



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular



RIAN RICHARD SANTOS DE FARIAS

**MORTE CELULAR MEDIADA POR DICALCOGENETOS
DIARÍLICOS FUNCIONALIZADOS EM *Leishmania (L.) infantum***

Orientador: Prof.º Dr.º Celso Vataru Nakamura

Coorientador (a): Prof.ª Dr.ª Francielle Pelegrin Garcia

MARINGÁ

2023

RIAN RICHARD SANTOS DE FARIAS

**MORTE CELULAR MEDIADA POR DICALCOGENETOS
DIARÍLICOS FUNCIONALIZADOS EM *Leishmania (L.) infantum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.º Dr.º Celso Vataru Nakamura

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

MARINGÁ

2023

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

F224m

Farias, Rian Richard Santos de

Morte celular mediada por dicalcogenetos diarílicos funcionalizados em *Leishmania (L.) infantum* / Rian Richard Santos de Farias. -- Maringá, PR, 2023.

71 f. : il. color., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Coorientadora: Profa. Dra. Francielle Pelegrin Garcia.

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

CDD 23.ed. 572.8

Síntique Raquel Eleutério - CRB 9/1641

FOLHA DE APROVAÇÃO

RIAN RICHARD SANTOS DE FARIAS

MORTE CELULAR MEDIADA POR DICALCOGENETOS DIARÍLICOS FUNCIONALIZADOS EM *Leishmania (L.) infantum*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 15 de Dezembro de 2023.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.º Dr.º Celso Vataru Nakamura

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.ª Dr.ª Elizandra Aparecida Britta

Universidade Cesumar – Campus Maringá

Prof.ª Dr.ª Danielle Lazarin Bidóia

Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Rian R. S. de Farias nasceu em Colorado, Paraná, no dia 01 de setembro de 2000. Possui graduação em Biomedicina pela Universidade UniCesumar de Maringá (2018-2021). Em 2022 ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual de Maringá e desenvolveu seu trabalho no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me guiado até aqui e por sempre se mostrar presente. Mesmo nos momentos mais obscuros... o Senhor foi a minha luz.

À minha família, em especial à minha mãe dona Rose; à minha segunda mãe, vó Terezinha (a razão por eu estar onde estou hoje); aos meus irmãos Aila, Cauã e Wallace. Pessoas mais que importantes na minha vida, que me apoiaram a todo momento. Agradeço o incentivo e toda compreensão ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof.º Dr.º Celso Vataru Nakamura, pela oportunidade e por todo o auxílio, confiança e, principalmente, paciência durante esse período. Nunca poderei expressar toda a gratidão.

Também a professora Tânia U. Nakamura, por todos os puxões de orelha, necessários para o meu aperfeiçoamento e desenvolvimento pessoal.

Agradeço imensamente a Andressa D. Valente por todo o apoio e parceria ao longo do mestrado. Pessoa maravilhosa e amiga verdadeira. Não será esquecida... nunca teria conseguido sem você!!!

Gostaria de deixar o meu 'muito obrigado' a uma pessoa que marcou a minha jornada acadêmica. Em primeiro lugar, eu nem teria entrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas se não fosse pela ajuda da Rayanne Regina Machado Beltrame. Mulher determinada, superinteligente e uma tutora sem igual. Tenho certeza de que seu futuro será brilhante.

À minha coorientadora Francielle Pelegrin Garcia, por me fornecer praticamente todo o conhecimento adquirido ao longo do mestrado e me proporcionar diversas experiências, que, provavelmente, nunca poderei retribuir de forma adequada.

À minha coorientadora não oficial Danielle Lazarin Bidóia, pelo auxílio em diversos experimentos. Uma tremenda pesquisadora, de conhecimentos indescritíveis, de técnica sofisticada e precisa. Uma mãe para os seus filhos e para os filhos que adquiriu no LITFaC.

Aos colegas de laboratório, que de maneira geral, sempre me ajudaram nos momentos que precisei. Em especial à Raíssa Zara, Bruna Terra, Amanda Hinobu, Rodolfo Balbinot e Amanda Bakoshi. Exímios pesquisadores.

Aos meus colegas de mestrado que ingressaram em 2022 e 2023, que estiveram nas mesmas aulas que eu e passaram pelos mesmos sufocos, mas nunca desistiram de fazer da pesquisa científica uma profissão digna.

Às minhas amigas Ana Paula e Rachel Cardoso, por acompanharem essa saga desde a infância e nunca perderem se quer um episódio da minha cômica série chamada vida.

Aos amigos, que indiretamente fizeram parte desse trabalho, com suas torcidas e orações.

À professora Juliana Cogo, que me instruiu durante a graduação e iniciação científica. Forneceu diversos ensinamentos, conselhos e me proporcionou conquistar uma vaga no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com destaque para a secretária Érica Nagasava, por ter suportado os meus surtos e me guiado sempre nas melhores escolhas; e ao coordenador do programa Prof.º Dr.º Marco Aurélio, por essa oportunidade, mas também a todos os professores do PBC, que contribuíram imensamente com a minha formação profissional.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir com esse trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram na construção desse texto, inclusive aos que eventualmente não foram citados.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Meus sinceros agradecimentos!

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um resumo geral, em português e inglês, e um artigo científico contemplando os principais resultados obtidos durante o mestrado. O artigo descreve a avaliação do potencial anti-*Leishmania* de duas substâncias calcogênicas sobre formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) infantum* e dá suporte para a compreensão do possível mecanismo de ação das substâncias e possível mecanismo de morte do parasito. O artigo científico será submetido na revista *Tropical Medicine and Infectious Disease* do grupo editorial *Molecular Diversity Preservation International* (MDPI).

RESUMO GERAL

As leishmanioses são Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e permanecem endêmicas em diversos países. Dentre as manifestações clínicas, a leishmaniose cutânea é a forma predominante enquanto a leishmaniose visceral se destaca como a mais grave e potencialmente letal. As substâncias calcogênicas têm ganhado destaque no campo do desenvolvimento de novos fármacos. O ditelureto **TZ3C** e o disseleneto **TZ5D** se mostraram bons agentes anti-*Leishmania*, com CI_{50} de 1,90 μM e 12,20 μM , respectivamente. As análises morfológicas e ultraestruturais evidenciaram alterações importantes, condizentes com os resultados bioquímicos para integridade de membrana e volume celular. Foram observadas anormalidades no balanço redox: acúmulo de lipídios neutros intracelulares, incremento de ERO e $\cdot\text{ON}$, além de diminuição dos níveis de tióis reduzidos. **TZ5D** foi capaz de comprometer a mitocôndria morfológica e bioquimicamente, elevando os níveis de ATP nas promastigotas, enquanto **TZ3C** reduziu significativamente a produção de energia e regulou a produção de óxido nítrico em macrófagos. Ambas as substâncias desencadearam a externalização de fosfatidilserina na membrana citoplasmática dos protozoários. Em conjunto, os resultados apontam que **TZ3C** induz a morte dos parasitos por meio da necrose mediada por depleção energética e interrupção de atividades ATP-dependentes, enquanto **TZ5D** está mais associada a morte semelhante a apoptose, provavelmente vinculada a inibição de enzimas do sistema antioxidante do parasito.

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose; anti-*Leishmania*; ditelureto; disseleneto.

GENERAL ABSTRACT

Leishmaniasis is a Neglected Tropical Disease (NTD) and remains endemic in several countries. Among the clinical manifestations, leishmaniasis remains as the predominant form, while visceral leishmaniasis stands out as the most serious and potentially lethal. Chalcogenic substances have gained prominence in the field of new drug development. The ditelluride **TZ3C** and the diselenide **TZ5D** proved to be good anti-*Leishmania* agents, with IC₅₀ of 1.90 μM and 12.20 μM, respectively. The morphological and ultrastructural analyzes showed important changes, conditioning the biochemical results for membrane integrity and cell volume. Abnormalities in the redox balance were observed: accumulation of intracellular neutral lipids, increase in ROS and ·NO, in addition to a decrease in the levels of reduced thiols. **TZ5D** was able to compromise mitochondria morphologically and biochemically, increasing ATP levels in promastigotes, while **TZ3C** significantly affects energy production and regulated nitric oxide production in macrophages. Both substances triggered the externalization of phosphatidylserine in the cytoplasmic membrane of protozoa. Taken together, the results indicate that **TZ3C** induces parasite death through necrosis mediated by energy depletion and interruption of ATP-dependent activities, while **TZ5D** is more associated with apoptosis-like death, probably linked to the inhibition of enzymes of the antioxidant system of the parasite.

KEYWORDS: leishmaniasis; anti-*Leishmania*; ditelluride; diselenide.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BTA	Benzotriazol
°C	Graus Celsius
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
DTN/NTD	Doença Tropical Negligenciada/ Neglected Tropical Disease
ERO/ROS	Espécies reativas de oxigênio/Reactive Oxygen Species
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
H ₂ DCFDA	2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP/PI	Iodeto de propídio/Propidium Iodide
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MTF	Miltefosina
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
$\cdot\text{ON}/\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico/Nitric Oxide
OsO_4	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
Rh123	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute, 1640
s	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
U.A.	Unidades arbitrárias
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1. Reagentes.....	19
2.2. Substâncias.....	19
2.3. Cultura de células aderentes.....	20
2.4. Manutenção das formas promastigota.....	20
2.5. Efeito antiproliferativo sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	21
2.6. Efeito antiproliferativo sobre formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	21
2.7. Efeito citotóxico sobre células de mamífero.....	22
2.8. Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> por microscopia eletrônica.....	22
2.9. Avaliação do volume celular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	23
2.10. Avaliação da integridade de membrana celular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	23
2.11. Avaliação de corpos lipídicos em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	24
2.12. Avaliação de vacúolos ácidos em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	24
2.13. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	24
2.14. Avaliação da produção de óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$) intracelular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	25
2.15. Avaliação da peroxidação lipídica em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	25
2.16. Avaliação de tióis reduzidos em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> e macrófagos.....	26
2.17. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	26
2.18. Avaliação de ATP intracelular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	27
2.19. Avaliação do ciclo celular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	27
2.20. Detecção da exposição de fosfatidilserina em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	27
2.21. Análise estatística.....	28

3. RESULTADOS.....	29
3.1. Perfil da atividade biológica das substâncias TZ3C e TZ5D	29
3.2. Alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas por dicalcogenetos em formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	30
3.3. Volume celular de promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	33
3.4. Permeabilidade de membrana plasmática de promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	34
3.5. Perfil de corpos lipídicos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	35
3.6. Vacúolos ácidos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	36
3.7. Espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	37
3.8. Óxido nítrico (NO) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	38
3.9. Peroxidação lipídica em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	39
3.10. Níveis de tióis reduzidos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	40
3.11. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	41
3.12. Níveis de ATP intracelular em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	42
3.13. Óxido nítrico e tióis reduzidos em macrófagos tratados com dicalcogenetos.....	43
3.14. Ciclo celular em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	45
3.15. Exposição de fosfatidilserina em promastigotas tratadas com dicalcogenetos.....	46
4. DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças complexas e negligenciadas, causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* spp. (Cecílio *et al.*, 2022). As formas clínicas da patologia incluem manifestações cutâneas ou mucocutâneas (leishmaniose tegumentar, LT) e viscerais (leishmaniose visceral, LV) e dependem, em grande parte, da espécie de leishmania envolvida (Chácon *et al.*, 2022). O parasito é inoculado no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo através de vetores flebotomíneos, em especial, os gêneros *Lutzomyia* spp. e *Phlebotomus* spp. (Reimann *et al.*, 2022; Cecílio *et al.*, 2022). A forma evolutiva responsável por infectar mamíferos é a promastigota, célula alongada e com flagelo externalizado na porção anterior; enquanto a forma amastigota é capaz de resistir no interior de vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico mononuclear, célula ovalar e com flagelo internalizado. Outros flebotomíneos podem ser contaminados com o parasito ao realizar hematofagia em hospedeiros infectados pelo protozoário iniciando novo ciclo (Maciel, 2021).

A LV é uma das manifestações da doença com maior potencial de letalidade (Oliveira *et al.*, 2010; Dos Santos Júnior *et al.*, 2023) e, ainda assim, permanece endêmica em diversos países, principalmente de regiões tropicais e subtropicais (Marcondes *et al.*, 2013; Curtin *et al.*, 2021). No Brasil, os casos confirmados de LV tiveram diminuição substancial de 4.858 casos no ano de 2000 para 1.684 em 2022, redução em cerca de 65,3% na incidência anual. Em contrapartida, a letalidade aumentou gradativamente, passando de 3,1% para 7,1% nos anos 2000 e 2012, respectivamente (MS, 2022), e permanece constante desde então com uma média de 8,2% nos últimos cinco anos. No novo mundo, o agente etiológico da doença é o protozoário *Leishmania infantum* (syn *chagasi*) (Marcondes *et al.*, 2013), enquanto no velho mundo a doença é causada principalmente pela espécie *L. donovani* (Ghatee *et al.*, 2020). Apesar da *L. infantum* apresentar variantes dermatrópicas (Gradoni *et al.*, 1994), essa espécie expressa majoritariamente viscerotropismo. Após circular no organismo dentro de células do sistema imune, os parasitos migram para órgãos linfoides como timo, baço, linfonodos e medula óssea, além de se instalarem no fígado (Ghosh *et al.*, 2023). Esse tropismo expressa efeitos clínicos importantes em pacientes com a doença ativa, como esplenomegalia e hepatomegalia (Pastorino *et al.*, 2002; Varma *et al.* 2010; Maeda *et al.*, 2021).

Fato importante é que a maioria dos indivíduos que eventualmente se infectam com o parasito não desenvolvem nenhum sintoma durante toda a vida. Assim, o termo leishmaniose se refere a condição de se tornar doente devido a infecção por *Leishmania* spp., não apenas por estar infectado pelo protozoário. Neste contexto, em 2018, 92 e 83 países foram considerados

endêmicos por reportarem casos de LT e LV, respectivamente (WHO, 2022). Em 2020, uma estimativa da *World Health Organization* (WHO) previu um perfil de 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos para LT em ocorrência anual. Mais recentemente, em novembro de 2022, a *Weekly Epidemiological Record* publicou os resultados da vigilância de leishmaniose global pós-impacto da COVID-19, pandemia viral que emergiu no final de 2019, na cidade de Wuhan na China, e gerou interrupção substancial dos sistemas de saúde através do globo (WHO, 2021). Em função deste episódio, os dados epidemiológicos obtidos durante este período (11.743 novos casos de LV e 221.953 novos casos de LT) podem não refletir a situação atual, uma vez que houve inibição nos serviços de vigilância para as doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2022).

De forma geral, o combate as leishmanioses se baseia em controle do vetor (Kishore *et al.*, 2006), promoção de informação sobre a doença pelos sistemas de saúde pública (Kusomani *et al.*, 2022) e, em especial, terapias medicamentosas (Bahmani *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2020), uma vez que não existe vacina comprovadamente efetiva contra os patógenos causadores da doença, apesar de diversos pesquisadores estarem em diferentes estágios da pesquisa científica com potenciais imunógenos (Lajevardi *et al.*, 2022; Ottino *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2022).

Em relação aos medicamentos disponíveis no mercado atual dá-se destaque aos antimoniais pentavalentes (SbV), classe representada por dois fármacos principais: estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, comercialmente vendidos como Pentostam[®] e Glucantime[®]. Estas formulações foram consideradas, desde 1940, os fármacos de primeira escolha no tratamento de praticamente todas as manifestações clínicas da leishmaniose (Mishra *et al.*, 2007; CDC, 2022). Em contrapartida, com a evolução dos estudos na área quimioterápica e o acompanhamento dos casos de leishmaniose, notou-se um perfil de susceptibilidade diferente entre as diversas manifestações da doença, bem como entre as espécies de parasitos envolvidos na infecção e, em menor grau, na distribuição geográfica dos casos reportados (Copeland e Aronson *et al.*, 2015). Estes fatores culminaram na indução de uma perspectiva holística a respeito da linha de tratamento a ser tomada. A partir das últimas décadas, estudiosos propuseram uma série de *guidelines*, constantemente atualizadas, visando o melhor manejo do paciente com a doença (Lazari, 2007; UFSC, 2017). Atualmente, a abordagem terapêutica é individualizada, *i.e.*, os profissionais da saúde se baseiam em diversos fatores para a seleção do melhor tratamento: espécie/cepa da leishmania; área geográfica onde a infecção foi adquirida; história natural da infecção; risco de disseminação para mucosas;

susceptibilidade ao fármaco; número, tamanho, localização, evolução e outras características clínicas das lesões do paciente (Aronson *et al.*, 2019; CDC, 2022).

Embora o cenário supracitado pareça agradável, as leishmanioses permanecem endêmicas em diversos países e são negligenciadas pelas grandes indústrias farmacêuticas (Alvar, 2006). Dito isto, pesquisadores têm se esforçado no desenvolvimento de fármacos capazes de interagir de maneira eficiente com as formas promastigotas e amastigotas do parasito e provocar sua eliminação, uma vez que os medicamentos disponíveis atualmente apresentam falhas terapêuticas recorrentes, pouca seletividade e, o excesso de efeitos adversos junto a via endovenosa de aplicação, colaboram com a desistência ou mesmo baixa adesão ao tratamento por parte da população (Sasidharan e Saudagar, 2021). Esta perspectiva justifica a busca por novos fármacos, com efetiva ação contra o estágio promastigota do parasito, mas principalmente, com ação sobre a forma intracelular, visto que o estágio evolutivo amastigota é a forma exclusiva nos tecidos dos pacientes com a doença, em especial nas manifestações viscerais. Não somente ação, mas também a seletividade é um fator crucial na quimioterapia anti-*Leishmania*, uma vez que o direcionamento da terapêutica para a forma intracelular do parasito gera menos efeitos indesejados no paciente em tratamento ao reduzir a dose efetiva do fármaco capaz de gerar a remissão da doença.

Atualmente, miltefosina (MTF) é o único fármaco de administração oral aprovado na Alemanha (Monge-Maillo *et al.*, 2015), na Índia, no Nepal (Sunyoto *et al.*, 2018) e alguns outros países (Monge-Maillo *et al.*, 2015), para o tratamento da leishmaniose, em especial para as manifestações viscerais (Sindermann *et al.*, 2006). No Brasil, o medicamento foi recentemente aprovado para o tratamento da LT através da portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018, sendo efetivamente liberada para utilização a partir de 2020. O ativo do medicamento é classificado como uma alquilofosfocolina, e seu mecanismo de ação, ainda que não totalmente elucidado, está associado a inibição da biossíntese de fosfolipídeos e esteróis de membrana, o que interfere nas vias de sinalização e permeabilidade celular, causando a morte dos protozoários por mecanismos de apoptose (MS, 2020). Assim como outros medicamentos usados no tratamento da leishmaniose, *e.g.*, Anfotericina B e Paromomicina, MTF apresenta problemas relacionados a toxicidade (Walcochnik *et al.*, 2009; Matoba *et al.*, 2021), resistência (Seifert *et al.*, 2003; Cojean *et al.*, 2012) e restrições (Melcon-Fernandez *et al.*, 2023), especialmente às gestantes, devido problemas de teratogenicidade.

Compostos que apresentam os elementos do grupo 16 da tabela periódica (calcogênios), em especial os elementos selênio e telúrio (Wiberg e Wiberg, 2001), têm ganhado destaque no campo de desenvolvimento de novos fármacos (Sekhon, 2013; Bandeira *et al.*, 2019;

Henriquez-Figueroe *et al.*, 2023). O telúrio, um semimetal, foi descoberto em 1783 (Reichenstein, 1783) e, desde então, estudiosos investigam sua interação com os sistemas biológicos, explorando especialmente sua capacidade antimicrobiana (Sekhon, 2013). Diversas moléculas orgânicas e inorgânicas já foram sintetizadas utilizando esse elemento em suas estruturas (Henriquez-Figueroe *et al.*, 2023), compostos estes que exibiram ampla atividade biológica (Sredni, 2012; Halperin-Sheinfeld *et al.*, 2012; Baquedano *et al.*, 2016), em especial, relacionada ao sistema antioxidante (Vishwakerma *et al.*, 2018), alguns pesquisadores já descreveram a influência de compostos telúricos no metabolismo redox, revelando uma possível inibição de enzimas cisteíno proteases em tripanossomatídeos (Albeck *et al.*, 1998). O selênio, um ametal, foi descoberto em 1817 (Berzelius, 1817) e apesar de ser amplamente utilizado na área de engenharia e tecnologia (Rashad *et al.*, 2020; Garza-García *et al.*, 2021; Xin *et al.*, 2021), exibe diversas interações biológicas (Bleys *et al.*, 2007; Hatfield *et al.*, 2011; Iwaoka *et al.*, 2013; Hamdan *et al.*, 2022). Compostos a base de selênio, como os disselenetos, demonstram ampla atividade tripanocida (Chao *et al.*, 2017; Martín-Escolano *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021). Apesar da maioria desses compostos calcogênicos terem sido avaliados apenas *in vitro* e a aprovação de novas substâncias ser um processo longo, resultados biológicos de substâncias contendo os elementos selênio e telúrio se mostraram promissores e alguns autores os sugerem como ponto de partida (Henriquez-Figueroe *et al.*, 2023).

Existem diversas estruturas e moléculas na célula do protozoário que podem atuar como alvo de interesse para o desenvolvimento de terapias medicamentosas. Algumas quimioterapias se baseiam em inibição enzimática afim de interromper certas vias bioquímicas (Cestari *et al.*, 2016), outras interferem com o metabolismo do parasito através do bloqueio de proteínas como canais iônicos ou transportadores de membrana (Kashif *et al.*, 2017), alguns ativos inibem a biossíntese dos esteróis (Chao *et al.*, 2017), outros afetam proteínas envolvidas na invasão celular e defesa contra a resposta imune (Bermudez *et al.*, 2016) e, finalmente, um dos principais alvos de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos contra tripanossomatídeos é a mitocôndria, através da interferência no potencial elétrico de membrana mitocondrial (Britta, *et al.*, 2015), o qual pode desencadear diversas vias metabólicas levando ao estresse oxidativo ou também a morte celular programada (Kathuria *et al.*, 2014).

Todos os organismos estão constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio (ERO), portanto, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos bioquímicos capazes de contrabalancear esses agentes. Apesar dos tripanossomatídeos não possuírem catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e tioredoxina reductase, apresentam um mecanismo de defesa singular, baseado em tripanotiona ditiol de baixo peso molecular [T(SH)₂], com

atividade semelhante ao sistema antioxidante de mamíferos. Esta peculiaridade que distingue os tripanossomatídeos das células de mamíferos pode ser um potencial aliado à quimioterapia anti-*Leishmania* (Santi e Murta, 2022).

Numa visão geral, o objetivo deste trabalho é descrever a atividade biológica de substâncias calcogênicas em *Leishmania (Leishmania) infantum* e elucidar o mecanismo de ação e morte celular sobre as formas promastigota do parasito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Ácido fólico, carbonil cianeto 3- 3-clorofenilhidrazona (CCCP), cianeto de potássio (KCN), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), hemina, MTF, rodamina 123 (Rh123) e 9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona (vermelho do Nilo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anexina V-FITC, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) e iodeto de propídio (IP) foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (NY, EUA). Acetato de uranila, cacodilato de sódio, citrato de chumbo, ferrocianeto de potássio, glutaraldeído, resina Polybed[®] 812 e tetróxido de ósmio foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (EMS - Hatfield, EUA). Kit de viabilidade celular luminescente CellTiter-GLO foi obtido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Substâncias

As substâncias 2-metil-2-(4-{[4-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]ditelânio}fenil)-1,3-dioxolano (**TZ3C**) (Fig. 1-a) e N-{1-[4-({4-[(hidroximino)metil]fenil]disselânio)fenil]etilideno}hidroxilamina (**TZ5D**) (Fig. 1-b) foram sintetizadas por Tay Zugman, integrante do grupo de pesquisa do Prof.º Dr.º Leandro Piovan, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Soluções estoque

serão preparadas de forma asséptica em DMSO, armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e diluídas em meio de cultura de forma que a concentração do solvente não exceda 1% nos experimentos.

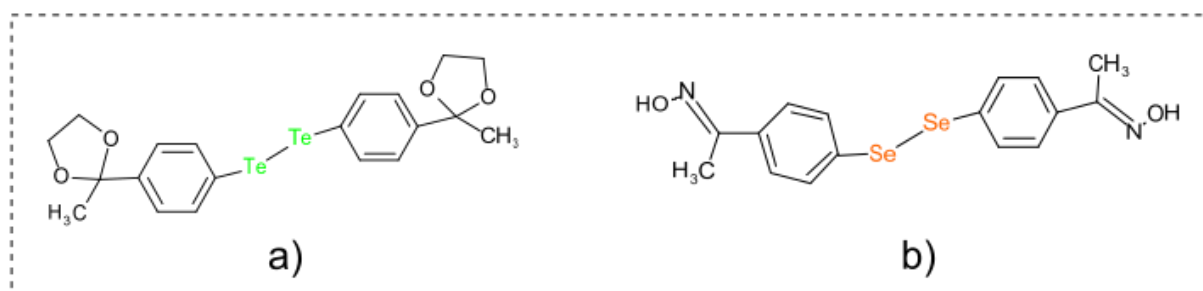


Figura 1. Substâncias dicalcogênicas diarílicas funcionalizadas. (a) Ditelureto **TZ3C**, apresenta átomos de telúrio (Te, em verde) no centro da molécula. (b) Disseleneto **TZ5D** apresenta Selênio (Se, em laranja) como átomos centrais.

2.3. Cultura de células aderentes

Macrófagos da linhagem J774A.1 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,4, 5000 U.mL^{-1} de penicilina e 5 mg.mL^{-1} de estreptomicina a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa com tensão de 5% de CO_2 . A observação da cultura celular foi realizada diariamente em microscópio invertido e o meio foi trocado quando observado pH ácido. A fim de promover a manutenção das células em uma linhagem contínua, após formação de uma monocamada confluenta (em média, superior a 80% de confluência), as células aderidas foram liberadas com auxílio de “*cell scraper*”, ressuspensas em meio RPMI-1640 e 10% SFB.

2.4. Manutenção das formas promastigotas

Formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (MCAN/BR/97/P142) foram mantidas em garrafas estéreis descartáveis para cultura celular de 25 cm^2 em meio Warren (infusão de cérebro e coração ‘Difco’ acrescido de Hemina e ácido fólico, 50 mg.mL^{-1}) pH 7,2 e esterilizado por autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. As culturas foram suplementadas com 10% de SFB, mantidas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os protozoários foram submetidos a passagens semanais.

2.5. Efeito antiproliferativo sobre formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

O ensaio é baseado na clivagem do sal de tetrazólio XTT por desidrogenases mitocondriais de células viáveis na presença de um reagente de acoplamento de elétrons, o que produz um sal de formazan solúvel e colorido (Fernandes *et al.*, 2021). Para isso, um inóculo de densidade 10^6 promastigotas de *L. (L.) infantum* na fase logarítmica de crescimento foi cultivado em microplaca de cultura de 96 cavidades estéril a 25 °C em meio Warren suplementado com 10 % de SFB. Os parasitos foram então incubados na presença de diferentes concentrações das substâncias (0,78-100 μM). Após 72 h de incubação a atividade anti-*Leishmania* foi determinada através da cor produzida pela metabolização do sal, a qual foi quantificada em leitor de microplacas por espectrofotometria (leitor de ELISA Power Wave XS) no comprimento de onda de 450 nm. A porcentagem de inibição do crescimento foi plotada em função da concentração das substâncias a fim de determinar a concentração inibitória para 50% dos parasitos (CI_{50}). MTF foi utilizada como substância de referência.

2.6. Efeito antiproliferativo sobre formas amastigotas de *L. (L.) infantum*

Para avaliação da atividade antiproliferativa sobre formas amastigotas seguiu-se as recomendações de Martinez-Sotillo *et al.* (2019). Assim, para a infecção das células um inóculo de promastigotas metacíclicas (densidade 5×10^6 cél.mL⁻¹) e um inóculo de macrófagos J774A.1 (densidade 5×10^5 cél.mL⁻¹), na proporção 10 parasitos por célula, foram dispensados sobre lamínulas de vidro redondas organizadas individualmente nas cavidades de placas de cultura (24 cavidades) na presença de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 h a 34 °C em estufa com 5% de CO₂. Após a interação entre os parasitos e os macrófagos, as substâncias **TZ3C** e **TZ5D** foram adicionadas aos microcultivos em concentrações crescentes (0,001-10 μM) e então incubadas nas mesmas condições por mais 48 h. Depois do período de tratamento, as lamínulas foram fixadas em metanol, coradas com uma proporção 1:10 de Giemsa/água destilada e montadas sobre lâmina de vidro com PermOUNT[®]. A visualização de 100 células foi realizada por microscopia óptica (objetiva 100x) e o índice de sobrevivência foi estabelecido multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófagos totais (Machado *et al.*, 2021). O valor de CI_{50} foi determinado por análise de regressão não linear simples.

2.7. Efeito citotóxico sobre células de mamífero

O ensaio é baseado na metabolização do sal de tetrazólio MTT pelas enzimas succinato desidrogenases nas mitocôndrias de células íntegras, com produção de cristais insolúveis de formazan. Desta forma, seguindo as recomendações de Kosari *et al.* (2022), suspensões de macrófagos da linhagem J774A.1 (densidade 5×10^5 cél.mL⁻¹) e células HepG2 (Oliveira *et al.*, 2018) em meio RPMI-1640 e DMEM, respectivamente, ambos suplementados com 10% de SFB, foram dispensadas em placas estéreis de 96 cavidades e incubadas por 24 h a 37 °C e tensão de 5% de CO₂ (Andrade, 2018). Após esse período, o sobrenadante foi retirado, as substâncias **TZ3C** e **TZ5D** foram adicionadas em concentrações crescentes (0,78-100 µM) e as células foram incubadas por mais 48 h nas mesmas condições anteriores. Dado o período de incubação, as células foram lavadas com tampão salina-fosfato (PBS) 0,01 M, foram adicionados 50 µL de MTT (2 mg.mL⁻¹) seguido de incubação por 4 h a 37 °C ao abrigo da luz. Após esse período, foram adicionados 150 µL de DMSO para solubilização dos cristais. A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) a 570 nm (Meinel, 2020). O valor de CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) foi calculado por regressão não linear simples.

2.8. Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* por microscopia eletrônica

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI₅₀ e 2xCI₅₀ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** e incubadas por 72 h a 25 °C. Após o período de incubação, os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Dörr, 1997; Pessoa, 2021). Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitos foram aderidos à lamínula de vidro com auxílio de poli-L-lisina e lavados três vezes com PBS. Os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (30-100%), submetidos ao ponto crítico, metalizados com ouro e, em seguida, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250. Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos foram pós-fixados em solução de 1% de OsO₄, 0,8% de K₄[Fe(CN)₆] e 10 mM CaCl₂ em 0,1 M de tampão cacodilato (Dörr, 1997). Após, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30-100%), incluídos em resina epóxi (Polybed[®]812) e polimerizados em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos por ultramicrotomia e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e

observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (Japão). Como substância de referência foi utilizado MTF 36,29 μM .

2.9. Avaliação do volume celular em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h. Seguindo as recomendações de Alonso *et al.* (2021), as células foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 0,5 mL do mesmo tampão. Em seguida, o volume celular foi analisado por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Gráficos da densidade (FSC-H) versus a dispersão (*Counts*) representam a aquisição de 30.000 eventos. Histogramas e análises foram realizados usando o *software* CellQuest. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e actinomicina D 20 μM como controle positivo para redução do volume celular.

2.10. Avaliação da integridade de membrana celular em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentração referentes ao CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e incubadas com 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IP por 10 min em temperatura ambiente (Andrade, 2018). Células com membrana íntegra captam pouco IP, assim apresentam baixa fluorescência, no entanto, células cuja membrana esteja alterada permitem entrada de IP, que se intercala ao DNA, o qual emite alta fluorescência quando excitado. A aquisição dos dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação com IP em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. Alterações na fluorescência do IP foram quantificadas como percentual de células alteradas para membrana plasmática. Como controle positivo foi utilizado digitonina 40 μM .

2.11. Avaliação de corpos lipídicos em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e 72 h e incubadas com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vermelho do Nilo, marcador que tem afinidade por gordura neutra, por 30 min a 25°C (Machado *et al.*, 2021). A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA), nos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e emissão (λ_{em}) de 485 e 535 nm, respectivamente. MTF $36,29 \mu\text{M}$ foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.12. Avaliação de vacúolos ácidos em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e incubadas com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de laranja de acridina por 15 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação os parasitos foram lavados em PBS. Laranja de acridina é um marcador permeável a membrana que apresenta fluorescência verde. Sua característica de base fraca permite que, quando em meios ácidos, receba um próton e forme um dímero, se tornando não permeável às membranas e apresentando fluorescência vermelha. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps, Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito (Alonso *et al.*, 2021). O nível de fluorescência foi determinado nos comprimentos de $488 \lambda_{\text{ex}}$ e $530 \lambda_{\text{em}}$ (Lazarin-Bidóia, 2015; Meinel, 2020), respectivamente. MTF $36,29 \mu\text{M}$ foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.13. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e 72 h e incubadas com $10 \mu\text{M}$ de H_2DCFDA por 45 min, sob proteção da luz (Alonso *et al.*, 2021). O marcador H_2DCFDA é uma molécula não fluorescente permeável a célula, que sofre desesterificação pelas esterases intracelulares na presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, após a oxidação, é

convertido em diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente (Machado *et al.*, 2021). O nível de fluorescência foi determinado nos comprimentos de onda de 488 λ_{ex} e 530 λ_{em} (Lazarin-Bidóia, 2015; Meinel, 2020) em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA). MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.14. Avaliação da produção de óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$) intracelular em promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos J774A.1 foram tratados com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D**, enquanto os macrófagos J774A.1 foram expostos apenas ao CI_{50} , por 24 h e então incubados no escuro com 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) 1 μM por 30 min a 37 °C. Após, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e incubadas por mais 15 min. DAF-FM diacetato é um marcador não fluorescente permeável à membrana plasmática (Lazarin-Bidóia, 2015). Uma vez dentro das células, pode reagir com o óxido nítrico para formar um benzotriazol (BTA) fluorescente (Chein *et al.*, 2023). O nível de fluorescência foi determinado nos comprimentos de onda de 495 λ_{ex} e 515 λ_{em} em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA). MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.15. Avaliação da peroxidação lipídica em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e 72 h e então incubadas com 50 μM de DPPP durante 15 min a temperatura ambiente (Alonso *et al.*, 2021). DPPP é uma molécula não fluorescente até ser oxidada por hidroperóxidos a um óxido de fosfina (DPPP-O) que se torna fluorescente (Lazarin-Bidóia, 2015). O nível de fluorescência foi determinado nos comprimentos de onda de 355 λ_{ex} e 460 λ_{em} em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA). MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.16. Avaliação de tióis reduzidos em promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos J774A.1 foram tratados com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em tampão Tris-HCl pH 7,5 e então sonicadas em gelo por 5 s em intervalos de 2 s (tempo total de sonicação de 1 min) e intensidade de 40% (Lazarin-Bidóia, 2015). Os macrófagos foram processados da mesma maneira, porém em solução contendo Triton X-100 (Rosenblat *et al.*, 2016). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min para remover os debris celulares, 100 μ L do sobrenadante e de PBS foram então transferidos para placas de 96 cavidades e incubados com 1 mM de DTNB por 15 min a temperatura ambiente. DTNB, ao entrar em contato com tióis reduzidos, forma um cromógeno de cor amarela (Turcano *et al.*, 2018) que pode ser detectado espectrofotometricamente. A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) a 412 nm. MTF 36,29 μ M foi utilizada como parâmetro de referência nos ensaios com promastigotas e como controle positivo foi utilizado H_2O_2 1 mM.

2.17. Avaliação do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentração referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h e incubadas com 5 μ g.mL⁻¹ de Rh123 por 15 min a 37 °C (Lazarin-Bidóia, 2015; Andrade, 2018). Rh123 é um marcador específico da mitocôndria e depende da sua polarização, desse modo, células com potencial de membrana mitocondrial inalterado acumulam Rh123 e apresentam alta fluorescência, enquanto mitocôndrias com alterações no $\Delta\Psi_m$ levam ao efluxo mitocondrial de Rh123, apresentado baixa fluorescência (Alonso *et al.*, 2021). Deste modo, após o período de incubação inicial com Rh123, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS para análise em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps, Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. MTF 36,29 μ M foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado CCCP 100 μ M.

2.18. Avaliação de ATP intracelular em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h, lavados e ressuspensas em PBS, e os níveis de ATP foram analisados seguindo o protocolo do Kit CellTiter-GLO® (Bidóia, 2015). Esse kit baseia-se na reação catalisada pela enzima luciferase (luciferina/oxiluciferina) para quantificação de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (López-Arencibia *et al.*, 2021). A luminescência foi determinada utilizando leitor de microplacas (Victor X3; PerkinElmer, EUA). MTF 36,29 μ M foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado KCN 500 μ M.

2.19. Avaliação do ciclo celular em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h, fixadas em metanol-PBS 70% a 4 °C por 72 h. Após esse período, os parasitos foram lavados em PBS e incubados com 10 μ g.mL⁻¹ de IP-RNAase, seguido de incubação a 37 °C por 45 min (Alonso *et al.*, 2021; Lazarin-Bidóia, 2015). A aquisição dos dados e análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. A porcentagem de células em cada estágio do ciclo celular foi determinada de acordo com a fluorescência de IP, que é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA. MTF 36,29 μ M foi utilizada como parâmetro de referência e como controle positivo foi utilizado taxol 10 μ M.

2.20. Detecção da exposição de fosfatidilserina em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com as concentrações referentes ao CI_{50} e $2xCI_{50}$ das substâncias **TZ3C** e **TZ5D** por 24 h, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em tampão de ligação (124 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES-Na, pH 7,4), marcadas com anexina V-FITC e incubadas por 15 min em temperatura ambiente (Dos Santos *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2022). Em seguida, foi adicionado 2 μ g.mL⁻¹ de IP para marcação, a aquisição dos dados e as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com *software* CellQuest

(Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. Células marcadas apenas com anexina-V foram consideradas apoptóticas, células somente positivas para IP, foram consideradas necróticas e células com dupla marcação foram consideradas em apoptose tardia, enquanto células não marcadas foram consideradas vivas. Como controle positivo foi utilizado MTF 36,29 μM .

2.21. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As análises estatísticas realizadas através do *software* Prisma 9 (GraphPad Prism 9, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil da atividade biológica das substâncias TZ3C e TZ5D

Tabelas 1, 2 e figura 2 apresentam os dados referentes a atividade das substâncias dicalcogênicas sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, respectivamente, e sua citotoxicidade em macrófagos J774A.1. **TZ3C** exibiu uma atividade ($CI_{50} = 1,90 \pm 0,51 \mu\text{M}$) 6,42 vezes maior na forma promastigota do parasito quando comparado ao dicalcogeneto **TZ5D** ($12,20 \pm 1,36 \mu\text{M}$), o que reflete, por consequência, uma seletividade igualmente maior sobre o parasito em relação à macrófagos ($IS_{TZ3C} = 3,95$; $IS_{TZ5D} = 1,92$). Da mesma maneira, a inibição do crescimento das formas intracelulares do protozoário pela substância **TZ3C** foi notavelmente superior ($0,45 \pm 0,11 \mu\text{M}$) em comparação à **TZ5D** ($4,83 \pm 0,44 \mu\text{M}$). Curiosamente, quando se observa os dados percentuais, nota-se que **TZ3C** tem cerca de 24% maior atividade sobre as formas amastigotas em relação às promastigotas, enquanto **TZ5D** apresenta cerca de 40%. Todavia, a seletividade nas formas intracelulares ($IS_{TZ3C} = 16,69$; $IS_{TZ5D} = 4,85$) confirmam o melhor perfil anti-*Leishmania* da substância **TZ3C**, cerca de 6,05 vezes mais seletiva em amastigotas que **TZ5D**.

Tabela 1. Seletividade de dicalcogenetos em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

Substância	CI_{50} promastigota de <i>L. (L.) infantum</i> (μM)	CC_{50} J774A.1 (μM)	IS^* (CC_{50}/CI_{50})
TZ3C	$1,90 \pm 0,51$	$7,52 \pm 1,52$	3,95
TZ5D	$12,20 \pm 1,36$	$23,43 \pm 3,28$	1,92
MTF†	$36,29 \pm 2,56$	$18,99 \pm 0,47$	0,52

† Substância de referência. * IS , Índice de seletividade em relação a J774A.1. NA , não aplicável; **J774A.1**, macrófago de rato (ATCC/TIB-67); CI_{50} , concentração inibitória de 50%; CC_{50} , concentração citotóxica de 50%.

Tabela 2. Seletividade de dicalcogenetos em amastigotas de *L. (L.) infantum*

Substância	CI_{50} amastigota de <i>L. (L.) infantum</i> (μM)	CC_{50} J774A.1 (μM)	IS (CC_{50}/CI_{50})
TZ3C	$0,45 \pm 0,11$	$7,51 \pm 1,24$	16,69
TZ5D	$4,83 \pm 0,44$	$13,33 \pm 3,28$	2,76

J774A.1, macrófago de rato (ATCC/TIB-67); CI_{50} , concentração inibitória de 50%; CC_{50} , concentração citotóxica de 50%; IS , Índice de seletividade.

3.2. Alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas por dicalcogenetos em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

De maneira geral, as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* apresentam uma morfologia padrão. A figura 3-A demonstra o formato alongado dessas células, corpo delgado e levemente afunilado, com membrana lisa e flagelo filiforme longo.

Promastigotas tratadas com **TZ3C** (Fig. 3, C e D) expressaram alterações na membrana citoplasmática de forma dose-dependente. Na concentração de 1,90 μM de **TZ3C**, é possível observar uma influência da substância, a qual se torna evidente nos parasitos tratados com o dobro da concentração (3,80 μM). A principal característica observada é o aspecto ovalado de parte das células (Fig. 3-C), inobstante, os parasitos tiveram uma redução substancial do volume celular como pode ser observado na figura 3-D.

A substância **TZ5D** exibiu alterações (Fig. 3, E e F) importantes em células tratadas com 12,20 μM e 24,40 μM de **TZ5D**. Nota-se a perda do afunilamento característico das promastigotas, o que leva as células a adquirirem um formato oval. Efeitos da substância no parasito também puderam ser verificados nos flagelos, a figura 3-E revela a presença de promastigotas biflagelares. Regiões em destaque da figura 3 (C-F) apontam células que apresentam solução de continuidade na membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático.

A figura 3-B corresponde às células tratadas com MTF 36,29 μM . É possível notar a perda de flagelo em alguns parasitos e arredondamento do corpo celular.

Existem caracteres intracelulares que descrevem, de forma geral, a ultraestrutura dos tripanossomatídeos. A figura 4-A é a micrografia eletrônica da forma promastigota de *L. (L.) infantum*, célula com membrana plasmática e sistema de endomembras íntegro; as organelas se localizam em posições convencionais e não apresentam anomalias; o núcleo e envelope nuclear estão preservados, e nota-se um caráter heterogêneo da eletrodensidade intranuclear característico do perfil de distribuição da eucromatina e heterocromatina; a mitocôndria única e alongada do parasito se distribui ao longo de todo o citoplasma e é observável a região dilatada dessa organela com uma densa zona eletrônica retilínea correspondente ao cinetoplasto (estrutura característica de organismos da classe Kinetoplastida); a bolsa flagelar e o flagelo também estão preservados.

De forma similar às anomalias morfológicas, promastigotas tratadas com **TZ3C** (Fig. 4, C e D) demonstraram alterações ultraestruturais dose-dependente. Na concentração de 1,90 μM de **TZ3C**, houve o surgimento de inclusões intracitoplasmáticas, as quais foram verificadas em

maior quantidade nos parasitos tratados com $3,80 \mu\text{M}$ da mesma substância. Dois tipos de inclusões podem ser identificadas, as gotas de gordura que apresentam superfície regular e não são envolvidas por membrana aparente; e precipitados ovulares dismórficos, os quais apresentam um vacúolo delimitando uma região de eletrodensidade oval de superfície não-regular excêntrica. O núcleo das células tratadas com **TZ3C** perdeu o perfil normal de distribuição da cromatina, como pode ser observado na figura 4-C, onde há deslocamento da eletrodensidade no interior do núcleo para a periferia do envelope nuclear. A mitocôndria das células sob tratamento se apresentou notadamente dilatada. Não foram observadas alterações expressivas no anexo flagelar das células tratadas com **TZ3C**.

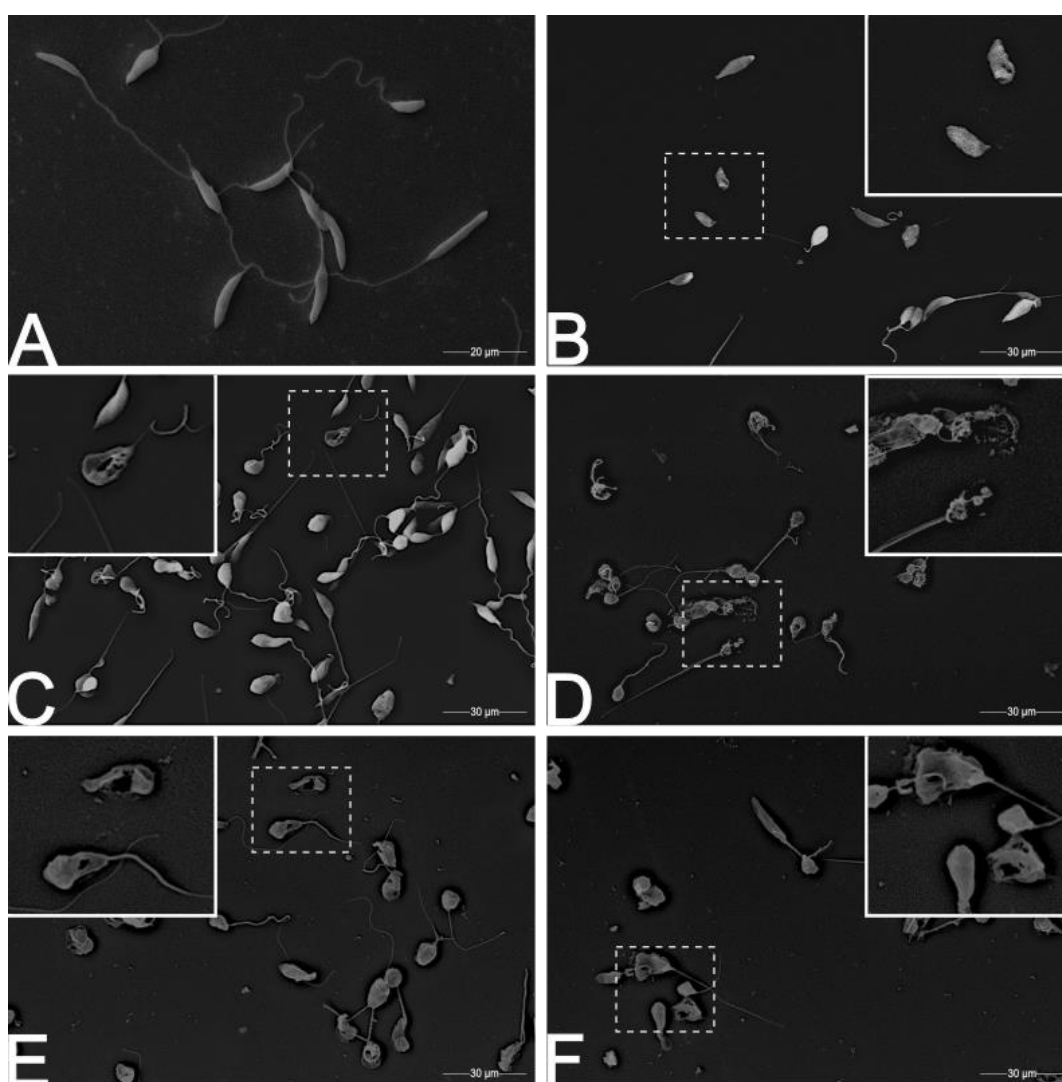


Figura 3. Alterações morfológicas em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 72 h. (A) Promastigotas sem tratamento. (B) Células tratadas com MTF $36,29 \mu\text{M}$. (C, D) Promastigotas tratadas com $1,90 \mu\text{M}$ e $3,80 \mu\text{M}$ de **TZ3C**, respectivamente. (E, F) Promastigotas tratadas com $12,20 \mu\text{M}$ e $24,40 \mu\text{M}$ de **TZ5D**, respectivamente. MTF foi utilizada como parâmetro de referência. (B-F) Quadrado segmentado demonstra a área em destaque.

As modificações observadas na ultraestrutura de protozoários tratados com a substância **TZ5D** (Fig. 4, E e F) foram drásticas e seguiram o mesmo perfil em ambas as concentrações utilizadas. Foram verificadas inclusões intracitoplasmáticas similares às encontradas nos protozoários tratados com **TZ3C**, além de outras alterações como o alargamento da mitocôndria e desorganização do flagelo. Curiosamente, ao redor dos parasitos, houve o aparecimento de corpos extracitoplasmáticos de aspecto vesicular com ausência de estruturas reconhecíveis no interior. Regiões em destaque da figura 4 (C-F) evidenciam as inclusões intracitoplasmáticas eletrodensas. A figura 4-B revela protusões da membrana plasmática de células tratadas com MTF 36,29 μM .

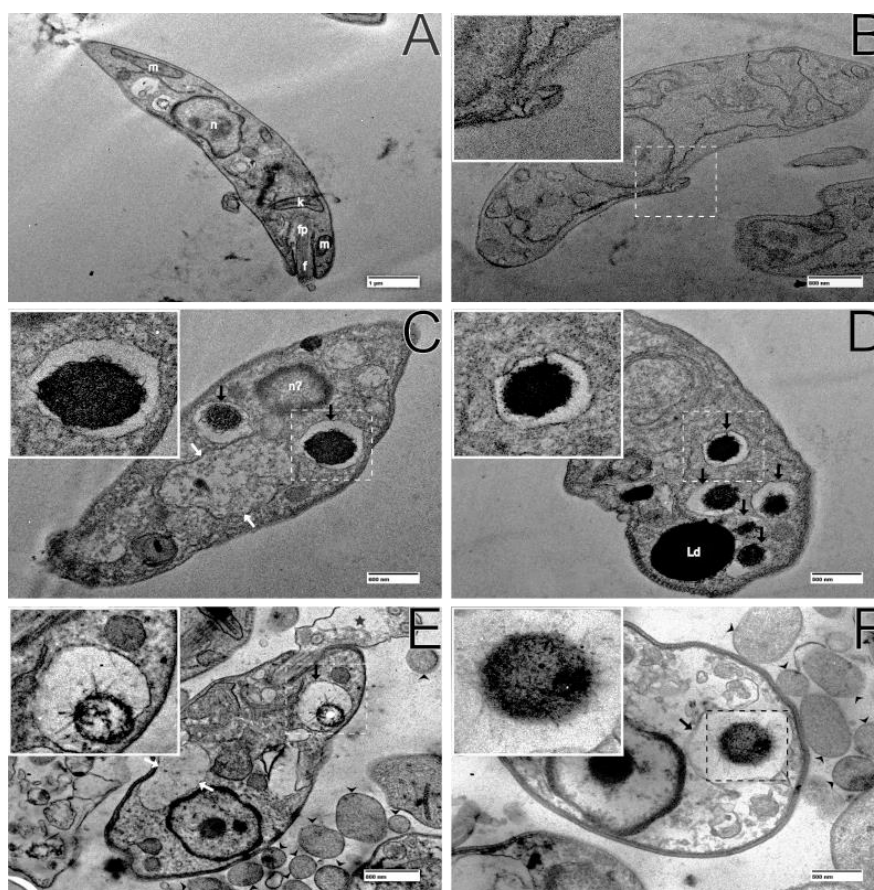


Figura 4. Alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 72 h. (A) Promastigotas sem tratamento (1 μm). (B) Células tratadas com MTF 36,29 μM (800 nm). (C, D) Promastigotas tratadas com 1,90 μM e 3,80 μM de **TZ3C**, respectivamente (600 e 500 nm). (E, F) Promastigotas tratadas com 12,20 μM e 24,40 μM de **TZ5D**, respectivamente (800 e 5000 nm). MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência. (B-F) Quadrado segmentado demonstra a área em destaque. (f) flagelo; (fp) bolsa flagelar; (k) cinetoplasto; (m) mitocôndria; (n) núcleo; (Ld) gota de gordura; (seta branca) alargamento da mitocôndria; (seta preta) inclusões eletrodensas; (cabeça de seta) vesícula extracitoplasmática; (estrela) desorganização do flagelo.

3.3. Volume celular em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

O volume celular (Fig. 5) foi determinado por citometria de fluxo em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* com objetivo de confirmar os dados observados nas micrografias eletrônicas.

Ambas as substâncias, **TZ3C** e **TZ5D**, exibiram padrões de redução no volume celular de forma dose-dependente e com caráter significativo entre as concentrações. Enquanto 1,90 μM de **TZ3C** reduziu o volume das células em 43,5%, o dobro da concentração (3,80 μM) reduziu cerca de 58,6%. Da mesma maneira, 12,20 μM de **TZ5D** diminuiu o volume das células em 59,9%, enquanto 24,40 μM reduziu em 74,3%.

Como esperado, actinomicina D e MTF reduziram o volume dos parasitos em 37,8% e 68,0%, respectivamente.

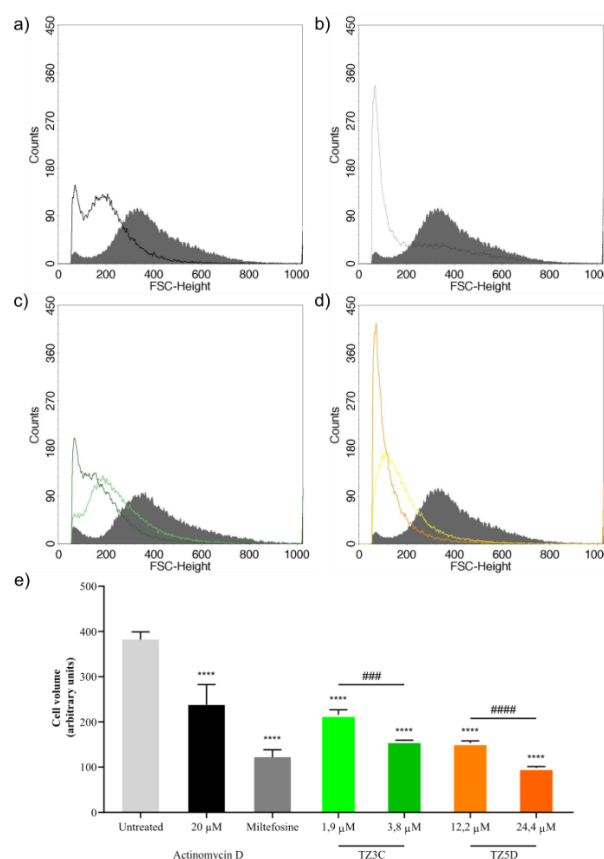


Figura 5. Volume celular de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. (a-d) Histograma do perfil volumétrico (FSC-Height) em relação a quantidade de células (Counts). (sombreado) Contagem de células de volume normal. (a) Promastigotas tratadas com actinomicina D 20 μM . (b) Células tratadas com MTF 36,29 μM . (c) Promastigotas tratadas com 1,90 μM (verde claro) e 3,80 μM (verde escuro) de **TZ3C**, respectivamente. (d) Promastigotas tratadas com 12,20 μM (laranja claro) e 24,40 μM (laranja escuro) de **TZ5D**, respectivamente. (e) Representação gráfica dos histogramas. MTF foi utilizada como parâmetro de referência e actinomicina D como controle positivo. (****) $P < 0,0001$; (###) $P = 0,0009$; (#####) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.4. Permeabilidade de membrana plasmática em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 6 expressa a intensidade de fluorescência do material genético das formas promastigotas após exposição a IP. Os dados representam quantitativamente a proporção de células com membrana plasmática lesionada, *i.e.*, passivas de terem o material genético intercalado por IP. Parasitos não tratados captam pouco ou nenhum IP, enquanto células permeabilizadas com digitonina 40 μM são marcadas pelo intercalante.

Promastigotas tratadas com **TZ3C** e **TZ5D** não exibiram captação de IP significativa em nenhuma das concentrações testadas durante o período de incubação de 24 h. Nesse sentido, as células foram submetidas ao mesmo esquema de tratamento, porém em um período de incubação de 72 h. Promastigotas tratadas com 1,90 μM e 3,80 μM de **TZ3C** tiveram aumento médio na permeabilidade de membrana de cerca de 24,7 vezes em relação ao controle não tratado, sem diferença estatística entre as concentrações. Já **TZ5D** demonstrou um perfil dose-dependente, uma vez que 12,20 μM foi capaz de aumentar a permeabilidade em cerca de 12,5 vezes, enquanto 24,40 μM da mesma substância reduziu a integridade da membrana citoplasmática em cerca de 79,7 vezes quando comparado ao controle não tratado.

MTF 36,29 μM , em ambos os esquemas de tratamento (24 h e 72 h), elevou a permeabilidade dos parasitos em 25,7 e 98,1 vezes, respectivamente.

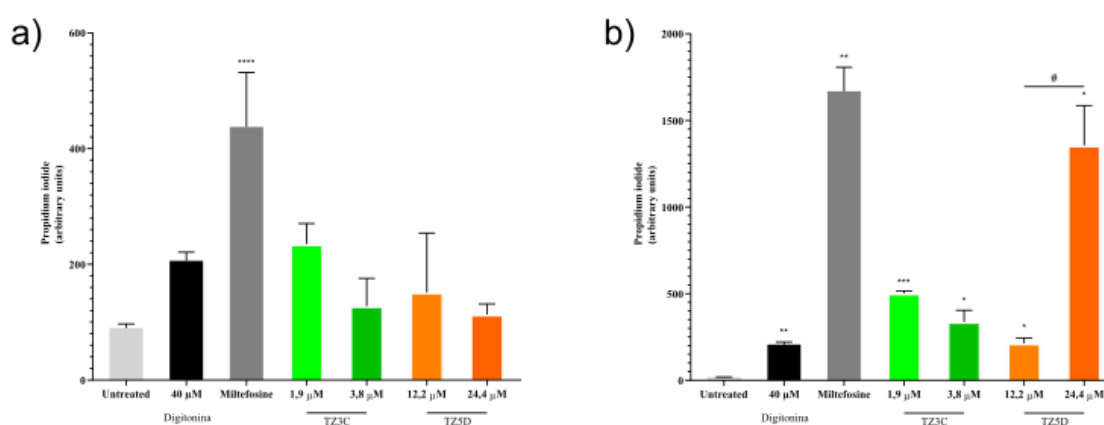


Figura 6. Permeabilidade de membrana plasmática de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por (a) 24 h e (b) 72 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e digitonina 40 μM como controle positivo. (*) $P < 0,03$ (**); $P = 0,006$; (***) $P = 0,0006$; (****) $P < 0,0001$; (#) $P < 0,01$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.5. Acúmulo de corpos lipídicos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 7 descreve o perfil de fluorescência de células com acúmulo de lipídios neutros. Parasitos não tratados apresentam pouca quantidade de corpúsculos lipídicos intracitoplasmáticos, enquanto células submetidas a exposição com H_2O_2 rapidamente demonstram acumulação de gordura no citoplasma.

TZ3C não induziu formação de gotas de gordura nas formas promastigotas em nenhuma das concentrações testadas durante o período de incubação de 24 h (Fig. 7-a). Em contrapartida, o tratamento com **TZ5D** gerou um incremento médio de corpos lipídicos de cerca de 37,2 vezes quando comparado com células não tratadas. Para investigar melhor o perfil dessas alterações no parasito, o mesmo esquema de tratamento foi realizado durante um período de incubação de 72 h. Promastigotas tratadas com 1,90 μM e 3,80 μM de **TZ3C** tiveram aumento médio na quantidade de lipídios neutros intracelulares de cerca de 3,8 vezes em relação ao controle não tratado, sem diferença estatística entre as concentrações. Curiosamente, **TZ5D** teve uma queda substancial na capacidade de gerar corpos lipídicos (Fig. 7-b), entretanto, novamente demonstrou um perfil dose-dependente, haja visto que 12,20 μM não foi capaz de aumentar o conteúdo lipídico das promastigotas após 72 h de tratamento, enquanto 24,40 μM da mesma substância aumentou significativamente os títulos de lipídios neutros em cerca de 8,2 vezes quando comparado ao controle não tratado, uma queda na expressão de corpos lipídicos pelo CI_{50} da substância de 22,0% ao longo de 48 h.

MTF 36,29 μM elevou significativamente a quantidade de corpos lipídicos das promastigotas expostas por 72 h em 5,2 vezes, em comparação a células não tratadas.

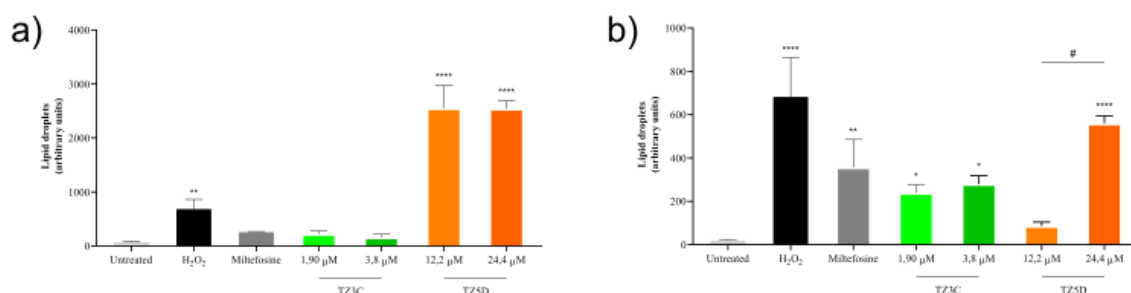


Figura 7. Lipídios neutros intracelulares em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por (a) 24 h e (b) 72 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (*) $P < 0,03$ (**); $P < 0,005$; (***) $P = 0,0006$; (****) $P < 0,0001$; (#) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.6. Vacúolos ácidos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 8 reflete os níveis de fluorescência de células exposta a laranja de acridina. Parasitos não tratados apresentam reduzida proporção de compartimentos com caráter ácido, enquanto células submetidas a exposição com H_2O_2 têm ativa formação de vacúolos intracitoplasmáticos com capacidade de aprisionar o marcador fluorescente.

Nenhuma das concentrações, de ambas as substâncias (TZ3C e TZ5D), foi capaz de induzir a expressão de compartimentos ácidos no citoplasma de formas promastigotas tratadas por 24 h.

MTF 36,29 μM , apesar de elevar razoavelmente a fluorescência do marcador, foi incapaz de proporcionar efeitos significativos no tempo de incubação de 24 h.

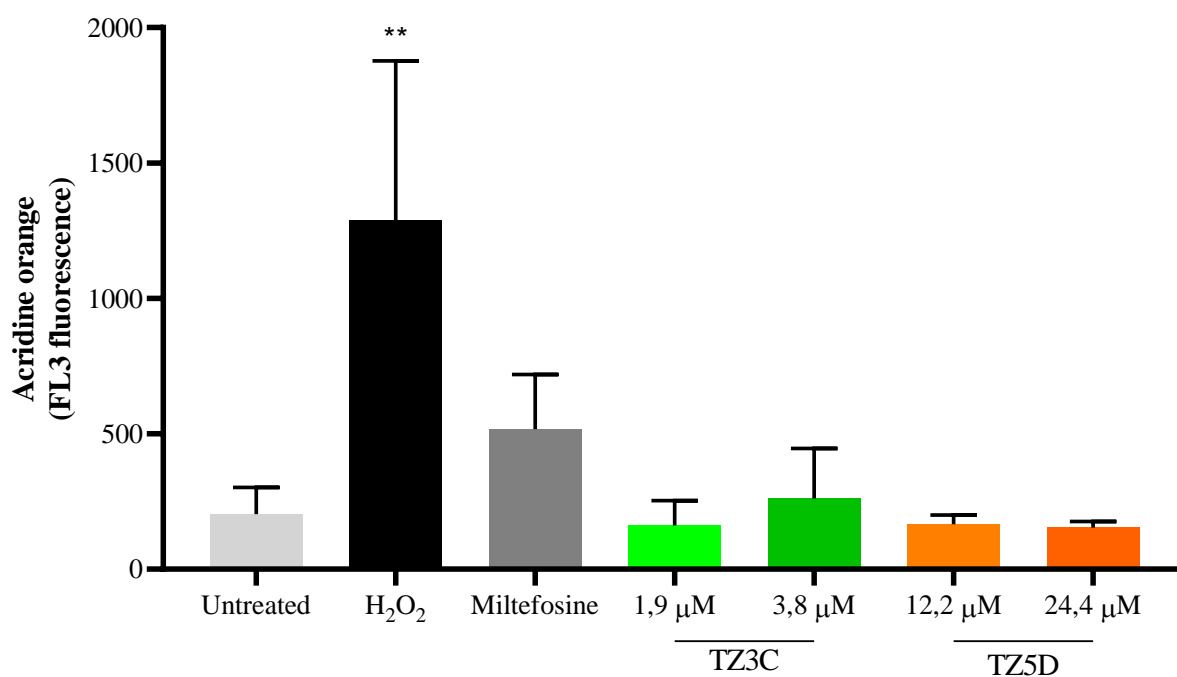


Figura 8. Níveis de vacúolos ácidos em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (**) $P < 0,001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado.

3.7. Espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 9 exibe a fluorimetria característica do marcador DCF. Parasitos não tratados apresentam baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio, insuficientes para induzir a clivagem da molécula não fluorescente H₂DCFDA, enquanto células submetidas a exposição com H₂O₂ prontamente convertem o marcador a sua forma altamente fluorescente (DCF).

TZ3C não induziu alterações significativas nos níveis de espécies reativas de oxigênio nas formas promastigotas em nenhuma das concentrações testadas durante o período de incubação de 24 h (Fig 9-a). Por outro lado, o tratamento com **TZ5D** causou elevação dose-dependente significativa entre as doses. **TZ5D** nas concentrações de 12,20 μ M e 24,40 μ M demonstrou 21,5 e 44,4 vezes, respectivamente, maiores níveis de ERO em comparação a células não tratadas. A fim de melhor avaliar possíveis alterações no perfil oxidativo de formas promastigotas, o tratamento foi realizado da mesma maneira durante um período de incubação de 72 h. Promastigotas tratadas com 1,90 μ M e 3,80 μ M de **TZ3C** expressaram aumento médio na quantidade de ERO de cerca de 5,1 vezes em relação ao controle não tratado, sem diferença estatística entre as concentrações. Interessantemente, **TZ5D** teve uma queda drástica nos títulos de espécies reativas de oxigênio (Fig. 9-b), todavia, demonstrando mais uma vez seu perfil dose-dependente, haja visto que 12,20 μ M não foi capaz de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio nas promastigotas após 72 h de tratamento, enquanto 24,40 μ M da mesma substância aumentou significativamente a concentração intracelular de ERO em cerca de 16,5 vezes quando comparado ao controle não tratado, uma queda da geração de ERO pelo CI₅₀ de 37,1% ao longo de 48 h.

MTF 36,29 μ M, só foi capaz de elevar o conteúdo intracitoplasmático de ERO nos parasitos em 72 h tratamento, cerca de 18,9 vezes quando comparado a células não tratadas, respectivamente.

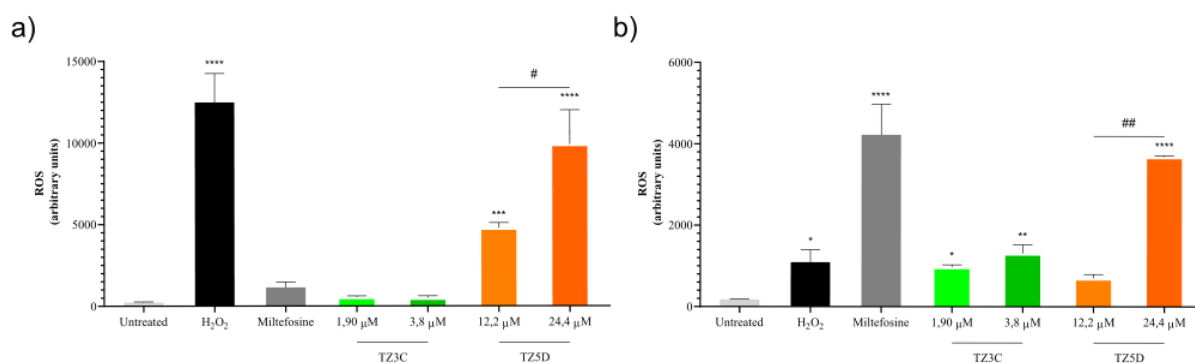


Figura 9. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por (a) 24 h e (b) 72 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (*) $P < 0,03$ (**); $P < 0,005$; (***) $P = 0,0006$; (****) $P < 0,0001$; (#) $P < 0,01$; (##) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.8. Óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 10 expressa a fluorescência característica do benzotriazol, produto da reação do marcador DAF-FM com óxido nítrico intracelular. Parasitos não tratados apresentam baixos níveis de $\cdot\text{ON}$, os quais não permitem geração significativa de fluorescência, enquanto células submetidas a exposição com H_2O_2 assumem um estado oxidativo capaz de gerar radicais livres como $\cdot\text{ON}$ e, portanto, emitem certa fluorescência.

TZ3C não foi capaz de promover geração significativa de $\cdot\text{ON}$ nas formas promastigotas em nenhuma das concentrações testadas e em ambos os períodos de incubação de 24 h e 72 h. Em contrapartida, o tratamento com **TZ5D** causou elevação dose-dependente, 12,20 μM e 24,40 μM da substância demonstraram capacidade de aumentar os níveis intracelulares de $\cdot\text{ON}$ em 17,1 e 24,1 vezes, respectivamente, em comparação a células não tratadas num período de exposição de 24 h. Enquanto 12,20 μM de **TZ5D** após um período de 72 h teve uma certa redução na capacidade de elevar os níveis de $\cdot\text{ON}$. Como demonstra a figura 10-b, houve elevação na concentração do radical em cerca de 6,1 vezes, demonstrando novamente seu perfil dose-dependente, haja visto que 24,40 μM foi capaz de sustentar a elevação nos níveis de $\cdot\text{ON}$ nas promastigotas após 72 h de tratamento, cerca de 19,9 vezes maior quando comparado a células não tratadas. A queda de geração de $\cdot\text{ON}$ mediada pelo CI_{50} de **TZ5D** foi de 35,6% ao longo de 48 h.

MTF 36,29 μM só foi capaz de elevar a o conteúdo intracelular de $\cdot\text{ON}$ nas formas promastigotas em 72 h de tratamento, cerca de 11,2 vezes quando comparado a células não tratadas, respectivamente.

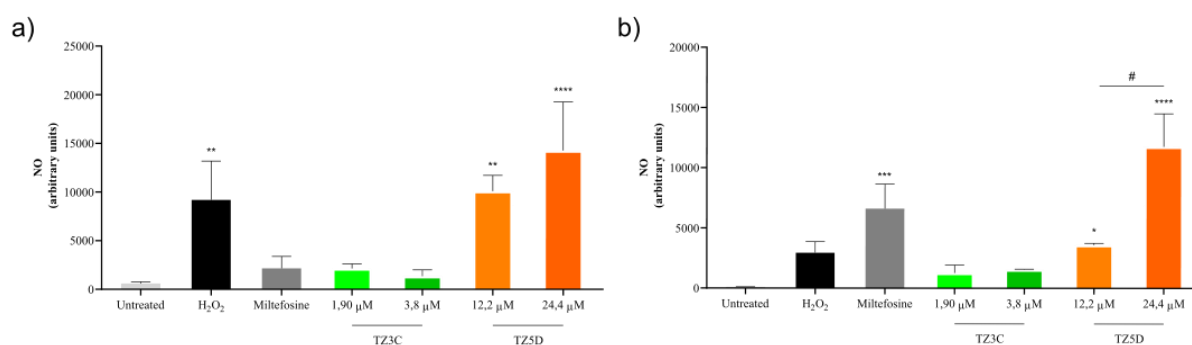


Figura 10. Níveis de óxido nítrico (\cdot ON) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por (a) 24 h e (b) 72 h. MTF 36,29 μ M foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (*) $P < 0,03$ (**); $P < 0,005$; (***) $P = 0,0002$; (****); $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.9. Peroxidação lipídica em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 11 apresenta dados referentes a fluorescência do óxido de fosfina, um produto da reação entre o marcador DPPF e hidroperóxidos. Parasitos não tratados expressam baixos níveis de peroxidação lipídica, os quais não permitem geração significativa de fluorescência, enquanto células submetidas a exposição com H_2O_2 acabam sofrendo lesões oxidativas que geram os hidroperóxidos e, portanto, emitem certa fluorescência.

TZ3C foi capaz de induzir a expressão de lesões oxidativas no parasito em 24 e 72 h. No período de incubação de 24 h, ambas as concentrações promoveram uma elevação média na peroxidação lipídica de cerca de 4,5 vezes em comparação a promastigotas não submetidas ao tratamento, enquanto a incubação com as concentrações de 1,90 e 3,80 μ M por 72 h tiveram elevação média de cerca de 1,6 vezes quando comparado às células sem tratamento. Já o tratamento com **TZ5D** causou elevação média dos níveis de lipoperoxidação nas formas promastigotas em 6,5 vezes em comparação a células não tratadas num período de exposição de 24 h. Enquanto células tratadas com 12,20 μ M de **TZ5D** por um período de 72 h não expressaram níveis significativos de lipoperoxidação, como demonstra a figura 11-b. Já a concentração de 24,40 μ M de **TZ5D** sustentou a indução de peroxidação lipídica em cerca de 6,2 vezes comparado a células não tratadas. A queda da peroxidação lipídica mediada pelo CI_{50} de **TZ5D** foi de 13,8% ao longo de 48 h.

MTF 36,29 μ M, apresentou um perfil altamente danoso às macromoléculas dos parasitos, revelando incremento da peroxidação de cerca de 13,7 e 6,5 vezes quando comparado a células não tratadas nos períodos de 24 e 72 h de incubação, respectivamente.

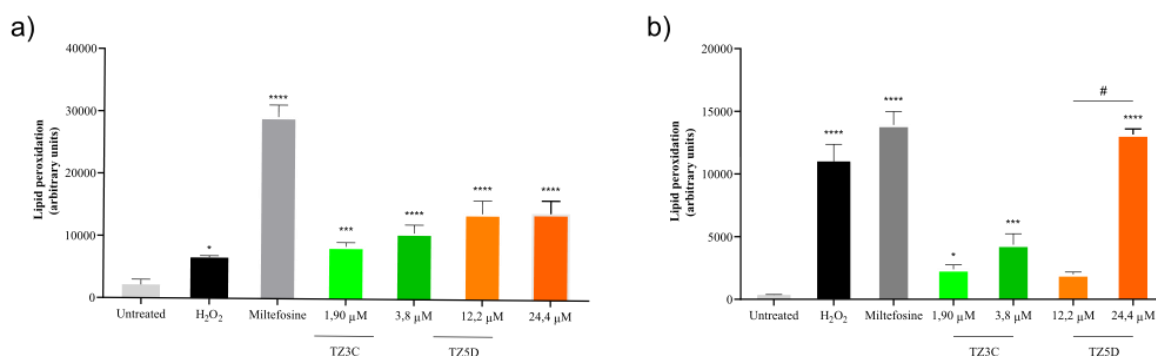


Figura 11. Nível de peroxidação lipídica em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por (a) 24 h e (b) 72 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (*) $P < 0,03$ (**); $P < 0,003$; (***) $P = 0,0003$; (****) $P < 0,0001$; (#) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.10. Níveis de tióis reduzidos em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 12 expõe a espectrometria realizada nos extratos de promastigotas incubadas com o marcador DTNB. Protozoários não tratados apresentam altas quantidades de grupamentos tióis (sulfidrilas) livres, os quais reagem com o marcador e produzem um cromógeno amarelo, enquanto células submetidas a exposição com H_2O_2 perdem parte das sulfidrilas livres por oxidação (formação de pontes de dissulfeto) e, conseqüentemente, não há formação de cor.

TZ3C e **TZ5D** foram capazes de diminuir drasticamente os níveis de tióis reduzidos de forma similar em ambas as concentrações, CI_{50} e $2 \times \text{CI}_{50}$, cerca de 77,2% em relação ao controle não tratado num período de 24 h.

MTF 36,29 μM , apresentou um perfil semelhante ao peróxido de hidrogênio, reduzindo em cerca de 95% as sulfidrilas livres das promastigotas.

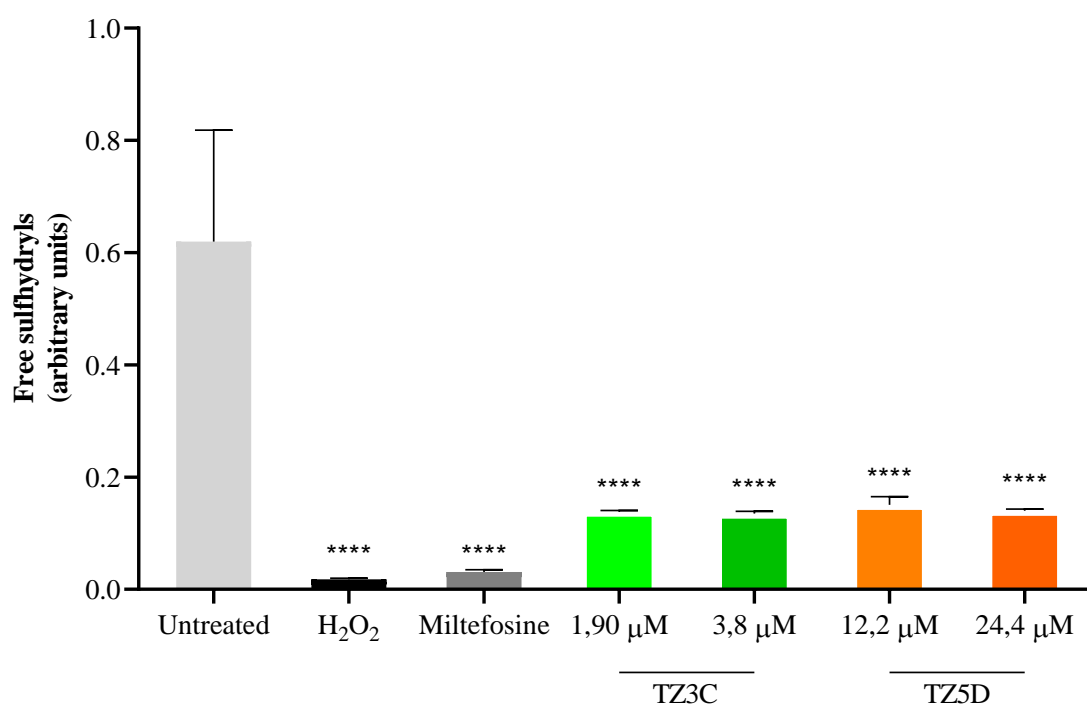


Figura 12. Níveis de tióis reduzidos em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (****) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado.

3.11. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 13 reflete os níveis de captação de Rh123 pela mitocôndria das promastigotas. Parasitos não tratados são capazes de captar prontamente o marcador e assim emitir alta fluorescência, enquanto células expostas ao CCCP apresentam baixa captação, uma vez que o tratamento com o desacoplador mitocondrial favorece o efluxo de Rh123 resultando em baixa intensidade de fluorescência.

Ambas as substâncias induziram despolarização da membrana mitocondrial. Os esquemas de tratamentos com as concentrações de CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ levaram a uma redução média no $\Delta\Psi\text{m}$ de 44,9% para **TZ3C** e de 46,9% para **TZ5D**.

MTF 36,29 μM revelou um perfil semelhante ao das substâncias calcogênicas ao reduzir proporcionalmente (cerca de 49,8%) o $\Delta\Psi\text{m}$ das formas promastigotas.

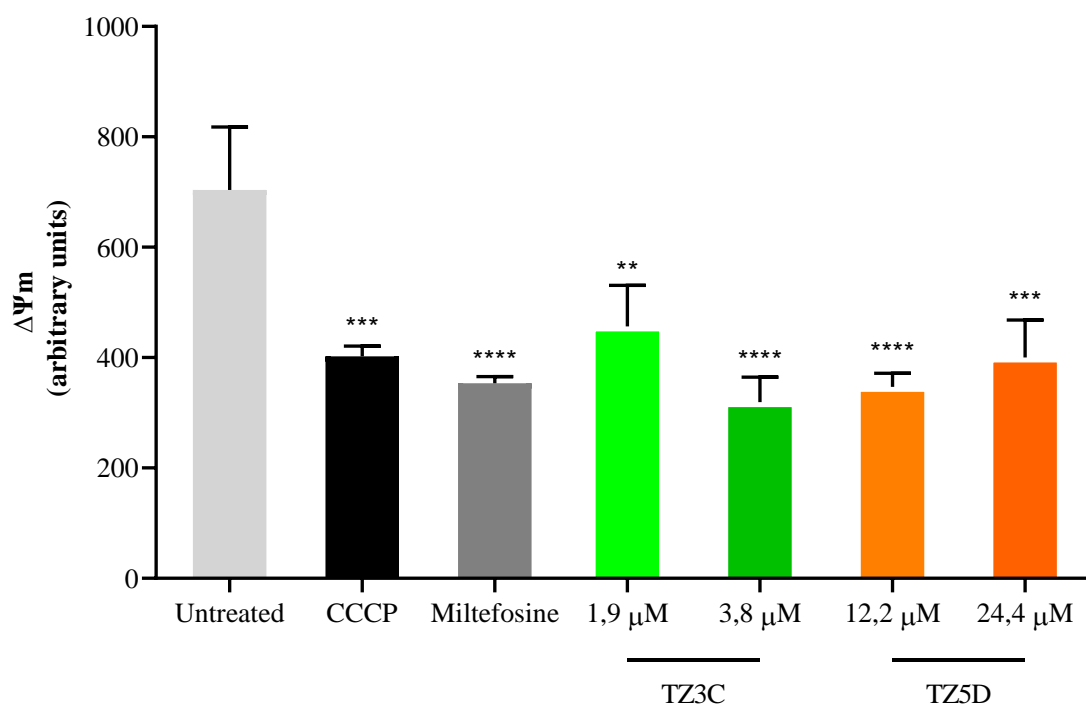


Figura 13. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e CCCP como controle positivo. (**) $P < 0,001$; (***) $P < 0,0002$; (****) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado.

3.12. Níveis de ATP intracelular em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 14 revela o perfil de luminescência gerado pela reação da adenosina trifosfato das promastigotas com a enzima luciferase. Protozoários não tratados apresentam concentrações normais de ATP, enquanto células expostas ao inibidor do complexo citocromo-oxidase (KCN), presente na cadeia respiratória, apresentam baixa luminescência, haja visto que a produção de nucleotídeos trifosfatados de adenina se encontra deficiente pela inibição, o que leva a reduzida emissão de luz pela depleção de energia da reação.

TZ3C teve capacidade de reduzir os níveis de ATP intracelulares em formas promastigotas tratadas por 24 h. A depleção de ATP variou significativamente em função da concentração, 1,90 μM da substância reduziu em cerca de 47,3%, enquanto 3,80 μM alterou a concentração em apenas 28,3%. Curiosamente, **TZ5D** elevou os títulos de ATP intracelulares em 156,3% em média para ambas as concentrações.

MTF 36,29 μM novamente demonstrou alterações intensas, com redução de 79,9% nos níveis intracelulares de ATP.

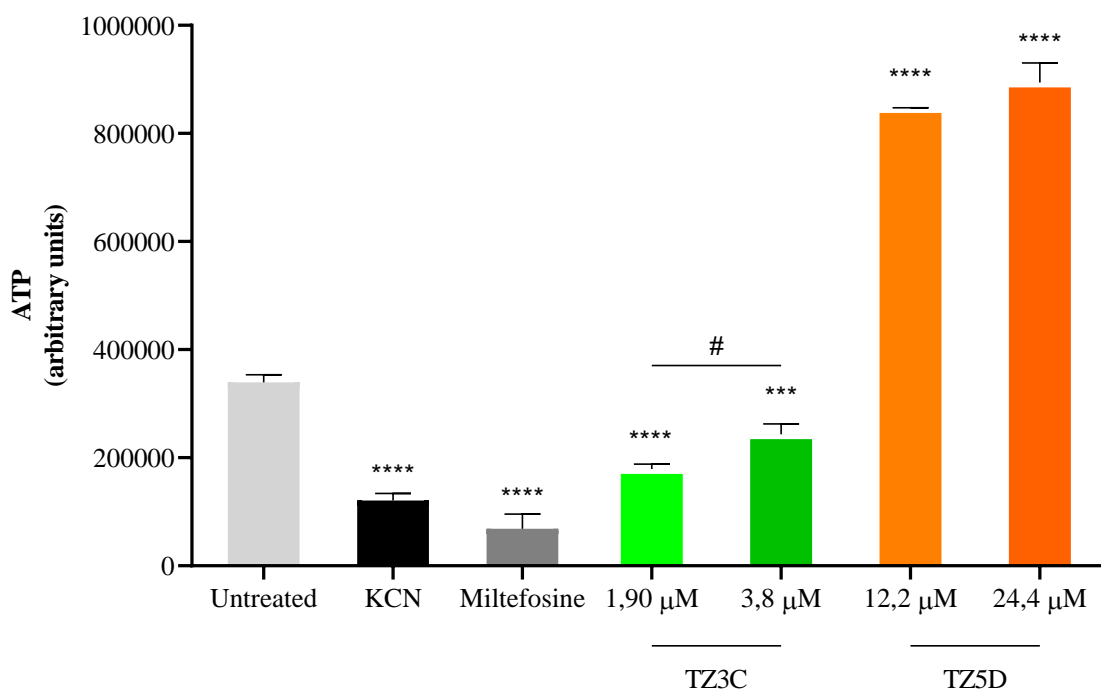


Figura 14. Níveis de ATP em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e KCN 500 μM como controle positivo. (***) P<0,0003; (****) P<0,0001; (#) P<0,005. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.13. Óxido nítrico e tióis reduzidos em macrófagos tratados com dicalcogenetos

A figura 15 demonstra os dados obtidos da análise da célula hospedeira. Macrófagos possuem capacidade microbicida otimizada quando os níveis de radicais livres produzidos nos fagolisossomos se encontram aumentados. Assim, títulos elevados de óxido nítrico refletem uma maior proporção de células ativas (Fig. 15-a), enquanto células expostas a peróxido de hidrogênio expressam o perfil de macrófagos em estresse oxidativo, para efeito de comparação.

TZ3C foi capaz de induzir aumento dose-dependente nos títulos de $\cdot\text{ON}$ em macrófagos. As concentrações de 1,90 μM e 3,80 μM elevaram cerca de 6,3 e 24,6 vezes a concentração de $\cdot\text{ON}$ em comparação a células não tratadas, respectivamente. Da mesma maneira, o tratamento com **TZ5D** causou elevação dose-dependente, ambas concentrações causaram um incremento médio na quantidade $\cdot\text{ON}$ de 5,7 vezes quando comparado a células sem tratamento.

MTF 36,29 μM, igualmente, elevou os níveis de $\cdot\text{ON}$ em cerca de 15,9 vezes em comparação a células não tratadas.

A figura 15-b aponta os dados espectrofotométricos do comportamento de macrófagos expostos ao DTNB. Como já era esperado, H_2O_2 levou a uma diminuição na concentração de tióis reduzidos de aproximadamente 51,5%.

TZ3C e **TZ5D** também reduziram as sulfidrilas livres de macrófagos tratados por 24 h em 56,6% e 41,8%, respectivamente.

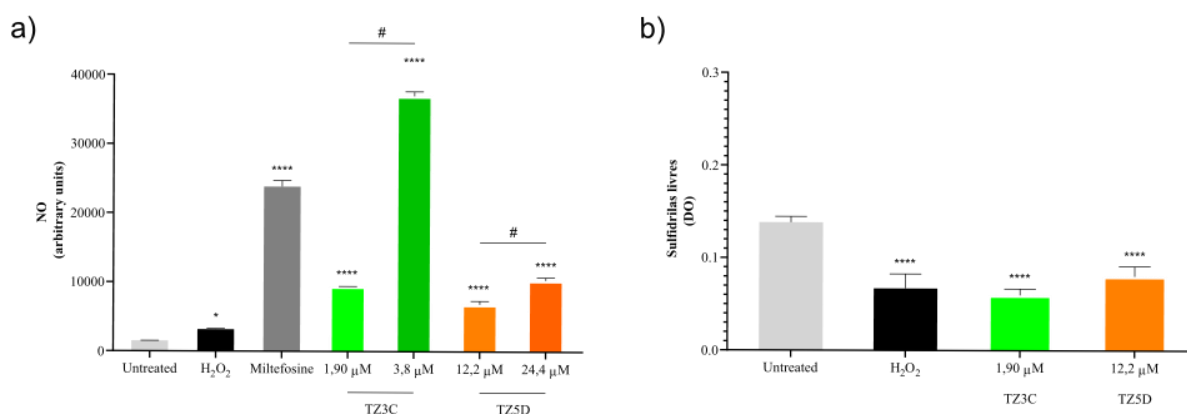


Figura 15. Nível de (a) óxido nítrico ($\cdot ON$) e (b) sulfidrilas livres em macrófagos J774A.1 tratados com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e H_2O_2 1 mM como controle positivo. (*) $P < 0,05$; (****) $P < 0,0001$; (#) $P < 0,0003$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado; #, diferença estatística entre a comparação.

3.14. Ciclo celular em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 16 expressa a porcentagem de promastigotas em suas respectivas subfases do ciclo celular. A quantidade de material genético, em especial o DNA, tem importantes variações ao longo da vida dos protozoários. Desta forma, a marcação com iodeto de propídio permite visualizar a proporção de células nas diferentes subfases do ciclo em função da intensidade de fluorescência característica de cada uma delas. Promastigotas sem tratamento apresentam uma proporção maior de células nas subfases G0/G1, seguida de S, G2/M e em menor proporção na subfase SubG1. Por outro lado, parasitos tratados com taxol revelam graves anomalias no ciclo, com elevação substancial da população SubG1, subfase caracterizada pela presença de células com DNA fragmentado.

TZ3C causou alterações discretas num perfil semelhante entre as concentrações da substância no ciclo de vida das promastigotas expostas por um período 24 h. Tanto 1,90 μM quanto 3,80 μM induziram parada no ciclo celular na subfase G0/G1 e, por consequência, redução significativa (43,3% e 30,2%, respectivamente) das células na subfase S. Em contraste, **TZ5D** promoveu alterações intensas no ciclo celular. Em subG1 houve elevação da população de cerca de 11,0 e 12,9 vezes quando comparado a células não tratadas, enquanto promastigotas de todas as outras subfases tiveram uma redução importante. As concentrações de CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ levaram a redução de 65,2% e 79,4% em G0/G1; 60,5% e 77,0% na subfase S e 83,5% e 92,0% em G2/M, respectivamente.

MTF 36,29 μM também demonstrou capacidade de alterar o ciclo celular. Promastigotas tratadas com a substância tiveram elevação na população SubG1 de cerca de 6,7 vezes, enquanto as outras subfases tiveram redução em 44,9%, 49,4% e 22,0%, respectivamente.

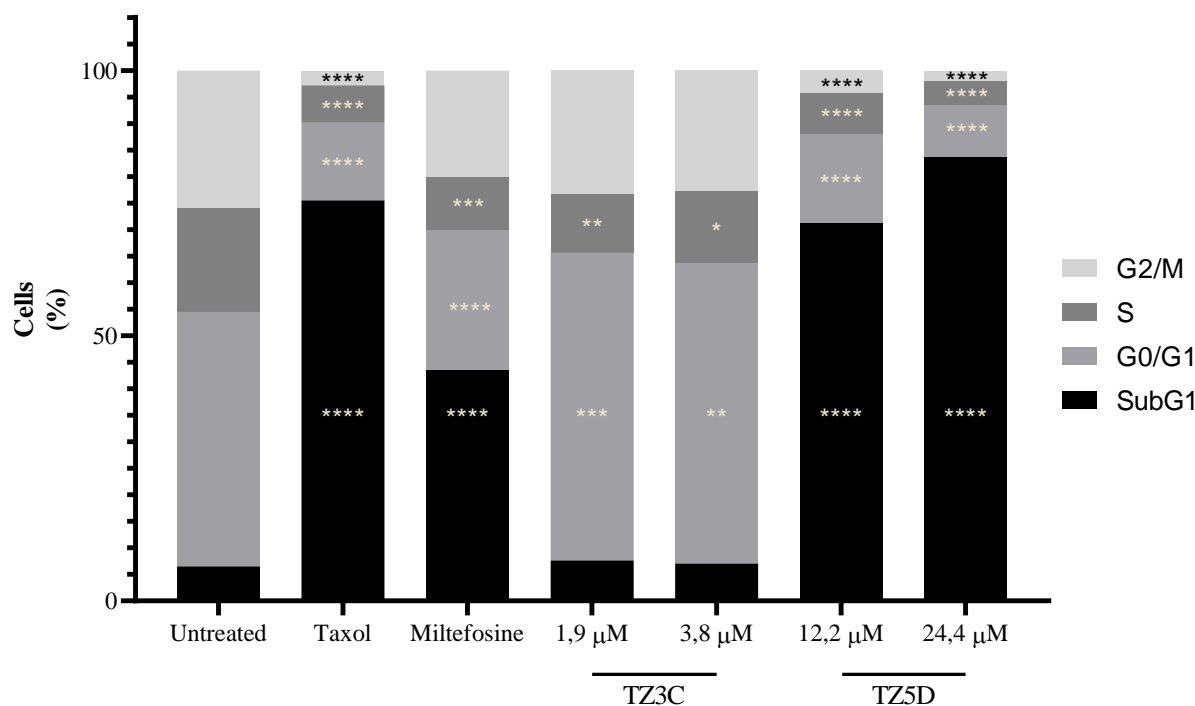


Figura 16. Perfil do ciclo celular em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. MTF 36,29 µM foi utilizada como parâmetro de referência e taxol como controle positivo. (*) P<0,05; (**) P<0,001; (***) P=0,0003; (****) P<0,0001. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado.

3.15. Exposição de fosfatidilserina em promastigotas tratadas com dicalcogenetos

A figura 17 é a representação do perfil de exposição da fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. Fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana que se encontra em maior proporção na camada interna da bicamada fosfolipídica. Promastigotas, durante morte semelhante a apoptose, elevam a quantidade dessa molécula na camada externa da membrana plasmática, onde ficam expostas para ligação com o marcador anexina V-FITC. Morte celular por necrose, outro mecanismo de morte avaliado em eucariotos menores, é caracterizada pela ruptura da membrana celular e extravasamento citoplasmático. Nesse sentido, protozoários com membrana plasmática comprometida tem o material genético exposto, o qual pode ser marcado com IP. Em alguns casos, o perfil combinado das marcações pode evidenciar a morte por apoptose tardia, caracterizada principalmente pela exposição de fosfatidilserina e lesões da membrana citoplasmática.

TZ3C promoveu um aumento significativo na população anexina-positiva de 15,2 vezes, quando comparado a células não tratadas, apenas na concentração de 3,80 µM, enquanto **TZ5D**, em ambas as concentrações, proporcionou elevação média de células marcadas com

anexina em cerca de 39,1 vezes. As populações de células necróticas e em apoptose tardia não sofreram alterações importantes durante o tratamento com dicalcogenetos por 24 h.

MTF 36,29 μM demonstrou seu perfil apoptótico ao elevar a proporção de células marcadas com anexina em cerca de 16,5 vezes quando comparado a células sem tratamento.

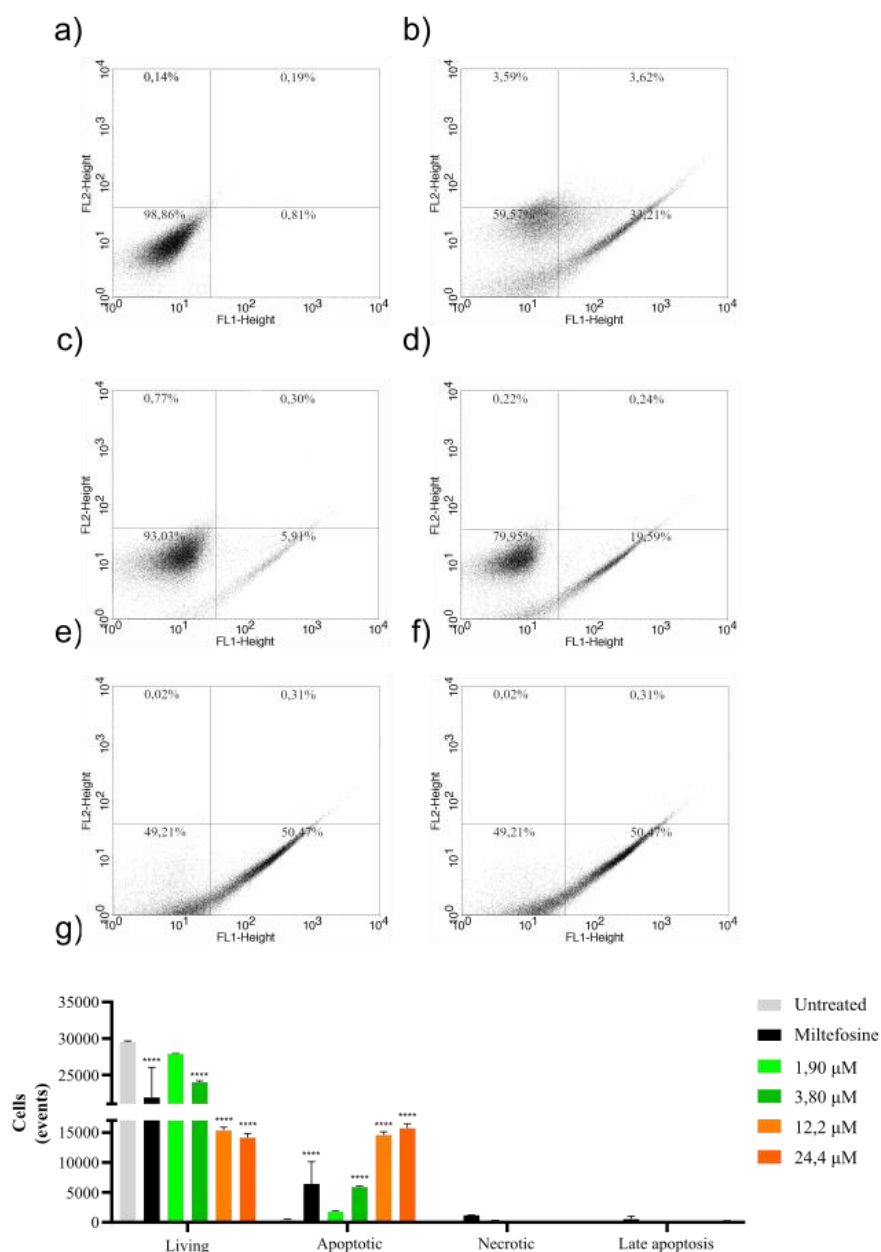


Figura 17. Perfil da exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas com dicalcogenetos por 24 h. (a) Promastigotas sem tratamento. (b) MTF 36,29 μM foi utilizada como parâmetro de referência e controle positivo. (c, d) Células tratadas com 1,90 μM e 3,80 μM de **TZ3C**, respectivamente. (e, f) Promastigotas tratadas com 12,20 μM e 24,40 μM de **TZ5D**, respectivamente. (g) Representação gráfica da quantidade de eventos anexina ou IP-positivos observados por citometria de fluxo em promastigotas com e sem tratamento. (****) $P < 0,0001$. *, diferença estatística em relação ao controle não tratado.

4. DISCUSSÃO

O cenário atual demonstra emergência por novas substâncias capazes de combater efetivamente as leishmanioses, especialmente após o impacto da COVID-19 na saúde da população. Estudos recentes demonstram que após a pandemia, casos de infecção pelo vírus SARS-Cov-2 se tornaram fator de comorbidade para indivíduos com leishmaniose visceral (Paul *et al.*, 2023).

Apesar da ampla gama de moléculas estudadas para o combate a leishmaniose (Pinheiro *et al.*, 2022), a terapia anti-*Leishmania* recai sempre aos mesmos medicamentos disponíveis no mercado (MS, 2022), fármacos de recorrentes falhas terapêuticas e certa toxicidade (Franke *et al.*, 1990; Deray, 2002; Sundar *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2010). Terapias combinatórias surgiram com o objetivo principal de reduzir os efeitos tóxicos das substâncias ao diminuir a dose necessária para se atingir a remissão da doença (Alcântara *et al.*, 2018; Essid *et al.*, 2023). O reposicionamento de medicamentos também é uma estratégia muito utilizada no campo da pesquisa relacionada às DTN, uma vez que reduz a longa jornada da aprovação de fármacos para o combate às doenças (Andrade Neto. *et al.*, 2018).

Revisão recentemente publicada (Pal *et al.*, 2023) avaliou a relação estrutura-atividade de uma vasta quantidade de moléculas sintéticas, e descreveu o perfil promissor de substâncias com caracteres fitoquímicos em relação a capacidade anti-*Leishmania*, apontando a notável importância dos anéis centrais para a atividade.

Duas substâncias com anéis foram avaliadas nesse artigo, **TZ3C** e **TZ5D**. De forma geral, apresentam estrutura semelhante, são moléculas que contêm dois anéis, cada qual formando um núcleo arila unido por dois átomos de telúrio e selênio, respectivamente. Os grupos funcionais ligados aos esqueletos carbônicos são distintos nas duas substâncias. Como esperado, tanto **TZ3C** quanto **TZ5D** demonstraram efeitos promissores em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*.

A substância **TZ3C** (código anterior, LQ7) já foi estudada pelo nosso grupo de pesquisa previamente quanto a atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando efeitos similares relacionados ao perfil biológico (Bandeira *et al.*, 2019). A atividade identificada girou em torno de 0,9 μM para as formas promastigotas e 0,5 μM para as formas intracelulares, muito próximo dos valores obtidos para a espécie *L. (L.) infantum*. Curiosamente, **TZ3C** exibiu maior seletividade para as formas intracelulares do protozoário, cerca de 16,7 vezes, equiparando-se a seletividade em amastigotas de *L. amazonensis* (IS = 18).

Micrografias eletrônicas dos parasitos demonstraram redução no volume celular em células tratadas com os valores de CI_{50} e $2xCI_{50}$, a qual foi verificada quantitativamente por citometria de fluxo. Ambas as substâncias reduziram o volume das células proporcionalmente à concentração. A redução do volume celular é uma característica comum na morte por apoptose (Hockenbery, 1995). MTF já demonstrou capacidade de induzir morte semelhante a apoptose em outras espécies de *Leishmania* spp. (Paris *et al.*, 2004), e assim como as substâncias calcogênicas, MTF gerou redução substancial no volume das promastigotas.

Outra característica observada por microscopia, muito evidente nos protozoários expostos às substâncias calcogênicas, foram lesões na membrana citoplasmática. Característica presente em células durante morte por necrose (Tonnus *et al.*, 2019). Promastigotas submetidas ao tratamento durante 24 h não apresentaram marcação com IP, enquanto o tratamento de 72 h foi capaz de alterar significativamente a membrana, achados que impedem a exclusão de um perfil necrótico de morte celular.

A morte do parasito pode envolver diversos mecanismos (D'arcy, 2019), e três tipos de morte já foram identificados em eucariotos menores: necrose, autofagia e morte semelhante a apoptose (Proto *et al.*, 2013). Dentre os mecanismos intracelulares, o sistema redox é um alvo de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que as vias de sinalização de tripanossomatídeos já foram bem descritas (Tomás *et al.*, 2013) e há enzimas importantes no metabolismo desses organismos que não são compartilhadas de forma homóloga com mamíferos (Dumas *et al.*, 1997). Alguns autores já demonstraram a relação entre o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídios intracelulares (Miranda *et al.*, 2017). Como observado nas micrografias, os níveis de corpos lipídicos foram elevados de forma significativa em promastigotas expostas aos dicalcogenetos, de forma mais expressiva sob o tratamento com **TZ5D**.

A principal alteração observada nos parasitos, em ambos os tratamentos, foi o aparecimento de inclusões citoplasmáticas. As características dessas estruturas, como vacuolização e eletrodensidade oval de superfície não regular, não foram reportadas por nenhum outro autor. A princípio, hipóteses sugeriram ser vacúolos com depósito do metabolismo celular do protozoário em situação de estresse, no entanto, a pesquisa por compartimentos ácidos não revelou presença desses vacúolos no período de tratamento avaliado. A hipótese, então proposta, é de acumulação da própria substância no interior das células, haja visto que a observação dos vacúolos por micrografia eletrônica procedeu de forma dose-dependente, *i.e.*, quanto maior a concentração dos dicalcogenetos maior foi a vacuolização

verificada. Estudos mais aprofundados, como a marcação das moléculas com isótopos radioativos, poderiam esclarecer a origem dessas estruturas peculiares.

Os corpos lipídicos, observados em secções do parasito e quantificados bioquimicamente, são organelas compostas por um núcleo lipídico eletrodense envolto por uma camada de fosfolipídios e proteínas (Murphy, 2001). São estruturas importantes para adaptação ao estresse celular, podendo se acumular no citosol a fim de reduzir o dano oxidativo às membranas e fornecer suprimento energético de longo prazo (Henne *et al.*, 2018; Jarc *et al.*, 2019). As gotas de gordura acumuladas no citoplasma do parasito sugerem alteração no balanço redox das células tratadas com as substâncias calcogênicas. O estresse oxidativo pode ser causado por incremento de radicais livres em títulos que impossibilitem as enzimas do metabolismo redox recuperar a homeostasia celular (Wilson *et al.*, 1994); ou por diminuição na quantidade ou atividade dos mecanismos utilizados pelo sistema antioxidante do protozoário (Dumas *et al.*, 1997), como por exemplo a inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase. Os níveis de ERO totais e $\cdot\text{ON}$ foram acessados em promastigotas submetidas aos tratamentos por 24 h, no entanto somente após 72 h de exposição, ambas as substâncias induziram elevação nos níveis dessas espécies. **TZ5D**, simulando o mesmo perfil do acúmulo de lipídios, teve capacidade de elevar as concentrações de ambas as espécies reativas com apenas 24 h de tratamento, ilustrando sua facilidade em desregular o sistema redox.

Diferentes efeitos podem ser observados nas células após o desbalanço do metabolismo redox (Sansom *et al.*, 2013; Caliri *et al.*, 2021), em especial às macromoléculas, *e.g.*, proteínas, lipídios de membrana e DNA (Mancini *et al.*, 2020). A lipoperoxidação é o dano oxidativo causado aos lipídios por meio de radicais livres (Oliveira *et al.*, 2000). Esse efeito foi observado em promastigotas desde as primeiras 24 h de exposição aos dicalcogenetos e continuou sendo observado após 72 h de tratamento, com redução substancial da peroxidação lipídica nos protozoários tratados com 12,20 μM de **TZ5D**. Talvez a alteração causada pelo disseleneto não seja capaz de continuar promovendo o dano oxidativo ao longo do tempo, uma vez que as enzimas do sistema antioxidante têm excelente capacidade de controlar os radicais livres após estresse não persistente (Castro *et al.*, 2002; Bahrami *et al.*, 2011).

O sistema antioxidante dos tripanossomatídeos é composto por uma série de enzimas que trabalham em conjunto para neutralizar os radicais livres como íon hidroxila e ânion superóxido (Santi *et al.*, 2022). Esses protozoários apresentam enzimas especiais, semelhantes às glutionas de mamíferos, reconhecidas em conjunto como sistema tripanotiona (Romão *et al.*, 2006). Essa classe de enzimas atua, de forma geral, através da redução de espécies radicalares por meio da oxidação de sulfidrilas livres em resíduos de cisteína (Mahmoudzadeh-

Niknam *et al.*, 2004). De forma interessante, as defesas antioxidantes das promastigotas revelaram rápido comprometimento pós-exposição aos dicalcogenetos. Esse efeito reforça o desbalanço no metabolismo redox provocado por substâncias calcogênicas.

Outra via importante no metabolismo redox é o efluxo mitocondrial de radicais livres produzidos na cadeia de transporte de elétrons (Castro *et al.*, 2002). A mitocôndria é a principal rota dos elétrons obtidos durante o consumo de nutrientes em vias aeróbias de produção energética (Gundersen, 1968; Bermúdez *et al.*, 1997). Situações que desestabilizam a fosforilação oxidativa, podem provocar ‘escapes’ eventuais de elétrons que são prontamente capturados gerando espécies reativas de oxigênio e radicais livres importantes (Bertram *et al.*, 2006). As micrografias eletrônicas de promastigotas expostas a **TZ3C** e **TZ5D** demonstraram o alargamento da mitocôndria. Alterações na atividade da organela também puderam ser observadas no tratamento com ambas as substâncias. Houve despolarização da membrana mitocondrial significativa, tanto para **TZ3C** quanto **TZ5D**, achado que corrobora com o incremento de ERO e $\cdot\text{ON}$ observado.

Nas mitocôndrias, a síntese de ATP é realizada pela proteína F_0F_1 -ATP sintase (Perry *et al.*, 2011). Diversos autores já observaram a atividade ATPásica dessa sintase durante alteração do $\Delta\Psi_m$ (Chinopoulos, 2011; Zorova *et al.*, 2018). A capacidade de produção energética de promastigotas expostas à dicalcogenetos também foi analisada, revelando um perfil distinto para ambas as substâncias. **TZ3C** reduziu a produção de ATP nas formas promastigotas, enquanto **TZ5D** elevou substancialmente os níveis intracelulares da molécula. Esse perfil de elevação já foi reportado por outros autores (Machado, 2021) que o analisam como um recurso final utilizado pela célula a fim de superar o impacto das injúrias e sobreviver. Outros sugerem que a elevação na produção de moléculas de ATP seja um pré-requisito para o processo de morte celular programada (Zamaraeva *et al.*, 2005).

O óxido nítrico, apesar de ser um radical livre, é extremamente importante para os sistemas biológicos, em especial, às vias de sinalização celular e mecanismos de defesa, *e.g.*, atividade antimicrobiana (Dusse *et al.*, 2003). Os fagócitos possuem a capacidade de aumentar $\cdot\text{ON}$ em títulos extremamente elevados através da expressão regulada da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Queiroz *et al.*, 1999). A atividade das substâncias nas células hospedeiras provocaram aumento importante e dose-dependente de $\cdot\text{ON}$, o qual não é semelhante ao perfil de células exposta a peróxido de hidrogênio, o que sugere ativação macrofágica. Por outro lado, macrófagos expostos ao CI_{50} das substâncias calcogênicas tiveram alterações nos níveis de tióis reduzidos, refletindo a precária seletividade das substâncias pelo sistema antioxidante dos parasitos.

Muitos eventos bioquímicos são capazes de promover interrupção no ciclo celular (Ambit *et al.*, 2011), em especial os danos oxidativos ao material genético (Raina *et al.*, 2012). Como esperado, houve alteração significativa nos perfis do ciclo celular de promastigotas tratadas com as substâncias dicalcogênicas. **TZ3C** exibiu alteração significativa em formas promastigotas, induzindo parada no ciclo celular na subfase G0/G1. Autores sugerem que a parada do ciclo especificamente nesta subfase pode estar relacionada a eventos oxidativos (Zahir *et al.*, 2014). Uma possível explicação pode estar vinculada ao consumo dos grupos sulfidrilas e conseqüente aumento na produção de ERO. Em contraste, **TZ5D** aumentou drasticamente o número de indivíduos em SubG1. Evidências apontam que a população desta subfase apresenta extensa fragmentação do DNA, o que poderia explicar a conseqüente redução das outras populações, *i.e.*, a lesão ao material genético é intensa ao ponto de impedir o progresso no ciclo, levando a morte celular (Costa *et al.*, 2019).

A fragmentação do DNA é uma das características da morte por apoptose (Shaha, 2006). Em organismos do metazoa, sabe-se que a partir do ponto de não retorno, as enzimas caspases deflagram uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que culminam, de forma geral, na morte por apoptose: caracterizada principalmente pela diminuição do volume celular, formação de protusões citoplasmáticas que se desprendem da membrana para dar origem a corpos apoptóticos (Sebbagh *et al.*, 2001), picnose (Wyllie *et al.*, 1984), fragmentação do DNA genômico (Enari *et al.*, 1998) e translocação de fosfatidilserina para o folheto externo da bicamada fosfolipídica (Suraweera *et al.*, 2006). Os tipos de mortes que ocorrem em protozoários ainda não foram totalmente elucidados, mas um tipo em específico, compartilha semelhanças com a morte programada do metazoa, a morte semelhante a apoptose (do inglês, *apoptosis-like death*) (Paris *et al.*, 2004; Basmacıyan, Azas e Casanova, 2018). Promastigotas expostas aos dicalcogenetos tiveram elevação substancial na exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática e não demonstraram alterações nos níveis de células em apoptose tardia ou necróticas no período avaliado.

A morte por necrose é um evento celular não programado, relacionado com injúrias agressivas e persistentes (Corral *et al.*, 2016). Células necróticas apresentam características muito expressivas, *e.g.*, alterações morfológicas marcantes, liberação do conteúdo intracelular e inchaço das células (Basmacıyan e Casanova, 2019). Promastigotas tratadas com dicalcogenetos apresentaram solução de continuidade na membrana plasmática e elevação da marcação com IP após 72 h de tratamento, achados que não podem ser descartados.

De forma geral, foi verificado perfis distintos em relação as alterações provocadas pelos dicalcogenetos nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. **TZ3C** demonstrou um impacto

mais tardio sobre o parasito, com alterações significativas observadas majoritariamente ao longo de 72 h de exposição. À microscopia eletrônica, foi possível observar alterações drásticas na membrana plasmática e inclusões celulares de origem desconhecida. O sistema antioxidante foi alterado de forma significativa, o que possivelmente comprometeu o metabolismo redox. O incremento de espécies radiculares, provavelmente, levou a oxidação de macromoléculas importantes, com a expressão evidente de peroxidação lipídica. A mitocôndria teve alterações ultraestruturais e perda do potencial de membrana, o que talvez tenha levado a incapacidade de produção de moléculas de ATP suficientes para sustentar os mecanismos de reparo, sugerindo uma possível cooperação entre a repressão do sistema antioxidante e a desregulação mitocondrial para a morte do protozoário.

Alguns autores já descreveram a presença de bombas ATP-dependentes na membrana citoplasmática de tripanossomatídeos (Meade, 2019), em especial a bomba de sódio (Na) e potássio (K). Essa proteína de membrana é responsável por promover o fluxo de íons Na^+ e K^+ contra o gradiente eletroquímico (Vieira *et al.*, 1995), de forma resumida, a bomba Na^+/K^+ -ATPase tem o papel de expulsar ativamente três cátions sódio e, por cotransporte, gerar o influxo de dois K^+ . As formas promastigotas tiveram os títulos de ATP reduzidos sob o tratamento com o ditelureto, o que pode ter gerado impactos sobre a atividade de proteínas ATP-dependentes, em especial da bomba de Na^+/K^+ -ATPase. Alguns autores já descreveram o perfil de anomalias que sucedem a falha desta bomba (Skou *et al.* 1992, Wang *et al.*, 1993), destacando a tumefação celular. Células tratadas com **TZ3C** perderam o afunilamento característico das formas promastigotas, se tornando arredondadas. Observando esses achados, entende-se que o desbalanço no metabolismo redox tenha sido o estopim do mecanismo de morte. A lipoperoxidação, em especial lesões ao material genético (Ames *et al.*, 1993), deixa evidente a necessidade de processos ATP-dependentes relacionados ao reparo da célula. Fato que explica a significativa redução na população de promastigotas na subfase de replicação do DNA. Diversos autores já demonstraram a repressão do progresso no ciclo celular causado por injúrias a esta macromolécula (Sorenson *et al.*, 1990; King e Cidlowky, 1998, Andrade *et al.*, 2022).

No metazoa, quando o dano celular é intenso e incapaz de ser consertado, a célula entra num processo altamente regulado de morte a fim de preservar os constituintes celulares permitindo que outras células os utilizem, para isso ela os direciona através de vesículas que expressam fosfatidilserina na membrana plasmática (Poon *et al.*, 2019; Naeini *et al.*, 2020). Esse fenômeno ocorre em protozoários, talvez seja apenas um vestígio do processo de evolução, alguns especulam uma possível comunicação entre os parasitos, numa espécie de *quórum*

sensing (Pinheiro, 2015). De qualquer forma, foi observado a externalização de fosfatidilserina em promastigotas tratadas com o ditelureto nas primeiras 24 h de tratamento, sugerindo que a morte celular mediada por **TZ3C** foi regulada (Fig. 18), ao menos inicialmente. Em contrapartida, o comprometimento da geração de energia pela única mitocôndria do parasito, pode ter impedido a ação das proteínas ATP-dependentes na regulação da morte semelhante a apoptose, acarretando o descontrole das vias metabólicas, autólise e ruptura da membrana celular, num processo equitativo à necrose em células de mamíferos.

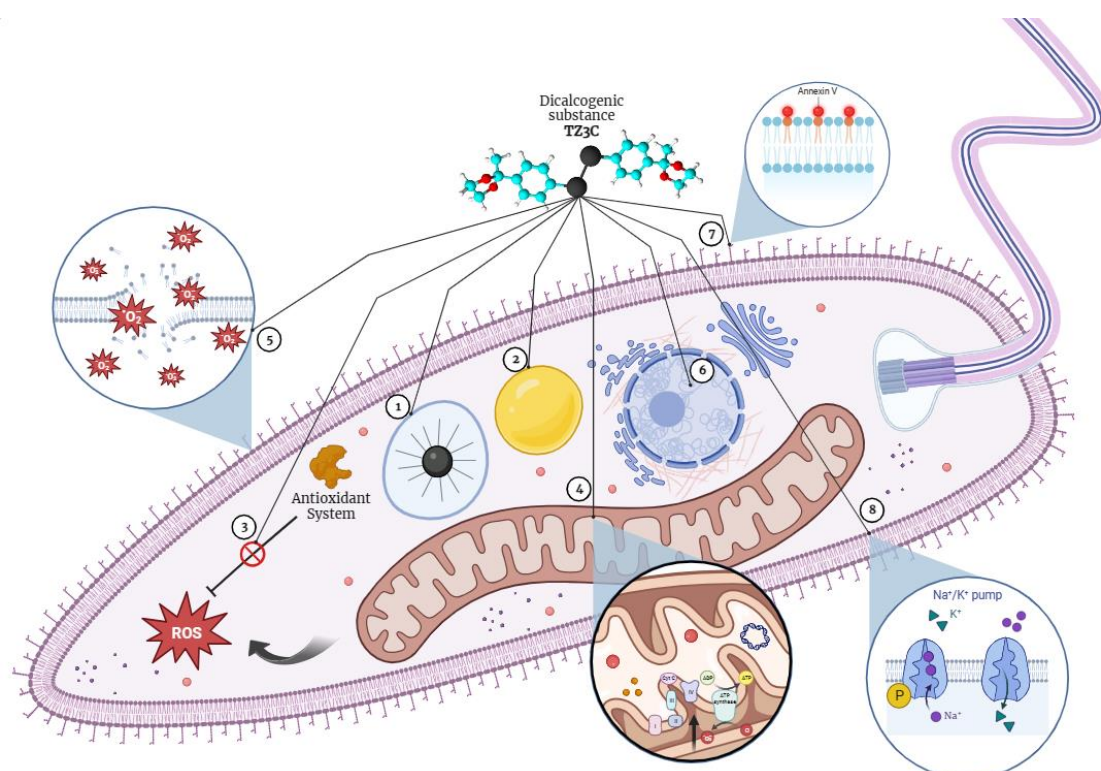


Figura 18. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da substância **TZ3C** sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. O tratamento com o ditelureto provocou a formação de inclusões citoplasmáticas: (1) vacúolos com estruturas eletrodensas irregulares e (2) gotas de gordura, o último, relacionado com o desbalanço redox, provavelmente induzido por (3) repressão do sistema antioxidante e (4) otimização da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (:ON) pela desestabilização da mitocôndria (hipopolarização, redução na produção de ATP e tumefação). O efeito oxidativo é observado na membrana citoplasmática e sistema endomembrana, através da (5) lipoperoxidação e (6) indução da parada no ciclo celular em G0/G1, talvez por lesão no DNA. O dano provocado induziu à programação da morte celular com (7) exposição de fosfatidilserina, a qual foi interrompida pelo baixo aporte energético e, conseqüentemente, levou a (8) inibição da atividade de proteínas ATP-dependentes.

TZ5D, de forma antagonista, demonstrou efeitos expressivos desde as primeiras horas de tratamento em praticamente todas as análises. Em contrapartida, o CI_{50} da substância não foi

capaz de sustentar as alterações em 72 h de tratamento para efeitos como: acúmulo de gordura intracitoplasmática, níveis intracelulares de ERO e $\cdot\text{ON}$, além de lipoperoxidação. Esse conjunto de alterações estão intimamente associados ao desbalanço oxidativo. Uma explicação plausível para esse perfil é a indução indireta desses efeitos sobre o incremento de radicais livres, *e.g.*, através de inibição enzimática. Autores relatam o perfil de ação das enzimas, descrevendo-as como catalizadores biológicos (Matés *et al.*, 1999). Essas proteínas otimizam o tempo de reação de diversas vias metabólicas ao reduzir a energia de ativação da reação no complexo enzima-substrato (Schowen, 2003). Possivelmente, o disseleneto interage de forma reversível com o sítio ativo de alguma enzima importante no metabolismo redox ou mesmo induz inibição alostérica, haja visto que após provável depuração da substância ao longo de 72 h, nota-se redução substancial dos efeitos observados na menor concentração (CI_{50}). Tomando esta hipótese como factual, pode-se julgar a fragmentação do DNA induzida pelo tratamento como resultado da ativação de vias de sinalização de morte semelhante a apoptose. Efeitos importantes, comuns a morte programada, puderam ser observados em células submetidas ao tratamento com **TZ5D** (Fig. 19): elevada exposição de fosfatidilserina; desestruturação organizada dos compartimentos celulares, como observado nas micrografias eletrônicas; surgimento de vesículas extracelulares semelhante a corpos apoptóticos. Essa via de morte, em contraste com o que foi observado em promastigotas tratadas com **TZ3C**, foi provavelmente sustentada pelo grande aporte energético, comprovado bioquimicamente.

A membrana plasmática dos tripanossomatídeos, assim como em células de mamífero, apresenta distribuição assimétrica da constituição fosfolipídica, mantida de forma ativa por *flippases* (Alonso *et al.*, 2020). Maior concentração de esfingolipídios é observado no folheto externo, enquanto o interno tem abundância em fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Dos Santos *et al.*, 2013). Contudo, os níveis citosólicos de cátions divalentes, especialmente o cálcio, tem a capacidade de modular a atividade das *scramblases*, permitindo o movimento dos fosfolipídios do folheto interno para o externo (Weingärtner *et al.*, 2011). Especulasse que a exposição dessa molécula em eucariotos menores possa ser um mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro. De fato, após reconhecimento de fosfatidilserina na membrana das partículas durante a fagocitose, as células passam a secretar fator de crescimento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$) e interleucina 10 (IL-10) (Shaha, 2006), com alteração do caráter inflamatório dos macrófagos (M1) para um perfil susceptível à infecção (M2). A polarização M2 é acompanhada de supressão da produção de óxido nítrico na célula hospedeira por inibição da síntese da enzima iNOS, o que acaba diminuindo a capacidade microbicida do macrófago e, assim, mantém um ambiente propício à replicação das formas intracelulares do protozoário.

Uma revisão de Nicotera e Orrenius (1998) descreveu o papel decisivo da mitocôndria no controle das vias de morte celular. Os autores apontam o papel dessa organela como compartimento de reserva intracitoplasmática de cálcio, cofator extremamente importante para enzimas relacionadas à apoptose. Ressaltam ainda que a perda do potencial de membrana mitocondrial está intimamente relacionada com o aumento de permeabilidade da organela, resultando em liberação de fatores mitocondriais, como cálcio e proteínas pro-apoptóticas (citocromo c). Nesse cenário, enquanto o cálcio modula a atividade de nucleases, *scramblases* e caspases (Hajnóczky *et al.*, 2003; Kumar e Chauhan, 2021); citocromo c estaria relacionado ao recrutamento das cisteíno proteases e regulação da via intrínseca de apoptose (Jiang e Wang, 2004).

Apesar de estudos demonstrarem que as caspases não são os principais efetores da apoptose em tripanossomatídeos (Martin, Gonzales e Fasel, 2014), atividade semelhante à destas enzimas já foi observada (Ambit *et al.*, 2008). Proteínas com função similar a das caspases, denominadas de forma geral como metacaspases, já foram identificadas em parasitos de gênero *Leishmania spp*, entretanto as vias pelas quais estas enzimas atuam precisam ser melhor estudadas.

Os dados em conjunto, apontam que ambas as substâncias (**TZ3C** e **TZ5D**) induziram alteração mitocondrial, a qual foi a provável mediadora da morte celular nas formas promastigotas do parasito, com destaque para o papel do íon cálcio na regulação do processo. Shaha (2006) sugere que o influxo citoplasmático lento desse íon por canais na membrana mitocondrial interna permeabilizada permite a regulação da morte celular, enquanto o fluxo drástico deste mesmo cátion seria responsável pelo descontrole das vias, o que acaba resultando em uma morte de perfil necrótico.

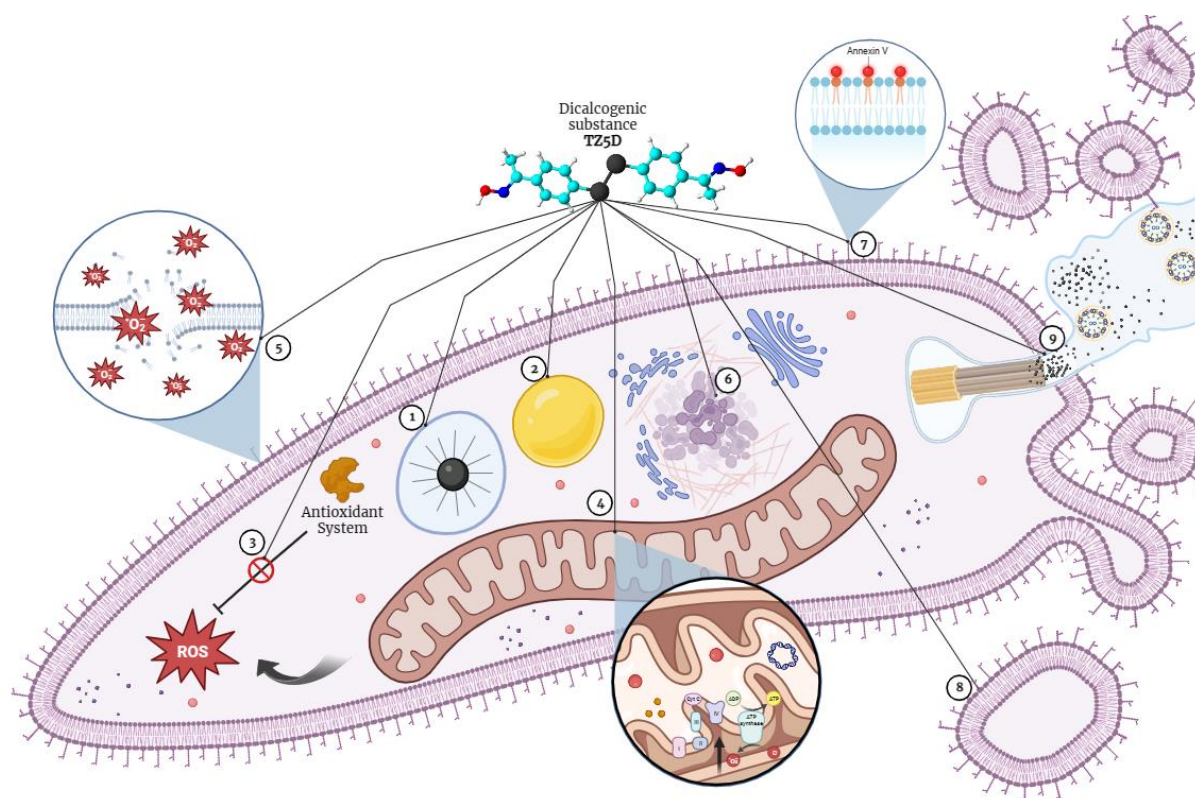


Figura 19. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da substância **TZ5D** sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. O tratamento com o disseleneto provocou a formação de inclusões citoplasmáticas: (1) vacúolos com estruturas eletrodensas irregulares e (2) gotas de gordura, o último, relacionado com o desbalanço redox, provavelmente induzido por (3) repressão do sistema antioxidante e (4) otimização da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$) por desestabilização da mitocôndria (hipopolarização, aumento na produção de ATP e tumefação). O efeito oxidativo é observado na membrana citoplasmática e sistema endomembrana, através da (5) lipoperoxidação e (6) indução de fragmentação do DNA e parada no ciclo celular em SubG0, provavelmente devido ao comprometimento do material genético. O dano provocado induziu à (7) exposição de fosfatidilserina o que revela a programação da morte celular, a qual foi sustentada pelo alto aporte energético. Foram observadas características da morte celular semelhante a apoptose nas promastigotas, como (8) formação de corpos apoptóticos e (9) desestruturação organizada de organelas.

Ambos dicalcogenetos demonstraram capacidade de inibir o crescimento das formas promastigotas, entretanto, o efeito mais notável foi a grande diferença na seletividade da substância **TZ3C** sobre as formas intracelulares do parasito. Essa propriedade, talvez, possa estar relacionada com a ativação de macrófagos. Células do sistema imune apresentam importantes mecanismos intracelulares que garantem a eliminação de invasores (Weiss *et al.*, 2015). Diversos estudos já demonstram a presença da enzima óxido nítrico sintase induzível em macrófagos (Yakovlev *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2013), isoforma não exclusiva, porém, intimamente relacionada a células imunológicas e regulada por citocinas (Xue *et al.*, 2018). Existem duas vias principais na regulação positiva de iNOS, ligação ao

receptor semelhante a Toll (do inglês, *Toll-like receptor*, TLR) e citocinas inflamatórias, *e.g.*, interferon gama (IFN- γ) (Bogdan *et al.*, 2000). Possivelmente, **TZ3C** interage com o macrófago modulando alguma dessas vias, o que resulta na expressão da enzima iNOS e, conseqüentemente, elevação nos títulos intracelulares de óxido nítrico que contribui para a atividade antiparasitária sobre as formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*. Estudos *in vitro*, demonstrando a presença da enzima iNOS, por *western blotting* por exemplo, e *in vivo*, especialmente relacionados a dosagem de citocinas inflamatórias, poderiam esclarecer melhor o mecanismo por trás da superior seletividade do ditelureto por parasitos intracelulares.

5. CONCLUSÃO

Os dicalcogenetos avaliados demonstraram ampla atividade anti-*Leishmania* e com certa seletividade, características necessárias para a quimioterapia das leishmanioses.

Os dados obtidos, em conjunto, apontam que o principal mecanismo de morte em promastigotas de *L. (L.) infantum* mediado pela exposição a **TZ3C** é a necrose, através do comprometimento do metabolismo redox e conseqüente interrupção dos processos ATP-dependentes, enquanto **TZ5D**, possivelmente, induz morte programada. Estudos mais aprofundados acerca da inibição enzimática precisam ser realizados para demonstrar efetivamente a capacidade inibitória sobre essas proteínas.

6. REFERÊNCIAS

ALBECK, Amnon *et al.* Tellurium compounds: selective inhibition of cysteine proteases and model reaction with thiols. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 1704-1712, 1998.

ALCÂNTARA, Laura M. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. International Journal for Parasitology: **Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430-439, 2018.

ALONSO, Lais *et al.* Analysis of the interactions of amphotericin B with the leishmania plasma membrane using EPR spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 45, p. 10157-10165, 2020.

ALONSO, Lais *et al.* Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183473, 2021.

AMBIT, A. *et al.* An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.

AMBIT, Audrey *et al.* Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429-1438, 2011.

AMES, Bruce N.; SHIGENAGA, Mark K.; GOLD, L. Swirsky. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. suppl 5, p. 35-44, 1993.

ANDRADE NETO, Valter Viana *et al.* Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. 2018.

ANDRADE, Adriana *et al.* iPLA2 β -Null Mice Show HCC Protection by an Induction of Cell-Cycle Arrest after Diethylnitrosamine Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 13760, 2022.

ANDRADE, PRISCILA M. *et al.* Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez.(Lauraceae Juss.). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 2671-2678, 2018.

ARAÚJO, Iasmin Aparecida Cunha *et al.* In vitro efficacy of isoflavonoids and terpenes against *Leishmania (Leishmania) infantum* and *L. amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 242, p. 108383, 2022.

ARONSON, Naomi E.; JOYA, Christie A. Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.

BAHMANI, Mahmoud *et al.* Leishmaniasis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 695-701, 2015.

BAHRAMI, S. *et al.* In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of *Leishmania tropica*. **Trop Biomed**, v. 28, n. 2, p. 411-417, 2011.

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.

BANDEIRA, Pamela T. *et al.* Diacetal ditellurides as highly active and selective antiparasitic agents toward *Leishmania amazonensis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 5, p. 806-810, 2019.

BAQUEDANO, Ylenia *et al.* Novel heteroaryl selenocyanates and diselenides as potent antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3802-3812, 2016.

BASMACIYAN, Louise; AZAS, Nadine; CASANOVA, Magali. Different apoptosis pathways in *Leishmania* parasites. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 90, 2018.

- BASMACIYAN, Louise; CASANOVA, Magali. Cell death in *Leishmania*. **Parasite**, v. 26, 2019.
- BERMUDEZ, José *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.
- BERMÚDEZ, Roldán *et al.* Characterization of mitochondrial electron-transfer in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 43-54, 1997.
- BERTRAM, Richard *et al.* A simplified model for mitochondrial ATP production. **Journal of Theoretical Biology**, v. 243, n. 4, p. 575-586, 2006.
- BERZELIUS, Jöns Jacob. Lärbok i kemien. 6 vols. **Stockholm: Nordström**, 1817.
- BIDÓIA, Danielle Lazarin. Avaliação do mecanismo de ação in vitro e dos efeitos biológicos in vivo induzido pelas dibenzilidenoacetonas A3K2A1 e A3K2A3 em *Trypanosoma cruzi*. 2015.
- BLEYS, Joachim; NAVAS-ACIEN, Ana; GUALLAR, Eliseo. Serum selenium and diabetes in US adults. **Diabetes Care**, v. 30, n. 4, p. 829-834, 2007.
- BOGDAN, Christian; RÖLLINGHOFF, Martin; DIEFENBACH, Andreas. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000.
- BRITTA, Elizandra Aparecida *et al.* 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces mitochondrial alterations in epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 142, n. 7, p. 978-988, 2015.
- CALIRI, Andrew W.; TOMMASI, Stella; BESARATINIA, Ahmad. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 787, p. 108365, 2021.
- CASTRO, Helena *et al.* Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1552-1562, 2002.
- CASTRO, Helena *et al.* Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1552-1562, 2002.
- CECÍLIO, Pedro; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; OLIVEIRA, Fabiano. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.
- CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). Treatment. 2022.
- CESTARI, Igor *et al.* Chemogenetic characterization of inositol phosphate metabolic pathway reveals druggable enzymes for targeting kinetoplastid parasites. **Cell chemical biology**, v. 23, n. 5, p. 608-617, 2016.

CHACÓN-VARGAS, Karla Fabiola *et al.* Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer and *Poliomintha longiflora* Gray) Essential Oils Induce Cell Death by Apoptosis in *Leishmania (Leishmania) mexicana* Promastigotes. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5183, 2022.

CHAO, María N. *et al.* Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6435-6449, 2017.

CHAO, María N. *et al.* Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6435-6449, 2017.

CHEN, Jiajun *et al.* Characterization of effects of chitoooligosaccharide monomer addition on immunomodulatory activity in macrophages. **Food Research International**, v. 163, p. 112268, 2023.

CHINOPOULOS, C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. **FEBS Letters**, v. 585, n. 9, p. 1255-1259, 2011.

COJEAN, Sandrine *et al.* *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 704, 2012.

COPELAND, Nathaniel K.; ARONSON, Naomi E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 426-437, 2015.

CORRAL, María J. *et al.* Allicin induces calcium and mitochondrial dysregulation causing necrotic death in *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004525, 2016.

COSTA, Mônica Soares *et al.* Increased ROS generation causes apoptosis-like death: mechanistic insights into the anti-*Leishmania* activity of a potent ruthenium (II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 1-12, 2019.

CURTIN, John M.; ARONSON, Naomi E. Leishmaniasis in the United States: emerging issues in a region of low endemicity. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 578, 2021.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.

DAS, Manika; MUKHERJEE, Sikha Bettina; SHAHA, Chandrima. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 13, p. 2461-2469, 2001.

DE SOUZA, Myla Lobo *et al.* Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Development Research**, v. 81, n. 7, p. 803-814, 2020.

DERAY, Gilbert. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 37-41, 2002.

DÖRR, Inge. How *Striga* parasitizes its host: a TEM and SEM study. **Annals of Botany**, v. 79, n. 5, p. 463-472, 1997.

DOS SANTOS JÚNIOR, Renato Brito *et al.* ANÁLISE ESPACIAL DA MORTALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL (2012-2019): UM ESTUDO ECOLÓGICO. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103509, 2023.

DOS SANTOS, Marcos Gonzaga *et al.* Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55604, 2013.

DOS SANTOS, Marcos Gonzaga *et al.* Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55604, 2013.

DUMAS, Carole *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2590-2598, 1997.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ENARI, Masato *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.

ESSID, Rym *et al.* Synergistic combination of *Cinnamomum verum* and *Syzygium aromaticum* treatment for cutaneous leishmaniasis and investigation of their molecular mechanism of action. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-15, 2023.

FERNANDES, Cassia Cristina *et al.* First report on chemical composition and biological properties of volatile oil from *Psidium firmum* O. Berg leaves. **Química Nova**, v. 44, p. 570-574, 2021.

FRANKE, Eileen D. *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 12, p. 934-940, 1990.

GARCIA, Francielle Pelegrin *et al.* A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, p. 57-71, 2017.

GARZA-GARCÍA, Jorge JO *et al.* The role of selenium nanoparticles in agriculture and food technology. **Biological Trace Element Research**, p. 1-21, 2021.

GHATEE, Mohammad Amin; TAYLOR, Walter R.; KARAMIAN, Mehdi. The geographical distribution of cutaneous leishmaniasis causative agents in Iran and its neighboring countries, a review. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 11, 2020.

GHOSH, Sanhita *et al.* Leishmaniasis: Tissue tropism in relation to the species diversity. In: **Pathobiology of Parasitic Protozoa: Dynamics and Dimensions**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 133-153.

GOMES, Daniel Claudio Oliveira *et al.* Intranasal immunization with chitosan microparticles enhances LACK-DNA vaccine protection and induces specific long-lasting immunity against visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 24, n. 2, p. 104884, 2022.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status?. **Parasitology Today**, v. 10, n. 7, p. 264-267, 1994.

GUNDERSEN, K. The formation and utilization of reducing power in aerobic chemoautotrophic bacteria. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 8, n. 5, p. 445-457, 1968.

HAJNÓCZKY, György; DAVIES, Erika; MADESH, Muniswamy. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 304, n. 3, p. 445-454, 2003.

HALPERIN-SHEINFELD, Meital *et al.* The Tellurium compound, AS101, increases SIRT1 level and activity and prevents type 2 diabetes. **Aging** (Albany NY), v. 4, n. 6, p. 436, 2012.

HAMDAN, Hamdan Z.; HAMDAN, Sumaia Zaki; ADAM, Ishag. Association of selenium levels with gestational diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 3941, 2022.

HATFIELD, Dolph L.; BERRY, Marla J.; GLADYSHEV, Vadim N. (Ed.). Selenium: its molecular biology and role in human health. **Springer Science & Business Media**, 2011.

HENNE, W. M.; REESE, M. L.; GOODMAN, J. M. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 12, e98947, 2018.

HENRIQUEZ-FIGUERO, Andreina *et al.* Small molecules containing chalcogen elements (S, Se, Te) as new warhead to fight neglected tropical diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 115002, 2023.

HOCKENBERY, David. Defining apoptosis. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 16, 1995.

[http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/50/manual-leishmaniose-\[50-151009-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/50/manual-leishmaniose-[50-151009-SES-MT].pdf)>. Acesso em: 22 fev, 2023.

HUANG, Min-Fu N. *et al.* Synthesis, in silico Study and Antileishmanial Evaluation of New Selenides Derived from 7-Chloro-quinoline and N-Phenylacetamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 712-721, 2021.

IWAOKA, Michio; ARAI, Kenta. From sulfur to selenium. A new research arena in chemical biology and biological chemistry. **Current Chemical Biology**, v. 7, n. 1, p. 2-24, 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.

JIANG, Xuejun; WANG, Xiaodong. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 87-106, 2004.

KASHIF, Mohammad *et al.* Screening of novel inhibitors against *Leishmania donovani* calcium ion channel to fight leishmaniasis. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 17, n. 2, p. 120-129, 2017.

KATHURIA, Manoj *et al.* Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by orally active clerodane diterpene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916-5928, 2014.

KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual review of physiology**, v. 60, n. 1, p. 601-617, 1998.

KISHORE, K. *et al.* Vector control in leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 467, 2006.

KOSARI, Neda *et al.* Dracocephalum kotschy Boiss. In Vitro Efficacy on Growth and Apoptosis Induction in *Leishmania major* Promastigotes. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

KUMAR, Vinod; CHAUHAN, Shyam S. Daidzein induces intrinsic pathway of apoptosis along with ER α/β ratio alteration and ROS production. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 22, n. 2, p. 603, 2021.

KUMOSANI, Taha A. *et al.* Leishmaniasis prevalence, awareness and control in Saudi Arabia. **African Health Sciences**, v. 22, n. 3, p. 640-647, 2022.

LAGE, Daniela P. *et al.* A recombinant chimeric protein-based vaccine containing T-cell epitopes from amastigote proteins and combined with distinct adjuvants, induces immunogenicity and protection against *Leishmania infantum* infection. **Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1146, 2022.

Lajevardi, Mahya Sadat, *et al.* "*Leishmania tarentolae* as potential live vaccine co-expressing distinct salivary gland proteins against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice model." **Frontiers in Immunology** 13 (2022): 895234.

LAZARI, P. Manual de Vigilância e Controle das Leishmanioses. 2007. Disponível em: <<http://>

LÓPEZ-ARENCIBIA, Atteneri *et al.* Discovery of new chemical tools against *Leishmania amazonensis* via the MMV pathogen box. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1219, 2021.

LUN, Zhao-Rong *et al.* Visceral leishmaniasis in China: an endemic disease under control. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 987-1004, 2015.

MACHADO, Paulo RL *et al.* A double-blind, randomized trial to evaluate Miltefosine and topical granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e2465-e2469, 2021.

MACHADO, R. R. B. EFEITO BIOLÓGICO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO (ACET-1) EM *Leishmania amazonensis*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS. Defesa de mestrado, UEM, Maringá-PR, 2021.

MACIEL, Lucas Tobias Rodrigues *et al.* Effect of serial photodynamic therapy with curcumin on *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e219101119544-e219101119544, 2021.

MAEDA, Kota *et al.* Hepatomegaly Associated with Non-Obstructive Sinusoidal Dilation in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1356, 2021.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J. H. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. **Experimental Parasitology**, v. 106, n. 3-4, p. 158-163, 2004.

MANCINI, Antonio *et al.* Evaluation of oxidative stress effects on different macromolecules in adult growth hormone deficiency. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0236357, 2020.

MAO, Kairui *et al.* Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Cell Research**, v. 23, n. 2, p. 201-212, 2013.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARTIN, Ricardo; GONZALEZ, Iveth; FASEL, Nicolas. *Leishmania* metacaspase: an arginine-specific peptidase. **Caspases, Paracaspases, and Metacaspases: Methods and Protocols**, p. 189-202, 2014.

MARTÍN-ESCOLANO, Rubén *et al.* Library of selenocyanate and diselenide derivatives as in vivo antichagasic compounds targeting *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 419, 2021.

MARTÍN-ESCOLANO, Rubén *et al.* Selenium derivatives as promising therapy for chagas disease: in vitro and in vivo studies. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1727-1738, 2021.

MARTINEZ-SOTILLO, Nathalia *et al.* Antiproliferative effect of a benzofuran derivate based on the structure of amiodarone on *Leishmania donovani* affecting mitochondria, acidocalcisomes and intracellular Ca²⁺ homeostasis. **Parasitology international**, v. 70, p. 112-117, 2019.

MATÉS, José M.; PÉREZ-GÓMEZ, Cristina; DE CASTRO, Ignacio Núñez. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MATOBA, Alice; WEIKERT, Mitchell P.; KIM, Stella. Corneal manifestations of miltefosine toxicity in *Acanthamoeba keratitis*. **Ophthalmology**, v. 128, n. 9, p. 1273, 2021.

MEADE, John C. P-type transport ATPases in *Leishmania* and *Trypanosoma*. **Parasite**, v. 26, 2019.

MEINEL, Raissa Soares *et al.* Novel functionalized 1, 2, 3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 108850, 2020.

MELCON-FERNANDEZ, Estela *et al.* Miltefosine and Nifuratel Combination: A Promising Therapy for the Treatment of *Leishmania donovani* Visceral Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1635, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar. Tratamento. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral. Tratamento. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota informativa Nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS. 2020.

MIRANDA, Nathielle *et al.* The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 342-354, 2017.

MISHRA, Bibhuti B. *et al.* Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . **Nature immunology**, v. 14, n. 1, p. 52-60, 2013.

MISHRA, Jyotsna; SAXENA, Anubha; SINGH, Sarman. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MONDIALE DE LA SANTÉ, Organisation *et al.* Weekly Epidemiological Record, 2022, vol. 97, 49 [full issue]. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 97, n. 49, p. 633-644, 2022.

MONGE-MAILLO, Begoña; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-1404, 2015.

MÜLLER VON REICHENSTEIN, Franz Joseph. Versuche mit dem in der Grube Mariahilf in dem Gebirge Fazeby bey Zalathna vorkommenden vermeinten gediegenen Spiesglangkönig. **Physikalische Arbeiten der Einträchtigen Freunde in Wien**, v. 1, p. 63-69, 1783.

MURPHY, Denis J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

NAEINI, Mehri Bemani *et al.* The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2020.

NICOTERA, Pierluigi; ORRENIUS, Sten. The role of calcium in apoptosis. **Cell calcium**, v. 23, n. 2-3, p. 173-180, 1998.

OLIVEIRA, Flávio Augusto de Souza *et al.* Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from Piper tuberculatum Jacq fruits. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 382-386, 2018.

- OLIVEIRA, Francisco Jde A.; CECCHINI, Rubens. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1067-1072, 2000.
- OLIVEIRA, Janaina Michelle de *et al.* Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 188-193, 2010.
- OTTINO, Jennifer *et al.* Nanoformulations with *Leishmania braziliensis* antigens triggered controlled parasite burden in vaccinated golden hamster (*Mesocricetus auratus*) against visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 10, n. 11, p. 1848, 2022.
- PAL, Rohit; TELI, Ghanshyam; MATADA, Gurubasavaraja Swamy Purawarga. The role of natural anti-parasitic guided development of synthetic drugs for leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 115609, 2023.
- PARIS, Caroline *et al.* Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.
- PASTORINO, Antonio C. *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 2, p. 120-7, 2002.
- PAUL, Anindita; SINGH, Sushma. Visceral leishmaniasis in the COVID-19 pandemic era. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 117, n. 2, p. 67-71, 2023.
- PERRY, S. W. *et al.* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **BioTechniques**, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.
- PESSOA, M. J. G. *et al.* Structural and histochemical attributes of secretory ducts and cavities in leaves of four species of Calophyllaceae J. Agardh in Amazonian savannas. **Plant Biology**, v. 23, n. 6, p. 1128-1140, 2021.
- PINHEIRO, Alessandra Campbell; DE SOUZA, Marcus Vinícius Nora. Current leishmaniasis drug discovery. **RSC Medicinal Chemistry**, 2022.
- PINHEIRO, Liliane Sena. Análise de evidências de comunicação quorum sensing mediada pelo isoprenóide farnesol em *Leishmania amazonensis*. 2015.
- POON, Ivan KH *et al.* Moving beyond size and phosphatidylserine exposure: evidence for a diversity of apoptotic cell-derived extracellular vesicles in vitro. **Journal of extracellular vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1608786, 2019.
- PROTO, William R.; COOMBS, Graham H.; MOTTRAM, Jeremy C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 58-66, 2013.
- QUEIROZ, Salete Linhares; BATISTA, Alzir Azevedo. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, p. 584-590, 1999.
- RAINA, Puneet; KAUR, Sukhbir. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 359, p. 135-149, 2012.

- RASHAD, Muhammad; ZAIDI, Syed Danish Ali; ASIF, Muhammad. Debating the magnesium–selenium battery technology. **Journal of Magnesium and Alloys**, v. 8, n. 4, p. 980-988, 2020.
- REIMANN, Mayra M. *et al.* Oral and intragastric: new routes of infection by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*?. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 688, 2022.
- ROMÃO, P. R. T. *et al.* Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania spp.* against nitrosothiol-induced cytotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 355-363, 2006.
- ROSENBLAT, Mira *et al.* Nitro-oleic acid reduces J774A. 1 macrophage oxidative status and triglyceride mass: involvement of paraoxonase2 and triglyceride metabolizing enzymes. **Lipids**, v. 51, p. 941-953, 2016.
- SANSOM, Fiona M. *et al.* *Leishmania major* methionine sulfoxide reductase A is required for resistance to oxidative stress and efficient replication in macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56064, 2013.
- SANTI, Ana Maria Murta; MURTA, Silvane Maria Fonseca. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210401, 2022.
- SANTI, Ana Maria Murta; MURTA, Silvane Maria Fonseca. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210401, 2022.
- SASIDHARAN, Santanu; SAUDAGAR, Prakash. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Research**, v. 120, p. 1541-1554, 2021.
- SCHOWEN, Richard L. How an enzyme surmounts the activation energy barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 11931-11932, 2003.
- SEBBAGH M., *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. **Nat Cell Biol.** 3:346–52, 2001.
- SEIFERT, Karin *et al.* Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 4, p. 380-387, 2003.
- SEKHON, B. S. Metalloid compounds as drugs. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 145, 2013.
- SHAHA, Chandrima. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233, 2006.
- SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S17-S20, 2006.

SKOU, Jens Christian; ESMANN, Mikael. The Na⁺, K⁺-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, p. 249-261, 1992.

SORENSEN, Christine M.; BARRY, Michael A.; EASTMAN, Alan. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 9, p. 749-755, 1990.

SREDNI, Benjamin. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, p. 60-69. 2012.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267-4277, 2010.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-794, 2008.

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, p. e000709, 2018.

SURAWEEERA, Chathura D. *et al.* Metazoans and intrinsic apoptosis: an evolutionary analysis of the Bcl-2 family. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3691, 2022.

TOMÁS, Ana M.; CASTRO, Helena. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 696-707, 2013.

TONNUS, Wulf *et al.* The pathological features of regulated necrosis. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 697-707, 2019.

TURCANO, Lorenzo *et al.* Identification and binding mode of a novel *Leishmania* trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006969, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Abordagem e tratamento da leishmaniose tegumentar Americana na Antecâmara Básica. Telesaúde, Santa Catarina, Brasil, 2017. Disponível em:
<file:///C:/Users/RianR/OneDrive/Documentos/MESTRADO/LABORAT%20C3%93RIO/CEL SO/PROJETO-DISSERTA%20C3%87%20C3%83O_MESTRADO/ARTIGOS,%20GUIDELINES%20e%20OUTROS/GUIDELINES/Apostila_Leishmaniose%20Teg%20Amer_N%20C3%93Acleo%20Telessa%20C3%93Ade%20SC%20UFSC.pdf> Acesso em: 29 jan, 2023.

VARMA, Neelam; NASEEM, Shano. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, p. 78-82, 2010.

VIEIRA, Lita; SLOTKI, Itzhak; CABANTCHIK, Z. Ioav. Chloride Conductive Pathways Which Support Electrogenic H⁺ Pumping by *Leishmania major* Promastigotes (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5299-5304, 1995.

VISHWAKARMA, Preeti *et al.* Ammonium trichloro [1, 2-ethanediolato-O, O']-tellurate cures experimental visceral leishmaniasis by redox modulation of *Leishmania donovani*

trypanothione reductase and inhibiting host integrin linked PI3K/Akt pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, p. 563-588, 2018.

WALOCHNIK, Julia *et al.* Anti-Acanthamoeba efficacy and toxicity of miltefosine in an organotypic skin equivalent. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 64, n. 3, p. 539-545, 2009.

WANG, W. H.; GEIBEL, J. O. H. N.; GIEBISCH, GERHARD. Mechanism of apical K⁺ channel modulation in principal renal tubule cells. Effect of inhibition of basolateral Na⁺-K⁺-ATPase. **The Journal of General Physiology**, v. 101, n. 5, p. 673-694, 1993.

WEINGÄRTNER, Adrien *et al.* Ca²⁺-activated transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in *Leishmania donovani* during ionomycin or thapsigargin stimulation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 179, n. 2, p. 59-68, 2011.

WEISS, Günter; SCHAIBLE, Ulrich E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

Wiberg, E.; Wiberg, N. *Inorganic Chemistry*, 1st ed.; Gruyter: Academic Press, Berlin, New York, 2001; pp. 470–597.

WIDMER, Fred *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.

WILSON, Mary E.; ANDERSEN, Kurt A.; BRITIGAN, Bradley E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5133-5141, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Executive Summary of Results Report, Programme budget 2020–2021. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leshmaniasis. 2022.

WYLLIE, A. H. *et al.* Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. **The Journal of Pathology**, v. 142, n. 1, p. 67-77, 1984.

XIN, Wang *et al.* Study on the Application of Photoelectric Technology in the Synthesis of Selenium-Containing Heterocycles. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 4588, 2021.

XUE, Qingjie *et al.* Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3805, 2018.

YAKOVLEV, Vasily A. *et al.* Tyrosine nitration of I κ B α : a novel mechanism for NF- κ B activation. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11671-11683, 2007.

ZAHIR, Abdul Abduz *et al.* Synthesis of nanoparticles using Euphorbia prostrata extract reveals a shift from apoptosis to G0/G1 arrest in *Leishmania donovani*. 2014.

ZAMARAEVA, M. V. *et al.* Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1390–1397, 2005.

ZOROVA, L. D. *et. al.* Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50-59, 2018.