

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PATRÍCIA FERREIRA ESPURI SEPINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE
PENTAMIDINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

ALFENAS/MG

2024

PATRÍCIA FERREIRA ESPURI SEPINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE
PENTAMIDINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa: Microbiologia e Parasitologia Aplicadas às Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso.

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Sepini, Patrícia Ferreira Espuri.

Avaliação da atividade e do mecanismo de ação de derivados de pentamidina em diferentes espécies de *Leishmania* / Patrícia Ferreira Espuri Sepini. - Alfenas, MG, 2024.

117 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Atividade leishmanicida.. 2. Mecanismo de Ação.. 3. Derivados da Pentamidina. I. Marques, Marcos José, orient. II. Título.

PATRICIA FERREIRA ESPURI SEPINI

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE PENTAMIDINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 16 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Marcos José Marques
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Letícia de Almeida
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Rosymar Coutinho de Lucas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2024, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1413735** e o código CRC **C90BC4BD**.

Dedico este trabalho à minha filha Laura, que é minha fonte de inspiração e alegria diária; e ao meu esposo Tobias, meu apoio constante, sem o qual nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria e força que me guiou em cada passo dessa jornada, por me dar coragem nos momentos de dúvida e por me sustentar nos períodos mais desafiadores. Agradeço especialmente pelo auxílio nos obstáculos impostos pela pandemia, pela maternidade e por tantos outros momentos difíceis. Te agradeço, também, pelo consolo diante da dor da perda de minha amada avó Veneranda, que foi mais que uma mãe para mim. Sua sabedoria, amor e presença foram pilares essenciais em minha vida, e mesmo em sua ausência física, sinto sua orientação e força em meu coração. Em tudo o que fiz, ela esteve presente, me inspirando a seguir em frente com fé, coragem e amor.

Ao meu orientador, Marcos, pela orientação paciente, pelas valiosas contribuições e pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos. Seu apoio foi essencial para a realização desta tese.

Ao meu coorientador, Eduardo, cuja presença foi fundamental em todos os aspectos. Seu compromisso, dedicação e generosidade com o conhecimento fizeram toda a diferença nesta caminhada. Agradeço imensamente por seu cuidado e por estar sempre disposto a ajudar, mesmo em momentos de licença saúde.

À minha filha Laura, fonte de inspiração e alegria incansável. Você é o meu maior presente, e cada dia ao seu lado é uma nova motivação para alcançar meus sonhos. Seu sorriso ilumina meu caminho e me lembra da beleza da vida, mesmo nas horas mais desafiadoras.

Ao meu esposo Tobias, que tem sido meu apoio incondicional, meu parceiro e meu porto seguro. Sua paciência, amor e compreensão transformaram cada obstáculo em uma experiência de aprendizado e crescimento. Junto de ti sou mais forte, e não há conquista maior do que caminhar ao seu lado.

Aos meus colegas de trabalho, em especial ao Thalles, pelo companheirismo, pelas trocas de ideias, parcerias nos ensaios e pela amizade.

À minha amiga Juliana, pelo apoio constante, pela amizade verdadeira. Nossas conversas e momentos compartilhados foram fundamentais para que eu seguisse em frente com mais confiança.

Ao meu pai, Antônio, pela confiança, pelo amor e por ser minha maior inspiração. Sua força e dedicação sempre foram a base para eu acreditar em meus próprios sonhos. Tudo que sou hoje é graças à sua garra, à sua sabedoria e ao

exemplo de homem e pai que você é.

À minha mãe Irmantina, cuja presença, mesmo ausente, é minha maior inspiração. Você é minha estrela guia, meu anjo, minha força. Cada conquista que celebro é, em grande parte, fruto do legado que me deixou. Sempre em meu coração, para sempre minha luz.

À minha irmã Priscilla e aos meus sobrinhos afilhados, Gabriel e Sophia, por estarem sempre ao meu lado com carinho e apoio. A alegria e o amor que vocês me proporcionam todos os dias são fontes constantes de motivação.

À Anicler, pelo apoio incondicional, pelo cuidado e pela presença acolhedora que sempre me trouxe conforto em momentos de necessidade.

À minha sogra Eugênia, pelo carinho, pelo apoio e por sempre demonstrar afeto e compreensão em todos os momentos.

A Isabela, Pedro e Gabriel, por cada gesto de carinho e por estarem presentes de forma tão especial em minha vida, tornando nossos momentos mais leve e feliz.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG e ao Departamento de Parasitologia. Agradeço pela oportunidade de aprendizado e crescimento intelectual, pelo suporte contínuo e pelas valiosas experiências proporcionadas ao longo do doutoramento. Meu reconhecimento a todos os professores, colaboradores e colegas que contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

A todos, minha eterna gratidão. Sem cada um de vocês, essa conquista não teria sido possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Aperfeiçoamento 001.

RESUMO

A leishmaniose abrange doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo um problema global de saúde pública. A quimioterapia é o principal tratamento, mas apresenta alta toxicidade, custo elevado, efeitos colaterais e resistência parasitária, destacando a necessidade de novas opções terapêuticas. A pentamidina, embora eficaz, é altamente tóxica, o que motiva a busca por derivados com menor toxicidade. Este estudo avaliou a atividade leishmanicida dos derivados de pentamidina (PQM 250 a PQM 262) em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* e sua toxicidade em macrófagos de mamíferos. Além disso, foi investigado o mecanismo de ação dos compostos promissores, focando na bioenergética mitocondrial pelo potencial de membrana mitocondrial e produção de ATP, estresse oxidativo pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), NADPH e atividade da tripanotona redutase (TryR), além de apoptose, estudos *in sílico* e *in vivo*. Os compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 mostraram atividade significativa contra formas promastigotas e amastigotas nas duas espécies estudadas e com menor toxicidade, sendo selecionados para estudos de mecanismo de ação. Os resultados com *Leishmania (L.) amazonensis* mostraram que a pentamidina e o PQM 254 causaram despolarização mitocondrial (10,9 e 10,44%, respectivamente) enquanto o PQM 261 induziu hiperpolarização (13,16%). O PQM 261 também aumentou a produção de ATP e NADPH (32 e 18,35%, respectivamente), enquanto a pentamidina reduziu esses parâmetros (73 e 35,86%, respectivamente), além da redução na produção de H_2O_2 (37,9%) e promoveu apoptose. O PQM 250 aumentou a produção de H_2O_2 e NADPH (18,9 e 14,89%, respectivamente), inibindo a TryR em 21%, provocando assim desequilíbrio redox. PQM 254 reduziu a produção de H_2O_2 em 41,7%, mas inibiu a TryR em 13,38%, prejudicando a homeostase redox. Já com relação a *Leishmania (L.) infantum chagasi*, os resultados preliminares mostram que os compostos PQM 254 e PQM 261 promoveu aumento de 211,3% e 311,3% na concentração de H_2O_2 , respectivamente, e que apenas o composto PQM 254 apresentou uma redução significativa de 21,6% nas taxas de NADPH em comparação com o grupo controle. Diante os ensaios *in vivo*, a qPCR demonstrou que com compostos PQM 250 e 254 reduziram significativamente a carga parasitária do fígado e baço dos animais em relação ao grupo controle. Os dados sugerem que

derivados da pentamidina mostram-se promissores no desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a leishmaniose ao interferirem em mecanismos críticos relacionados à sobrevivência do parasita. Este estudo oferece contribuições valiosas sobre as vias metabólicas nas quais os compostos afetam, proporcionando uma base importante para futuras abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida; Mecanismo de Ação; Derivados da Pentamidina.

ABSTRACT

Leishmaniasis includes diseases caused by more than 20 species of protozoa of the genus *Leishmania*, and is a global public health problem. Chemotherapy is the main treatment, but it has high toxicity, high cost, side effects and parasite resistance, highlighting the need for new therapeutic options. Pentamidine, although effective, is highly toxic, which motivates the search for derivatives with lower toxicity. This study evaluated the leishmanicidal activity of pentamidine derivatives (PQM 250 to PQM 262) in *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum chagasi* and their toxicity in mammalian macrophages. In addition, the mechanism of action of the promising compounds was investigated, focusing on mitochondrial bioenergetics through mitochondrial membrane potential and ATP production, oxidative stress through the production of hydrogen peroxide production (H_2O_2), NADPH and trypanothione reductase (TryR) activity, as well as apoptosis, *in silico* and *in vivo* studies. The compounds PQM 250, PQM 254 and PQM 261 showed significant activity against promastigote and amastigote forms in the two species studied and with lower toxicity, being selected for mechanism of action studies. The results with *Leishmania (L.) amazonensis* showed that pentamidine and PQM 254 caused mitochondrial depolarization (10.9 and 10.44%, respectively) while PQM 261 induced hyperpolarization (13.16%). PQM 261 also increased ATP and NADPH production (32 and 18.35%, respectively), while pentamidine reduced these parameters (73 and 35.86%, respectively), as well as reducing H_2O_2 production (37.9%) and promoting apoptosis. PQM 250 increased H_2O_2 and NADPH production (18.9 and 14.89%, respectively), inhibiting TryR by 21%, thus causing a redox imbalance. PQM 254 reduced H_2O_2 production by 41.7%, but inhibited TryR by 13.38%, impairing redox homeostasis. With regard to *Leishmania (L.) infantum chagasi*, the preliminary results show that the compounds PQM 254 and PQM 261 promoted an increase of 211.3% and 311.3% in the concentration of H_2O_2 , respectively, and that only the compound PQM 254 showed a significant reduction of 21.6% in NADPH rates compared to the control group. In the *in vivo* tests, qPCR showed that the PQM 250 and 254 compounds significantly reduced the parasite load in the liver and spleen of the animals compared to the control group. The data suggest that pentamidine derivatives show promise in the development of more effective therapies against *Leishmaniasis* by interfering with critical mechanisms related to the parasite's

survival. This study offers valuable insights into the metabolic pathways on which the compounds affect, providing an important basis for future therapeutic approaches.

Keywords: Leishmanicidal Activity; Mechanism of Action; Pentamidine Derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Principais formas evolutivas de <i>Leishmania spp.</i>	24
Figura 2-	Esquema ilustrativo das principais formas evolutivas de <i>Leishmania spp.</i>	25
Figura 3-	Ciclo evolutivo de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	26
Figura 4-	Molécula do fármaco pentamidina.....	34
Figura 5-	Planejamento estrutural de uma nova série de derivados da pentamidina planejados como candidato a fármacos antiparasitário.....	38
Figura 6-	Curva de proliferação das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	63
Figura 7-	Curva de proliferação das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	64
Figura 8-	Mapa de calor dos resultados da atividade da pentamidina e seus.....	67
Figura 9-	Avaliação da bioenergética mitocondrial através do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) e produção de ATP em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.....	71
Figura 10-	Avaliação da produção de H ₂ O ₂ , NADPH e atividade da TryR em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação	74
Figura 11-	Avaliação da atividade da TryR em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.....	76
Figura 12-	Análise comparativa por citometria de fluxo do percentual de apoptose em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.	78
Figura 13-	Mapa de calor dos resultados da atividade da pentamidina e seus derivados contra promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> , nas fases <i>lag</i> e <i>log</i> da curva de proliferação, tratadas durante 24, 48 e 72 horas.	81
Figura 14-	Determinação da liberação de H ₂ O ₂ em promastigotas de <i>Leishmania (L.)</i>	

<i>infantum chagasi</i> na fase <i>log</i> da curva de proliferação tratadas ou não (controle) com pentamidina e seus derivados (PQM 250, PQM 254 e PQM 261) por 72 horas.	84
Figura 15- Avaliação da produção de NADPH em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> na fase <i>log</i> da curva de proliferação tratadas ou não (controle) com pentamidina e seus derivados (PQM 250, PQM 254 e PQM 261) por 72 horas.	86
Figura 16- Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de baço e fígado de hamsters infectados com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Delineamento experimental do estudo.	41
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos dos ensaios <i>in vivo</i>	51
Tabela 2- Valores de LogP da pentamidina e seus derivados.....	54
Tabela 3- Previsões ADMET dos compostos derivados da pentamidina comparados com os fármacos de referência pentamidina e glucantime®.	55
Tabela 4- Regra dos 5 de <i>Lipinski</i>	56
Tabela 5- Identificação PDB dos organismos para modelagem de acordo com as proteínas específicas.....	58
Tabela 6- Função de avaliação (<i>score function</i>) do <i>docking</i> molecular dos derivados da pentamidina com diferentes proteínas.	59
Tabela 7- Relação dos compostos promissores com o <i>docking</i> molecular, mostrando a melhor qualidade de ligação em cada espécie de <i>Leishmania</i>	60
Tabela 8- Avaliação da citotoxicidade de compostos derivados da pentamidina em macrófagos peritoneais murinos, incubados por 24, 48 e 72 horas. ..	65
Tabela 9- Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.)</i> <i>amazonensis</i> e citotoxicidade incubadas por 72 horas e índice de seletividade (IS) e especificidade (InEs).....	69
Tabela 10-Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.)</i> <i>infantum chagasi</i> e citotoxicidade incubadas por 72 horas e índice de seletividade (IS) e especificidade (InEs).....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpB	Anfotecicina B
ATP	Adenosina Trifosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
Cdna	DNA complementar
CEUA-UNIFAL	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EC ₅₀	Concentração inibitória que causa 50% do efeito
EC ₅₀ -PRO	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular de formas promastigotas
EC ₅₀ -AMA	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular de formas amastigotas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fase log	Fase logarítmica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LIT	Meio de cultura <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LogP	Coeficiente de partição (P)
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nm	Nanômetro

NO	Óxido nítrico
Kg	Quilogramas
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PeQuiM	Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
IS	Índice de seletividade
InEs	Índice de especificidade
SFB	Soro Fetal Bovino
Via i.p.	Via intraperitoneal
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
V _{máx}	Velocidade máxima
WHO	Organização Mundial de Saúde
µg/mL	Concentração em microgramas por mililitros
Mg	Miligramas
µL	Microlitros
µM	Concentração em micromolar
λ	Comprimento de onda
∅	Macrófago
ΔΨ	Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	LEISHMANIOSE	22
2.1.1	Parasitas do Gênero <i>Leishmania</i>	23
2.1.2	Ciclo Biológico de Parasitas do Gênero <i>Leishmania</i>	25
2.1.3	Transmissão	27
2.1.4	Reservatório	28
2.1.5	Manifestações clínicas	28
2.1.6	Tratamento	29
2.2	SISTEMA ANTIOXIDANTE	30
2.3	BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	32
2.4	COMPOSTOS DERIVADOS DE PENTAMIDINA	34
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	METODOLOGIA	38
5.1	COMPOSTOS QUÍMICOS	38
5.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	39
5.3	PARASITAS	39
5.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
5.5	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	41
5.5.1	Coeficiente de Partição	41
5.5.2	Previsões ADMET e Regra dos 5 De Lipinski	42
5.5.3	Modelagem molecular e <i>docking</i>	42
5.6	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	43
5.6.1	Curva de Proliferação	43
5.6.2	Citotoxicidade em Macrófagos, Avaliação da Atividade Anti-Promastigota, Anti-Amastigota, e Índice de Seletividade (IS) e de Especificidade (InEs)	43
5.6.2.1	Avaliação da Citotoxicidade em Macrófagos	43
5.6.2.2	Avaliação da Atividade Anti-Promastigota em <i>Leishmania (L.)</i>	

<i>amazonensis</i> e <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	44
5.6.2.3 Avaliação da Atividade Anti-Amastigota em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	45
5.6.2.4 Índice de Seletividade (IS) e de Especificidade (InEs)	45
5.7 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> - MECANISMO DE AÇÃO	46
5.7.1 Bioenergética Mitocondrial	46
5.7.1.1 Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	46
5.7.1.2 Produção de ATP	46
5.7.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	47
5.7.3 Produção de NADPH	48
5.7.4 Avaliação da tripanotona redutase (TryR)	48
5.7.5 Apoptose	49
5.7.6 Análise Estatística	49
5.8 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	50
5.8.1 Animais de Experimentação	50
5.8.2 Tratamento	50
5.8.3 Extração de RNA de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> e síntese de cDNA	51
5.8.4 Quantificação da carga parasitária <i>in vivo</i> por PCR em tempo real	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	53
6.1.1 Lipofilicidade, Previsões ADMET e Regra dos 5 de Lipinski	53
6.1.2 Modelagem molecular e <i>docking</i>	57
6.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> SPP.....	61
6.3 CURVA DE PROLIFERAÇÃO	62
6.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS.....	64
6.5 <i>LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS</i>	66
6.5.1 Atividade anti-promastigota e anti-amastigota; IS e InEs	66
6.5.2 Mecanismo de Ação	70
6.6 <i>LEISHMANIA (L.) INFANTUM CHAGASI</i>	80
6.6.1 Atividade anti-promastigota e anti-amastigota; IS e InEs	80
6.6.2 Mecanismo de ação	84
6.6.3 Ensaio <i>in vivo</i>	87
6.7 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE	89

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
8	ETAPAS FUTURAS.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICES.....	110
	ANEXOS.	113

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença classificada em tegumentar e visceral, com potencial de fatalidade, afetando anualmente milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Pradhan *et al.*, 2022). O parasita *Leishmania* apresenta um ciclo de vida complexo e mecanismos de sobrevivência eficientes que dificultam o desenvolvimento de tratamentos eficazes e vacinas (Akbari *et al.*, 2021). Até o momento, não há vacina disponível para humanos e, os tratamentos atuais, como antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina, são limitados por toxicidade, custo elevado e crescente resistência aos fármacos, representando um dos maiores desafios no controle da doença. Também, a resistência observada em várias cepas impulsiona a urgência por novos fármacos e abordagens terapêuticas inovadoras como estratégias fundamentais no combate à leishmaniose (Ortiz *et al.*, 2016; Altamura *et al.*, 2022).

A pentamidina é um fármaco utilizado como opção de tratamento de segunda linha para a leishmaniose (Pennini *et al.*, 2023). No entanto, apesar de sua eficácia significativa, a pentamidina apresenta limitações como toxicidade e resistência em certas cepas de *Leishmania*, como *Leishmania donovani*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania amazonensis* (Pinheiro; Souza, 2022). Sendo assim, com o objetivo de aumentar a eficiência contra o parasita e reduzir a toxicidade às células do hospedeiro, o grupo de pesquisa Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM) fez modificações na estrutura da pentamidina, seguindo uma abordagem semelhante a de outros medicamentos contra tripanossomatídeos, como miltefosina e benznidazol, cujas alterações estruturais visaram melhorar a eficácia e minimizar os efeitos adversos (Andreana *et al.*, 2022; González-Montero *et al.*, 2024; Benítez *et al.*, 2016). Tais estudos destacam a importância dessas modificações para alcançar uma melhor seletividade e reduzir a toxicidade em modelos experimentais. Compreender como esses novos compostos interagem com alvos específicos nas células parasitárias e os mecanismos que sustentam sua atividade é essencial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas, com potencial para erradicar a parasita de forma mais eficiente.

Parâmetros bioquímicos desempenham um papel crucial na investigação

do mecanismo de ação de compostos com atividade *anti-Leishmania*, contribuindo para desvendar como esses compostos interferem nas vias metabólicas do parasita e contribuem para sua eliminação (Amlabu *et al.*, 2020). Como destaque, a mitocôndria surge como um alvo terapêutico promissor, devido à sua participação em diferentes processos celulares, a exemplo da produção energética e estresse oxidativo, fundamentais para a sobrevivência do parasita (Villa-Pulgarín *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2024).

Os mecanismos de ação dos compostos derivados da pentamidina são complexos e envolvem interações bioquímicas essenciais que contribuem para sua eficácia *anti-Leishmania*. Esses compostos têm se mostrado capazes de interferir na homeostase redox do parasita, principalmente através da inibição da tripanotiona redutase (TryR), enzima com papel crucial na manutenção do equilíbrio redox e na proteção contra estresse oxidativo (Battista *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2022). A inibição da TryR resulta em um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), comprometendo a viabilidade do parasita (Inacio *et al.*, 2022). Adicionalmente, evidências sugerem que os derivados da pentamidina podem impactar negativamente a produção de ATP e NADPH, moléculas fundamentais para a sobrevivência e replicação celular do parasita (Ebanks; Chakrabart, 2022). Ao modular esses processos metabólicos críticos, esses compostos também podem induzir a apoptose, revelando um mecanismo multifacetado que deve ser explorado para o desenvolvimento de terapias *anti-Leishmania* mais eficazes (Ebanks; Chakrabart, 2022).

Neste contexto, foi investigada a atividade da pentamidina e seus derivados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, e a citotoxicidade em macrófagos murinos. Com os derivados mais promissores foi avaliado o mecanismo de ação através do coeficiente de partição octanol-água (LogP), produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), produção de ATP intracelular e NADPH, atividade da TryR e apoptose, estudos *in silico* e *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de vinte espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kumar *et al.*, 2023; Who, 2024), transmitidas através da picada de um flebotomíneo infectado (Vijayakumar; Das, 2018). Segundo World Health Organization (WHO) (2024), essas doenças são endêmicas em 98 países e mais de um milhão de pessoas estão em áreas de risco de infecção, sendo classificadas como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2024). As apresentações clínicas da doença podem ser determinadas pelas características do parasita, associadas à resposta imune do hospedeiro (Torres-Guerreiro *et al.* 2017), apresentando lesões cutâneas auto reparadoras a lesões viscerais, que se não tratadas a tempo podem levar a óbito (Khadem; Uzonna, 2014). A leishmaniose se destaca por duas formas clínicas principais, a tegumentar e a visceral; não sendo específicas de humanos, já que a *Leishmania* infecta também outros mamíferos, criando um reservatório zoonótico, o que dificulta o controle da doença (McMahon-Pratt; Alexander, 2004; Reimão *et al.*, 2020).

Leishmania spp. são parasitas unicelulares que apresentam duas fases principais em seu ciclo de vida: as formas promastigota e amastigota (WHO, 2024). A forma promastigota extracelular desenvolve-se no trato digestivo de flebotomíneos, invertebrados vetores da família Psychodidae de insetos hematófagos. A forma amastigota é intracelular e reside nos tecidos de hospedeiros vertebrados, infectando principalmente a pele e o sistema de fagócitos mononucleares em órgãos como o baço, o fígado, a medula óssea e os tecidos linfoides. Estes parasitas multiplicam-se nos vacúolos fago lisossômicos dos fagócitos dos mamíferos (Mougneau; Bihl; Glaichenhaus, 2011; Islek *et al.*, 2022). O tratamento precoce é altamente recomendado para evitar a proliferação excessiva das formas amastigotas, o que pode piorar a progressão da doença.

Segundo o Who (2024), a relação de medicamentos essenciais contra as leishmanioses são os antimoniais pentavalentes – glucantime®; anfotericina

B; e pentamidina (Who, 2024). A primeira linha para o tratamento da leishmaniose tem sido os compostos antimoniais há mais de 60 anos (Haldar *et al.*, 2011) e, a pentamidina e a anfotericina B estão incluídas na segunda linha deste tratamento (Mishra *et al.*, 1992). Paralelamente, a miltefosina tem sido utilizada como fármaco oral para a leishmaniose visceral em alguns países, como Índia, Nepal e Bangladesh, e no Brasil se apresenta pouco ativa no tratamento (Sundar; Olliaro, 2007; Palic *et al.*, 2022).

Apesar de intensas pesquisas, ainda não há vacina eficaz contra a infecção por *Leishmania* e o tratamento é limitado pela alta toxicidade, o custo dos fármacos e hospitalização (Costa *et al.*, 2017). Além disso, a crescente incidência de falhas terapêuticas e o surgimento de parasitas resistentes a medicamentos ressalta a necessidade por novos fármacos eficazes (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). A resistência dos parasitas aos fármacos é um importante entrave para o sucesso da terapia o que tem sido objetivo de inúmeras pesquisas.

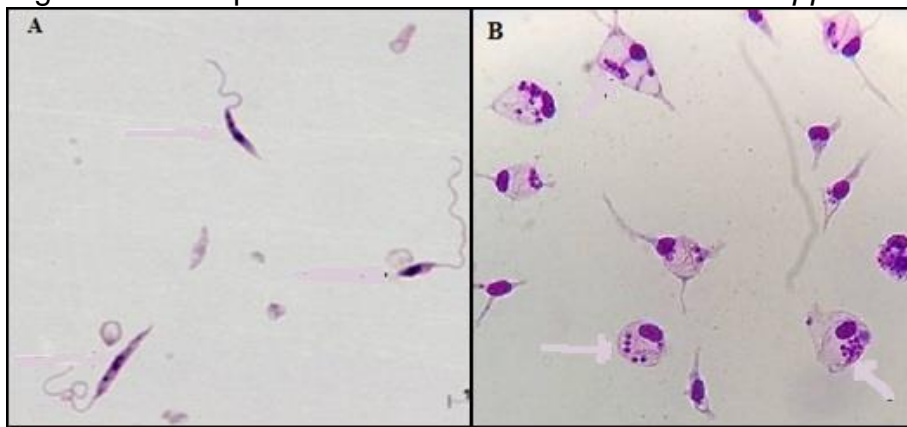
2.1.1 Parasitas do Gênero *Leishmania*

Como muitos protozoários, a *Leishmania* tem um ciclo de vida digenético, que envolve um hospedeiro mamífero e um inseto vetor (Matthews, 2011; Van Bockstal *et al.*, 2020). Os parasitas *Leishmania* exibem uma variedade de diferentes morfologias celulares e vários tipos de células (formas de desenvolvimento) que são adaptadas ao hospedeiro vertebrado ou ao vetor (hospedeiro invertebrado) (Sunter; Gull, 2017).

O protozoário *Leishmania* apresenta duas morfologias principais durante seu ciclo de vida: a forma promastigota, que é extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular. Segundo Gluenz e colaboradores (2010), a forma promastigota é caracterizada por um corpo celular ovalado e alongado, com um flagelo longo que se estende para fora da bolsa flagelar, conferindo motilidade e capacidade de propulsão. Essa estrutura facilita a passagem do protozoário pelo trato digestivo do flebotomíneo (De Souza *et al.*, 2021). Por outro lado, a forma amastigota tem um corpo celular menor e mais esférico, com um flagelo curto e imóvel, que apenas se projeta ligeiramente da bolsa

flagelar. Essa morfologia pode estar relacionada a funções sensoriais (Sadlova *et al.*, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Principais formas evolutivas de *Leishmania spp.*

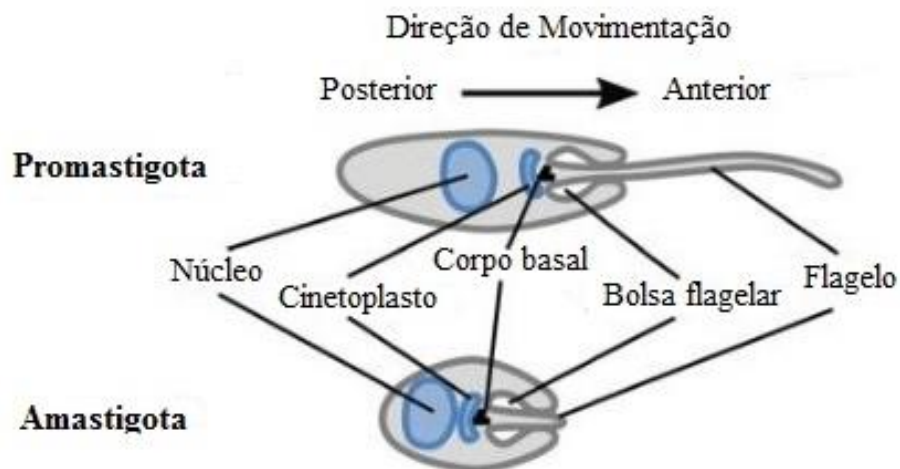


Fonte: Espuri *et al.* (2019).

Nota: Formas promastigotas em meio de cultura, aumento de 100X (A) e formas amastigotas intracelulares em macrófagos, aumento de 40X (B). Coloração por Giemsa.

A disposição celular básica, entretanto, é conservada entre as duas formas celulares de *Leishmania*, sendo definida por microtúbulos reticulados que são mantidos ao longo do ciclo celular, de modo que a divisão celular depende da inserção e do alongamento dos microtúbulos na matriz existente (Wheeler; Sunter; Gull K, 2016; Dandugudumula *et al.*, 2022). A célula abriga o núcleo e um conjunto de organelas, como a mitocôndria e o aparelho de Golgi que estão presentes em uma única cópia. Anteriormente ao núcleo, encontra-se o cinetoplasto, que apresenta uma massa de DNA mitocondrial diretamente conectado ao corpo basal, de onde o flagelo se estende (Figura 2) (Sunter; Gull, 2017). O cinetoplasto é fundamental na manutenção do DNA mitocondrial, e também na regulação da replicação desse material genético. Além disso, interações entre os microtúbulos do flagelo e os do fuso mitótico são essenciais para a divisão eficiente da célula (Dandugudumula *et al.*, 2022). Recentemente, estudos indicam que o aparelho de Golgi não apenas modula a secreção de proteínas, mas também desempenha papel crucial na formação da membrana do flagelo e na modificação das glicoproteínas da superfície celular (Sunter *et al.*, 2020).

Figura 2 - Esquema ilustrativo das principais formas evolutivas de *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptada de Sunter; Gull (2017).

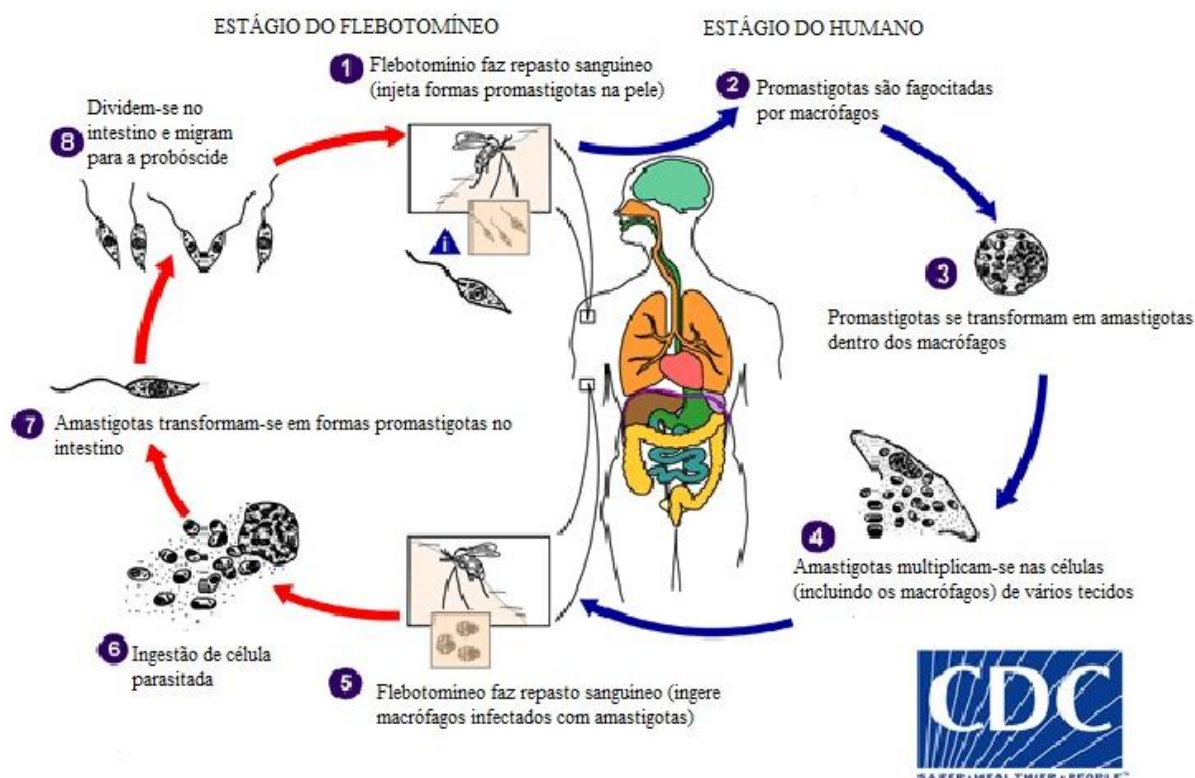
Embora não seja o foco deste trabalho, é importante contextualizar que a forma infectante dos protozoários *Leishmania* são as promastigotas metacíclicas. Durante seu desenvolvimento no interior dos hospedeiros invertebrados, além do alongamento do flagelo, são observadas modificações bioquímicas na superfície da célula. Estas alterações bioquímicas em sua superfície mostram uma maior expressão das glicoproteínas gp63 e das moléculas de lipofosfoglicano (LPG) (Da Silva, 2015). O LPG, presente na membrana celular do parasita, está envolvido em processos como adesão às células do hospedeiro, evasão da resposta imune e manipulação do ambiente celular para facilitar a infecção, além de ser essencial para a virulência do parasita, ajudando-o a evitar a morte induzida por macrófagos, células do sistema imunológico que tentam combater o parasita (Kumari *et al.*, 2022). Por outro lado, a gp63 é uma protease secretada pelo parasita que desempenha um papel crucial na modulação do microambiente celular, facilitando a evasão da resposta imune do hospedeiro vertebrado, além de facilitar a entrada dessas formas aos macrófagos (Guay-Vincent *et al.*, 2022).

2.1.2 Ciclo Biológico de Parasitas do Gênero *Leishmania*

A infecção em hospedeiros vertebrados é iniciada e transmitida durante

o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de flebotomíneos infectados com *Leishmania spp.* (Figura 3). Durante este processo, formas promastigotas metacíclicas presentes nos hospedeiros invertebrados são depositadas no local da picada juntamente com a inoculação da saliva, que irá modular a resposta imune local, bem como das formas promastigotas na pele do hospedeiro, que serão fagocitadas inicialmente por neutrófilos (Assis *et al.*, 2021). Estas células serão capazes de eliminar grande parte dos parasitas por uma série de mecanismos leishmanicidas, contudo alguns são adaptados a tais mecanismos, segundo Paul e colaboradores (2014), levando à entrada silenciosa nas células hospedeiras finais, os macrófagos (Mukherjee *et al.*, 2015). O dano causado pelo flebotomíneo resulta também no recrutamento de macrófagos para o local da picada, e essas são as células que a *Leishmania* infecta e utiliza como residência, permitindo que se mantenham no hospedeiro vertebrado (De Menezes; Saraiva; Da Rocha-Azevedo, 2016).

Figura - 3 Ciclo evolutivo de parasitas do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de CDC (2021).

Após o desenvolvimento e multiplicação das formas amastigotas de

Leishmania spp. dentro do fagócito, pode ocorrer lise celular, e assim, acontece a liberação destas formas no meio extracelular, e conseqüentemente estas células infectarão outros macrófagos. Posteriormente, durante um novo repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos ingerem macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* presentes nos hospedeiros vertebrados, reiniciando o ciclo (Silva, 2016; Assis *et al.*, 2021).

2.1.3 Transmissão

O ciclo de transmissão da leishmaniose envolve interações entre o parasita, vetores, hospedeiros vertebrados e diferentes habitats. A sobrevivência dos protozoários *Leishmania* depende do sucesso da transmissão zoonótica ou antroponótica entre o vetor e um reservatório de mamífero (Dantas-Torres, 2024). A transmissão zoonótica de *Leishmania* spp. acontece em ciclos domésticos, onde o cão é o principal reservatório urbano. Essa condição é atribuída ao seu elevado parasitismo cutâneo e ao contato próximo que mantém com os humanos (Camargo-Neves *et al.*, 2006); ou em ciclos silvestres, como nas florestas tropicais das Américas ou em desertos da Ásia Central, onde a transmissão ocorre entre animais selvagens, com humanos funcionando como hospedeiros acidentais quando infectados (Bern *et al.*, 2008).

Para que ocorra uma transmissão bem-sucedida a um hospedeiro mamífero, os parasitas *Leishmania* precisam colonizar a região da válvula estomodeal do flebotomíneo e, assim, migrar do intestino médio em direção ao aparelho bucal. A motilidade flagelar de formas promastigotas de *Leishmania* ativa, auxilia nestes processos para que ocorra a infecção (Lehane, 1997). Durante a transmissão da doença, é possível que a fagocitose de *Leishmania* ocorra em locais distantes do local da picada. Adicionalmente, talvez o espectro das leishmanioses se reflita na capacidade do parasita de invadir o hospedeiro além do local da picada, diretamente ou por meio do movimento do macrófago infectado (Mukherjee *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2021).

Também é importante destacar que existem muitas espécies de flebotomíneos capazes de transportar os parasitas *Leishmania*. No entanto,

muitas vezes existem relações específicas pelas quais algumas delas são capazes de transmitir apenas um único ou um número limitado de espécies de *Leishmania* (Who, 2024).

2.1.4 Reservatório

Os animais reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania* que eles albergam. Estes podem ser: animais silvestres (edentados – tatus e tamanduás; marsupiais – gambás; e roedores – ratos, camundongos e hamsters) e domesticados (gatos, cães e equídeos) (WHO, 2024).

Segundo a Who (2024), existem parâmetros que devem ser observados para incriminar um animal como hospedeiro reservatório, como a superposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; garantia de sobrevivência do reservatório na tentativa de assegurar a transmissão do parasita, não devendo causar patogenicidade ao mesmo; deve haver na área uma proporção elevada de animais infectados; manutenção do parasita no sangue ou na pele para garantir a transmissão ao flebotomíneo; e a espécie de parasita encontrada tanto no reservatório quanto no hospedeiro humano deve ser a mesma.

No Brasil, vêm ocorrendo atualmente não somente a disseminação da doença para novos locais, como também a reativação de focos onde a doença já estava supostamente controlada. Isso se deve, particularmente, às falhas no controle da doença, que se baseia quase que somente no combate ao cão como reservatório, e também à adaptação dos vetores aos ambientes urbanos (Ribeiro *et al.*, 2018).

2.1.5 Manifestações clínicas

Segundo a Who (2024), a infecção causada pelo protozoário *Leishmania* é caracterizada pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear, apresentando-se sob as formas tegumentares (Leishmaniose Tegumentar - LT) e viscerais (Leishmaniose Visceral - LV). As LT se

subdividem em cutânea (LC), cutâneo-difusa (LCD) e muco-cutânea (LM).

A LC se caracteriza por apresentar lesões localizadas, podendo ocorrer como lesão única ou múltipla, geralmente no local da picada do flebotomíneo. Estas lesões se apresentam ulceradas com fundo granulomatoso e bordas infiltradas, com tendência à cura (Who, 2024). A LCD é uma manifestação clínica rara da doença; essa forma, provavelmente ocorre por disseminação hematogênica ou linfática do parasita, e se caracteriza por apresentar lesões numerosas, pequenas, exolucradas e distantes do local da picada. Este tipo de doença apresenta manifestações mais graves, ocorrendo em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, evoluindo de uma lesão que não responde ao tratamento à formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não ulcerativas (Who, 2024). A LM é caracterizada pela severidade que acomete as mucosas da face, como cartilagens e mucosas, em especial as regiões oro-respiratórias. Estas lesões surgem no local da picada ou se manifestam após meses ou anos da lesão primária na pele. Essa forma clínica pode desfigurar o indivíduo e requer um tratamento mais prolongado (Who, 2024).

Segundo a Who (2024) em relação às LT, o Brasil possui alta prevalência sendo as espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* as principais causadoras, afetando quase 30 mil pessoas anualmente (Who, 2024). A forma mais grave das leishmanioses, a LV, se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, provocando anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (Who, 2024). Além disso, segundo McGwire e colaboradores (2013), os pacientes também podem apresentar dor de cabeça, calafrios, sudorese, tosse, diarreia, tonturas, vômitos, sangramento das gengivas, dores nos membros, perda de peso, anemia com leucopenia e linfadenopatia. A principal espécie causadora da LV no Brasil é a *L. (L.) infantum chagasi* (Lopes *et al.*, 2020).

2.1.6 Tratamento

Apesar da existência de outros quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose, os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira

escolha. Conforme recomendação da OMS, existem dois tipos de antimoniais que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio, porém somente o glucantime® é comercializado no Brasil, sendo considerado o fármaco de primeira escolha (WHO, 2024). As vias de administração do medicamento podem ser intramuscular ou endovenosa, com a recomendação de aplicação lenta e de repouso após a medicação.

Dentre as outras opções de tratamento disponíveis estão a anfotericina B, pentamidina e miltefosina. A administração da anfotericina B é por infusão intravenosa; a pentamidina por via intramuscular ou intravenosa; a miltefosina por via oral (Monge-Maillo; Lopez-Velez, 2013). No Brasil, os principais medicamentos utilizados contra a LV são o antimoniato de N-metilglucamina, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B; já nos casos de LT é utilizado o antimoniato de N-metilmeglumina; mas há também outros medicamentos como a pentamidina, paromomicina e miltefosina (Who, 2024).

Nas situações em que o paciente apresenta resistência ao tratamento com antimoniais pentavalentes ou na impossibilidade de sua administração, é recomendável a utilização da anfotericina B, fármaco de segunda escolha, aplicada em ambiente hospitalar, devido a sua toxicidade (Who, 2024). Em resposta ao tratamento, a maioria das opções disponíveis para leishmaniose está associada a reações adversas significativas, devido à sua alta toxicidade.

A necessidade urgente de pesquisa e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para tratar as leishmanioses decorre da presença de fármacos na quimioterapia dessas doenças, os quais não apenas apresentam efeitos adversos graves, resistência por parte do parasita, mas também exigem tratamentos de longa duração e administração desafiadora (DNDi, 2018). Nesse contexto crítico, destaca-se que, além de desenvolver resistência aos fármacos, a sobrevivência dos parasitas está intrinsecamente ligada à habilidade de enfrentar e sobreviver ao ambiente oxidativo no fagolisossomo, demandando a presença de um sistema antioxidante eficiente (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

2.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Durante seu ciclo de vida, a *Leishmania spp.* apresenta duas formas principais, acompanhadas de modificações bioquímicas e morfológicas que a capacitam a infectar e sobreviver no hospedeiro vertebrado. Além disso, cada estágio de diferenciação expressa um padrão de proteínas específicas envolvidas no processo de adaptação ao novo ambiente (Turens, 2004; Jara *et al.*, 2022). Assim, o parasita deve lidar com a geração exógena de espécies reativas de oxigênio (EROs), além da endógena, para garantir a sua infecção (Kierszenbaum *et al.*, 1974). A presença dessas moléculas altamente oxidativas são mantidas em baixas concentrações pelas vias antioxidantes do parasita.

A maioria dos organismos mantém ambiente intracelular com baixos níveis de oxidação através da presença de altas concentrações de glutathione, um tiol de baixo peso molecular (Castro; Tomás, 2008). Entretanto, em *Leishmania spp.*, a maior parte do conteúdo de glutathione é encontrada na forma de tripanotiona (T(SH)₂, N¹,N⁸-bis(glutathionil)espermidina), exercendo um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo (Galarreta *et al.*, 2008). A partir disso, diferentes enzimas e substratos específicos foram identificadas, levando à conclusão de que o parasita apresenta um elaborado sistema de metabolização de hidroperóxidos (Castro; Tomás, 2008; Santi; Murta, 2022). Muitos parasitas, incluindo *Leishmania*, desenvolveram diferentes mecanismos enzimáticos para prevenir o dano celular causado pelas EROs. A função de peroxidases inclui a defesa contra agentes químicos e estresse oxidativo, catalisando a redução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroperóxidos a água e álcool, respectivamente. Sendo assim, a ação combinada de TryR, triparedoxina e triparedoxina peroxidase é crucial para manter uma baixa concentração de H₂O₂ e diminuir o estresse oxidativo (Turens, 2004; Ali *et al.*, 2022; Santi; Murta, 2022).

O sistema de defesa antioxidante da *Leishmania spp.* têm aspectos únicos, e as moléculas envolvidas nesse processo têm sido apontadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de uma terapia mais específica (Piacenza, 2009; Jara *et al.*, 2022). Interessantemente, a superexpressão das peroxiredoxinas citosólicas e mitocondriais em *L. infantum* levou a diferentes resistências ao estresse oxidativo. Os parasitas que superexpressavam a citosólica eram mais resistentes ao tratamento com H₂O₂, enquanto que os que superexpressavam a mitocondrial, mais resistentes ao *t*-butil hidroperóxido

(Castro *et al.*, 2002). A primeira evidência da presença de uma triparedoxina na mitocôndria veio de estudos com *L. infantum*, onde duas triparedoxinas, além da citosólica (*LITXN1*) foram identificadas: uma de matriz (*LITXN2*) descrita por Castro *et al.* (2004) e outra localizada na membrana mitocondrial externa (*LITXN3*) (Castro *et al.*, 2010).

Adicionalmente, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima essencial na via das pentoses fosfato, desempenhando um papel crucial na produção de NADPH, especialmente em organismos como *Leishmania*. Essa enzima catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconato (6PG), gerando NADPH, que é vital para diversas funções celulares (Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007). As leishmanias habitam ambientes altamente oxidativos e, para sobreviver nessas condições, precisam de um sistema antioxidante eficaz, que depende da enzima tripanotiona redutase (TryR) para a detoxificação de radicais oxidantes. Para funcionar adequadamente, a TryR requer NADPH, que também é fundamental para a biossíntese de ácidos graxos e a regeneração da glutatona, um importante antioxidante que protege as células contra o estresse oxidativo (Fuentes-Lemus *et al.*, 2023). Assim, a G6PD está diretamente envolvida na manutenção do equilíbrio redox celular e na proliferação do parasita, sendo crucial para sua sobrevivência em ambientes hostis. Kumar e Kaur (2019) destacam as implicações clínicas da deficiência de G6PD e sua importância para a saúde celular em *Leishmania*, o qual a produção de NADPH pela fase oxidativa da via das pentoses fosfato é fundamental para o sistema antioxidante desse parasita, pois fornece os equivalentes reduzidos necessários para reduzir EROs e manter o estado reduzido da tripanotiona (Fuentes-Lemus *et al.*, 2023).

2.3 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Os tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria com presença de enzimas de vias metabólicas exclusivas e um arranjo específico de DNA mitocondrial. Durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos, a forma e a plasticidade funcional de suas mitocôndrias únicas sofrem alterações profundas, refletindo adaptação a diferentes ambientes. A mitocôndria deve ser

melhor entendida pelo extenso envolvimento em diferentes eventos celulares. Esta organela além de ser o principal sítio de geração de ATP e de EROs na célula, também está envolvida em processos de diferenciação, proliferação, homeostase de cálcio, balanço redox e na morte celular programada (Duchen *et al.*, 2000; Mailloux, 2020). Em resposta a mudanças no ambiente intracelular por diferentes sinais de estresse, hipóxia e estresse oxidativo, as mitocôndrias liberam proteínas envolvidas com a morte celular, resultando em alteração na síntese de ATP e ativação das vias de morte celular (Rvagnan *et al.*, 2002; Napolitano; Fasciolo; Venditti, 2021).

A taxa de utilização de diferentes fontes de carbono e nutrientes em vários estágios de cultura de *Leishmania* tem sido estudada no seu metabolismo. Em promastigotas de *L. mexicana* e amastigotas axênicas diferenciadas *in vitro*, a taxa de absorção da glicose e uma gama de aminoácidos metabólitos diminuiu em promastigotas de fase estacionária e amastigotas axênicas, consistentes com os últimos estágios a entrarem num estado metabólico reduzido (Blum *et al.*, 1990). Estas formas também usaram os ácidos graxos livres no meio, um indicativo de que a oxidação de ácidos graxos pode ser utilizada para conduzir a fosforilação oxidativa mitocondrial nestes estágios. Curiosamente, em promastigotas de *L. major*, a oxidação de ácidos graxos foi fortemente inibida pela glicose, indicando um nível significativo de seletividade e regulação da oxidação de ácidos graxos nesta forma (Blum *et al.*, 1990). As leishmanias expressam enzimas necessárias para a oxidação de ácidos graxos, mas carecem de enzimas necessárias para a conversão líquida destes em carboidratos e são conseqüentemente incapazes de utilizar estes ácidos como sua única fonte de carbono. Embora essas observações sugiram que a *Leishmania* pode ser capaz de utilizar múltiplas fontes de carbono, a absorção de nutrientes também pode refletir o uso preferencial de substratos exógenos para fins biossintéticos (Naderer *et al.*, 2008).

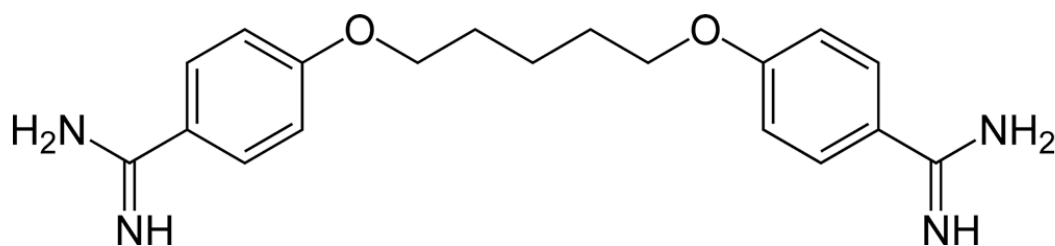
Adicionalmente, o mecanismo de ação de alguns fármacos envolve vias relacionadas à bioenergética mitocondrial e mecanismos de defesa antioxidante desses parasitas. Por apresentarem características peculiares, perspectivas inovadoras na terapia contra os tripanossomatídeos poderiam ser desenvolvidas com base em uma melhor compreensão dos processos acima

citados (Figueiredo *et al.*, 2014; Mailloux, 2020).

2.4 COMPOSTOS DERIVADOS DE PENTAMIDINA

As pentamidinas fazem parte do grupo das diamidinas aromáticas, compostos orgânicos nos quais a característica principal é a presença de uma cadeia alceno central inerte unida através de ligação éter ao grupo amidino polar terminal (Figura 4) (Costa, 1993). São mais utilizadas devido a sua estabilidade, são solúveis em água e possuem uma menor toxicidade em relação aos demais fármacos desta classe (Santos, 2012). Além disso, uma de suas vantagens é não apresentarem resistência *in vitro* (Soto *et al.*, 2016). O mecanismo de ação da pentamidina contra *Leishmania* ainda não está bem esclarecido, sendo reportado inibição de transporte ativo (Tiwari *et al.*, 2018), bem como inibição da topoisomerase II na mitocôndria (Tiwari *et al.*, 2018); além disso, interfere na síntese do DNA, fragmentando a membrana mitocondrial e alterando morfológicamente o cinetoplasto (Amato, 2006; Matos *et al.*, 2020).

Figura 4 – Molécula do fármaco pentamidina.



Fonte: Elaborada pela autora pelo programa *ChemDraw Ultra* versão 11.0 (2024).

O isotionato de pentamidina é utilizado há anos no tratamento de infecções produzidas por *Trypanosoma*, *Babesia* e *Pneumocystis* (Robledo *et al.*, 2006). Geralmente é utilizado como alternativa aos pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais ou anfotericina B (Santos, 2012). Na Colômbia e em outros países, a pentamidina tem se mostrado um

medicamento promissor, com altas taxas de cura, até de 96%, no entanto, as taxas de recaída e a eficácia podem variar conforme a resistência do parasita, além de apresentarem uma toxicidade elevada (Robledo *et al.*, 2006; Piccica *et al.*, 2021). Na região amazônica do Brasil, utilizou-se o isotionato de pentamidina em portadores de LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana) causada pela *L. (V.) guyanensis*, onde a taxa de cura obtida foi excelente, embora os efeitos colaterais tenham sido considerados agravantes para os pacientes (WHO, 2024). Em Brasília foram feitos testes com portadores de lesões cutâneas causadas por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* e o resultado obtido foi semelhante ao SbV, com efeitos colaterais incipientes (WHO, 2024).

Embora a pentamidina tenha demonstrado resultados positivos no tratamento da leishmaniose, seu uso enfrenta limitações significativas, como alta toxicidade e a ocorrência de efeitos colaterais adversos. Essas características restringem sua aplicação clínica e reforçam a necessidade de aprimoramento. Nesse contexto, modificações estruturais em sua molécula têm se mostrado uma estratégia promissora para o desenvolvimento de derivados mais eficazes e seguros, capazes de melhorar a atividade terapêutica e reduzir os impactos negativos associados ao tratamento.

O presente trabalho utilizou a estrutura molecular da pentamidina como modelo, cujas subunidades aromáticas foram conservadas, inserindo-se uma subunidade triazólica como um possível bioisómero da função imidamida, contemplando a subunidade triazólica e uma subunidade acilidrazona ou arilidrazona funcionalizadas, estruturas privilegiadas descritas como importantes biofóros em derivados com atividade anti-inflamatória na literatura (Duarte *et al.*, 2007). Portanto, acredita-se que as modificações introduzidas na síntese dos derivados da pentamidina, que resultam em melhorias significativas, tais como o aumento da atividade leishmanicida e a redução da toxicidade, possam ser efetivamente exploradas no desenvolvimento de uma nova série de compostos promissores para o tratamento da doença.

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas no mundo, onde o número de casos tem aumentado, principalmente devido à migração humana e de animais domésticos contribuindo para a dispersão da doença em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade (Who, 2024).

Além de ser uma doença grave que afeta milhões de pessoas anualmente, apresenta desafios significativos devido à ausência de vacinas eficazes e à limitação dos tratamentos disponíveis. Nesse contexto, a pentamidina surge como uma opção promissora, mas suas limitações em termos de toxicidade e resistência demandam novas abordagens terapêuticas. No entanto, modificações estruturais na pentamidina, visam aumentar sua eficácia e reduzir a toxicidade. Com ênfase na interação dos novos compostos com alvos específicos nas células parasitárias, investigou-se a atividade *anti-Leishmania* em modelos experimentais, além de desvendar os mecanismos que sustentam essa eficácia. Este estudo foca na importância da mitocôndria como alvo terapêutico, a inibição da TryR e a modulação de processos metabólicos críticos que induzem apoptose, revelando um mecanismo multifacetado. Ao explorar esses novos compostos e suas propriedades bioquímicas, o trabalho não só contribui para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a leishmaniose, mas também tem o potencial de transformar o cenário do tratamento dessa doença devastadora, trazendo esperança a milhões de pacientes em todo o mundo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade de derivados de pentamidina em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* determinando o mecanismo de ação no contexto *in vitro* e por análises *in silico* e *in vivo*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No contexto *in vitro*:

- a) determinar a curva de proliferação de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*;
- b) avaliar a citotoxicidade; a atividade leishmanicida em promastigotas e amastigotas;
- c) avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), produção de ATP, liberação de H_2O_2 , produção de NADPH, atividade da tripanotona redutase (TryR) e apoptose.

No contexto *in silico*:

- a) determinar o Índice de Seletividade (IS) e de Especificidade (InEs); o Log do coeficiente de partição e verificar a biodisponibilidade oral dos compostos pela regra dos 5 de Lipinski e previsões ADMET;
- b) avaliar por meio de análise computacional (modelagem e *docking* molecular), se os compostos derivados de pentamidina podem interagir quimicamente com a glicose-6-fosfato desidrogenase, topoisomerase I e II, tripanotona sintetase e redutase de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*;

No contexto *in vivo*:

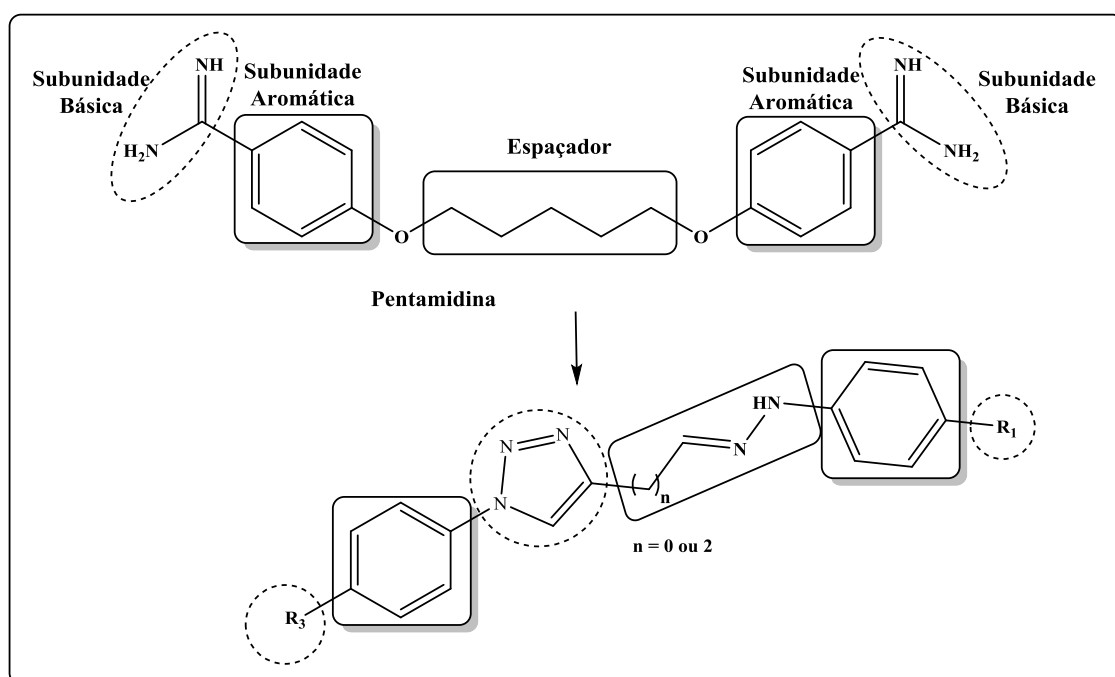
- a) analisar quantitativamente pela qPCR o número de leishmanias em relação ao grupo controle.

5 METODOLOGIA

5.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

Os compostos testados nesse projeto são derivados da pentamidina (PQM 250, PQM 251, PQM 252, PQM 253, PQM 254, PQM 256, PQM 257, PQM 258, PQM 259, PQM 261 e PQM 262) que foram sintetizados pela Pós-doutoranda Vanessa Silva Gontijo e Prof. Dr. Cláudio Viegas Junior do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG empregando a estrutura da pentamidina como protótipo para obtenção dos derivados (Figura 5).

Figura 5 - Planejamento estrutural de uma nova série de derivados da pentamidina planejados como candidato a fármacos antiparasitário.



Fonte: Elaborada pelos pesquisadores responsáveis pela síntese, Vanessa Silva Gontijo e Claudio Viegas Junior.

Nota: As estruturas químicas estão em processo de publicação.

Vale ressaltar que alguns desses compostos estão em processo de patenteamento (conforme detalhado no Anexo 1), evidenciando o caráter inovador dessas moléculas. Esse avanço reforça o potencial significativo dos

derivados, tanto no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas quanto na contribuição para a inovação científica e tecnológica no tratamento da leishmaniose.

5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 84 camundongos SWISS com nove semanas de idade, mantidos no Biotério Experimental da Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL-MG) em ambiente com ventilação, ração e água *ad libitum*, os quais foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais nos ensaios de citotoxicidade e avaliação da atividade leishmanicida em formas amastigotas. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL / protocolo número 0013/2020 – Anexo 2). Também foram utilizados 35 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), com três semanas de idade, mantidos no Biotério Experimental da Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL-MG) em ambiente com ventilação, ração e água *ad libitum*, os quais foram utilizados para ensaios *in vivo* com os compostos mais promissores. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas do CONCEA e aprovado pela CEUA-UNIFAL (protocolo número 0033/2023 – Anexo 3).

5.3 PARASITAS

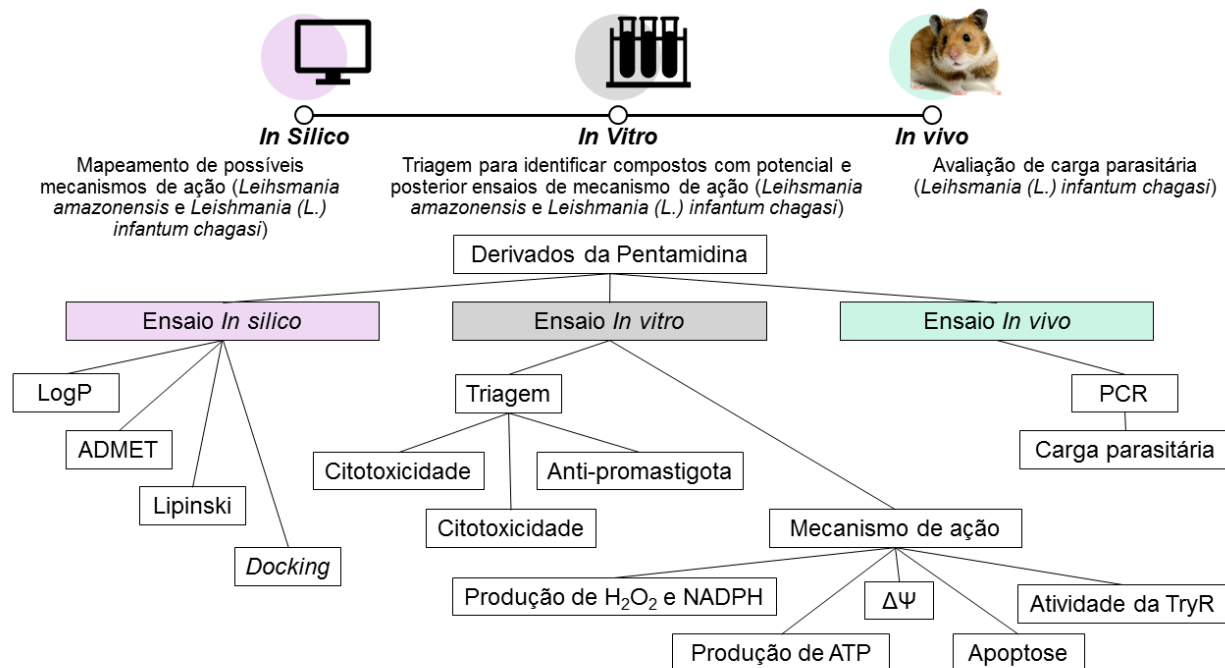
Foram utilizadas as espécies *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) e *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46). Para a manutenção destes protozoários, os parasitas da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* foram inoculados na pata de camundongo SWISS, enquanto da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram inoculados na cavidade peritoneal de hamsters (*Mesocricetus auratus*). Após cerca de 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo feito o maceramento da lesão da pata do camundongo e do

baço de hamsters, para isolamento e expansão dos parasitas. Os parasitas isolados foram mantidos à 25°C em meio LIT para *Leishmania (L.) amazonensis* e meio Schneider (Sigma) para *Leishmania (L.) infantum chagasi*, suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 50000UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2% de urina humana.

5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na busca por novos tratamentos para a leishmaniose, o trabalho foi conduzido em etapas estratégicas. Inicialmente, foi realizado um estudo *in silico* que mapeou possíveis mecanismos de ação dos compostos derivados da pentamidina, permitindo uma investigação mais eficiente e precisa para as duas espécies trabalhadas. Em seguida, foi feita uma triagem cuidadosa desses compostos, no contexto *in vitro*, com o objetivo de identificar aqueles com maior potencial para elucidar os mecanismos de ação. Por fim, foram desvendados alguns mecanismos de ação dos compostos promissores (Quadro 1). É importante ressaltar que os ensaios de mecanismos de ação em *Leishmania (L.) infantum chagasi* não foram concluídos devido à escassez de reagentes. No entanto, foram incluídos ensaios *in vivo* que permitiram avaliar a carga parasitária por PCR em tempo real, contribuindo para uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico dos compostos estudados.

Quadro 1 - Delineamento experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

5.5 ANÁLISE IN SILICO

5.5.1 Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição (P) de um composto é dado pela razão entre a sua concentração entre uma fase orgânica e uma aquosa, sendo utilizado para determiná-lo, um sistema “n-octanol/água” (Equação 4):

$$\text{Equação (4)} \rightarrow P = [\text{Molécula em n-octanol}] / [\text{Molécula em água}]$$

Para investigar o comportamento farmacocinético dos compostos derivados da pentamidina, utilizou-se a forma logarítmica do coeficiente de partição, o LogP, frequentemente utilizado como medida quantitativa de lipofilicidade, que foi calculado com o auxílio do programa ChemDraw Ultra versão 11.0 utilizando as estruturas moleculares dos compostos derivados de pentamidina fornecidas pelo Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal

(PeQuiM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG e confirmadas pela plataforma SWISS ADME.

5.5.2 Previsões ADMET e Regra dos 5 De Lipinski

Para as análises computacionais foram observados os descritores ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), que tem a finalidade de prever a absorção, solubilidade, hepatotoxicidade e ligação às proteínas plasmáticas (Sahu *et al.*, 2019), através da plataforma SWISS ADME, pelo site: <http://www.swissadme.ch/>.

A regra dos 5 de Lipinski foi aplicada na plataforma SWISS ADME e as estruturas dos compostos foram obtidas pelo programa ChemDraw Ultra versão 11.0 e utilizados na plataforma para avaliação.

5.5.3 Modelagem molecular e *docking*

Foram utilizadas as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, topoisomerase I e II, tripanotona sintetase e redutase para a realização do *docking* molecular. A sequência destas foram obtidas na plataforma PDB (site: <https://www.rcsb.org/>). Posteriormente, a homologia das enzimas utilizadas para o *docking* foram obtidas a partir da sequência FASTA da plataforma Blast (site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e enviadas para o programa Phyre2 (site: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015). Após este passo, foi realizado a verificação das homologias nos programas ERRAT (site: <https://www.doe-mpi.ucla.edu/erratt/>) (Colovos; Yeates, 1993), Verify 3D (site: <https://www.doe-mpi.ucla.edu/verify3d/>) (Bowie; Lüthy; Eisenberg, 1991; Lüthy; Bowie; Eisenberg, 1992), PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), Ramachandran (Ramachandran, 1968) e ProsaWeb, selecionando assim, a melhor homologia. As simulações de *docking* foram feitas usando o algoritmo genético implementado no programa GOLD (2022.1 CSD Release) (Jones *et al.*, 1997) e os parâmetros de cálculos foram definidos como: tamanho da população 100, pressão de seleção 1,1, número de

operações 100.000, o número de ilhas 5, o tamanho do nicho 2, as corridas de encaixe 10 e os pesos dos operadores para migração, mutação e cruzamento foram 10, 95 e 95, respectivamente. Os sítios de ligação dos compostos foram detectados usando o software CAVITY (Yuan; Pei; Lai, 2013). O desenho das estruturas dos compostos foi feito no programa ChemDraw Ultra versão 11.0.

5.6 ANÁLISE *IN VITRO*

5.6.1 Curva de Proliferação

Promastigotas na 2ª passagem (repique), na concentração de 1×10^5 células/mL foram adicionados em falcons de 15 mL contendo meio LIT para *Leishmania (L.) amazonensis*, e Schneider para *Leishmania (L.) infantum chagasi*, e mantidos a 25°C. Diariamente, uma alíquota foi removida e o número de promastigotas determinado utilizando uma câmara de Neubauer (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005). Para a determinação da curva de proliferação foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.6.2 Citotoxicidade em Macrófagos, Avaliação da Atividade Anti-Promastigota, Anti-Amastigota, e Índice de Seletividade (IS) e de Especificidade (InEs)

5.6.2.1 Avaliação da Citotoxicidade em Macrófagos

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) utilizando macrófagos peritoneais murinos para a determinação do CC_{50} conforme descrito por Folquitto *et al.* (2017). Para tanto, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO_2 , dispostos em placas de 96 poços na razão de 1×10^6 por poço, onde se adicionou os compostos a serem avaliados nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90 $\mu\text{g/mL}$ e

incubados por 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 µL de MTT (na concentração de 5 mg/mL) por poço, com nova incubação de 4 horas. As células foram lisadas com dimetilsulfóxido (DMSO) e avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 a 570 nm para determinação do CC₅₀ por comparação ao controle sem adição de compostos ou fármacos (Pereira *et al.*, 2011; Folquitto *et al.*, 2017; Espuri *et al.*, 2019). A densidade óptica obtida foi então convertida à porcentagem de inibição usando a equação (1), para que então por análise de regressão dos dados possa ser determinada o CC₅₀ (Pereira, 2010).

$$\text{Equação (1)} \rightarrow \% \text{Inibição} = [(DO_{\text{controle}} - DO_{\text{composto}}) / DO_{\text{controle}}] \times 100$$

O DMSO foi usado como controle negativo e a pentamidina como medicamento de referência.

5.6.2.2 Avaliação da Atividade Anti-Promastigota em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*

A avaliação da atividade dos compostos contra formas promastigotas foi realizada pelo método da resazurina para a determinação do EC_{50-PRO} conforme descrito em Folquitto *et al.* (2017) nas espécies de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* nas fases *lag* e *log* da curva de proliferação, incubadas por 24, 48 e 72 horas com os derivados de pentamidina. Para tanto, formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram mantidas em meio LIT e Schneider, respectivamente, suplementados com 10% de SFB em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas 1 x 10⁶ células/mL por poço para placas de 48 poços, onde se adicionou os compostos a serem avaliados nas concentrações de 50; 10; 5 e 0,1 µg/mL. Após os tempos de incubação a 25°C, foram adicionados 50 µL de resazurina de sódio em cada poço. Após 6 horas de incubação, as células foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm e

600nm para a determinação do EC_{50-PRO}, tendo como controle leishmanias em meio de cultura sem a adição de compostos ou fármacos. Este EC_{50-PRO} foi então comparado ao EC_{50-PRO} do fármaco de referência (pentamidina) (Pereira *et al.*, 2011).

5.6.2.3 Avaliação da Atividade Anti-Amastigota em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Para avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, mantidos em meio RPMI-1640 a 37°C e 5% de CO₂, em placas de 24 poços. Após 24 horas, removeu-se os macrófagos não aderidos e estas células foram infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* na fase estacionária da curva de proliferação na razão de 10:1. No dia seguinte à infecção, removeu-se os parasitas não internalizados, e posteriormente se adicionou os compostos a serem avaliados nas concentrações de 40, 10, 5 e 0,1 µg/mL e incubados por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂, quando então foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (MERCK®) a 10% para posterior análise por microscopia óptica. Para avaliar o efeito dos compostos se avaliou o número de amastigotas/macrófago e o número de macrófagos infectados. A porcentagem de células infectadas foi levada em consideração para a ilustração dos resultados, uma vez que estes são expressos como EC_{50-AMA} (Folquitto *et al.*, 2017; Espuri *et al.*, 2019). O fármaco de referência utilizado neste ensaio foi a pentamidina (Pereira, 2010).

5.6.2.4 Índice de Seletividade (IS) e de Especificidade (InEs)

O IS é a razão entre CC₅₀ e EC₅₀ considerando-se a mesma substância, segundo Pereira (2010), representado pela equação 2:

$$\text{Equação (2)} \rightarrow \text{IS} = \text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$$

O InEs é calculado pela razão entre o EC_{50-PRO} e o EC_{50-AMA}, tendo como objetivo determinar a especificidade dos compostos para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania spp.* (MUYLDER *et al.*, 2011) (Equação 3).

$$\text{Equação (3)} \rightarrow \text{InEs} = \text{EC}_{50\text{-PRO}} / \text{EC}_{50\text{-AMA}}$$

5.7 ANÁLISE *IN VITRO* - MECANISMO DE AÇÃO

5.7.1 Bioenergética Mitocondrial

5.7.1.1 Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O $\Delta\Psi$ foi realizado conforme descrito por Inacio e colaboradores (2014) e adaptado por Peloso e colaboradores (2020). Resumidamente, as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) chagasi* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,4) e incubadas por trinta minutos com a sonda JC-10 na concentração de 10mg/mL a 25°C. Após esse período, as promastigotas foram lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,4) e o $\Delta\Psi$ foi determinado em comprimentos de onda de excitação de 530 nm e 590 nm e de emissão de 480 nm, utilizando um espectrofluorímetro (*Varian Cary Eclipse Fluorescence*®). Como controle positivo do desacoplamento, os parasitas foram incubados com 100uM de CCCP (cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona).

5.7.1.2 Produção de ATP

A determinação da concentração de ATP foi realizada utilizando o kit ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (MAK190) conforme descrito em Peloso *et al.* (2011). Brevemente, assim como no item 5.7.1.1, as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação ($1000 \times g$ à 4°C) e lavadas em PBS. A concentração de ATP foi determinada pela fosforilação do glicerol, o que resultou em produto fluorométrico proporcional à concentração de ATP. A fluorescência foi determinada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 535 nm e 587 nm, respectivamente, em placas pretas com fundo preto de 96 poços usando um espectrofluorímetro (*Varian Cary Eclipse Fluorescence*®).

5.7.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi realizada conforme descrito em Peloso *et al.* (2020). Brevemente, assim como no item 5.7.1.1, as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) chagasi* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação ($1000 \times g$ à 4°C) e lavado em PBS, e posteriormente incubadas no tampão de reação 1X de Kit Amplex Red® na presença de succinato 5 mM, digitonina 40 µM, horseradish peroxidase 0,1 U/mL e Amplex Red 25 µM (Molecular Probes®). A fluorescência foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 571 nm e 585 nm, respectivamente, em placas pretas de 96 poços usando um espectrofluorímetro (*Varian Cary Eclipse Fluorescence*®). A correlação quantitativa entre a fluorescência e o H₂O₂ liberado pelas células foi determinada como descrito por

Peloso *et al.* (2012).

5.7.3 Produção de NADPH

A produção de NADPH foi determinada como descrito em Mielniczki-Pereira *et al.* (2007). Brevemente, assim como no item 5.7.1.1, as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) chagasi* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação ($1000 \times g$ à $4^\circ C$) e lavadas em PBS. Posteriormente, a atividade combinada da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) foi medida pela adição de 1×10^6 cel/mL no tampão de reação (50mM Tris-HCL, pH 7,6, 50 mM KCL, 0,1% Triton X-100, 250 mM $NADP^+$, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM 6-fosfogluconato e 1 mM glicose-6-fosfato) e o curso de redução do $NADP^+$ foi medido em 340nm.

5.7.4 Avaliação da tripanotona redutase (TryR)

A avaliação da atividade da TryR foi determinada como descrito em Bogaart *et al.* (2014). Brevemente, assim como no item 5.7.1.1, promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas em PBS. Posteriormente, as amostras foram quimicamente lisadas por incubação de 15 minutos com tampão de lise (EDTA (1 mM), HEPES (40 mM), Tris (50 mM; pH7,5) e Triton X-100 (2% vol/vol). Imediatamente antes da utilização, o tampão foi suplementado com inibidor de proteases, fluoreto de fenilmetanosulfonilo a uma concentração final de 1 mM. A atividade de TryR foi

medida pela adição de 1×10^7 cel/mL dispensados no poço de ensaio de uma placa de 96 poços, acrescentando NADPH (200 μ M), tripanotona (T[S]₂) (75 μ M) e DTNB (100 μ M), respectivamente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550) à 512 nm por 40 minutos. A densidade ótica medida no branco foi subtraída do sinal correspondente ao da amostra, obtendo-se assim a atividade da TryR responsável pela produção de 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB²).

5.7.5 Apoptose

O Kit Alexa Fluor™ 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para determinar a frequência de células que externalizaram a fosfatidilserina. Brevemente, assim como no item 5.7.1.1, as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (1×10^7 células/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) com os valores específicos de EC_{50-PRO} (definidos nos experimentos referenciados no item 5.6.2.2) dos compostos que apresentaram significativos IS, em seus respectivos tempos de incubação. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação (1000×g à 4°C) e lavadas em PBS. Em seguida, o precipitado de células foi ressuspensionado em 100 μ L de tampão de ligação de anexina (conforme especificações do fabricante) e foi adicionado a anexina V conjugada a AF488 (2,5 μ L) e iodeto de propídeo (1 μ). As amostras foram incubadas, protegidas da luz e em temperatura ambiente, por 30 minutos. A análise foi realizada no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software GuavaSoft 2.7.

5.7.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando regressão não linear seguida pela análise do teste de Tukey. Diferenças foram considerados significativas quando o *p*-valor foi menor que 0,05. Todos os ensaios foram realizados pelo menos por três experimentos independentes em triplicata.

5.8 ENSAIOS *IN VIVO*

5.8.1 Animais de Experimentação

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^8 amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/cepa46) provenientes de um baço de outro animal infectado.

A avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos compostos PQM 250 e PQM 254 foi realizada em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) tratados por via oral (15 mg/Kg/dia) e o glucantime® (50 mg/kg/dia) (fármaco de referência) tratados por via intraperitoneal. Os compostos selecionados para o ensaio *in vivo* foram o PQM 250, PQM 254, já que apresentaram menor toxicidade e IS satisfatórios, além de estarem em estudos sobre mecanismo de ação. Ao final de dez dias de tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo removidos fragmentos do fígado e do baço, imediatamente pesados para avaliação da carga parasitária, citocinas pro e anti-inflamatórias; e o restante do órgão foi separado e armazenado em formol para posterior análise histopatológica futuras. As amastigotas foram obtidas por meio de centrifugação diferencial do baço de hamsters previamente infectados e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958).

5.8.2 Tratamento

Após 60 dias de infecção, os animais receberam tratamento durante 10 dias consecutivos de acordo com o grupo alocado. Também foram utilizados um grupo de animais infectados e sem tratamento, com a mesma idade dos demais que será utilizado como grupo controle.

Os grupos experimentais, número de animais em cada grupo e a logística de tratamento estão representados na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Grupos dos ensaios *in vivo*.

Grupo	Tratamento	Dose/Via/Veículo	Total de animais
(1)	-	-	6
(2)	PQM 250	15 mg/Kg/dia Oral Óleo de milho	6
(3)	PQM 254	15 mg/Kg/dia Oral Óleo de milho	6
(4)	Glucantime®	50 mg/kg/dia Intraperitoneal PBS	6

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: (1): Grupo de animais infectados e não tratados; (2) Grupo de animais infectados e tratados com o derivado PQM 250; (3) Grupo de animais infectados e tratados com o derivado PQM 254; (4) Grupo de animais infectados e tratados com o fármaco Glucantime®.

5.8.3 Extração de RNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e síntese de cDNA

Os fragmentos dos órgãos com aproximadamente 200 mg foram removidos e congelados imediatamente a -80°C para posterior extração de RNA usando um kit (RNeasy Mini Kit). Na sequência, as amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA. A obtenção de cDNA foi feita conforme descrita por Reimão *et al.* (2011). As amostras foram congeladas a -20°C para posterior uso em PCR quantitativo em tempo real, marcador molecular da PCR em tempo real *single*. Para a PCR em tempo real foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3'-end, foi ligado um “quencher” NFQ (non-fluorescent quencher). O desenho das sequências foi a do LINJ31, cujas condições de realização foram descritas por Colombo *et al.* (2011).

5.8.4 Quantificação da carga parasitária *in vivo* por PCR em tempo real

Para a avaliação do tratamento pela PCR em tempo real foi utilizada a curva padrão para determinar o número absoluto de parasitas presentes por mg de amostra, conforme descrito por Reimão *et al.* (2011). O número de parasitas por grama de órgão foi calculado com base na regressão linear e a partir da curva padrão obtida com DNA das formas promastigotas. As análises estatísticas foram realizadas usando *Test-t de student* com Mann Whitney com significância em $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação por novas possibilidades quimioterápicas contra as leishmanioses tem como intuito a busca por moléculas alternativas que apresentem baixa toxicidade aos humanos e que tenham especificidade pelos parasitas, levando-os à morte ou à redução de sua proliferação (SINGH *et al.*, 2023). A nova série de derivados de pentamidina tem o potencial de revelar compostos inovadores como candidatos promissores para o tratamento da leishmaniose. Além disso, essa investigação busca compreender os mecanismos de ação desses compostos por meio de ferramentas bioquímicas, análise *in silico* e experimentos *in vivo*.

6.1 ANÁLISE *IN SILICO*

6.1.1 Lipofilicidade, Previsões ADMET e Regra dos 5 de Lipinski

A lipofilicidade refere-se à capacidade de dissolver-se em substâncias apolares, sendo um fator importante para a eficácia dos fármacos (Arnott; Planey, 2012; Klein *et al.*, 2021). Ela atua como indicativo da capacidade de uma molécula em atravessar membranas celulares. Dessa forma calculou-se os valores de LogP dos compostos testados (Tabela 2).

O valor LogP determinado é a razão entre a concentração das substâncias na fase orgânica e sua concentração na aquosa. De acordo com Tavares (2004), para que exista balanço entre a permeabilidade membranar e solubilidade, os valores de LogP devem variar de 2 a 5 (Alves *et al.*, 2023). Neste contexto, é possível verificar que os compostos apresentaram maior lipofilicidade em comparação à própria pentamidina. Isso significa que eles permeiam mais facilmente as membranas celulares, o que facilita sua capacidade de atingir os protozoários, especialmente as formas amastigotas, que estão localizadas no meio intracelular (Zolek *et al.*, 2019).

Tabela 2 - Valores de LogP da pentamidina e seus derivados.

Compostos	LogP ^a
PQM 250	4,04
PQM 251	4,44
PQM 252	4,71
PQM253	4,37
PQM 254	3,44
PQM 256	4,93
PQM 257	5,02
PQM 258	4,86
PQM 259	3,93
PQM 261	5,34
PQM 262	5,48
Pentamidina	2,84

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: ^a Valores expressos de LogP (octanol/água) utilizando programa ChemDraw Ultra versão 11.0.

De acordo com essa análise, maiores valores de LogP espera-se melhores atividades dos compostos derivados de pentamidina contra as diferentes formas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* devido a melhor permeabilidade membranar, quando comparados ao fármaco de referência (Soliman *et al.*, 2021).

Paralelamente, foram realizadas as previsões ADMET pela plataforma SWISSADME, plataforma *online* que analisa através da estrutura química de compostos, parâmetros de farmacocinética como absorção gastrointestinal, barreira hematoencefálica, permeabilidade glicoproteica e permeabilidade na pele (Log Kp). Além disso, também foram analisadas a possível inibição por proteínas da família do citocromo P450. Para o presente ensaio, os resultados dos compostos foram comparados com os parâmetros ADMET dos fármacos pentamidina e glucantime® (GLU) (Tabela 3).

Os resultados indicaram que os compostos apresentam alta absorção gastrointestinal, sugerindo que poderiam ser administrados por via oral com boa biodisponibilidade. Em relação à barreira hematoencefálica (BHE), os compostos mostraram uma capacidade limitada de atravessá-la, similar à pentamidina, o que pode ser vantajoso para evitar efeitos adversos no sistema nervoso central, mantendo a eficácia no tratamento da leishmaniose.

Quanto à permeabilidade glicoproteica (Pgp), que atua como uma

bomba de efluxo, limitando a biodisponibilidade de fármacos e sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, o composto PQM 250 apresentou uma interação com a Pgp. Isso sugere que esses compostos poderiam ter uma biodisponibilidade mais favorável e uma maior eficácia terapêutica, uma vez que seriam menos propensos a serem rapidamente eliminados pelas células-alvo, otimizando sua ação no organismo.

Por fim, a maioria dos derivados demonstrou uma inibição eficaz das enzimas citocromo P450 de *Leishmania*, com atividade superior à observada para a pentamidina e o glucantime®. Esse dado sugere que os compostos investigados possuem um mecanismo de ação promissor para interromper a infecção pelo parasita, oferecendo potencial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no combate à leishmaniose.

Tabela 3 - Previsões ADMET dos compostos derivados da pentamidina comparados com os fármacos de referência pentamidina e glucantime®.

Parâmetros Compostos	AGI	BHE	Pgp	Log Kp	CPY450 1A2	CPY450 2C19	CPY450 2C9	CPY450 2D6	CPY450 3A4
	PQM250	Alto	Não	Sim	-5,57	Sim	Sim	Sim	Não
PQM251	Alto	Não	Não	-5,3	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM252	Alto	Não	Não	-5,52	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM253	Alto	Não	Não	-5,36	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM254	Alto	Não	Não	-6,14	Não	Não	Sim	Não	Não
PQM256	Alto	Não	Não	-5,12	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM257	Alto	Não	Não	-5,34	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM258	Alto	Não	Não	-5,18	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM259	Alto	Não	Não	-5,96	Sim	Não	Não	Não	Não
PQM261	Alto	Não	Não	-5,01	Sim	Sim	Sim	Não	Não
PQM262	Alto	Não	Não	-4,88	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Pent	Alto	Não	Não	-9,80	Não	Não	Não	Não	Não
GLU	Baixa	Não	Não	-11,34	Não	Não	Não	Não	Não

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: GLU – Glucantime®; Pent – Pentamidina; AGI – Absorção gastrointestinal; BHE – Barreira hematoencefálica; Pgp – Permeabilidade glicoproteica; Log Kp – Permeabilidade à pele; CYP – Citocromo.

Nota: Alto/Baixa significa o grau de absorção gastrointestinal pelo composto; Não/Sim significa se o composto atravessa a barreira hematoencefálica, apresenta permeabilidade glicoproteica e se inibem o cinetocromo.

Um ensaio também já realizado com os compostos derivados da pentamidina analisou as propriedades físico-químicas para avaliar seu potencial administração por via oral em estudos *in vivo*. Neste caso, foram avaliados parâmetros essenciais, como a massa molecular, os aceptores de ligação de hidrogênio, a função doadora de hidrogênio e o coeficiente de partição (Log P). Conforme apresentado na Tabela 2, os valores de Log P dos compostos confirmaram-se compatíveis com os calculados pelo programa ChemDraw, garantindo maior confiabilidade aos dados. De acordo com Lipinski *et al.* (2001), os pontos de corte de cada parâmetro, conhecidos como 'Regras dos 5', devem ser próximos ou múltiplos de 5, incluindo a solubilidade em água, para prever a biodisponibilidade oral. Em comparação com os fármacos controle pentamidina e glucantime®, observou-se que a maioria dos compostos testados não apresentou violações às Regras dos 5 de Lipinski, com exceção do composto PQM 262, que, assim como os fármacos de referência, apresentou violações.

Tabela 4 - Regra dos 5 de *Lipinski*.

Lipinsk	Solubilidade em água	MM (≤500)	ALH (≤ 10)	DLH (≤5)	Log P (≥5)	Violações
PQM250	MS	345,76	5	1	4,04	0
PQM251	MS	362,21	4	1	4,44	0
PQM252	MS	406,66	4	1	4,71	0
PQM253	MS	341,79	4	1	4,37	0
PQM254	MS	371,78	6	2	3,44	0
PQM256	MS	365,74	6	1	4,93	0
PQM257	MS	410,19	6	1	5,02	0
PQM258	MS	345,32	6	1	4,86	0
PQM259	MS	375,3	8	2	3,93	0
PQM261	MS	359,35	6	1	5,34	0
PQM262	MS	400,19	6	1	5,48	1
Pent	MS	340,37	4	1	2,84	1
GLU	OS	365,98	9	7	-2,9	1

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: Pent - Pentamidina; GLU – Glucantime®; MS – moderadamente solúvel; PS – Pouco solúvel; MM- massa molecular; ALH –ceptor de ligação de Hidrogênio; DLH – doador de ligação de Hidrogênio; Log P – Coeficiente de Partição.

A regra dos 5 de Lipinski é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a viabilidade de compostos com propriedades farmacêuticas desejáveis, particularmente no contexto de administração oral. Ela se baseia na premissa

de que compostos ativos por via oral não devem ter moléculas excessivamente polares, o que pode comprometer sua biodisponibilidade. De acordo com essa regra, os compostos não devem violar mais de um parâmetro para serem considerados bons candidatos a fármacos orais (Masood, 2017). Especificamente, quando um composto apresenta baixa absorção ou permeabilidade, isso geralmente está associado a violações em mais de um critério das Regras dos 5. Esses compostos, em geral, possuem mais de cinco doadores de ligação de hidrogênio, uma massa molar superior a 500, um coeficiente de partição (Log P) maior que cinco e a soma dos átomos de nitrogênio e oxigênio maior que dez (Lipinski *et al.*, 2001). Tais características podem dificultar a passagem através das membranas celulares e reduzir a solubilidade, afetando a absorção e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica do composto.

Portanto, ao aplicar a regra dos 5 de Lipinski, é possível racionalizar o design de novos compostos, ajustando suas propriedades para otimizar a absorção oral e a eficácia clínica. Vale ressaltar que, embora a violação das regras possa indicar desafios, não significa que um composto esteja automaticamente descartado. A modificação de sua estrutura, como a introdução de grupos funcionais que favoreçam a solubilidade ou a alteração do perfil de lipofilicidade, pode superar esses obstáculos, possibilitando o desenvolvimento de fármacos orais mais eficazes. Adicionalmente, para aprofundar os estudos *in silico* com os derivados da pentamidina, buscou-se identificar proteínas/enzimas específicas que possivelmente estão envolvidas no mecanismo de ação. Este processo baseou-se na literatura, a qual descreve ações da pentamidina e orientou a execução do *docking* molecular.

6.1.2 Modelagem molecular e *docking*

Os estudos de *docking* têm sido amplamente utilizados para prever a interação entre proteínas e ligantes, com base nas energias de ligação entre ambos (Venkatesan *et al.*, 2010). Para este estudo, foram utilizadas algumas sequências de proteínas coletadas do banco de dados PDB para a modelagem (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação PDB dos organismos para modelagem de acordo com as proteínas específicas.

Proteína	Organismo	Identificação PDB
Glicose-6-fosfato desidrogenase	Sequência de aa de <i>T. cruzi</i>	5AQ1
Topoisomerase I	Sequência de aa de <i>L. donovani</i>	2B9S
Topoisomerase II	Sequência de aa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1BJT
Tripanotiona Sintase	Sequência de aa de <i>L. major</i>	2VOB
Tripanotiona Redutase	Sequência de aa de <i>L. infantum</i>	2JK6

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Conforme descrito previamente por Piacenza (2009) o sistema antioxidante exclusivo de *Leishmania spp.* torna suas moléculas envolvidas nesse processo candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma terapia mais específica. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a glicose-6-fosfato desidrogenase, tripanotiona sintase e redutase, topoisomerase I e II, além de estudos mostrarem que o mecanismo de ação da pentamidina estaria envolvido com estes fatores.

Com base nas sequências de proteínas apresentadas na Tabela 5, a modelagem foi realizada por homologia, seguida de testes de qualidade das proteínas utilizando programas específicos. A homologia mais validada nas verificações foi escolhida, e a melhor sequência disponível no *Protein Data Bank* (PDB) foi utilizada para a identificação dos sítios ativos das proteínas, por meio do programa *Cavity*, que detecta e define as cavidades de ligação do ligante nas superfícies das proteínas. O *docking* molecular foi então realizado (Tabela 6). No entanto, vale destacar que o *docking* não pôde ser realizado para a proteína topoisomerase II, uma vez que a modelagem não apresentou qualidade ideal para análise.

Tabela 6 - Função de avaliação (*score function*) do docking molecular dos derivados da pentamidina com diferentes proteínas.

<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>											
Proteína / Compostos	PQM 250	PQM 251	PQM 252	PQM 253	PQM 254	PQM 256	PQM 257	PQM 258	PQM 259	PQM 261	PQM 262
Glicose-6- fosfato	- 64.85	- 60.89	- 54.33	- 63.38	- 49.67	- 59.98	- 61.43	- 64.92	- 56.92	- 69.24	- 66.83
desidrogenase											
Topoisomerase I	- 53.73	- 53.01	- 54.63	- 56.46	- 58.48	- 53.16	- 53.01	- 54.41	- 46.62	- 56.66	- 60.51
Tripanotiona sintase	- 66.61	- 57.46	- 51.68	- 66.36	- 59.67	- 71.45	- 68.88	- 71.89	- 60.10	- 70.80	- 74.29
Tripanotiona redutase	- 58.39	- 55.38	- 53.00	- 57.22	- 53.48	- 63.47	- 65.65	- 66.83	- 59.68	- 73.46	- 68.35
<i>Leishmania (L.) infantum</i>											
Proteína / Compostos	PQM 250	PQM 251	PQM 252	PQM 253	PQM 254	PQM 256	PQM 257	PQM 258	PQM 259	PQM 261	PQM 262
Glicose-6- fosfato	- 63.90	- 63.53	- 64.12	- 62.46	- 65.67	- 68.56	- 63.13	- 63.71	- 67.75	- 68.93	- 70.75
desidrogenase											
Topoisomerase I	- 57.72	- 61.99	- 55.92	- 60.66	- 61.38	- 63.90	- 63.78	- 58.41	- 66.14	- 68.83	- 68.46
Tripanotiona sintase	- 63.06	- 60.98	- 57.23	- 62.93	- 63.23	- 65.41	- 66.75	- 67.31	- 69.23	- 72.30	- 68.92
Tripanotiona redutase	- 80.46	- 81.52	- 83.34	- 82.32	- 79.26	- 72.71	- 75.73	- 76.04	- 66.31	- 82.02	- 86.06

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: *Docking* sinalizados de cinza se destacam por apresentarem melhor qualidade ligação à proteína.

A Tabela 6 apresenta alguns parâmetros (destacados em cinza) que indicam que o composto sinalizado, quando comparado aos outros, demonstrou melhor qualidade de interação. Isso sugere que o composto se liga de maneira mais eficiente à proteína específica, impedindo sua atividade e afetando, assim, o metabolismo dependente dessa proteína, o que pode levar à morte celular.

A relação dos melhores resultados de *docking* com os valores de citotoxicidade (Tabela 7) sugere que o derivado PQM 261 possui a melhor qualidade de ligação com a maioria das proteínas estudadas em todas as cepas analisadas, quando comparado aos derivados PQM 250 e PQM 254. Essa correlação positiva entre os resultados de docking e citotoxicidade é um indicativo de que, além de se ligarem eficientemente às proteínas-alvo, esses compostos têm impacto biológico direto na viabilidade do parasita.

Além disso, os compostos derivados da pentamidina apresentam uma vantagem significativa, pois a maioria deles não violou as regras de Lipinski, conforme os parâmetros físico-químicos avaliados, como o coeficiente de partição Log P (Tabela 2). Isso sugere que esses compostos possuem propriedades favoráveis à absorção oral, o que é crucial para o desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados de forma mais conveniente, oferecendo uma alternativa mais eficaz no tratamento da leishmaniose. A identificação de compostos com essas características pode superar as limitações dos tratamentos atuais, que possuem eficácia limitada e efeitos colaterais indesejáveis.

Tabela 7 - Relação dos compostos promissores com o *docking molecular*, mostrando a melhor qualidade de ligação em cada espécie de *Leishmania*.

Espécies	Proteínas/Enzimas	Compostos		
		PQM 250	PQM 254	PQM 261
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Glicose-6-fosfato desidrogenase	-64.85	-49.67	-69.24
	Topoisomerase I	-53.73	-58.48	-56.66
	Tripanotiona sintase	-66.61	-59.67	-70.8
	Tripanotiona redutase	-58.39	-53.48	-73.46
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	Glicose-6-fosfato desidrogenase	-63.9	-65.67	-68.93
	Topoisomerase I	-57.72	-61.38	-68.83
	Tripanotiona sintase	-63.06	-63.23	-72.3
	Tripanotiona redutase	-80.46	-79.26	-82.02

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: Valores destacados em cinza significam que apresentou melhor qualidade de ligação quando comparados aos demais derivados da pentamidina, de acordo com a enzima específica.

Embora os resultados sejam promissores, algumas limitações devem ser consideradas. A modelagem de topoisomerase II não foi ideal, o que impede uma análise completa dessa proteína como alvo terapêutico. Futuras melhorias na modelagem molecular ou obtenção de dados experimentais podem

melhorar a análise dessa proteína. Além disso, a validação dos resultados de *docking* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* será crucial para confirmar a eficácia e a especificidade dos compostos, além de sua viabilidade terapêutica. A modelagem de proteínas desempenha um papel crucial na identificação de novos alvos terapêuticos, e os resultados aqui apresentados fornecem uma base sólida para a otimização dos compostos derivados da pentamidina.

Com base nas análises realizadas e nas pesquisas sobre a atividade e mecanismos de ação da pentamidina, foram definidos ensaios adicionais para elucidar as possíveis vias pelas quais os derivados da pentamidina afetam a *Leishmania*. Esses ensaios ajudarão a aprofundar o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes contra a leishmaniose.

6.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE *Leishmania* spp.

A diferenciação *in vitro* de amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* em promastigotas foi observada por microscopia óptica, cujo resultado corrobora com os achados na literatura. A primeira etapa visível neste processo é o alongamento de um flagelo móvel, que ocorre antes da divisão celular, e após esta primeira divisão, ambas as células filhas apresentam um flagelo móvel (Gadelha; Cunha-e-Silva; De Souza, 2013). Outro fator visível é a mudança da morfologia do parasita, onde as amastigotas esféricas passam a se tornar mais alongadas. Segundo Ambit e colaboradores (2011), é importante analisar morfológicamente os diferentes tipos de células promastigotas, já que essas sofrem mudanças durante o ciclo celular em cultivo *in vitro*. Um estudo demonstrou que à medida que uma promastigota prossegue no ciclo celular, ela se duplica e, em seguida, reduz seu comprimento celular à metade. Além disso, ao contrário de muitos outros organismos, as duas células-filhas produzidas pela divisão celular de formas promastigotas de *Leishmania* são diferentes. Ou seja, uma herdará o flagelo antigo e, portanto, mais longo, e a outra o flagelo novo mais curto, de modo que a divisão pode gerar duas células-filhas com comprimentos de flagelo

diferentes (Wheeler; Gluenz; Gull, 2011).

No entanto, o desenvolvimento do ciclo de vida é considerado uma via de mão única, em que à medida que o parasita passa por cada etapa, ele se compromete a se diferenciar para o próximo estágio do ciclo de vida, sem ser capaz de reverter o estágio anterior. Isso significa que haverá diferenças significativas entre os parasitas nos seus diferentes estágios do ciclo de vida, e estas vão muito além da morfológica, a exemplo das variações no metabolismo celular e na expressão de proteínas de membrana (Inbar *et al.*, 2017; Freitas-Mesquita *et al.*, 2021). Em vista disso, a determinação da curva de proliferação da *Leishmania* utilizada na pesquisa revelou-se de extrema importância, já que o parasita se comporta de maneiras distintas em cada fase (Mule *et al.*, 2024). Dessa forma, a determinação dessas fases fornece informações cruciais para o planejamento estratégico experimental. Isso não apenas aprimora a precisão dos resultados obtidos, mas também contribui para uma interpretação mais precisa das respostas dos parasitas a diferentes tratamentos.

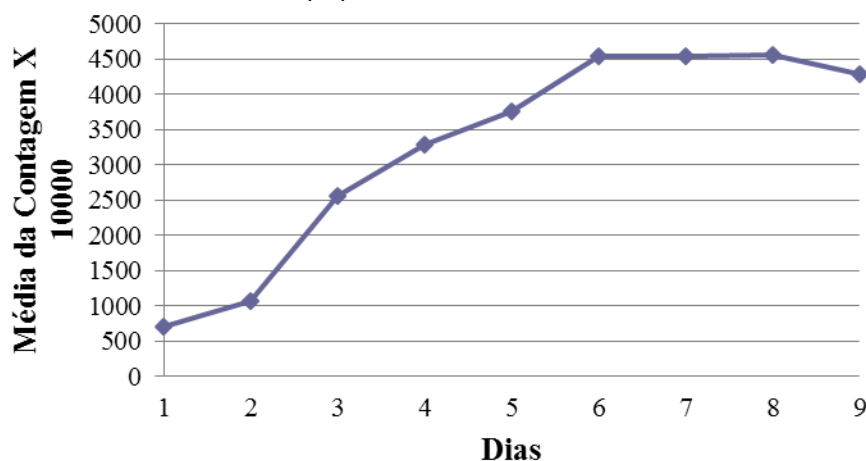
6.3 CURVA DE PROLIFERAÇÃO

A categorização das fases da curva de proliferação é de suma importância, uma vez que cada uma delas exibe distinções bioquímicas notáveis, incluindo variações na disponibilidade de substrato, suplementação e na produção de metabólitos pelos parasitas (Nunes *et al.*, 2022). Durante a fase logarítmica, as leishmanias possuem um corpo celular ampliado, flagelo longo e uma maior taxa de proliferação celular. Em contraste, na fase estacionária, há uma redução no tamanho do corpo celular e no comprimento do flagelo, sendo esta a fase mais propensa à infecção. Neste contexto, a fase logarítmica é utilizada para ensaios anti-promastigota, enquanto a estacionária é empregada na infecção de macrófagos peritoneais murinos em ensaios anti-amastigota (Sinha *et al.*, 2018).

A curva de proliferação obtida para *Leishmania (L) amazonensis* (Figura 6) demonstrou que nas primeiras 48 horas, os parasitas se encontram em fase *lag*; seguido pela *log* até o sexto dia (48 a 144 horas); e posteriormente a estacionária, do sexto ao oitavo dia (144 a 192 horas). A partir do oitavo dia

após o repique, as formas promastigotas se encontram em fase de declínio ou morte.

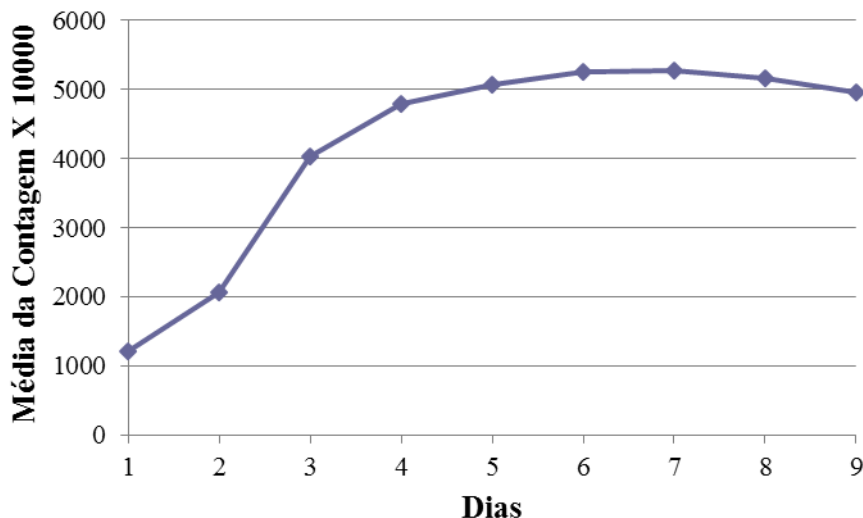
Figura 6 - Curva de proliferação das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A curva de proliferação obtida para *Leishmania (L) infantum chagasi* (figura 7) demonstrou que nas primeiras 48 horas, os parasitas se encontram em fase *lag*; seguida pela *log*, do segundo ao sexto dia (48 a 120 horas); e posteriormente atinge a estacionária até o sétimo dia (120 a 168 horas). A partir do sétimo dia após o repique, as formas promastigotas se encontram em fase de declínio ou morte.

Figura 7 - Curva de proliferação das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A partir dos dados indicados pelas figuras 6 e 7 foi estabelecido para a realização de experimentos que para *Leishmania (L.) amazonensis* a fase *lag* se encontra no segundo dia; *log*, três dias e estacionária, seis dias a partir do repique. Em relação a *Leishmania (L.) infantum chagasi*, a fase *lag* se encontra em dois dias; *log* a partir do segundo dia, e estacionária, a partir do sexto dia após o repique. Foi possível notar que as duas cepas apresentam comportamento diferente em cultura, como também observado por Espuri *et al.* (2017). Uma vez estabelecido os dias das fases da curva de proliferação, tornou-se viável dar continuidade aos experimentos de avaliação da atividade leishmanicida e investigação dos mecanismos de ação.

6.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS

Como as formas amastigotas de *Leishmania* invadem especialmente o sistema fagocítico mononuclear nos hospedeiros vertebrados (Mougneau; Bihl; Glaichenhaus, 2011; Burza *et al.*, 2018), a avaliação da citotoxicidade dos compostos é fundamental para verificar se os mesmos têm efeito tóxico nas células deste sistema. Assim, avaliou-se a toxicidade dos compostos quando incubados com macrófagos peritoneais murinos em diferentes tempos de incubação (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da citotoxicidade de compostos derivados da pentamidina em macrófagos peritoneais murinos, incubados por 24, 48 e 72 horas.

Compostos	CC₅₀ ($\mu\text{M} + \text{dp}$)^a 24 horas	CC₅₀ ($\mu\text{M} + \text{dp}$)^a 48 horas	CC₅₀ ($\mu\text{M} + \text{dp}$)^a 72 horas
PQM 250	236.72 \pm 10.41	274.75 \pm 15.01	257.98 \pm 8.57
PQM 251	149.63 \pm 5.57	188.56 \pm 10.84	227.63 \pm 3.82
PQM 252	161.09 \pm 14.7	101.80 \pm 8.88	63.44 \pm 13.48
PQM 253	31.15 \pm 4.28	32.76 \pm 3.98	65.44 \pm 3.98
PQM 254	75.98 \pm 5.82	89.30 \pm 2.75	120.09 \pm 6.12
PQM 256	124.40 \pm 8.11	245.72 \pm 6.43	178.81 \pm 17.15
PQM 257	62.77 \pm 3.82	132.62 \pm 13.48	119.45 \pm 8.88
PQM 258	34.31 \pm 7.65	104.25 \pm 4.13	140.44 \pm 10.41
PQM 259	52.41 \pm 7.04	48.22 \pm 6.12	29.84 \pm 5.05
PQM 261	126.20 \pm 6.40	96.98 \pm 1.37	245.44 \pm 9.19
PQM 262	98.57 \pm 5.51	87.33 \pm 6.58	80.08 \pm 14.39
Pentamidina	16.59 \pm 0.18	11.16 \pm 0.61	75.77 \pm 2.75

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: dp: desvio padrão

Nota: ^a Cada valor de CC₅₀ representa a média \pm desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. *Compostos apresentam diferença estatística com à pentamidina quando comparados com seu tempo de incubação ($p < 0,05$). Valores com tracejados significam que o estudo foi descontinuado.

De acordo com os resultados da tabela 8 é possível observar que os compostos derivados da pentamidina apresentaram menor toxicidade em relação ao fármaco de referência, pentamidina, em todos os tempos de incubação, principalmente os derivados PQM 250, PQM 254 e PQM 261. O composto PQM 250 apresentou menor toxicidade em todos os tempos de incubação (CC₅₀ 24horas = 236.72 \pm 10.41 μM ; CC₅₀ 48horas = 274.75 \pm 15.01 μM ; CC₅₀ 72horas = 257.98 \pm 8.57 μM) em relação ao demais compostos e fármaco de referência (pentamidina: CC₅₀ 24horas = 16,59 \pm 0,18 μM ; CC₅₀ 48horas = 11,16 \pm 0,61 μM ; CC₅₀ 72horas = 75,77 \pm 2,75 μM). Corroborando esses resultados, estudos anteriores avaliaram citotoxicidade de diferentes compostos em variados tempos de incubação, demonstrando a importância de testar a eficácia de novos compostos em múltiplos intervalos de tempo (Mirzaei *et al.*,

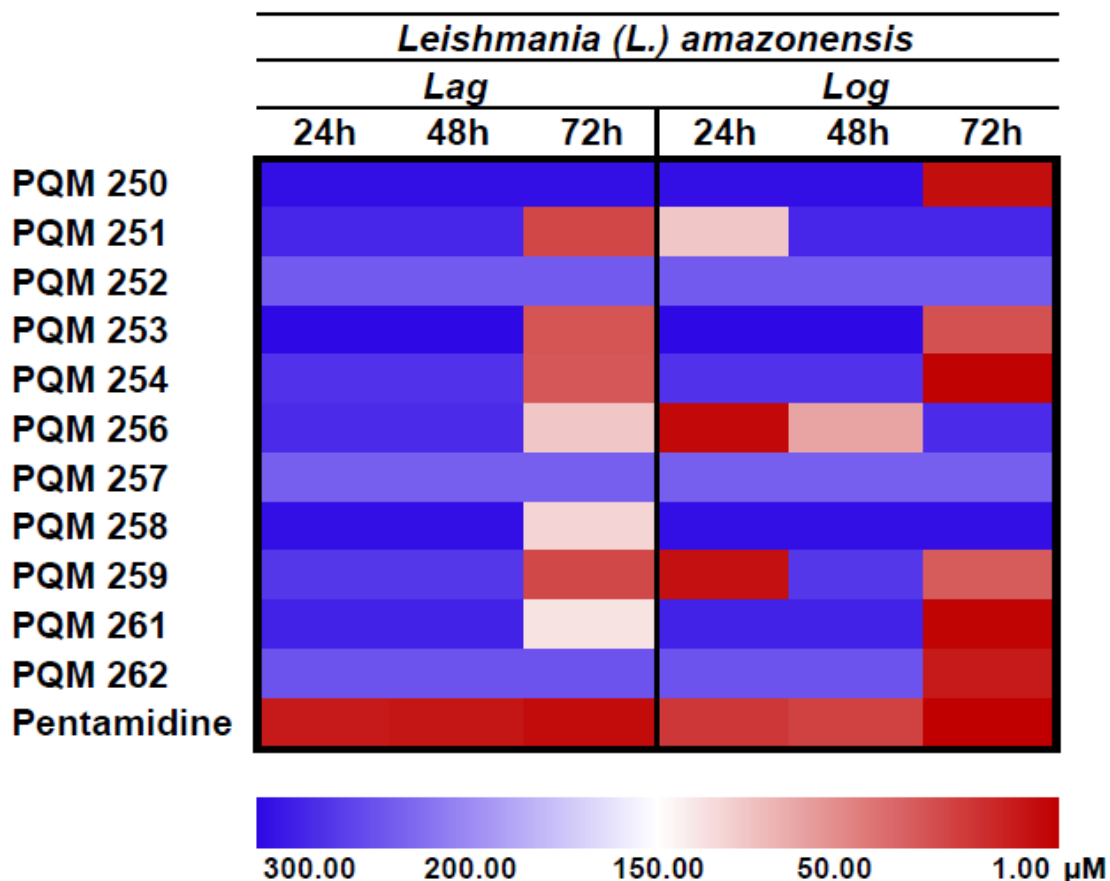
2020; Brasil *et al.*, 2017; Gouveia *et al.*, 2022). Estes dados mostram que modificações estruturais na molécula da pentamidina favoreceram a redução de sua toxicidade em células de mamíferos. Nesse sentido foi realizado ensaios para avaliação da atividade leishmanicida e mecanismo de ação com a pentamidina e seus derivados.

6.5 *Leishmania (L.) amazonensis*

6.5.1 Atividade anti-promastigota e anti-amastigota; IS e InEs

Após a determinação da curva de proliferação foi avaliada *in vitro* a atividade leishmanicida nas duas formas evolutivas do parasita. A atividade antipromastigota da pentamidina e seus derivados foi testada durante períodos de tratamento por 24, 48 e 72 horas, bem como nas fases *lag* e *log* da curva de proliferação para a determinação da EC₅₀ (Figura 8; Apêndice A).

Figura 8 - Mapa de calor dos resultados da atividade da pentamidina e seus derivados contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, nas fases *lag* e *log* da curva de proliferação, tratadas durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: A escala de cores do mapa de calor ilustra o EC_{50} contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. A coloração azul indica “nenhuma atividade”, o branco indica “pouca atividade” enquanto a coloração vermelha indica “forte atividade”. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

Na fase *lag* da curva de proliferação é possível observar que a maioria dos compostos apresentaram atividade contra promastigotas apenas quando incubados por 72 horas e são estatisticamente diferentes ao resultado observado com a pentamidina ($p < 0,05$). Já na fase *log*, os compostos PQM 256 e PQM 259 demonstraram excelentes resultados com 24 horas de incubação, com EC_{50} de 8,88 e 13,45 μM , respectivamente (Apêndice A). Além disso, foi possível observar uma potente atividade da maioria dos derivados com 72 horas de incubação na fase *log*, destacando-se PQM 254 e PQM 261, com valores menores que 5,98 μM e estatisticamente iguais ao obtido com a pentamidina, na mesma fase.

Paralelamente aos estes de ensaios, foi possível notar, como já descrito em 6.4, que os compostos derivados da pentamidina apresentaram menor toxicidade em relação ao fármaco de referência, pentamidina, em todos os tempos de incubação, principalmente os derivados PQM 250, PQM 254 e PQM 261, que se destacaram na atividade anti-promastigota quando tratadas com 72 horas (Apêndice A).

Com base nessas análises, determinou-se que o melhor tempo de incubação para os experimentos foi de 72 horas, proporcionando o tempo ideal para a avaliação da eficácia dos compostos.

Simultaneamente aos ensaios realizados com promastigotas, foram conduzidas avaliações da atividade anti-amastigota utilizando os compostos mais promissores, PQM 250, PQM 254 e PQM 261, em comparação à pentamidina. Esses ensaios foram realizados ao longo de um período de incubação de 72 horas (Tabela 9). A escolha desse tempo de incubação foi baseada em observações prévias de que, após 72 horas de tratamento, os compostos demonstraram maior atividade contra formas promastigotas. Além disso, a comparação entre a atividade antiparasitária e a citotoxicidade permitiu identificar os compostos mais seletivos, destacando os que apresentaram alta eficácia contra os parasitas e baixa toxicidade para as células hospedeiras (Fan *et al.*, 2018).

Também, a especificidade dos derivados da pentamidina foi analisada por meio do cálculo do InEs (Tabela 9), um índice que avalia a atividade dos compostos em diferentes estágios evolutivos do parasita. De acordo com Muijder *et al.* (2011), valores do InEs superiores a 2,0 indicam maior atividade em amastigotas intracelulares, valores abaixo de 0,4 indicam maior atividade em promastigotas, enquanto valores entre 0,4 e 2,0 indicam atividade em ambas as formas evolutivas (Muijder *et al.*, 2011; Vázquez-Jiménez, 2022).

Tabela 9 - Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e citotoxicidade incubadas por 72 horas e índice de seletividade (IS) e especificidade (InEs).

Compostos	EC₅₀-PRO ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)[*] IS	EC₅₀-AMA ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)[*] IS	CC₅₀ ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)[*]	InEs
PQM 250	12.17 \pm 1.2 21.19	29.52 \pm 3.3 ^b 8.73	257.98 \pm 8.5 ^c	0.41
PQM 254	5.16 \pm 1.8 ^a 23.27	21.92 \pm 0.1 ^b 5.47	120.09 \pm 6.1	0.23
PQM 261	5.98 \pm 0.6 ^a 41.04	45.63 \pm 5.8 5.37	245.44 \pm 9.19 ^c	0.13
Pentamidina	3.81 \pm 0.08 19.88	3.08 \pm 0.2 24.6	75.77 \pm 2.7	1.23

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: dp: desvio padrão.

Nota: * Cada valor de EC₅₀ representa a média \pm desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. ^{a,b,c} estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

Os resultados mostrados no mapa de calor revelam que alguns compostos, como PQM 250, PQM 254 e PQM 261, demonstraram eficácia contra as formas promastigotas, além de atividade contra amastigotas intracelulares. Segundo Don e Ioset (2014), o IS é um importante fator a ser analisado para mostrar que substâncias possuam especificidade, ou seja, possam atingir sítios ativos específicos do parasita causando menores efeitos colaterais nas células hospedeiras, onde valores superiores ou iguais a 10 são considerados satisfatórios (Oliveira *et al.*, 2020). Valores de IS maiores que 10 indicam que o composto apresentou maior atividade contra as formas promastigotas e/ou amastigotas e/ou menor toxicidade aos macrófagos (Antwi *et al.*, 2019). Assim, calculou-se os valores de IS em relação às formas promastigotas e amastigotas com os compostos mais promissores (PQM 250, PQM 254 e PQM 261). Considerando as diferenças estatísticas em relação à pentamidina, a ação desses contra o parasita foi evidente. No entanto, mesmo que os compostos apresentem um IS menor do que o do fármaco em

amastigotas, continua a ser nítida sua seletividade pelo protozoário, o que, por sua vez, torna pertinente o estudo de seu mecanismo de ação e sua “relação estrutura atividade”, de modo a identificar os alvos afetados no parasita e suas consequências. Trabalhos também realizaram avaliações de IS em ensaios leishmanicidas, como nos estudos de Alves *et al.* (2024), Espuri *et al.* (2019), e Folquitto *et al.* (2017), que observaram a importância dos valores obtidos para determinar a seletividade e segurança dos compostos, sugerindo que valores elevados de IS indicam uma melhor seletividade para o parasita em detrimento das células hospedeiras. Tal investigação de grande valia, visto que torna possível determinar quais alvos apresentam maior importância no contexto de sua sobrevivência, contribuindo, como um todo, para o avanço da pesquisa no combate à leishmaniose.

Ainda, a partir da análise da tabela 9, percebe-se que para os compostos PQM 254 e PQM 261, o InEs foi menor que 0,4, portanto mais ativos em promastigotas. Já o composto PQM 250 e pentamidina apresentaram-se entre 0,4 e 2, evidenciando seletividade para o estágio intracelular do parasita. Este fato é de extrema importância, uma vez que o amastigota intracelular é a forma de relevância clínica (Chanmol *et al.*, 2019).

Pela associação dos resultados obtidos com os ensaios anti-promastigota, anti-amastigota, citotoxicidade e coeficiente de partição, foi possível notar que os compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 se destacaram, mostrando-se potentes contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, e pouco tóxicos em relação aos macrófagos. Posteriormente, foi investigado o mecanismo de ação desses compostos para compreender sua interferência na sobrevivência dos parasitas.

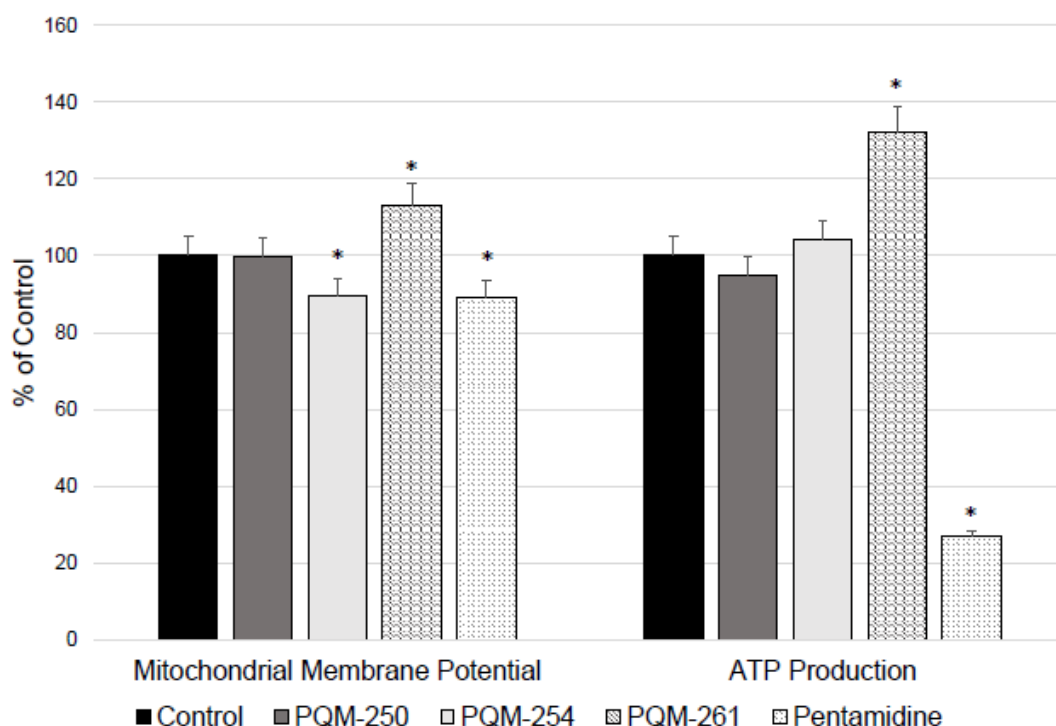
6.5.2 Mecanismo de Ação

O $\Delta\Psi$ desempenha um papel crucial na função mitocondrial, influenciando diretamente a produção de ATP, a geração de EROs, o transporte de íons e proteínas e a manutenção de vias de sinalização (Zorova *et al.*, 2018). Ao mesmo tempo, a manutenção de um ambiente celular reduzido é fundamental para a *Leishmania*, sendo mantido por um eficiente sistema de

defesa antioxidante centrado na tripanotiona (González-Montero *et al.*, 2024), que por sua vez depende da atividade da TryR e NADPH como fonte de equivalentes reduzidos (Piñeyro *et al.*, 2021). Assim, estes parâmetros e apoptose foram avaliados em leishmanias após o tratamento com concentrações equivalentes à EC_{50} dos compostos por 72 horas objetivando a compreensão do mecanismo de ação destes derivados de pentamidina.

Com relação ao $\Delta\Psi$, PQM 250, PQM 254, PQM 261 e pentamidina apresentaram diferentes efeitos (Figura 9). A pentamidina e o PQM 254 promoveram despolarização mitocondrial de 10,9 e 10,44%, respectivamente, enquanto o PQM 261 causou hiperpolarização de 13,16%. O tratamento com PQM 250 não resultou em alteração significativa ($p < 0,05$).

Figura 9 - Avaliação da bioenergética mitocondrial através do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) e produção de ATP em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: *Estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

A funcionalidade mitocondrial é essencial para a viabilidade celular, já que estes protozoários possuem apenas uma mitocôndria, que é o principal

sítio de geração de EROs e produção de ATP (Garcia *et al.*, 2017). A manutenção do $\Delta\Psi$ é crucial para a sobrevivência do parasita, regulando a fosforilação oxidativa e a geração de EROs (Brand; Nicholls, 2011). Alterações no $\Delta\Psi$, como despolarização ou hiperpolarização, podem resultar em apoptose. A pentamidina e o PQM 254, por exemplo, induziram despolarização mitocondrial ao longo de 72 horas, sugerindo que ambos compartilham mecanismos relacionados à morte celular. Estudos mostram que o estresse oxidativo, frequentemente associado à despolarização mitocondrial, pode levar à produção excessiva de EROs, danificando componentes celulares essenciais, como proteínas, lipídios, DNA e carboidratos (Duchen, 2000; Peloso *et al.*, 2020; Matos *et al.*, 2020). Pequenas alterações no $\Delta\Psi$ podem interferir no estado redox celular, influenciando diretamente a proliferação celular, uma vez que as EROs, especialmente o H_2O_2 , atuam como moléculas sinalizadoras que afetam as vias de sinalização ligadas ao crescimento e à sobrevivência celular (Lennicke *et al.*, 2015). Portanto, a disfunção mitocondrial e a plasticidade metabólica energética nos protozoários são limitadas, destacando a importância da função mitocondrial na sobrevivência e na eficácia dos tratamentos antiparasitários (Dagnino *et al.*, 2018). Dada a importância do $\Delta\Psi$ para a geração de ATP, a disfunção mitocondrial pode comprometer severamente a capacidade do parasita de sobreviver e se proliferar, sublinhando a relevância de estudos que investigam a relação entre potencial de membrana, produção de ATP e a eficácia de novos compostos antiparasitários (Mishra; Singh, 2013).

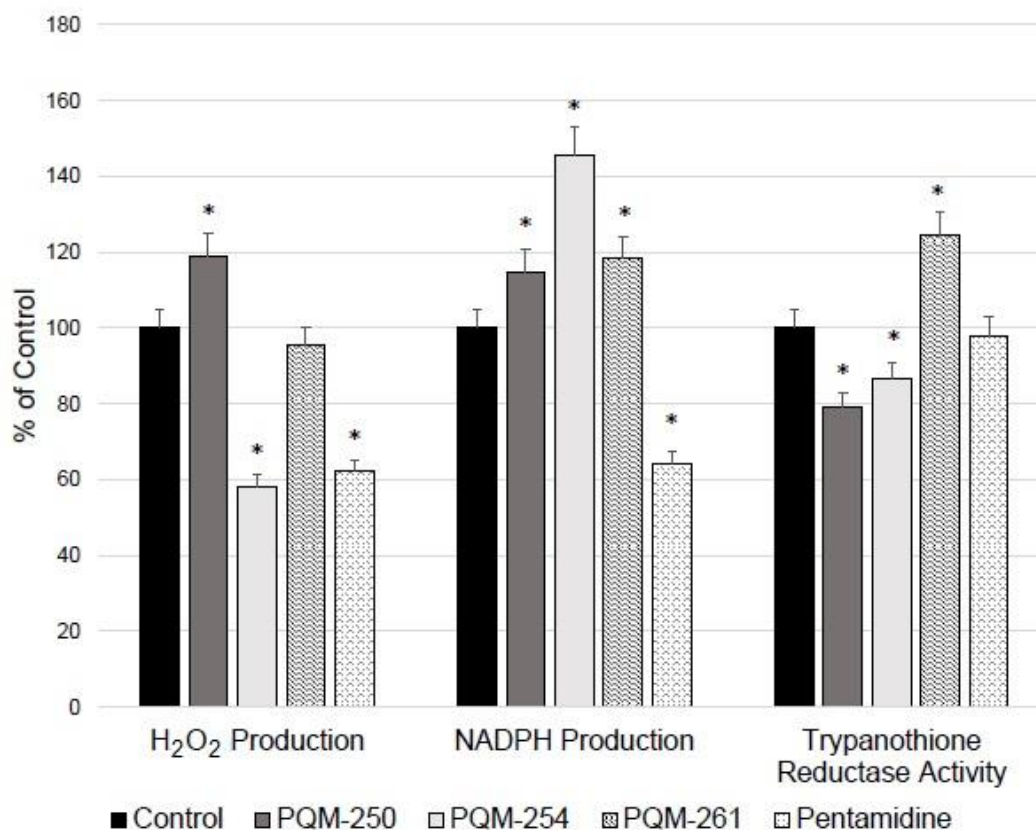
Com relação à produção de ATP, observou-se que o PQM 261 promoveu aumento em 32%, enquanto a pentamidina, redução de 73%. Os derivados PQM 250 e PQM 254 não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 9). O metabolismo de organismos unicelulares e multicelulares depende da síntese de moléculas energéticas, como o ATP (Duchen, 2000; Peloso *et al.*, 2020). A mitocôndria é o principal local de produção de ATP, e a proliferação dos parasitas de *Leishmania spp.* está intimamente relacionada ao metabolismo mitocondrial e à utilização de metabólitos e fontes de energia para seu desenvolvimento (O'Neill; Kishton; Rathmell, 2016). Embora a pentamidina e seus derivados possam atuar na mitocôndria, isso não implica necessariamente na redução dos níveis

plasmáticos de ATP, pois os parasitas já são adaptados para proliferar em condições de hipóxia, como as encontradas nos fagossomos do sistema imune dos hospedeiros (Fidalgo; Gille, 2011; Manzano *et al.*, 2011; Basselin *et al.*, 2002). Estudos mostram que a inativação do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e a interrupção da fosforilação oxidativa em amastigotas de *L. (L.) donovani* evidenciam que a produção de ATP na mitocôndria desempenha um papel secundário na sobrevivência do parasita, que possui mecanismos compensatórios para a produção energética, fundamentais na resistência a fármacos (Sarkar *et al.*, 2022). Assim, a manutenção dos níveis de ATP intracelular por parte dos compostos PQM 250 e PQM 254 não indica ausência de ação na mitocôndria ou na cadeia transportadora de elétrons; ao contrário, sugere que o parasita utiliza mecanismos de compensação energética, onde o efeito leishmanicida não resulta da falta de energia, mas do comprometimento mitocondrial, que pode inviabilizar sua sobrevivência (Sarkar *et al.*, 2022; Manzano *et al.*, 2010). Paralelamente, Manzano *et al.* (2010) demonstraram que o aumento da concentração de ATP, oriundo primariamente da via glicolítica, é um mecanismo chave na resistência a fármacos. Assim, o aumento da concentração de ATP observado após o tratamento com o composto PQM 261 corrobora a ideia de que o parasita se adapta utilizando outras vias metabólicas para a geração de energia.

Os tripanossomatídeos, incluindo os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, possuem um sistema antioxidante sofisticado que desempenha um papel crucial na sua sobrevivência e virulência (Ramu; Singh, 2019). Este sistema é composto por enzimas, como a TryR, peroxidases e catalases, que trabalham em conjunto para neutralizar as EROs, incluindo o H₂O₂ (Docampo *et al.*, 2022). Embora o H₂O₂ seja um subproduto natural do metabolismo celular e desempenhe funções importantes como sinalizador redox, sua concentração deve ser cuidadosamente regulada. Assim, a manutenção do equilíbrio entre a produção e a detoxificação do H₂O₂ é essencial para a viabilidade e a eficácia terapêutica contra os tripanossomatídeos (Peloso *et al.*, 2020). No que diz respeito à produção de H₂O₂, em relação ao controle, os tratamentos com PQM 254, PQM 261 e pentamidina resultaram em redução de 41,7%, 4,6% e 37,9%, respectivamente, enquanto o PQM 250, aumento de

18,9% (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da produção de H₂O₂, NADPH e atividade da TryR em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: *Estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

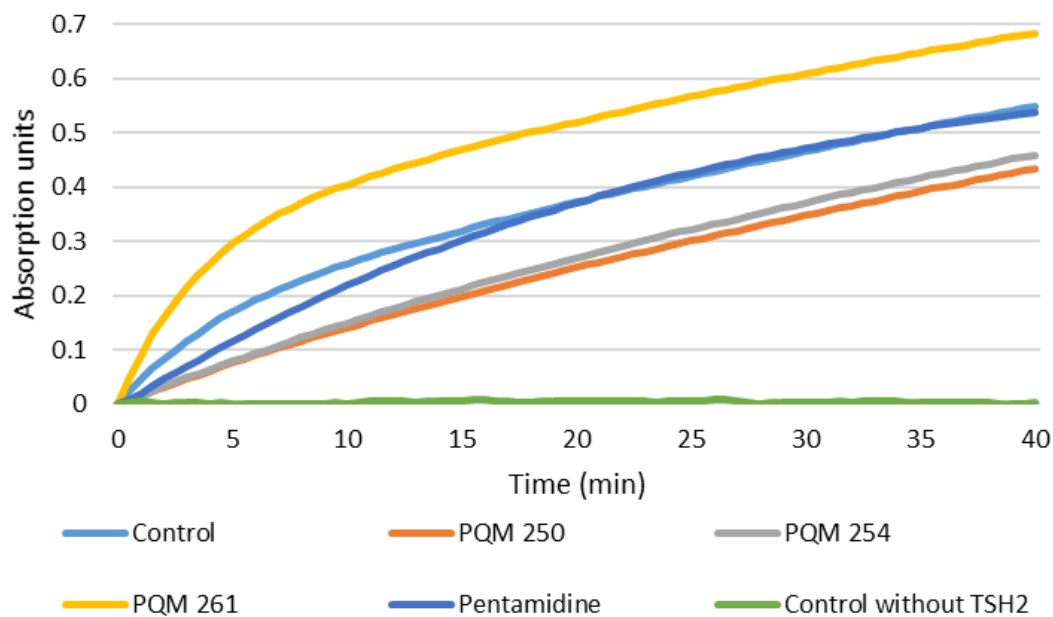
Níveis elevados de H₂O₂ podem causar estresse oxidativo, levando à oxidação de componentes celulares essenciais e, conseqüentemente, à morte celular (Duchen, 2000; Peloso *et al.*, 2020). Contudo, a manutenção de uma concentração fisiológica de H₂O₂ é igualmente crucial, pois níveis adequados podem ativar vias de sinalização que promovem a adaptação e sobrevivência dos parasitas, ajudando-os a responder a condições adversas. Pesquisas indicam que a regulação apropriada dos níveis de H₂O₂ pode favorecer a proliferação celular e fortalecer a capacidade dos parasitas de lidar com condições adversas, desempenhando um papel importante na resistência a fármacos (Garcia *et al.*, 2017; Sarkar *et al.*, 2022). Nesse contexto, a

concentração ideal de H_2O_2 é fundamental para a sobrevivência do parasita. Pesquisas demonstram que níveis baixos de H_2O_2 estão associados à diminuição do crescimento e proliferação celular (Lennicke *et al.*, 2015), enquanto níveis elevados provocam estresse oxidativo e comprometem a viabilidade celular (Peloso *et al.*, 2012). Por exemplo, o aumento de H_2O_2 observado com os compostos PQM 250 pode levar a danos celulares e inviabilidade do parasita, evidenciada pela redução significativa no número de parasitas após o tratamento com esses derivados da pentamidina. Em contraste, os compostos PQM 254 e pentamidina mantiveram baixos níveis de H_2O_2 , resultando em uma diminuição do crescimento celular.

Neste contexto, a manutenção da produção de H_2O_2 dentro de níveis normais é crucial e depende da atividade da TryR (Piñeyro *et al.*, 2021). Para que essa enzima funcione adequadamente, é necessário que os equivalentes reduzidos de NADPH estejam disponíveis, o qual desempenha um papel central na resposta antioxidante dos tripanossomatídeos. Na avaliação da produção de NADPH, os compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 promoveram aumentos de 14,89%, 45,61% e 18,35%, respectivamente, enquanto a pentamidina resultou em uma redução de 35,86% (Figura 10). Este aumento na produção de NADPH sugere que os derivados da pentamidina podem potencialmente melhorar a capacidade dos parasitas em lidar com o estresse oxidativo, reforçando sua resposta antioxidante. Em contraste, o tratamento com a pentamidina resultou em uma redução significativa de NADPH, o que pode comprometer a função da TryR e, portanto, a capacidade do parasita de mitigar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (García *et al.*, 2017). A relação entre a atividade da TryR e a produção de NADPH é particularmente relevante no contexto da resistência a fármacos. Em *Leishmania spp.*, a desregulação de vias antioxidantes pode levar à sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo, comprometendo a viabilidade do parasita. O estudo de Fidalgo e Gille (2011) sugere que o metabolismo adaptativo das leishmanias, em resposta a condições de estresse, pode estar intimamente ligado à capacidade do parasita de regular a produção de H_2O_2 e NADPH. Portanto, as descobertas relacionadas aos derivados que parecem aumentar a produção de NADPH sugerem novas oportunidades para intervenções farmacológicas focadas na modulação da homeostase redox nos

parasitas. O aumento na disponibilidade de NADPH fortalece o sistema antioxidante dos parasitas, auxiliando na manutenção do equilíbrio redox, essencial para sua sobrevivência em condições de estresse oxidativo. Além disso, a inibição da TryR, uma enzima chave no sistema de defesa antioxidante de tripanossomatídeos, é amplamente reconhecida como uma abordagem promissora para comprometer o sistema redox e levar à morte celular. A TryR, sendo fundamental para a regeneração de tripanotiona, ou seja, um componente vital na neutralização de EROs, é um alvo molecular valioso para o desenvolvimento de fármacos eficazes pois é essencial para a sobrevivência do parasita (Ortalli *et al.* 2018). Ao interferir na função dessa enzima, os compostos podem induzir ao estresse oxidativo irreversível no parasita, promovendo sua eliminação (Turcano *et al.*, 2020). Nesse sentido, nos ensaios para avaliar a atividade da TryR, a incubação com PQM 250 e PQM 254 promoveu uma redução de 21 e 13,4% em relação ao controle, respectivamente, enquanto o PQM 261, aumento de 24,5%. O tratamento com pentamidina não gerou alteração significativa ($p < 0,05$) (Figura 10 e 11).

Figura 11 - Avaliação da atividade da TryR em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

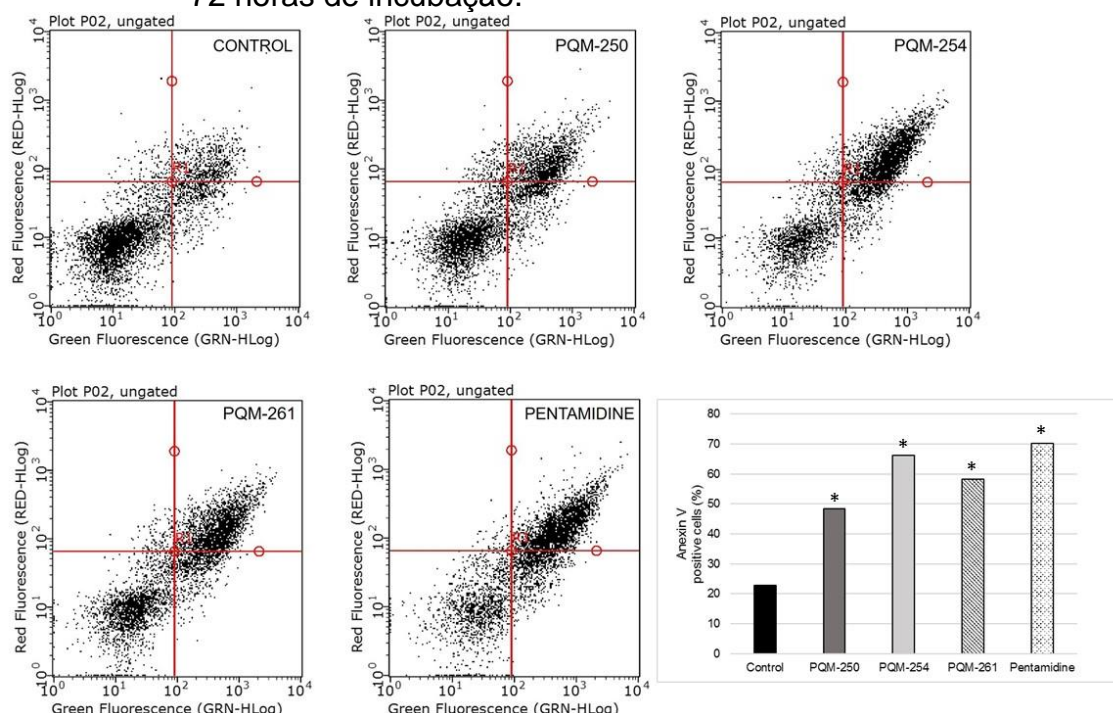
Nota: Os dados são expressos em unidade de absorbância ao longo do tempo (min). As curvas representam a redução do DTNB pela atividade da TryR, avaliada durante 40 minutos com leituras realizadas a cada 30 segundos.

Inibidores que afetam a atividade da TryR podem comprometer as defesas do parasita contra o estresse oxidativo, tornando-o vulnerável ao dano induzido pelas EROs, levando eventualmente à morte celular (Turcano *et al.*, 2020). Além de isso, estudos demonstraram que compostos que visam a TryR reduzem a capacidade do parasita de lidar com o estresse oxidativo, resultando em um desequilíbrio na homeostase redox (Ortalli *et al.*, 2018; Turcano *et al.*, 2020). Nos seus resultados específicos, PQM 250 e PQM 254 reduziram a atividade da TryR, o que sugere que esses compostos comprometem a capacidade do parasita de regenerar a tripanotona reduzida e neutralizar as EROs, provavelmente levando ao acúmulo de estresse oxidativo. Esse efeito é consistente com outros estudos que mostram que a inibição da TryR perturba o equilíbrio redox em *Leishmania* e compromete sua sobrevivência (Ortalli *et al.*, 2018). O aumento da atividade da TryR observado com PQM 261 pode indicar um mecanismo compensatório ou uma interação distinta com a enzima.

Além disso, a pentamidina, que não mostrou inibição significativa da TryR, pode atuar por outros mecanismos, como já relatado em estudos sobre seus efeitos na função mitocondrial e nas vias de síntese de poliaminas (Krauth-Siegel *et al.*, 2005).

Como foi visto, alterações na atividade da TryR podem afetar a homeostase redox, e um desequilíbrio pode resultar em acúmulo de EROs. Esse aumento de EROs é conhecido por induzir a apoptose (Fidalgo; Gille, 2011; Turcano *et al.*, 2020). Assim, a perturbação do sistema redox pode ser um gatilho significativo para a apoptose, evidenciando a interconexão entre a regulação redox e a morte celular nos parasitas. Os compostos PQM 254 e pentamidina apresentaram perfis apoptóticos similares, com aumentos de 43,27% e 47,42%, respectivamente. Já PQM 250 e PQM 261 também induziram apoptose, com incrementos de 25,49% e 35,29%, respectivamente, demonstrando a capacidade desses compostos em promover a morte celular (Figura 12).

Figura 12 - Análise comparativa por citometria de fluxo do percentual de apoptose em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não (controle) com pentamidina e seus derivados por 72 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: * estatisticamente diferente em relação ao controle ($p < 0,05$). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

O processo apoptótico envolve cascatas de sinalização ativadas tanto pela via intrínseca, relacionada às mitocôndrias, quanto pela via extrínseca, associada a receptores de morte celular (Igney; Krammer, 2002). Na via mitocondrial intrínseca, EROs e danos ao DNA desempenham um papel importante, provocando a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a liberação de citocromo *c* no citosol, desencadeando a apoptose (Fidalgo *et al.*, 2011). Esse mecanismo está diretamente associado à desregulação do $\Delta\Psi$, síntese de ATP e produção de H_2O_2 , fatores críticos para a sinalização apoptótica. De acordo com os dados obtidos, a pentamidina e seus derivados induzem a apoptose ao reduzir o $\Delta\Psi$, o que implica em uma desaceleração na cadeia transportadora de elétrons e uma menor taxa de bombeamento de prótons no espaço intermembrana (Zorova *et al.*, 2018). Isso gera estresse mitocondrial e promove a sinalização para apoptose. Esses resultados estão em concordância com estudos que demonstram a relação entre a diminuição de $\Delta\Psi$ e a indução de apoptose (Zorova *et al.*, 2018). É importante ressaltar

que o processo apoptótico, embora induza a morte celular, requer energia em algumas de suas fases, particularmente o ATP, para garantir que o processo ocorra de forma regulada e mantenha o equilíbrio energético da célula.

Analisando os dados referentes ao mecanismo de ação, foi observado que o composto PQM 250 induziu um aumento significativo na produção de H_2O_2 , acompanhado por aumento nos níveis de NADPH, enquanto reduziu a atividade da TryR. Esse perfil sugere que o PQM 250 provoca um desequilíbrio no sistema redox do parasita, gerando estresse oxidativo devido à maior produção de EROs, como o H_2O_2 . O aumento de NADPH pode representar uma tentativa de resposta do parasita para compensar esse estresse, uma vez que o NADPH é essencial para regenerar a tripanotiona (Battista *et al.*, 2020). No entanto, a inibição da TryR pelo PQM 250 impede essa regeneração, comprometendo ainda mais a capacidade do parasita de lidar com o acúmulo de oxidantes. Essa combinação de estresse oxidativo crescente e falha na defesa antioxidante pode levar à disfunção celular e à morte do parasita (Totsuka *et al.*, 2019).

O composto PQM 254, por sua vez, demonstrou uma redução nos níveis de H_2O_2 , acompanhada por um aumento na produção de NADPH e uma redução na atividade da TryR. A diminuição de H_2O_2 sugere que o PQM 254 pode estar estimulando mecanismos antioxidantes alternativos no parasita, que promovem a remoção ou a neutralização de EROs, como o H_2O_2 . O aumento de NADPH pode refletir a tentativa do parasita de manter sua capacidade antioxidante, já que o NADPH é um cofator crucial na regeneração de tripanotiona. Entretanto, com a redução da atividade da TryR, o ciclo redox do parasita é prejudicado. Isso indica que, embora o PQM 254 inicialmente reduza os níveis de H_2O_2 , a inibição prolongada da TryR compromete a defesa antioxidante do parasita, o que pode levar à disfunção redox e, eventualmente, à morte celular.

A redução da produção de ATP observada nos experimentos com a pentamidina pode interferir diretamente na síntese proteica (Jara *et al.*, 2017) o que, por sua vez, leva à redução na concentração intracelular de TryR. A redução do $\Delta\Psi$, outro efeito constatado com o tratamento, indica um comprometimento na passagem de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência, há menos escape de elétrons, o que reduz a

produção de EROs (Zhao *et al.*, 2019). Esse fenômeno pode explicar a diminuição nos níveis de H₂O₂ observados nas células tratadas. Essas análises também se justificam para o composto PQM 254.

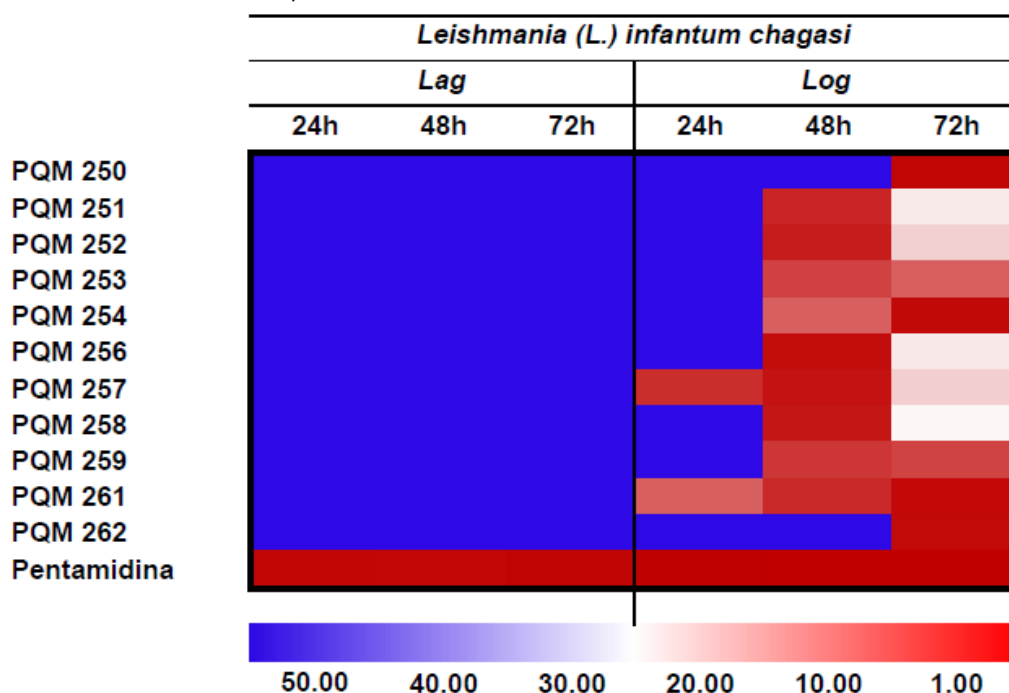
O tratamento com o composto 261 resultou em uma diminuição significativa na produção de H₂O₂. O aumento na produção de NADPH e na atividade da Try sugere que o composto interfere a sobrevivência do parasita. Além disso, o aumento do $\Delta\Psi$ indica que a cadeia respiratória está funcionando de forma mais eficiente, o que se reflete em um aumento na produção de ATP (Jara *et al.*, 2017). Essa elevação no ATP é crucial, pois fornece a energia necessária para diversas funções celulares, incluindo a síntese de proteínas e a manutenção das atividades metabólicas (Garcia *et al.*, 2017). Portanto, o composto 261 parece atuar de maneira multifacetada, promovendo a homeostase redox e a viabilidade celular do parasita.

6.6 *Leishmania (L.) infantum chagasi*

6.6.1 Atividade anti-promastigota e anti-amastigota; IS e InEs

Também foi analisado o efeito da incubação dos compostos em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. De acordo com os resultados obtidos, não foi possível observar atividade dos derivados na fase *lag* (Figura 13). Já na fase *log* da curva de proliferação (Figura 13), os compostos apresentaram melhor atividade com 72 horas de incubação, onde PQM 254 e PQM 261 exibiram valores próximos de 4 µg/mL (Apêndice B). Por outro lado, com 48 horas de incubação, os derivados que se destacaram foram o PQM 253, PQM 257 e PQM 258, porém menos ativos que a pentamidina.

Figura 13 - Mapa de calor dos resultados da atividade da pentamidina e seus derivados contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, nas fases lag e log da curva de proliferação, tratadas durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: A escala de cores do mapa de calor ilustra o EC_{50} contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A coloração azul indica “nenhuma atividade”, o branco indica “pouca atividade” enquanto a coloração vermelha indica “forte atividade”. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

Assim, pode-se afirmar que os derivados PQM 250, PQM 254 e PQM 261 apresentaram atividade leishmanicida contra ambas espécies de *Leishmania* e, portanto, foram avaliados nas formas amastigotas.

A realização de experimentos em formas amastigotas se justifica uma vez que vivem em ambientes diferentes ao da promastigota, apresentando assim um metabolismo adaptado e, portanto, comportamento diferencial frente à incubação com os compostos. Um dos fatores mais importantes das formas amastigotas é a sua capacidade de sobreviver e lidar com o ambiente oxidativo do fagolisossomo, onde para a sua sobrevivência é necessário um sistema antioxidante eficiente (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Neste contexto, tal observação evidencia que a atividade dos compostos pode ser distinta entre as diferentes formas evolutivas do parasita.

Concomitantemente aos ensaios realizados com promastigotas, foram

conduzidas avaliações da atividade anti-amastigota empregando os compostos mais promissores: PQM 250, PQM 254 e PQM 261, em comparação com o fármaco de referência, pentamidina, ao longo de um período de incubação de 72 horas (Tabela 10). A determinação desse intervalo de tempo foi embasada nos resultados obtidos nos ensaios de atividade anti-promastigota e citotoxicidade, evidenciando que esse tempo proporcionaria relações promissoras e esclarecedoras entre esses importantes ensaios.

Também foi possível realizar os cálculos do IS em relação as formas amastigotas com estes compostos, uma vez que há relatos na literatura de fármacos que tiveram atividade leishmanicida em apenas uma das formas evolutivas (Antinarelli, 2015). A exemplo do comportamento diferencial das formas evolutivas de *Leishmania* frente ao tratamento com os mesmos compostos, segundo Antinarelli (2015), não foi possível notar atividade significativa da monoquilonina frente à promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, entretanto se observou na forma amastigota da mesma espécie.

Tabela 10 - Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e citotoxicidade incubadas por 72 horas e índice de seletividade (IS) e especificidade (InEs).

Compostos	EC ₅₀ -PRO	EC ₅₀ -AMA	CC ₅₀	InEs
	($\mu\text{M} \pm \text{dp}$) [*] IS	($\mu\text{M} \pm \text{dp}$) [*] IS	($\mu\text{M} \pm \text{dp}$) [*]	
PQM 250	8,85 \pm 2,37 29.15	17,49 \pm 2,37 14.74	257.98 \pm 8.5 ^c	0.50
PQM 254	12,15 \pm 0,94 ^a 9.87	3,36 \pm 0,05 ^b 35.72	120.09 \pm 6.1	3.61
PQM 261	11,46 \pm 0,25 ^a 20.67	25,88 \pm 2,83 9.48	245.44 \pm 9.19 ^c	0.44
Pentamidina	0,93 \pm 0,04 6.05	2.79 \pm 0,58 ^b 27.15	75.77 \pm 2.7	0.97

Fonte: Elaborado pela autora (2024). Legenda: dp: desvio padrão.

Nota: ^{*} Cada valor de EC₅₀ representa a média \pm desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. ^{a,b,c} estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

Os resultados obtidos na tabela 10 mostram que os compostos com melhor atividade contra as formas promastigotas, também apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares, apresentando similaridade, ou seja, eles foram efetivos em ambas as espécies de *Leishmania*. Apesar da maioria dos valores terem apresentado diferenças estatísticas quando comparados à pentamidina, foi possível observar uma potente atividade destes contra as amastigotas. Vale destacar que o composto mais ativo e que não apresentou diferença estatística em relação à pentamidina foi o PQM 254, com EC_{50} de $3,36 + 0,05 \mu M$ para *L. (L.) infantum chagasi*.

A análise dos IS revelou resultados notáveis, especialmente nas formas promastigotas, onde os compostos PQM 250, PQM 254, PQM256, PQM 261 e PQM262 demonstraram valores significativamente mais elevados, sugerindo uma maior seletividade ao parasita com diferenças estatisticamente significantes (Apêndice C). É importante destacar que esses compostos exibiram seu potencial principalmente após 72 horas de incubação, sendo esse o intervalo em que se destacaram, enquanto que nos outros tempos de incubação não apresentaram resultados igualmente satisfatórios em ambas as espécies estudadas. A escolha desses compostos para os demais ensaios foi fundamentada nos valores de IS acima de 20, considerando os mais promissores. Além disso, os mencionados compostos também se destacaram nas formas amastigotas, reforçando a sua eficácia seletiva. Nesse contexto, a análise dos dados permitiu observar variações intrínsecas de sensibilidade entre as espécies de *Leishmania spp*, evidenciadas pela variação nos IS observados. Os achados no presente estudo corroboram com os da literatura que mostram diferenças na atividade leishmanicida quando diferentes compostos são testados em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) braziliensis* (Nascimento *et al.*, 2010). Segundo Machado *et al.* (2012), isolados de *Leishmania (L.) braziliensis* são mais susceptíveis ao antimoniato de meglumina que os de *Leishmania (L.) amazonensis*.

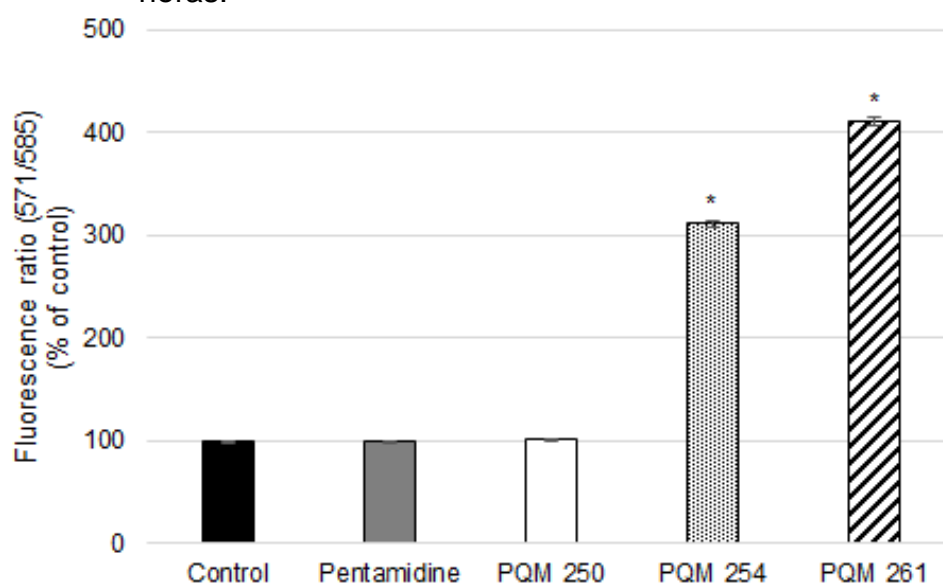
Em relação ao InEs da tabela 10, percebe-se que o composto PQM 254 indicou maior atividade em amastigotas intracelulares, apresentando InEs aproximadamente 3. No entanto, de acordo com os valores de InEs dos outros compostos, notou-se que esses apresentaram-se entre 0,4 e 2, evidenciando seletividade para o estágio intracelular do parasita. Este fato é de extrema

importância, uma vez que o amastigota é a forma de relevância clínica. De acordo com os excelentes valores de IS obtidos com PQM 250, PQM 254 e PQM 261 um melhor entendimento sobre mecanismo de ação destes compostos na *Leishmania* se justifica.

6.6.2 Mecanismo de ação

Adicionalmente aos estudos anteriores, foi realizado o tratamento de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* para determinar a produção de H₂O₂ na fase *log* da curva de proliferação com os derivados PQM 250, PQM 254, PQM 261 e pentamidina (Figura 14).

Figura 14 - Determinação da liberação de H₂O₂ em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na fase *log* da curva de proliferação tratadas ou não (controle) com pentamidina e seus derivados (PQM 250, PQM 254 e PQM 261) por 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: * Valores marcados com asterisco significam que os compostos apresentam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Dados preliminares.

Os resultados preliminares para *Leishmania (L.) infantum chagasi* demonstraram que o tratamento com os derivados de pentamidina promoveu aumento de 211,3% e 311,3 % na concentração de H₂O₂ com os compostos PQM 254 e PQM 261, respectivamente, em relação ao grupo controle (não

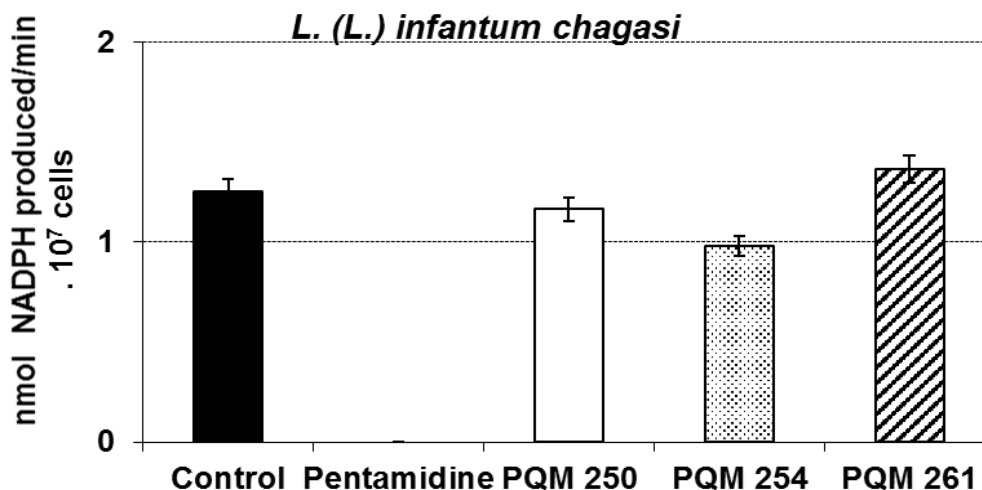
tratado). Vale salientar que os dados de pentamidina e PQM 250 não apresentaram diferença significativa (Figura 14).

Durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos, suas mitocôndrias sofrem profundas modificações para se adaptarem às diferentes condições ambientais, como hipóxia e estresse oxidativo (Aparicio, 2004; Fidalgo; Gille, 2011; Basmacıyan; Casanova, 2019). O aumento de H_2O_2 observado com os compostos PQM 254 e PQM 261 em *Leishmania (L.) infantum chagasi* sugere que esses derivados de pentamidina podem estar induzindo um aumento significativo nos níveis de H_2O_2 dentro das células do parasita.

O estresse oxidativo pode causar danos celulares graves, como oxidação de biomoléculas essenciais para a sobrevivência do parasita (Garcia *et al.*, 2017). Níveis elevados de H_2O_2 afetam negativamente a integridade celular, resultando em uma diminuição significativa na viabilidade do parasita. Assim, esses compostos apresentam potencial terapêutico ao explorar vulnerabilidades no sistema de defesa antioxidante da *Leishmania* e induzir danos celulares que levam à inviabilidade do parasita.

Adicionalmente, promastigotas metacíclicas exibem maior expressão de diversas enzimas que compõem a via das pentoses fosfato, responsável pela produção de NADPH e pentoses. A superexpressão dessas enzimas sugere sua contribuição na geração de substratos para suprir a glicólise. Vale também ressaltar que as vias antioxidantes da *Leishmania* utilizam a tripanotiona, que é reduzida pela tripanotiona redutase utilizando o NADPH como fonte de elétrons, portanto, a cascata de detoxificação de hidroperóxidos somente funcionará de forma adequada se houver o fornecimento de NADPH (Peloso *et al.*, 2011). Assim, o aumento da produção de NADPH pode desempenhar um papel crucial na prevenção do estresse oxidativo (Moreira *et al.*, 2014). A produção de NADPH na fase logarítmica da curva de proliferação de *Leishmania (L.) infantum chagasi* foi avaliada utilizando os derivados PQM 250, PQM 254, PQM 261 e pentamidina (Figura 15). Vale ressaltar que os dados apresentados são preliminares.

Figura 15 - Avaliação da produção de NADPH em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na fase *log* da curva de proliferação tratadas ou não (controle) com pentamidina e seus derivados (PQM 250, PQM 254 e PQM 261) por 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: * Valores marcados apresentam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Dados preliminares.

Embora a via das pentoses fosfato ocorra no citoplasma, o NADPH gerado por essa via tem implicações significativas na manutenção do equilíbrio redox e na proteção contra o estresse oxidativo nas mitocôndrias (Kumar *et al.*, 2019).

O sistema antioxidante depende do NADPH para fornecer elétrons necessários para neutralizar as EROs. Quando a concentração de EROs aumenta, o sistema antioxidante utiliza o NADPH para manter o equilíbrio redox e impedir o estresse oxidativo nas células. Logo, a análise da figura 12 revela que apenas o composto PQM 254 apresentou uma redução significativa de 21,6% nas taxas de NADPH em comparação com o grupo controle. Esse achado sugere uma especificidade na ação do PQM 254 em modular a produção de NADPH nessa linhagem celular, destacando a seletividade desse composto em relação aos processos redox específicos dessa espécie de *Leishmania*. Essa diferenciação nos efeitos entre os compostos ressalta a complexidade das interações entre os derivados e as respostas metabólicas das diferentes espécies de *Leishmania*.

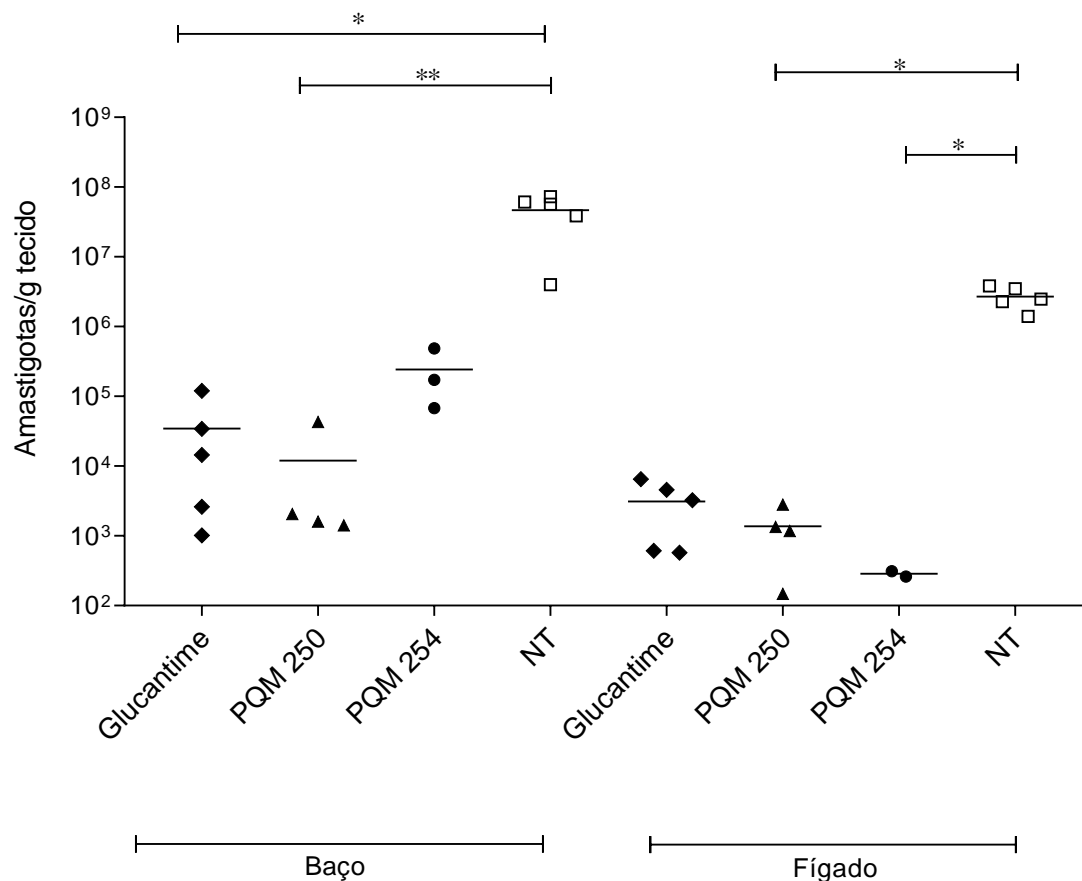
Concomitantemente com os estudos *in vitro* destinados a elucidar os possíveis mecanismos de ação dos derivados da pentamidina, optamos por

explorar suas atividades por meio da avaliação da carga parasitária no contexto *in vivo*. Essa decisão foi tomada para aprofundar ainda mais as nossas investigações sobre esses compostos promissores.

6.6.3 Ensaio *in vivo*

A avaliação da carga parasitária foi conduzida por qPCR (utilizando o alvo Linj31) em amostras de fígado e baço dos diferentes grupos de tratamento, que incluíam animais não tratados, tratados com glucantime®; PQM 250 e PQM 254. Os resultados revelaram uma redução significativa na carga parasitária em ambos os órgãos, fígado e baço, quando comparados ao grupo não tratado (Figura 16).

Figura 16 - Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de baço e fígado de hamsters infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nota: NT: grupo de animais infectado e não tratado; PQM 250: grupo de animais infectados e tratados com o composto PQM 250; PQM 254: grupo de animais infectados e tratados com o composto PQM 254; Glucantime®: PQM 250: grupo de animais infectados e tratados com o fármaco Glucantime®. Valores marcados com * significam que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos com $p < 0,005$; Valores marcados com ** significam que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos com $p < 0,001$ (Teste de Mann Whitney).

O PCR em tempo real oferece uma ampla faixa de detecção, permitindo a identificação de quantidades mínimas ou elevadas de moléculas na amostra em análise (CDG, 2015). Além disso, tem sido empregado como uma ferramenta para avaliar a eficácia de compostos antiparasitários em configurações *in vivo*. Essa metodologia vem sendo elogiada por seus atributos de reprodutibilidade, confiabilidade e sensibilidade (Reimão *et al.*, 2013).

Nesse contexto, ao final do tratamento foi observada uma significativa redução da carga parasitária no fígado e no baço dos hamsters tratados com

glucantime®, com valores de $3,11 \times 10^3$ e $3,45 \times 10^4$, por grama de tecido. Em contraste, o grupo de animais infectados e não tratados apresentou cargas parasitárias substancialmente mais elevadas, registrando valores de $2,7 \times 10^6$ e $4,68 \times 10^7$, correspondente a carga parasitária do fígado e baço, respectivamente. Com base nos resultados apresentados, observou-se uma redução significativa no número de amastigotas por grama de tecido no fígado, induzida pelos compostos PMQ 250 e PQM 254, em comparação com o grupo de animais não tratados. Os valores obtidos foram $1,37 \times 10^3$ e $2,86 \times 10^2$, respectivamente. Além disso, verificou-se uma diminuição dessas formas de *Leishmania* também no baço, causada pelos mesmos compostos, com valores correspondentes a $1,2 \times 10^4$ e $2,43 \times 10^5$, respectivamente. Esses resultados sugerem que os compostos PQM 250 e PQM 254 têm potencial de se tornarem promissores no tratamento da leishmaniose.

6.7 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

A relação estrutura atividade dos compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 foi estabelecida com base nos resultados obtidos após 72 horas de incubação na fase *log* da curva de proliferação das cepas *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Influência do tipo de substituintes no anel fenílico: os compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 destacaram-se como os mais eficazes contra a *Leishmania* em vários ensaios biológicos. O composto PQM 261, notável por seu perfil leishmanicida, apresenta em sua estrutura subunidades doadoras de densidade eletrônica nos sítios 2 e 5 do anel aromático adjacente à unidade espaçadora triazólica. Isso confere maior estabilidade estrutural. Os valores de EC_{50-PRO} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 5,98 / 11,46 μM ; e os valores de EC_{50-AMA} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 45,63 / 25,88 μM , respectivamente. Em contraste, os compostos PQM 250 e 254 diferente do composto anterior, possuem grupos retiradores de densidade eletrônica na posição 4 do anel aromático próximo à unidade espaçadora triazólica. Isso pode resultar em uma leve perda de atividade em comparação ao PQM 261,

mas ainda são altamente ativos frente ao controle positivo utilizado, pentamidina. Para o composto PQM 250, os valores de EC_{50-PRO} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 12,17 / 8,85 μM ; e os valores de EC_{50-AMA} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 29,52 / 17,49 μM , respectivamente. Para o composto PQM 254, os valores de EC_{50-PRO} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 5,16 / 12,15 μM ; e os valores de EC_{50-AMA} para *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram 21,92 / 3,36 μM , respectivamente. Avaliando a citotoxicidade destes compostos comparativamente, o composto PQM 254, com um grupo retirador de densidade eletrônica forte, mostrou-se mais tóxico. Já os compostos PQM 250 e PQM 261 exibiram níveis de citotoxicidade comparáveis, ambos superiores aos valores do composto PQM 254. Os valores de CC_{50} foram 257,98 μM (PQM 250), 120,09 μM (PQM 254), 245,44 μM (PQM 261).

Influência dos substituintes do anel fenílico: com base nos resultados expostos nas tabelas 7 e 8, que mostraram os IS para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, observou-se que os compostos monosubstituídos na posição 4 do anel fenílico, tais como PQM 250 e PQM 254 exibiram uma melhor seletividade (*Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* com $IS_{promastigota} = 21,18$ e $23,25 / 29,15$ e $9,87$ respectivamente; *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* $IS_{amastigota} = 8,73$ e $5,47 / 14,74$ e $35,72$, respectivamente). Bem como o composto dissubstituído PQM 261 com o mesmo padrão de posição de substituição (*Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* com $IS_{promastigota} = 41,02 / 20,67$; respectivamente; *Leishmania (L.) amazonensis* / *Leishmania (L.) infantum chagasi* $IS_{amastigota} = 5,37 / 9,48$, respectivamente). Esses resultados sugerem que a posição e natureza dos substituintes no anel fenílico têm um impacto significativo na seletividade desses compostos contra as diferentes formas de *Leishmania*.

Influência dos substituintes em relação ao LogP: apesar dos fatores mencionados anteriormente, a configuração específica de substituintes nos anéis pode impactar a atividade leishmanicida. A análise dos resultados da

Tabela 2 revela que os valores de LogP (previsto por Chemdraw 15.0) constituem um parâmetro crucial que influencia a atividade anti-*Leishmania* nas cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Entretanto, não foi observada uma regularidade aparente entre os valores de EC₅₀ e valores de LogP em geral.

Embora a pentamidina e de seus derivados tenham demonstrado atividade significativa contra a *Leishmania*, os mecanismos pelos quais esses compostos interagem com os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita ainda estão sendo investigados. O presente estudo avança nesse campo ao revelar que esses compostos afetam processos bioquímicos essenciais do parasita, sugerindo potencial de atuação em diferentes alvos celulares. Os resultados aqui obtidos reforçam a importância dos derivados de pentamidina como promissores candidatos no desenvolvimento de terapias mais eficientes contra a leishmaniose.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Derivados de pentamidina mostraram-se ativos contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, principalmente quando incubados por 72 horas, na fase *log* da curva de proliferação;
- A maioria dos compostos se mostrou menos tóxico para macrófagos peritoneais murinos quando comparados ao fármaco de referência, pentamidina, nos três tempos de incubação analisados.
- Os derivados que se destacaram de acordo com o IS referente a ambas as espécies foram PQM 250, PQM 254 e PQM 261, mostrando-se menos tóxicos e mais ativos contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*;
- De acordo com o estudo *in silico* foi possível observar que os derivados apresentaram maiores valores de LogP, indicando maior lipofilicidade do que a pentamidina;
- Através do *docking* molecular foi possível observar que o derivado PQM 261 apresenta melhor qualidade de ligação com quase todas as proteínas estudadas em todas as cepas analisadas, quando comparadas aos derivados PQM 250 e PQM 254;
- A incubação das *Leishmania (L.) amazonensis* com os derivados PQM 250, PQM 254 e PQM 261 geram alterações na produção de H₂O₂, ATP, NADPH, $\Delta\Psi$ e TryR, o que pode levar à inviabilidade celular; e induziu atividade apoptótica;
- No contexto *in vivo*, houve redução de carga parasitária observada por qPCR no fígado e no baço dos animais tratados com os derivados PQM 250 e PQM 254 quando comparados com o grupo de animais infectados e não tratados.
- Os derivados PQM 250, PQM 254 e PQM 261 representam um modelo promissor para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes leishmanicidas.

De um modo geral, os resultados indicam que os compostos PQM 250, PQM 254 e PQM 261 atuam de maneiras distintas nos parâmetros bioquímicos

e no sistema redox de *Leishmania*, além de induzirem a apoptose. Entre eles, o PQM 250 se destaca uma vez que afeta o equilíbrio redox e resulta na morte celular do parasita. Por outro lado, os derivados da pentamidina também se mostraram promissores como candidatos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a leishmaniose. Além disso, esses compostos abrem novas perspectivas para a compreensão de seus mecanismos de ação.

8 ETAPAS FUTURAS

Finalizar os ensaios de mecanismo de ação em *Leishmania (L.) infantum chagasi* incubadas por 72 horas com PQM 250, PQM 254 e PQM 261, de acordo com a metodologia.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of *Leishmaniasis*. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80-86, 2021.
- ALI, V. *et al.* Unique thiol metabolism in trypanosomatids: Redox homeostasis and drug resistance. **Advances in Parasitology**, v. 117, p. 75-155, 2022.
- ALTAMURA, F. *et al.* The current drug discovery landscape for trypanosomiasis and *Leishmaniasis*: Challenges and strategies to identify drug targets. **Drug Development Research**, v. 83, n. 2, p. 225-252, 2022.
- ALVES, M. S.; STREIT, L.; PIZZOLATO, T. M. Utilização de modelos *in silico* para avaliação da toxicidade de resíduos de agrotóxicos, fármacos e metabólitos em águas naturais. **Química Nova**, v. 46, n. 9, p. 881-889, 2023.
- ALVES, M. A. *et al.* New Licarin A derivative is effective against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 8, p. e-20240024, 2024.
- AMATO, V. S. Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista** (online), v. 26, p. 2-6, 2006.
- AMBIT, A.; WOODS, K. L.; CULL, B.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryot Cell**, v. 10, p. 1429–1438, 2011.
- AMLABU, W. E. *et al.* Elucidating the possible mechanism of action of some pathogen box compounds against *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008188, 2020.
- ANDREANA, I. *et al.* Nanotechnological approaches for pentamidine delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 8, p. 1911-1927, 2022.
- ANTWI, C. A. *et al.* In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007206, 2019.
- ANTINARELLI, L. M. R. *et al.* 4-aminoquinoline derivatives as potential *anti-Leishmanial* agents. **Chem. Biol. Drug Des.** v. 86, p. 704-714, 2015.
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5892-5902, 2004.

ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 863-875, 2012.

ARRAIS-SILVA, W. W.; COLHONE, M. C.; AYRES, D. C.; SOUTO, P. S.; GIORGIO, S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Parasitol Int.**, v. 54, p. 1-7, 2005.

ASSIS, L. H. C. *et al.* Cell cycle, telomeres, and telomerase in *Leishmania* spp.: What do we know so far?. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3195, 2021.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in *Leishmania*. **Parasite**, v. 26, 2019.

BASSELIN, M. *et al.* Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3731-3738, 2002.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in *Leishmania*. **Parasite**, v. 26, p. 71, 2019.

BATTISTA, T. *et al.* Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against *Leishmaniasis* and trypanosomiasis. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1924, 2020.

BENÍTEZ, D. *et al.* Identification of novel chemical scaffolds inhibiting trypanothione synthetase from pathogenic trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004617, 2016.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to *Leishmaniasis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BLUM, J. J. Effects of culture age and hexoses on fatty acid oxidation by *Leishmania major*. **Journal Protozoology**, v. 37, p. 505–510, 1990.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297-312, 2011.

BRASIL, P. F. *et al.* Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Parasitology International**, v. 66, n. 2, p. 47-55, 2017.

BOGAART, E. V. D. *et al.* Simple colorimetric trypanothione reductase-based assay for high-throughput screening of drugs against *Leishmania* intracellular amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 527-535, 2014.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. *Leishmaniasis*. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. *et al.* **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. 2. ed. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2006.

CASTRO, H. *et al.* Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology Medicine**, v. 11, p. 1552–1562, 2002.

CASTRO, H. *et al.* Two linked genes of *Leishmania infantum* encode trypanothione synthetase localized to cytosol and mitochondrion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 137-47, 2004.

CASTRO, H. *et al.* Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of trypanothione activity. **PloS One**, v. 8, n. 59, p. e12607, 2010.

CASTRO, H.; TOMÁS, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 10, n. 9, p. 1593-606, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Atlanta: CDC, [2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 1 fev. 2021.

CHANMOL, W. *et al.* Axenic amastigote cultivation and *in vitro* development of *Leishmania orientalis*. **Parasitology Research**, v. 118, p. 1885-1897, 2019.

CHEN, P. *et al.* Mitochondrial dysfunction: A promising therapeutic target for liver diseases. **Genes & Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101115, 2024.

COLOMBO, F. A. *et al.* Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 1, p. 267-274, 2011.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N.; LUNG, I. Lipophilicity as a central component of drug-like properties of chalcones and flavonoid derivatives. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1505, 2019.

COSTA, J. M. L. **O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses.** 1993. 119 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 1993.

COSTA, L. E. *et al.* Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral *Leishmaniasis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 1-6, 2017.

DA CÂMARA ROCHA, J. *et al.* Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-*Leishmania* activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, v. 118, p. 3067-3076, 2019.

DA SILVA, I. A. *et al.* *In vitro* metacyclogenesis of *Leishmania (Vianna) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to human Macrophages. **Biomed. Research International**, p. 1-5, 2015.

DAGNINO, A. P. A. *et al.* Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1199-1209, 2018.

DANDUGUDUMULA, R.; FISCHER-WEINBERGER, R.; ZILBERSTEIN, D. Morphogenesis dynamics in *Leishmania* differentiation. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 952, 2022.

DANTAS-TORRES, F. Canine *Leishmaniasis* in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 198, 2024.

DE QUEIROZ, E. F. F. *et al.* Virtual screening and assessment of anticancer potential of selenium-based compounds against HL-60 and MCF7 cells. **Future Med. Chem.**, v. 12, n. 24, p. 2191–2207, 2020.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit. Vectors**, v. 9, p. 264, 2016.

DE SOUZA, C. *et al.* Polyelectrolytic gelatin nanoparticles as a drug delivery system for the promastigote form of *Leishmania amazonensis* treatment. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 1, p. 1-21, 2021.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES initiative. **Disease factsheet: Leishmaniasis.** [2014]. Genebra: DNDi, 2018. Disponível em: https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/12/Factsheet2018_Leishmaniasis.pdf. Acesso em: 9 jan. 2024.

DOCAMPO, R.; VERCESI, A. E. Mitochondrial Ca²⁺ and reactive oxygen

species in Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 36, n. 13, p. 969-983, 2022.

DON, R. O. B.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.

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

DUCHEN, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 57-68, 2000.

EBANKS, B.; CHAKRABARTI, L. Mitochondrial ATP synthase is a target of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 354-361, 2022.

ESPURI, P. F. *et al.* Synthesis and evaluation of the *anti-Leishmanial* activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 419-432, 2019.

FAN, Y. *et al.* Anti-*Leishmanial* and cytotoxic activities of a series of maleimides: synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2878, 2018.

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

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

FIGUEIREDO, S. R. *et al.* The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMedical Research International**, p. 1-14, 2014.

FREITAS-MESQUITA, A. L.; DOS-SANTOS, A. L. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. Involvement of *Leishmania* phosphatases in parasite biology and pathogeny. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 633146, 2021.

FOLQUITTO, L. R. S. *et al.* Synthesis, protease inhibition, and *anti-Leishmanial* activity of new benzoxazoles derived from acetophenone or benzophenone and synthetic precursors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, p. 1149-1159, 2017.

FUENTES-LEMUS, E. *et al.* The enzymes of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway as targets of reactive species: consequences for NADPH production. **Biochemical Society Transactions**, v. 51, n. 6, p. 2173-2187, 2023.

GADELHA, A. P. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; DE SOUZA, W. Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. **J. Struct. Biol.**, v. 184, p. 280–292, 2013.

GALARRETA, B. C. *et al.* The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6689-6695, 2008.

GARCIA, F. P. *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.

GLUENZ, E.; HÖÖG, J. L.; SMITH, A. E.; DAWE, H. R.; SHAW, M. K.; GULL, K. Beyond 9 + 0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. **FASEB J.**, v. 24, p. 3117–3121, 2010.

GONZÁLEZ-MONTERO, M. C. *et al.* Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatids. **Molecules**, v. 29, n. 10, p. 2214, 2024.

GOUVEIA, A. L. A. *et al.* Thiazolidine derivatives: In vitro toxicity assessment against promastigote and amastigote forms of *Leishmania infantum* and ultrastructural study. **Experimental Parasitology**, v. 236, p. 108253, 2022.

GUAY-VINCENT, M. M. *et al.* Revisiting *Leishmania* GP63 host cell targets reveals a limited spectrum of substrates. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 10, p. e1010640, 2022.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of *Leishmaniasis*: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, ID 571242, 2011.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-288, 2002.

INACIO, J. D. F. *et al.* The effect of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate in vitro and in vivo in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3093, 2014.

INACIO, J. D. F. *et al.* Epigallocatechin-O-3-gallate inhibits trypanothione reductase of *Leishmania infantum*, causing alterations in redox balance and leading to parasite death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 640561, 2021.

INBAR, E. *et al.* The transcriptome of *Leishmania major* developmental stages in their natural sand fly vector. **MBio**, v. 8, n. 2, p. 10.1128/mbio. 00029-17, 2017.

ISLEK, Z. *et al.* The role of extracellular vesicles in immunomodulation and pathogenesis of *Leishmania* and other protozoan infections. **Extracellular Vesicles-Role in Diseases, Pathogenesis and Therapy**, v. 2, p. 1-12, 2022.

JARA, M. *et al.* Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. **PloS One**, v. 12, n. 7, p. e0180532, 2017.

JARA, M. *et al.* Transcriptional shift and metabolic adaptations during *Leishmania* quiescence using stationary phase and drug pressure as models. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 97, 2022.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 727-748, 1997.

KARAMPETSOU, K. *et al.* Total Phenolic Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of apoptotic-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0008968, 2021.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, n. 1, p. 726328, 2014.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KIERSZENBAUM, F. *et al.* Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal Immunology**, v. 112, n. 5, p. 1839-44, 1974.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral *Leishmaniasis*: implications for immunotherapy. **Future microbiology**, v. 9, p. 901–15, 2014.

KLEIN, V. G. *et al.* Amide-to-ester substitution as a strategy for optimizing PROTAC permeability and cellular activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 24, p. 18082-18101, 2021.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 5, p. 690-715, 2005.

KUMAR, A. *et al.* Understanding the Cross-Talk of Redox Metabolism and Fe-S Cluster Biogenesis in *Leishmania* Through Systems Biology Approach. **Front Cell. Infect. Microbiol.**, v. 4, n. 9, p. 15, 2019.

KUMAR, V.; MADHU, M.; MURTI, K. An overview on *Leishmaniasis*. **Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections**, p. 389-406, 2023.

KUMARI, Diksha *et al.* Virulence factors of *Leishmania* parasite: Their paramount importance in unraveling novel vaccine candidates and therapeutic targets. **Life Sciences**, v. 306, p. 120829, 2022.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 42, p. 525–550, 1997.

LENNICKE, C. *et al.* Peróxido de hidrogênio – produção, destino e papel na sinalização redox de células tumorais. **Cell Commun. Signal**, p. 13-39, 2015.

LIPINSKI, C.A., *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LOPES, J. V. *et al.* Canine visceral *Leishmaniasis* in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200141, 2020.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.

MACHADO, P. A. *et al.* Effect of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues in *Leishmania* Species related to American Cutaneous *Leishmaniasis*. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 8, p. 745-751, 2012.

MACHADO, P. A. **Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol em *Leishmania amazonensis***. 2013. 154 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

MAIA, A. C. R. G. *et al.* *Leishmania infantum* amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1): Its inhibition as a new insight into mode of action of pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 200, p. 1-6, 2019.

MAILLOUX, R. J. An update on mitochondrial reactive oxygen species production. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 472, 2020.

MANZANO, J. I. *et al.* Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1045-1052, 2011.

MASOOD, M. M. *et al.* Anti-*Leishmanial* and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 9, p. 1886–1891, 2017.

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

MATTHEWS, K. R. Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. **Science**, v. 331, p. 1149–1153, 2011.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. *Leishmaniasis*: clinical syndromes and treatment. **QJM.**, v. 107, p. 7–14, 2013.

McMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous *Leishmaniases* or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 206–224, 2004.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2019.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. **Acta Tropica**, v. 101, n. 1, p. 54-60, 2007.

MISHRA, J.; SINGH, S. Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 397-406, 2013.

MIRZAEI, F. *et al.* Butanol fraction of *Kelussia odoratissima* Mozaff inhibits the growth of *Leishmania major* promastigote and amastigote. **World's Veterinary Journal**, n. 2, p. 254-259, 2020.

MONGE-MAILLO B.; LÓPEZ-VÉLEZ R. Therapeutic options for old world cutaneous *Leishmaniasis* and new world cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*. **Drugs**, v. 73, p. 1-12, 2013.

MOREIRA, W. *et al.* Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 171–183, 2014.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell Biology and Immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 286–296, 2011.

MULE, S. N. *et al.* The protein map of the protozoan parasite *Leishmania*

(*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* during growth phase transition and temperature stress. **Journal of Proteomics**, v. 295, p. 105088, 2024.

MUYLDER, G. *et al.* A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.

MUKHERJEE, S.; PANDA, A.; GHOSH, T. C. Elucidating evolutionary features and functional implications of orphan genes in *Leishmania* major. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 330-337, 2015.

NADERER, T. *et al.* Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 69, p. 858–869, 2008.

NAPOLITANO, G.; FASCIOLO, G.; VENDITTI, P. Mitochondrial management of reactive oxygen species. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1824, 2021.

NASCIMENTO, R. C. Z. *et al.* *In vitro* sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2010.

NUNES, D. C. O. S. *et al.* Mitochondrial dysfunction on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* induced by ketoconazole: insights into drug mode of action. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210157, 2022.

OLIVEIRA, V. V. G. *et al.* Study of *in vitro* biological activity of thiazoles on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 414-421, 2020.

O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553-565, 2016.

ORTALLI, M. *et al.* Identification of chalcone-based *anti-Leishmanial* agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 527-541, 2018.

ORTIZ, D. *et al.* Targeting the cytochrome bc 1 complex of *Leishmania* parasites for discovery of novel drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4972-4982, 2016.

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

PAUL, M. L. S. *et al.* Essential gene identification and drug target prioritization in *Leishmania* species. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 5, p. 1184-1195, 2014.

PELOSO, E. F. *et al.* Investigation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one as a promising coumarin compound for the development of a new and orally effective *anti-Leishmanial* agent. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 8465-8474, 2020.

PELOSO, E. F. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 419-424, 2011.

PELOSO, E. F. *et al.* Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 520, n. 2, p. 117-122, 2012.

PENNINI, S. N. *et al.* Treatment of cutaneous *Leishmaniasis* with a sequential scheme of pentamidine and tamoxifen in an area with a predominance of *Leishmania (Viannia) guyanensis*: A randomised, non-inferiority clinical trial. **Tropical Medicine & International Health**, v. 28, n. 12, p. 871-880, 2023.

PEREIRA, G. R. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2011.

PEREIRA, I. O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 13, p. 1455-1464, 2009.

PICCICA, M. *et al.* Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human *Leishmaniasis*: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 6, p. taab065, 2021.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Trypanothione metabolism as drug target for trypanosomatids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 15, p. 1834-1846, 2021.

PINHEIRO, A. C.; DE SOUZA, M. V. N. Current *Leishmaniasis* drug discovery. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1029-1043, 2022.

PRADHAN, S. *et al.* Treatment options for *Leishmaniasis*. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

RAMACHANDRAN, G. T.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283-437, 1968.

RAMU, D.; SINGH, S. Oxidative Stress: A Boon or Bane for Trypanosomatids Diseases?. **Oxidative Stress in Microbial Diseases**, p. 175-183, 2019.

REIMÃO, J. Q. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Exp. Parasitol.**, v. 130, p. 195-199, 2012.

REIMÃO, J. Q. *et al.* Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral *Leishmaniasis*: current and future methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-8, 2018

ROBLEDO, S. M *et al.* Eficacia y tolerância de la pentamidina en el tratamiento de la *Leishmaniasis* cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia. **Biomédica**, v. 26, p. 188, 2006.

RVAGNAN, L. *et al.* Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, p. 131–137, 2002.

SADLOVA, J. *et al.* *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote-and amastigote-initiated infections. **Parasitology**, v. 144, n. 4, p. 403-410, 2017.

SAHU, A.; AGRAWAL, R. K.; PANDEY, R. K. Synthesis and systemic toxicity assessment of quinine-triazole scaffold with antiprotozoal potency. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102939, 2019.

SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and *Leishmaniasis* chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210401, 2022.

SANTOS, S. S. **Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendrimétricos de primeira geração com hidroximetilnitrofuril**. 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Área de Insumos Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

SARKAR, D. *et al.* Ascaridole exerts the leishmanicidal activity by inhibiting parasite glycolysis. **Phytomedicine**, v. 103, p. 154221, 2022.

SAUDAGAR, P. *et al.* Molecular mechanism underlying *anti-Leishmanial* effect of oxabicyclo [3.3. 1] nonanones: inhibition of key redox enzymes of the pathogen. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 569-577, 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Mitochondria Membrane Potential Kit - JC-10 Assay for Flow Cytometry**. Product Information Sheet – MAK160. St. Louis, USA, 2014. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/mak160>.

SILVA, F. M de F. *et al.* Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with *Leishmaniasis*. **Rev. Bras. Parasitol.**, v. 25, n. 1, p. 127-130, 2016.

SILVA, S. C. **Estudo comparativo de cepas de *Leishmania infantum*: avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da expressão de microRNAs em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados**. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Ouro Preto, 2015.

SINGH, N. *et al.* *Leishmaniasis*: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 485-497, 2012.

SINGH, R. *et al.* Recent advances in chemotherapeutics for *Leishmaniasis*: Importance of the cellular biochemistry of the parasite and its molecular interaction with the host. **Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 706, 2023.

SINHA, R. *et al.* Genome plasticity in cultured *Leishmania donovani*: comparison of early and late passages. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1279, 2018.

SOLIMAN, K. *et al.* Predicting the membrane permeability of organic fluorescent probes by the deep neural network based lipophilicity descriptor DeepFI-LogP. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6991, 2021.

SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutic Design**, v. 14, p. 822–838, 2008.

SOTO, J. Intralesional Pentamidine: A Novel Therapy for Single Lesions of Bolivian Cutaneous *Leishmaniasis*. **ASTMH**, v. 94, p. 852, 2016.

STAUBER, L. A.; FRANCHINO, E. M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. **The Journal of Protozoology**, v. 5, n. 4, p. 269-273, 1958.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of *Leishmaniasis*: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

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

TAVARES, L. QSAR: a abordagem de Hansch. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. **Química Nova**, v. 27. São Paulo, 2004.

TIAN, W. *et al.* CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2018.

TIWARI, N. *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of *Leishmaniasis*. **Bentham Science**, v. 18, p. 26, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* *Leishmaniasis*: a review. **F1000 Research**, v. 26, n. 6, p. 750, 2017.

TOTSUKA, K. *et al.* Oxidative stress induces ferroptotic cell death in retinal pigment epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 181, p. 316-324, 2019.

TROCHINE, A. *et al.* Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 5, p. e2844, 2014.

TUPPERWAR, N.; R. SHRIVASTAVA, M. S. LeishIF4E1 Deletion Affects the Promastigote Proteome, Morphology, and Infectivity. **mSphere**, v. 4, n. 6, p. e00625-19. 2019.

TURCANO, L. *et al.* Spiro-containing derivatives show antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei* through inhibition of the trypanothione reductase enzyme. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. e0008339, 2020.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-220, 2004.

VAN DEN BOGAART E. *et al.* Simple colorimetric trypanothione reductase-based assay for high-throughput screening of drugs against *Leishmania* intracellular amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 1, p. 527-35, 2014.

VÁZQUEZ-JIMÉNEZ, L. K. *et al.* Recent advances in the development of triose phosphate isomerase inhibitors as antiprotozoal agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 14, p. 2504-2529, 2022.

VENKATESAN, S. K.; SHUKLA, A. K.; DUBEY, V. K. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 13, p. 2463-2475, 2010.

VAN BOCKSTAL, L. *et al.* Sand fly studies predict transmission potential of drug-resistant *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 9, p. 785-795, 2020.

VERGNES, B. *et al.* A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. **Molecular Cellular Proteomics**, v. 6, p. 88–101, 2007.

VIJAYAKUMAR S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating *Leishmaniasis*. **Acta Tropical**, v. 181, p. 95–104, 2018.

VINCENT, I. M. *et al.* Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **International Journal Parasitology: Drugs and Drugs Resistance**, v. 5, p. 20-27, 2013.

VILLA-PULGARÍN, J. A. *et al.* Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP synthase as major therapeutic targets in the *anti-Leishmanial* and anticancer activities of ether lipid edelfosine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005805, 2017.

ZHAO, R. Z. *et al.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. **International journal of molecular medicine**, v. 44, n. 1, p. 3-15, 2019.

ZOLEK, T. *et al.* Drug-likeness of linear pentamidine analogues and their impact on the hERG K⁺ channel—correlation with structural features. **RSC Advances**, v. 9, n. 66, p. 38355-38371, 2019.

ZOROVA, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Anal Biochem.**, v. 1, n. 552, p. 50-59, 2018.

WHEELER, R. J.; SUNTER, J. D.; GULL, K. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. **J. Cell Sci.**, v. 129, p. 854–867, 2016.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol. Microbiol.**, v. 79, p. 647–662, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/Leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 20 jan. 2024.

YUAN, Y.; PEI, J.; LAI, L. Binding site detection and druggability prediction of protein targets for structure based drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 2326-2333, 2013.

APÊNDICE A – ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA EM *Leishmania (L.) amazonensis*

Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas nas fases *lag* e *log* da curva de proliferação de *Leishmania (L.) amazonensis*, incubadas por 24, 48 e 72 horas.

Compostos	EC ₅₀ (µM ± dp) ^a					
	Fase Lag			Fase Log		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
PQM 250	-	-	-	-	-	12.17 ± 1.27*
PQM 251	-	-	43.95 ± 0.22	117.39 ± 5.79	-	-
PQM 252	-	-	-	-	-	-
PQM253	-	-	52.81 ± 4.12	-	-	50.52 ± 26.09
PQM 254	-	-	53.9 ± 2.85	-	-	5.16 ± 1.80*
PQM 256	-	-	117.7 ± 9.76	8.88 ± 2.43*	97.74 ± 8.39	-
PQM 257	-	-	-	-	-	-
PQM 258	-	-	125.82 ± 3.85	-	-	-
PQM 259	-	-	45.27 ± 1.89	13.45 ± 2.39	-	56.48 ± 2.39
PQM 261	-	-	134.4 ± 0.38	-	-	5.98 ± 0.69*
PQM 262	-	-	-	-	-	18.24 ± 0.49*
Pentamidina	18.88 ± 1.23	16.74 ± 2.99	10.45 ± 0.88	35.36 ± 8.34	41.44 ± 1.52	3.81 ± 0.080

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: ^a Cada valor de EC₅₀ representa a média ± desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. – Valores marcados com tracejado significa que o composto não teve atividade. *Valores marcados com asterisco significam que os compostos apresentam diferenças estatísticas comparadas à pentamidina. **

APÊNDICE B – ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA EM *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Atividade leishmanicida de compostos derivados da pentamidina contra formas promastigotas nas fases *lag* e *log* da curva de proliferação de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, incubadas por 24, 48 e 72 horas.

Compostos	EC ₅₀ (µM ± dp) ^a					
	Fase Lag			Fase Log		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
PQM 250	-	-	-	-	-	8,85 ± 2,37
PQM 251	-	-	-	-	44,72 ± 1,35	-
PQM 252	-	-	-	-	35,41 ± 2,23	-
PQM253	-	-	-	-	77,97 ± 1,17	112,99 ± 0,45
PQM 254	-	-	-	-	113,91 ± 2,17	12,15 ± 0,94
PQM 256	-	-	-	-	17,63 ± 5,68	-
PQM 257	-	-	-	55,34 ± 0,34	23,28 ± 0,24	-
PQM 258	-	-	-	-	27,65 ± 0,28	-
PQM 259	-	-	-	-	65,14 ± 4,98	80,25 ± 10,6
PQM 261	-	-	-	113,12 ± 10,71	50,09 ± 2,33	11,46 ± 0,25
PQM 262	-	-	-	-	-	13,54 ± 2,12
Pentamidina	9,42 ± 0,11	10,39 ± 0,05	6,10 ± 0,06	3,26 ± 0,91	1,58 ± 0,04	2,73 ± 0,11

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: ^a Cada valor de EC₅₀ representa a média ± desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. – Valores marcados com tracejado significa que o composto não teve atividade. *Valores marcados com asterisco significam que os compostos apresentam diferenças estatísticas comparadas à pentamidina.

APÊNDICE C – ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Índice de Seletividade (IS) de acordo com CI_{50} de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* nas fases lag e log da curva de proliferação e em relação aos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas.

	IS <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>						IS <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>					
	Fase Lag			Fase Log			Fase Lag			Fase Log		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
PQM 250	-	-	-	-	-	21,18*	-	-	-	-	-	29,15*
PQM 251	-	-	5,17	1,27	-	-	-	-	-	-	4,21	-
PQM 252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,87	-
PQM 253	-	-	1,23	-	-	1,29	-	-	-	-	2,83	0,57
PQM 254	-	-	2,22	-	-	23,25*	-	-	-	-	1,24	9,87
PQM 256	-	-	1,5	14,00*	2,51	-	-	-	-	-	2,12	-
PQM 257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	8,43	-
PQM 258	-	-	1,11	-	-	-	-	-	-	-	3,76	-
PQM 259	-	-	0,65	3,89	-	0,52	-	-	-	-	0,74	0,37
PQM 261	-	-	1,82	-	-	41,02*	-	-	-	1,11	1,9	20,67*
PQM 262	-	-	-	-	-	14,9*	-	-	-	-	-	5,91
Pentamidina	0,87	0,66	7,24	0,46	0,26	3,89	-	-	-	5,09	7,03	6,05

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: Os valores referentes ao IS foram calculados através da razão entre a CC_{50} e os valores da EC_{50} de formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*. – Valores marcados com tracejado significa que o composto não teve atividade. *Valores marcados com asterisco significam que os compostos apresentam valores significativos para novas análises, buscando o mecanismo de ação.

ANEXO A – PATENTE



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 022941 0

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DO HÍBRIDO MOLECULAR 1-(3-CLORO-4-METOXIFENIL)-4-((E)-[2-(2,5-DICLOROFENIL)HIDRAZIN-1-ILIDENO]METIL)-1H-1,2,3-TRIAZOL COMO AGENTE ANTIVIRAL

Resumo: A presente tecnologia trata de novo uso para o híbrido molecular 1-(3-cloro-4-metoxifenil)-4-((E)-[2-(2,5-diclorofenil)hidrazin-1-ilideno]metil)-1H-1,2,3-triazol, doravante denominado PQM-262. Tal híbrido é obtido a partir de azidas aromáticas funcionalizadas com reações click e subsequentemente condensadas com hidrazinas. Tal híbrido molecular apresenta atividade antiviral pronunciada quando comparado aos antivirais presentes no mercado, especialmente contra o SARS-CoV-2.

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG



Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE PENTAMIDINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA**, registrada com o nº **0013/2020**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **03/08/2020 a 02/02/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Especie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Swiss	84	84	0	Centro de bioterismo unifal-mg

Alfenas, 16 de Novembro de 2020

Prof(a). Dr(a). Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 7047b974f578b1d3d27abc04d7161fca

ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA 2

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE PENTAMIDINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA**, registrada com o nº **0033/2023**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/11/2023 a 30/12/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Hamster dourado	35	35	0	Anilab

Alfenas, 28 de Setembro de 2023

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: b81090f855e07b823e60bf696244bf7

ANEXO D – ARTIGO SUBMETIDO

01/12/2024, 12:29

ScholarOne Manuscripts

 ACS Infectious Diseases Home

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

ACS Infectious Diseases

Manuscript ID

id-2024-009664

TitleEVALUATION OF THE LEISHMANICIDAL ACTIVITY AND MECHANISMS OF ACTION OF PENTAMIDINE DERIVATIVES AGAINST *Leishmania (L.) amazonensis***Authors**Ferreira Espuri, Patricia
Gontijo, Vanessa
Souza, Thalles
Nunes, Juliana
Zavan, Bruno
Alves, Marina
Souza, Hygor
Couto, Dyecika
Viegas Jr, Claudio
Ionta, Marisa
Peloso, Eduardo
Marques, Marcos**Date Submitted**

01-Dec-2024





ACS Paragon Plus Environment. Copyright © 2024 American Chemical Society. All rights reserved.

[Privacy Statement](#) | [Ethical Guidelines](#) | [ACS Publications \(pubs.acs.org\)](#)

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2024. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 @Clarivate for Academia & Government |  System Requirements |  Privacy Statement | 
[Terms of Use](#) | [Definições de cookies](#) | [Accessibility](#)