondamento e perda de morfologia contribuem para a redução do tamanho celular (MENNA BARRETO, 2019; BORTOLETI et al., 2019). Assim, a análise do

tamanho celular por citometria de fluxo confirmou as alterações visualizadas por microscopia eletrônica, principalmente após 24 h de tratamento, em ambas as substâncias.

É conhecido que protozoários do gênero *Leishmania* possuem uma única mitocôndria que percorre o corpo celular do parasito e por isso possui grande importância para sua sobrevivência. O funcionamento adequado desta organela é essencial para estes parasitos (LAZARIN-BIDOIA et al., 2022). Considerando o que foi observado por microscopia eletrônica, dentre outras coisas, sugere-se alteração mitocondrial, e isso foi investigado nesses protozoários por citometria de fluxo através da marcação com Rh 123. O tratamento com ambas as substâncias induziu à despolarização da membrana mitocondrial nos diferentes tempos de tratamento (24 h e 72 h), confirmando que elas possuem a capacidade de alterar o funcionamento desta organela. A diminuição do metabolismo mitocondrial total, assim como no potencial de sua membrana evidenciam alterações na função desta organela, que, além de provocar danos na cadeia respiratória, podem desencadear uma série de eventos que contribuem para a morte do parasito (ALONSO et al., 2021).

Nesse sentido, nosso próximo passo foi avaliar a produção de ATP nesses protozoários tratados. Como esperado, foi possível verificar uma diminuição nos níveis de ATP durante as primeiras 24 h de tratamento com ambas as substâncias, porém, após 72 h de tratamento houve um aumento dos níveis de ATP. Esse aumento pode estar associado a ativação de vias metabólicas alternativas como a via glicolítica, na qual os parasitos recorrem afim de manter o fornecimento de energia para sua sobrevivência. Em ambientes propícios, mais de 50% da energia dos parasitas é gerada pela mitocôndria através da fosforilação oxidativa, que produz mais ATP em comparação com a glicólise. No entanto, quando essa função mitocondrial é prejudicada, os protozoários conseguem se adaptar e recorrer a vias metabólicas alternativas (MANZANO et al., 2011). O mesmo também foi descrito em pesquisas anteriores com células tumorais que, ao terem comprometimento mitocondrial, notou-se um aumento nos níveis ATP através da ativação da via glicolítica pelo aumento da expressão de enzimas necessárias para o funcionamento da via (MATHUPALA; REMPEL; PEDERSEN, 2001; XU et al., 2005).

A despolarização mitocondrial ao desencadear danos na função da cadeia respiratória, pode ainda promover o aumento na formação de ERO (CABRAL et al., 2023). ERO são produzidos em condições fisiológicas pelas mitocôndrias e possuem um

papel importante na fisiologia celular, porém quando existe falha no sistema antioxidante que elimina esses radicais, a célula sofre um processo conhecido como estresse oxidativo, levando macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA a sofrerem oxidação, (SCHIEBER; CHANDEL, 2014; DA SILVA et al., 2016). Nossos dados evidenciaram esse aumento na produção de ERO tanto nos tratamentos de 72 h com TZ4C, quanto no tratamento de 24 h e 72 h com TZ3D.

De maneira semelhante, segundo Martinez e Andriantsitohaina (2009), espécies reativas de nitrogênio (ERN), substâncias derivadas do óxido nítrico, possuem um papel importante na regulação fisiológica das células. No entanto, níveis elevados dessas espécies podem levar à indução do estresse nitrosativo. Neste trabalho, as substâncias avaliadas, além do aumento nos níveis de ERO, induziram um aumento dos níveis de ERN tanto nos tratamentos de 72 h com TZ4C, quanto no tratamento de 24 h e 72 h com TZ3D, corroborando com a geração de radicais reativos que podem contribuir com o estresse oxidativo na célula do protozoário.

O aumento de espécies reativas como já mencionado, pode promover danos em macromoléculas como os lipídios e isso também foi confirmado neste trabalho, uma vez que houve aumento na peroxidação lipídica após o tratamento com os dicalcogenetos nos diferentes tempos avaliados. Sabe-se que peroxidação lipídica é um processo que compromete a integridade estrutural e funcional das membranas celulares, causando uma reorganização em sua estrutura e provocando modificações em sua capacidade de permitir a passagem de substâncias. (PAMPLONA, 2008; ALONSO; DORTA; ALONSO, 2022). Sendo assim, é também justificável o aumento de células positivas para marcação com IP após os tratamentos por 72 h com TZ4C e TZ3D.

Adicionalmente, em situações de estresse oxidativo, a célula pode intensificar a síntese de gotículas lipídicas, resultando na sua acumulação, que serve como um mecanismo de proteção para as membranas celulares contra reações de peroxidação. Essas gotículas lipídicas podem funcionar como fonte de energia em uma tentativa de sobrevivência (JARC; PETAN, 2019). Nesse sentido, o aumento expressivo de gotículas lipídicas observado em promastigotas tratadas com TZ4C e TZ3D pode estar associado a esse mecanismo de sobrevivência em resposta ao estresse oxidativo induzido pelos tratamentos.

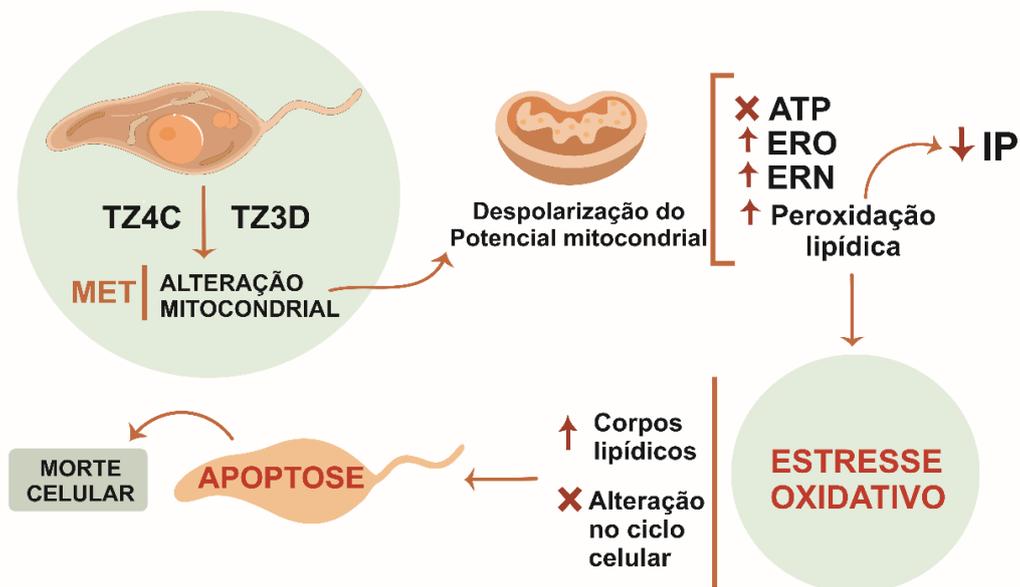
Dado que os tratamentos com os dicalcogenetos desencadearam estresse oxidativo nas células, acúmulo e formação rápida de corpos lipídicos no citoplasma celular, perda da integridade da membrana plasmática e redução do volume celular, o próximo passo foi avaliar o possível mecanismo de morte celular induzido por essas substâncias. É cabível que esses fatores juntos podem estar associados com a morte celular por apoptose (LEE et al., 2013).

Inicialmente investigamos o funcionamento do ciclo celular desses parasitos. O tratamento com TZ4C e TZ3D induziu um aumento na subpopulação na fase G₀/G₁ e significativa diminuição de células na fase S e G₂/M, o que indica que menos células estão se envolvendo na síntese de DNA e preparação para a divisão celular, o que pode resultar em um bloqueio no ciclo celular. De acordo com Meira et al. (2017), as alterações no ciclo celular que foram encontradas em seus estudos com promastigotas de *L. amazonensis* demonstram que a parada na fase G₀/G₁ e diminuição na população de células na fase G₂/M, contribuindo assim para o processo de apoptose.

A fosfatidilserina é um fosfolípido que é externalizado na superfície de células que sofrem processo de apoptose (TAVARES, 2008). Ensaio com anexina V, evidenciaram a translocação da fosfatidilserina, que migra da camada mais interna da membrana plasmática para a camada mais externa, e esta alteração é característica de morte celular programada (MEHTA; SHAHA, 2006). Quando avaliada a externalização da fosfatidilserina, os resultados dos tratamentos com TZ4C e TZ3D mostram que a maior população de células está positiva para a marcação tanto por anexina V quanto com IP, sugerindo, portanto, que pode ter ocorrido um processo de apoptose tardia. Existem duas vias principais que podem desencadear a apoptose: a extrínseca e a intrínseca. Os danos mitocondriais identificados no estudo indicam que possivelmente a indução da apoptose ocorreu por meio da via intrínseca (SOLANO-GÁLVEZ et al., 2021).

Por fim, foi possível observar que, apesar de serem substâncias compostas por dicalcogenetos diferentes, TZ4C e TZ3D exibiram efeitos semelhantes nos dois tempos de tratamento avaliados. Destacamos, porém, que TZ3D apresentou aumento de ERO e ERN logo após 24 h de tratamento, evidenciando precocemente danos mais exacerbados e característicos de estresse oxidativo. Essas semelhanças entre os dicalcogenetos já era esperado devido às suas propriedades químicas serem muito parecidas, o que corrobora com os resultados encontrados. Portanto, é possível constatar que as alterações

morfológicas e bioquímicas que foram induzidas por TZ4C e TZ3D no presente estudo induziram uma cascata de eventos (Figura 16) que não são compatíveis com a sobrevivência do protozoário.



Fonte: autora (2023).

Figura 16. Sequência de eventos que contribuíram com a morte celular de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com TZ4C e TZ3D.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados apontam que os dicalcogenetos TZ4C e TZ3D possuem forte atividade antileishmania e mostram satisfatória seletividade frente a formas promastigotas e amastigotas do protozoário. Em conjunto, os dados obtidos fornecem uma hipótese sobre o possível mecanismo de ação de ambas as substâncias frente à forma promastigota. Sugere-se que estas substâncias levam a danos mitocondriais e estes provavelmente são responsáveis pelo aumento de ERO e ERN, que, juntamente com as outras alterações mostradas, levam a célula ao estresse oxidativo, podendo assim ocasionar a morte do protozoário provavelmente via apoptose. Os resultados alcançados mostram-se promissores e sustentam a ideia de considerar as substâncias TZ4C e TZ3D para futuras investigações *in vivo* e como possíveis alternativas no tratamento de pacientes que sofrem de leishmaniose cutânea. Vale ressaltar que estudos adicionais são

necessários a fim de investigar mais a fundo os mecanismos que estão associados com a morte não só nas formas promastigotas, mas também na forma intracelular do parasito.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. F., RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no brasil: artigo de revisão. **Unimontes Claros**, v. 19, n.1, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, e0004349, 2016.
- ALONSO L, DORTA ML, ALONSO A. Ivermectin and curcumin cause plasma membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* due to oxidative stress. **Biochim Biophys Acta Biomembranes**, v. 1864, n. 9, 2022.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BANDEIRA, P. T. **Síntese, atividades antioxidante e leishmanicida e citotoxicidade de Organo(di)teluretos**. 2019. 184f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.
- BANDEIRA, P. T. et al. Diacetal Ditellurides as Highly Active and Selective Antiparasitic Agents toward *Leishmania amazonensis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 806–810, 2019.
- BOYD, R. Selenium storie. **Nature Chemistry**, v. 3, p. 570-570, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: 189 p., 2ed., 2017.
- BRINDHA, J.; BALAMURALI, M.; KAUSHIK, C. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers Chemistry**, v. 9, p. 1-19, 2021.
- BURZA, S.; CROFT S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet** v. 15, n. 392, p. 951-970, 2018.
- CABRAL, F. V. et al. New insights in photodynamic inactivation of *Leishmania amazonensis*: A focus on lipidomics and resistance. **PLOS ONE**, v.18, n. 9, 2023.
- CONTATO, A. G. et al. Antiproliferative Activity and Ultrastructural Changes in Promastigote and Amastigote forms of *Leishmania amazonensis* Caused by Limonene-Acylthiosemicarbazide Hybrids. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, e202300523 p. 1-10, 2023.
- CORPAS-LÓPEZ V. et al. *O*-Alkyl Hydroxamates Display Potent and Selective Antileishmanial Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 5734-5751, 2020.
- COSER, E. M. et al. Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility *in vitro* and the treatment outcome *in vivo*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 91–98, 2020.

- DA SILVA, M. S. et al. Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochim Biophys Acta Molecular Cell Research**. v.1864, n. 1, p. 138-150, 2017.
- DE MACEDO-SILVA, S. T, et al. Benzylamines as highly potent inhibitors of the sterol biosynthesis pathway in *Leishmania amazonensis* leading to oxidative stress and ultrastructural alterations. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p.11-31, 2022.
- DUQUE, M. C. DE O. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis hort Communications, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, n. 49, 2016.
- EVANS, B. C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of Visualized Experiments**, v. 73, 2013.
- FERNANDES, C. C.; CHRYSTALB P.; PEREIRA, A. C. First report on chemical composition and biological properties of volatile oil from *Psidium firmum* O. Berg leaves. **Quimica Nova**, Vol. 44, N. 5, p. 570-574, 2021.
- GABRIEL, Á.; VALÉRIO-BOLAS, A.; PALMA-MARQUES, J.; et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.
- GARCIA F. P. et. al. Eupomatenoïd-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, e940531, 2013.
- JARC, E.; PETAN, T. Lipid droplets and the management of cellular stress. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 435-452, 2019.
- KOJIMA, H. et. al. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 21, p. 3209-3212, 1999.
- KOSARI, N.; KHAMESIPOUR, F. *Dracocephalum kotschy* Boiss. *In Vitro* Efficacy on Growth and Apoptosis Induction in *Leishmania major* promastigotes. **Biomed Research International**, v. 14, 2022.
- KUMAR, V. et al. Deletion of Glutamine Synthetase Gene Disrupts the Survivability and Infectivity of *Leishmania donovani*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 26, n. 11, 2021.
- LAZARIN-BIDOIA, D. et al. Natural compounds based chemotherapeutic against Chagas disease and leishmaniasis: mitochondrion as a strategic target. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 117, e220396, 2022.
- LEE, S. et. al. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 327167, 2013.
- LEMOS, M.; SOUSA, O.; SILVA, Z. Perfil da leishmaniose visceral no brasil: uma revisão bibliográfica. **Journal Business Technology**. v. 9, n. 1, p. 93-114, 2019.

- MACHÍN, L. *Leishmania amazonensis* response to artemisinin and derivatives. **Parasitology International**, v. 80, 2021.
- MAGALHÃES, T. B. dos S.; SILVA, D. K. C.; TEIXEIRA, J. S. et al. A Betulinic Acid Derivative, BA5, Induces G0/G1 Cell Arrest, Apoptosis Like-Death, and Morphological Alterations in *Leishmania sp.* **Frontiers Pharmacology**, 2022.
- MANZANO, J. I. et al. Increased Glycolytic ATP Synthesis Is Associated with Tafenoquine Resistance in *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1045–1052, 2011.
- MARTINEZ, G. **Síntese e Potencial anti - Chagas de Chalconas O-Geraniladas**. 2022. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2022.
- MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.
- MASPI, N.; ABDOLI, A; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.
- MATHUPALA, P. S.; REMPEL, A.; PEDERSEN, P. L. Glucose Catabolism in Cancer Cells: identification and characterization of a marked activation response of the type ii hexokinase gene to hypoxic conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 43407–43412, 2001.
- MEHTA, A.; SHAHA, C. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania spp.*: role of iron, reactive oxygen species. Ca^{2+} and glutathione. **Free Radical Biology Medicine**, v. 40, p. 857–1868, 2006.
- MEIRA, C. S. et al. Betulinic Acid Derivative BA5, a Dual NF-kB/ calcineurin Inhibitor, Alleviates Experimental Shock and Delayed Hypersensitivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, p. 156–165, 2017.
- MENDES, E. A. et al. C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Chemico Biological Interactions**, v. 25, n. 256, p. 16-24, 2016.
- MENNA-BARRETO, R. F.; GONCALVES, R. L.; COSTA, E. M.; et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology Medicine**, v. 47, n. 5, p. 644-653, 2009.
- MIRANDA, N. et. al. The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 342-354, 2017.
- MOKNI M. Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]. **Annales Dermatologie et Venereologie**, v. 3, n. 146, p. 232-246, 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

OMS, **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/ending-ntds-together-towards-2030>> 2021.

OMS, **ficha técnica da Organização Mundial da Saúde sobre Leishmaniose**. <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> 2 de março de 2020.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1777, p.1249-1262, 2008.

PAULA, J. C. et. al. Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 211, n.105653, 2020.

ROMERO, A. H.; LÓPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. **Journal Molecular Graphes and Modelling**, 2017.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research Society and Development**, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021.

SCARIOT, D. B. et. al. Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 255, 2017.

SCARIOT, D. B. et. al. Activity and cell-death pathway in *Leishmania infantum* induced by sugiol: vectorization using yeast cell wall particles obtained from *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 208, 2019.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stres. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453– 462, 2014.

SCUDIERO, D. A. et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 48, n.17, p. 4827-33, 1988.

SOLANO-GÁLVEZ, S. G. et al. *Leishmania*: manipulation of signaling pathways to inhibit host cell apoptosis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**. v. 27, n.8, 2021.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 49-58, 2012.

SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** 2008.120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2008.

SOTO, J. A.; BERMAN, J. D. Miltefosine Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 5, n. 73, p. 2463-2464, 2021.

STEFANELLO, T. F. et. al. N-butyl-[1-(4-methoxy)phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.

TAKAHASHI, M., SHIBATA, M., NIKI, E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, Diphenyl-1-pyrenylphosphine. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 31, p. 164–174, 2001.

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

VIARO, R. S.; VIARO, M. S.; FLECK, J. importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Disciplinarum Scientia**, v.2, n.1, p.17-21, 2001.

VOLPATO, H. et. al. Mitochondrial dysfunction induced by N-butyl-1-(4 dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide is required for cell death of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, e0130652, 2015.

VOLPATO, H. et. al. **In vitro** anti-*Leishmania* activity of T6 synthetic compound encapsulated in yeast-derived β -(1,3)-D-glucan particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1264-1275, 2018.

WIDMER, F. et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 414-421, 2006.

XU, R. H. et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **Cancer Research**. v. 65, n. 2, p. 613-21, 2005.

ZUGMAN, T. T. B. **Dicalcogenetos diarílicos funcionalizados: avaliação do potencial antiparasitário contra *Leishmania* spp.** 2022. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2022.