

EFEITO DO METALOCOMPLEXO ZnBS CONTRA PROMASTIGOTA DE
Leishmania amazonensis IN VITRO

MAICLEY FERREIRA PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Coytacazes - RJ - Brasil

Fevereiro/2024

EFEITO DO METALOCOMPLEXO ZnBS CONTRA PROMASTIGOTA DE
Leishmania amazonensis IN VITRO

MAICLLEY FERREIRA PEREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Henrique Seabra

Coorientador: Dr. Renato Augusto DaMatta

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes - RJ – Brasil

Fevereiro/2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

P436

Pereira, Maicley Ferreira.

Efeito do Metalocomplexo ZnBS contra promastigota de *Leishmania amazonensis* in vitro.
/ Maicley Ferreira Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

55 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Sergio Henrique Seabra.

Coorientador: Renato Augusto Damatta.

1. Metalocomplexo. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Promastigota. 4. Complexo de Zinco (II). 5. Quimioterapia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Expresso de maneira especial, o meu reconhecimento e gratidão:

A minha mãe Tatiana Gomes Ferreira, pelo amor, conselhos e incentivo durante toda essa jornada acadêmica, você foi o farol que me orientaram até chegar aqui.

Homenageio!

Aos meus avós, Adélia Gomes Ferreira e Rui Comes Ferreira (*in memoriam*), expresso minha profunda gratidão. Meus alicerces e a minha fonte de inspiração, impulsionando-me na busca por novos desafios.

Dedico!

Agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda por guiarem meu caminho, tornando esta jornada mais suave e iluminada.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e fortaleza para enfrentar e superar todas as dificuldades.

Agradeço a minha mãe e avó, Tatiana Gomes e Adélia Gomes pelo apoio, cuidados e por acreditarem na minha capacidade de conseguir realizar meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos: Maillany Ferreira e Mayllon Ferreira, por toda parceria e apoio ao longo do mestrado.

Quero expressar meu agradecimento ao professor Sergio Henrique Seabra por ter me proporcionado a oportunidade de adentrar no meio científico e evoluir como pesquisador. Sua paciência incansável e os ensinamentos compartilhados foram fundamentais para a conclusão deste ciclo acadêmico. Sou grato por todo o apoio e orientação oferecidos ao longo dessa jornada.

Agradeço ao professor Renato Augusto DaMatta pelo seu apoio em todas as fases deste trabalho. Sua presença constante, mesmo diante de múltiplas responsabilidades, e o acolhimento em seu laboratório foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo. Obrigado por sua coorientação.

Gostaria de expressar meu sincero agradecimento a Lara Manhães, Felipe Figueirôa e Renata Moreira pelo suporte imprescindível durante a fase inicial dos experimentos envolvendo quimioterapia celular. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos e prontidão em esclarecer minhas dúvidas. Almejo, em algum momento futuro, poder retribuir aos próximos alunos em nosso grupo de pesquisa o conhecimento que recebi de vocês.

A todos os colegas e companheiros de bancada e laboratório: Eliane Barbosa, Frederico Nolasco, Lara Manhães, Felipe Figueirôa, Renata Moreira,

Daniel Areias, Taymara Sabino, Giovana Albuquerque, Lícia da Silva, Ana Beatriz Miranda, Marcos Roberto Dias, Karla Oliveira, Victor Parente, Tâmara Carolina, Pedro Souto, Ana Carolina de Pádua, Saulo Augusto Alves, Maria Eduarda Fernandes, Marcela Amaral, Giulia Rios e Ruan Gomes. Agradeço pelo convívio no ambiente de trabalho e por estarem sempre dispostos a me ajudar quando necessário. Esse apoio faz toda a diferença e sou grato por tê-los ao meu lado.

Gostaria de expressar minha gratidão aos amigos que construí ao longo desses anos na vida acadêmica: Luciane Pereira, Gabrielly Leonardo, Jeanne Campos, Gustavo Chagas, João Dias, Gabriel Campos, Filipy Said, Marcos Coutinho, Paolla Flório.

Agradeço a técnica Juliana Azevedo por dedicar seu tempo e oferecer suporte nas análises do experimento realizado no citômetro. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço às técnicas Rose, Beatriz, Geovana, Márcia Adriana e, especialmente, a Adriana Alves Martins, pelo esforço no laboratório e pela manutenção das condições ideais para a realização dos experimentos.

Agradeço o professor André de Oliveira Carvalho (LFBM UENF), por disponibilizar os kits TUNEL, utilizados nos ensaios de morte celular neste trabalho.

Quero agradecer aos professores Adolfo Horn Junior e Christiane Fernandes Horn pela colaboração no estudo, especialmente na síntese química do composto analisado.

A UENF, FAPERJ, CNPq e CAPES pelo suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Por último, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma maneira, colaboraram, seja de forma direta ou indireta, para a conclusão deste trabalho

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose	2
1.1.1. Epidemiologia	2
1.1.2. Formas Clínicas da Leishmaniose	3
1.1.3. Ciclo Biológico	4
1.1.4. Ultraestrutura da forma promastigota de <i>L. amazonensis</i>	6
1.1.5. Mecanismos de morte celular.	7
1.1.6. Tratamento para manifestação da Leishmaniose	9
1.1.7. Compostos metalocomplexos.	10
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivos	11
2.2. Objetivos específicos.	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Metalocomplexo	12
3.2. Manutenção das promastigotas <i>in vitro</i>	12
3.3. Manutenção de células LLC-MK2	12
3.4. Ensaio de viabilidade celular	12
3.5. Ensaio antiproliferativo com promastigotas	13
3.6. Microscopia eletrônica de transmissão	13
3.7. Interferência do composto em organelas de <i>L. amazonensis</i> por microscopia de fluorescência	14
3.8. Análise de morte celular-Apoptose e Necrose	15
3.8.1. Ensaio TUNEL TMR red	15
3.8.2. Indução de apoptose e necrose secundária com a marcação de Brometo de Etídio	15
3.9. Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Efeito no crescimento de promastigota de <i>L. amazonensis</i>	17
4.2. Análise ultraestrutural	19
4.3. Interferência do ZnBS no retículo endoplasmático de <i>L. amazonensis</i> com ER-Tracker por microscopia de fluorescência	21
4.4. Análise de morte celular por apoptose e necrose: utilizando o kit TUNEL <i>in situ</i> e coloração com Brometo de Etídio.	24
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância Entre Grupos

C°: Graus Celsius

Cm: Centímetro

CO₂: Dióxido de carbono

DIC: Contraste Interferencial Diferencial

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ER: Reticulo endoplasmático

LC: Leishmaniose cutânea

LV: Leishmaniose visceral

LMC: Leishmaniose muco-cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea-difusa

Min: Minuto

mL: Mililitro

MTT: Brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazol.

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão fosfato-salino

RPM: Rotação por Minuto

SFB: Soro fetal bovino

µL: Microlitro

µM: Micromolar

µg: Micrograma

Zn: Zinco

BS: Ligante (II)

IC₅₀: Concentração inibitória para 50% da viabilidade celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição de incidência de Leishmaniose Cutânea (LC) em escala global no ano de 2018, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), destacando o Brasil com mais de > 5 mil casos registrados somente neste período.

Figura 2 - Ciclo de vida de *Leishmania spp.* Fases do ciclo segundo a numeração acima: 1 - infecção do hospedeiro vertebrado por formas promastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo; 2 - fagocitose de formas promastigotas por macrófagos; 3 - transformação de promastigotas em amastigotas e multiplicação; 4 - rompimento do macrófago e liberação de amastigotas; 5 - ingestão de células infectadas pelo inseto vetor; 6 - lise de células infectadas durante digestão; 7 - transformação de amastigotas em promastigotas; 8- multiplicação de promastigotas.

Figura 3 - Morfologia geral da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. (A) Representação esquemática. (B) Várias das estruturas representadas em (A) estão assinaladas: N - núcleo, c - cinetoplasto, b – bolsa flagelar, m - mitocôndria. (C) Ampliação de uma promastigota de *Leishmania*, mostrando perfis de RE (setas) nas proximidades do núcleo e da membrana plasmática. Observe a presença de poros nucleares bem definidos (ponta seta). (Retirado de Pimenta and De Souza *et al.*, 1985).

Figura 4 - Morte celular por apoptose e necrose. Na apoptose é possível identificar a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos. Por outro lado, na necrose observa-se a ruptura da membrana plasmática, das organelas e o núcleo. (Retirado de Steller, 2015).

Figura 5 - Estrutura química dos compostos Pentamidina (A) e Anfotericina b (B). (Retirado de BERNE *et al.*, 2015).

Figura 6- Efeitos antiproliferativos do composto ZnBS em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Crescimento dos parasitos após

o tratamento com o ZnBS em diferentes concentrações por até 72 horas. *P ≤ 0.05 e **P ≤ 0.01 em relação ao controle one-way ANOVA com pós-teste deTukey.

Figura 7 - Efeitos antiproliferativos do composto ZnBS em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Crescimento dos parasitos após o tratamento com o ZnBS em diferentes concentrações por até 120 horas. **P ≤ 0.01 em relação ao controle one-way ANOVA com pós-teste deTukey.

Figura 8 - Análise dos efeitos citotóxicos do composto ZnBS no tratamento de células LLC-MK₂. A quantificação da absorbância foi realizada para avaliar a produção de formazan solúvel pela redução celular após o tratamento com diferentes concentrações do composto. A absorbância foi registrada a 570 nm.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão de *Leishmania amazonensis* controle e tratados com o composto ZnBS por 120 horas. Controle sem tratamento (A), com tratamento 1µM (B, C e D) e a 10 µM (E, F e G). Nota-se alterações no retículo endoplasmático (seta), condensação do DNA, indicativa de apoptose (cabeça de seta), presença de corpos apoptóticos (*) e sinais de necrose secundária (SN). Barras: 0,5 µm, 1 µm. 2 µm.

Figura 10 - Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 µM e 10µM do composto ZnBS por 72 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1µM; E e F concentração de 10µM.; B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Barras: 20 µm.

Figura 11 - Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 µM e 10µM do composto ZnBS por 96 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1µM; E e F concentração de 10µM. B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Barras: 20 µm.

Figura 12 - Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS por 120 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1 μ M; E e F concentração de 10 μ M. B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC) Barras: 20 μ m.

Figura 13 - Detecção de morte celular in situ foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 72 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 3.5%. Nos grupos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 63 e 65.6%.

Figura 14 - Detecção de morte celular in situ foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 96 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 9.4%. Nos grupos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 38.2 e 86.6%.

Figura 15 - Detecção de morte celular in situ foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 120 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 14.5%. Nos grupos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 56.7 e 49.7%.

Figura 16 - Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1µM de ZnBS; E e F tratamento com 10 µM do composto ZnBS; B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC) .Nota-se a presença de inchaço nuclear e aumento do volume citoplasmático (seta); fragmentação nuclear emitindo sinal de fluorescência (*).Barras: 20 µm.

Figura 17 - Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 96 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1µM de ZnBS; E-F tratamento com 10 µM do composto ZnBS; B,D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Nota-se o aumento do volume citoplasmático e redução da marcação do fluoróforo de Brometo de Etídio (seta); fragmentação do núcleo (*).Barras: 20 µm.

Figura 18 - Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 120 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1µM do ZnBS; E-F tratamento com 10 µM do ZnBS; B, D e F - contraste interferencial diferencial (DIC). Nota-se a presença de inchaço anormal do núcleo (seta) e aumento do volume citoplasmático (seta); fragmentação do núcleo e intensa emissão de fluorescência (*).Barras: 20 µm.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) categoriza a leishmaniose como doença tropical negligenciada. Estima-se que anualmente ocorram cerca de 1,3 milhões de novos casos, colocando aproximadamente 310 milhões de pessoas em risco. A terapia atual para leishmaniose causa vários efeitos colaterais e gera cepas resistentes a medicamentos. Portanto, é urgente e essencial a triagem de novos compostos visando o desenvolvimento de novas terapias. Essa situação estimulou a busca por tratamentos alternativos, como o uso de metalocomplexos. Os metalocomplexos são compostos que contêm um núcleo metálico capaz de coordenar-se a ligantes orgânicos, potencializando assim sua atividade. Em comparação com fármacos convencionais baseados em compostos orgânicos, os metais de transição apresentam vantagens, pois oferecem diversas possibilidades de coordenação e geometria com o ligante, que é o fármaco, assim como com as moléculas biológicas. Os metalocomplexos surgem como uma alternativa promissora na terapia antiparasitária, pois já se mostraram ativos contra *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Neste sentido, nosso projeto visa analisar os efeitos *in vitro* do metalocomplexo ZnBS no tratamento contra promastigota de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados com o composto ZnBS em concentrações de 1, 10, 40, 60, 80 μM e seu crescimento foi quantificado após o tratamento. O composto apresentou um valor de IC_{50} de 1.2; 1.8; 1.3; 0.98; 1.7 μM , para os tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de tratamento. Análise ultraestrutural dos parasitos após o tratamento com o composto mostrou alterações no retículo endoplasmático, como a condensação do DNA indicativa de apoptose e a presença de corpos apoptóticos. Além disso, o composto não apresentou toxicidade significativa sobre as células LLC-MK2. O composto ZnBS foi ativo contra promastigota de *L. amazonensis* apresentando valores de IC_{50} na faixa micromolar e ocasionando apoptose. Esses resultados podem abrir uma porta de acesso à inovação, pois o efeito do composto metalocomplexo em *L. amazonensis* pode destacá-lo como opção de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da Leishmaniose cutânea.

Palavras chaves: Metalocomplexo, Leishmaniose, *Leishmania amazonensis*

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) categorizes leishmaniasis as a neglected tropical disease. It is estimated that approximately 1.3 million new cases occur annually, putting around 310 million people at risk. The current therapy for leishmaniasis causes several side effects and generates drug-resistant strains. Therefore, screening for new compounds aiming at the development of new therapies is urgent and essential. This situation has stimulated the search for alternative treatments, such as the use of metal complexes. Metallocomplex are compounds that contain a metallic core capable of coordinating with organic ligands, thus enhancing their activity. Compared to conventional drugs based on organic compounds, transition metals offer advantages as they provide various coordination possibilities and geometries with the ligand, which is the drug, as well as with biological molecules. Metallocomplex emerge as a promising alternative in antiparasitic therapy, as they have already shown activity against *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma cruzi*. In this regard, our project aims to analyze the in vitro effects of the metal complex in the treatment against *L. amazonensis* promastigotes. The parasites were treated with the compound ZnBS at concentrations of 1, 10, 40, 60, 80 μM , and their growth was quantified after treatment. The compound showed an IC₅₀ value of 1.2; 1.8; 1.3; 0.98; 1.7 μM for treatment times of 24, 48, 72, 96, and 120 hours. Ultrastructural analysis of the parasites after treatment with the compound showed alterations in the endoplasmic reticulum, such as DNA condensation indicative of apoptosis and the presence of apoptotic bodies. Furthermore, the compound showed no significant toxicity on LLC- MK2 cells. The ZnBS compound was active against *L. amazonensis* promastigotes, showing IC₅₀ values in the micromolar range and causing apoptosis via the endoplasmic reticulum. These results may open a door to innovation, as the effect of the metallocomplex compound on *L. amazonensis* may highlight it as an option for the development of new drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Metallocomplex, Leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose abrange uma gama de enfermidades desencadeadas pela infestação de protozoários do gênero *Leishmania*, capazes de comprometer órgãos internos, pele e mucosas (DESJEUX, 2004). Esta doença, transmitida por vetores, representa uma ameaça para cerca de 350 milhões de indivíduos globalmente, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, levando a 20.000–30.000 mortes anualmente (WHO, 2021). Mais de 90% dos novos casos de leishmaniose são registrados no Brasil, Bolívia, Afeganistão, Colômbia, Índia, Peru (OPAS, 2020). A leishmaniose se apresenta em duas formas principais: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose cutânea (LC), também conhecida como leishmaniose tegumentar (LT). A forma cutânea é a manifestação mais comum da doença, abrangendo mais de 90% dos casos (KLATT *et al.*, 2012).

Estratégias eficazes de diagnóstico e tratamento podem desempenhar um papel crucial na redução da prevalência da doença (ALVAR *et al.*, 2006). Apesar de suas limitações, a quimioterapia permanece como a principal abordagem de controle para todas as formas clínicas de leishmaniose (OMS, 2021). Embora os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam), apresentem diversas limitações e efeitos colaterais, esses agentes farmacológicos são considerados a terapia de primeira linha.

O extenso uso de antimoniais tem contribuído para a seleção de parasitas com mecanismos de resistência a esses compostos. Como alternativa outros fármacos são empregados no tratamento da leishmaniose. Entre os principais estão a anfotericina B e a pentamidina (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Entretanto, esses fármacos apresentam algumas limitações, como toxicidade, efeitos adversos, tratamento prolongado e elevado custo benefício (KEDZIERSKI *et al.*, 2009; SUNDAR *et al.*, 2012).

Os metalocomplexos surgem como uma alternativa promissora nas terapias antiparasitárias (MOREIRA *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente estudo analisou o efeito do composto metalocomplexo de Zinco e o ligante BS (ZnBS) em promastigota de *L. amazonensis*, com o intuito de investigar sua viabilidade para o desenvolvimento de novas terapias quimioterápicas contra a *Leishmania*.

1.1. Leishmaniose

Leishmanioses são antropozoonoses infecto-parasitárias com prevalência em áreas tropicais e subtropicais, apresentando diferentes manifestações clínicas (BRASIL, 2021). Consideradas endemias, essas doenças estão entre as chamadas doenças tropicais negligenciadas, afetando especialmente grupos populacionais vulneráveis com limitado acesso aos serviços de saúde (OPAS, 2020). São doenças transmitidas por vetores flebotomíneos infectados (CONITEC, 2018). Estes vetores correspondem às fêmeas de mosquitos hematófagos, denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*. Popularmente conhecidos como mosquito-palha (PELLISSARI *et al.*, 2011), desempenham um papel crucial na transmissão da doença.

No contexto da leishmaniose cutânea, a espécie *L. braziliensis* é identificada como o principal agente etiológico da doença no Brasil. A infecção por este parasito pode desencadear uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde quadros benignos com resolução espontânea até lesões desfigurantes associadas a uma considerável morbidade (LESTINOVA *et al.*, 2017). Na América Latina, a infecção ocasionada pela espécie *L. amazonensis* está associada à manifestação clínica localizada da leishmaniose cutânea, que se caracteriza pela presença de pápulas que se transformam em úlceras com bordas elevadas. Esta apresentação clínica é reconhecida como a forma mais comum da doença, denominada leishmaniose cutânea localizada (FARIAS *et al.*, 2021).

1.1.1. Epidemiologia

Atualmente, uma população superior a 1 bilhão de indivíduos reside em regiões endêmicas da leishmaniose, sujeita ao risco de infecção. Estima-se anualmente a ocorrência de mais de 1 milhão de novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC), sendo esta enfermidade reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das endemias de prioridade em escala global (Figura 1). As ocorrências de leishmanioses vêm se espalhando pelo Brasil. A Leishmaniose tegumentar foi detectada em 19 estados na década de 1980. No

entanto, em 2018, foram registrados casos autóctones em todos os estados brasileiros (OMS, 2018). Isso significa que a doença está se espalhando rapidamente, possivelmente devido às interferências humanas nos ecossistemas.

Desde então, a doença tem sido relatada em diversos estados do país, exibindo alterações significativas no seu padrão de transmissão. Inicialmente, era mais prevalente em ambientes rurais e, mais recentemente, tem se manifestado também em centros urbanos (WERNECK *et al.*, 2011). Em média, aproximadamente 53 casos de leishmaniose cutânea foram confirmados nos municípios do Rio de Janeiro, Vassouras, São José do Vale do Rio Preto, Teresópolis, Paraíba do Sul, Angra dos Reis e Itaperuna, conforme relatado no Boletim Epidemiológico do RJ (2021). A leishmaniose cutânea afeta todas as faixas etárias, com uma incidência mais significativa em jovens e adultos, resultando na maior confirmação de casos clínicos nos municípios do Estado do Rio de Janeiro (SINNANET, 2019).

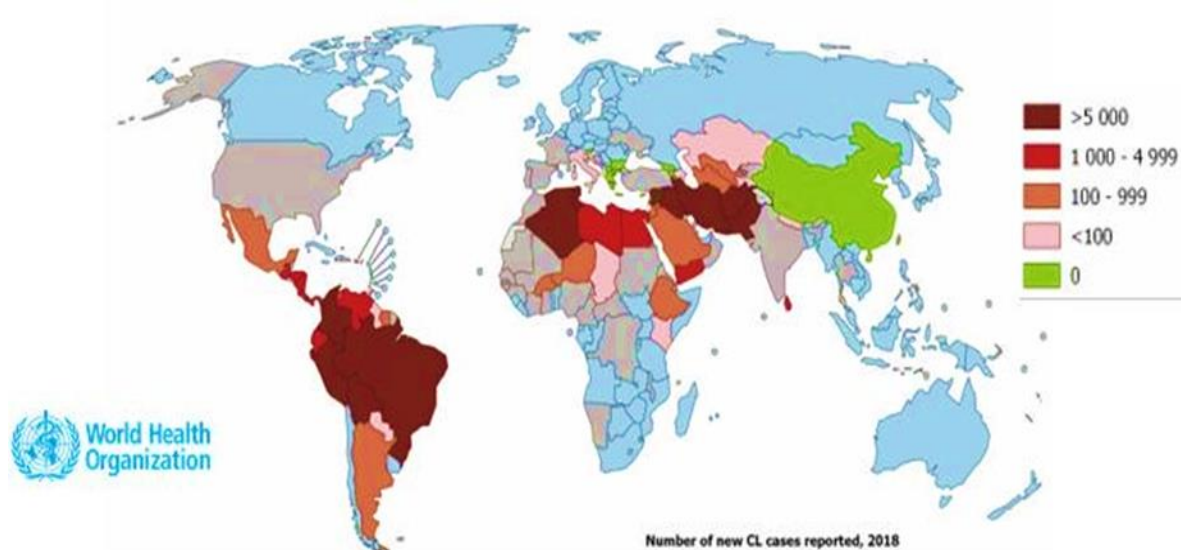


Figura 1 – Mapa da distribuição de incidência de Leishmaniose Cutânea (LC) em escala global no ano de 2018, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), destacando o Brasil com mais de > 5 mil casos registrados somente neste período.

1.1.2. Formas clínicas da Leishmaniose

As leishmanioses apresentam uma classificação clínica distinta,

dividindo-se em duas categorias principais: a leishmaniose tegumentar (LT), abrangendo a forma cutânea, muco-cutânea e cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral (LV) (KANE & MOSSER, 2000).

A Leishmaniose cutânea (LC) é identificada pela presença de lesão característica no local de inoculação pelo vetor (ASHFORD, 2000). A LC apresenta manifestações clínicas que varia de úlceras na pele com bordas elevadas e um centro necrótico (GILL e BEECHING, 2009). A morbidade decorrente da leishmaniose cutânea (LC) é de considerável relevância devido às lesões desfigurativas que têm potencial para induzir à exclusão social dos indivíduos afetados por essa doença (KASSI *et al.*, 2008).

A Leishmaniose muco-cutânea (LMC) se distingue pela manifestação de úlceras nas regiões nasal, oral e faríngea, frequentemente acompanhadas de obstrução ou sangramento nasal (LESSA *et al.*, 2007). Além disso, alguns casos clínicos observa-se uma evolução para quadros lesões desfigurantes. Por outro lado, a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) com forma anérgica e não ulcerativa da leishmaniose tegumentar (LT). Esta condição é marcada pela presença de lesões disseminadas em diversas áreas do corpo, podendo evoluir para um estado crônico que resulta em debilitação do indivíduo (VIEIRA GONÇALVES *et al.*, 2008).

Leishmaniose Visceral (LV) tem início com a apresentação de sintomas como perda de apetite, febre alta persistente, anemia, hemorragias e inchaço de órgãos como fígado e baço (WILHELM, 2019). A desregulação do apetite pode levar o paciente a quadros de desnutrição grave, e a evolução da doença pode ser rápida, resultando em óbito em um curto período. Os pacientes podem manifestar uma forma crônica da doença, com duração ao longo de anos, ou uma forma aguda que é rápida e fatal (THALHOFER, 2010).

1.1.3. Ciclo Biológico

O ciclo de vida da *Leishmania* (figura 2) inicia-se quando uma fêmea de flebotomíneo, durante seu repasto sanguíneo, inocula formas promastigotas juntamente com sua saliva no hospedeiro vertebrado. Esses parasitos são fagocitados por macrófagos residentes ou neutrófilos recrutados devido à resposta ao repasto sanguíneo ocasionado pelo inseto. Dentro do

fagolisossomo, ocorre a transformação de formas promastigotas em amastigotas. As amastigotas se reproduzem por divisão binária até que a célula infectada sofra lise, liberando mais parasitos para infectar outras células fagocíticas (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Quando outro inseto vetor se alimenta do hospedeiro infectado, suga macrófagos no sangue contendo os protozoários e se estabelecem no intestino do inseto. Lá, passam por uma nova diferenciação, transformando-se em formas promastigotas chamadas procíclicas, que têm menor capacidade de infectar. Posteriormente, essas formas procíclicas se convertem em promastigotas metacíclicas altamente infectantes, migrando para o probóscide do inseto. Durante um novo repasto, essas formas contaminam outro hospedeiro vertebrado, encerrando assim o ciclo (MUSKUS & MARÍN VILLA, 2002).

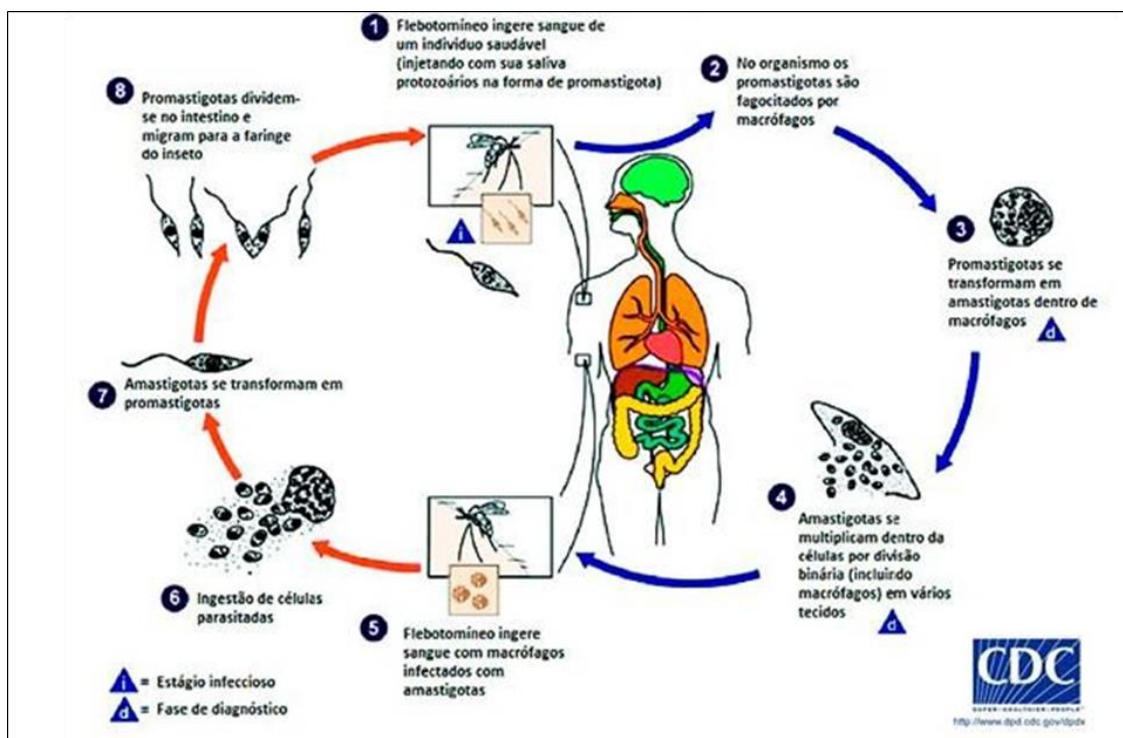


Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fases do ciclo segundo a numeração acima: 1 - infecção do hospedeiro vertebrado por formas promastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo; 2 - fagocitose de formas promastigotas por macrófagos; 3 - transformação de promastigotas em amastigotas e multiplicação; 4 - rompimento do macrófago e liberação de amastigotas; 5 - ingestão de células infectadas pelo inseto vetor; 6 - lise de células infectadas durante digestão; 7 - transformação de amastigotas em promastigotas; 8 - multiplicações de promastigotas.

2.1. Ultraestrutura da forma promastigota de *L. amazonensis*

As promastigotas, conforme ilustrado na (Figura 3), são células extracelulares de morfologia alongada e livre, cujas dimensões variam entre 14 e 20 μm de comprimento e 1,5 a 4 μm de largura. Elas exibem uma extremidade anterior ligeiramente arredondada, da qual se origina o flagelo, essencial para a motilidade e a fixação no epitélio intestinal do inseto vetor, assim como nas células do sistema fagocítico mononuclear (TEIXEIRA *et al.*, 2013). O núcleo está posicionado no terço médio da célula, enquanto o cinetoplasto encontra-se anterior ao núcleo, próximo à bolsa flagelar. Além das organelas típicas das células eucarióticas, como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias e citoesqueleto, as promastigotas também apresentam estruturas exclusivas da família Trypanosomatidae, como cinetoplasto, estrutura paraflagelar, glicosomo e microtúbulos subpeculiares (REY, 2008).

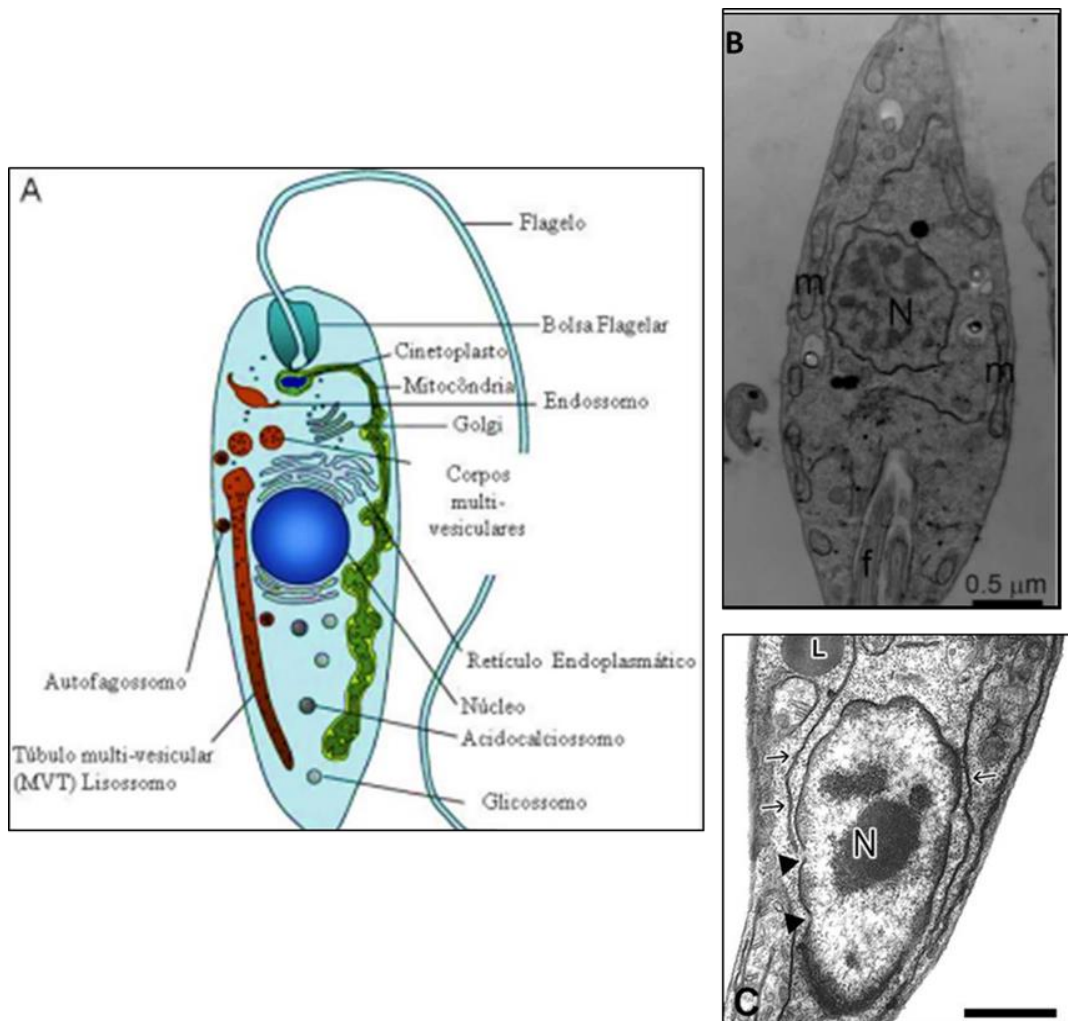


Figura 3 – Morfologia geral da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. (A) Representação esquemática. (B) Várias das estruturas representadas em (A) estão assinaladas: N - núcleo, c - cinetoplasto, b – bolsa flagelar, m - mitocôndria. (C) Ampliação de uma promastigota de *Leishmania*, mostrando perfis de RE (setas) nas proximidades do núcleo e da membrana plasmática. Observe a presença de poros nucleares bem definidos (ponta seta). (Retirado de Pimenta and De Souza *et al.*, 1985).

2.2. Mecanismos de Morte Celular

Uma das formas mais estudadas de morte celular é a apoptose, um processo identificado e nomeado por Jonh Kerr e pesquisadores no ano de 1972. O termo apoptose, derivado do grego para "queda", sugere uma queda controlada, semelhante à queda de pétalas de flores ou folhas de árvores (FUCHS; STELLER, 2015). As células apoptóticas são distintas por apresentarem uma série de alterações morfológicas características. Estas incluem o arredondamento celular, redução do volume celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, além da presença de vesículas liberadas

na superfície da membrana plasmática, conhecidas como (“Blebbs”) (ROACH e CLARKE, 2000). A apoptose é um processo de morte celular programada (Figura 4) que impede o começo da via inflamatória, o que confere vantagens a todos os organismos (KANDUC *et al.*, 2012). Este mecanismo desempenha um papel crucial no desenvolvimento normal dos tecidos, na patogênese de diversas doenças infecciosas, bem como na eliminação seletiva de células prejudiciais e desnecessárias do sistema corporal (DANIALL e KORSMEYER, 2004).

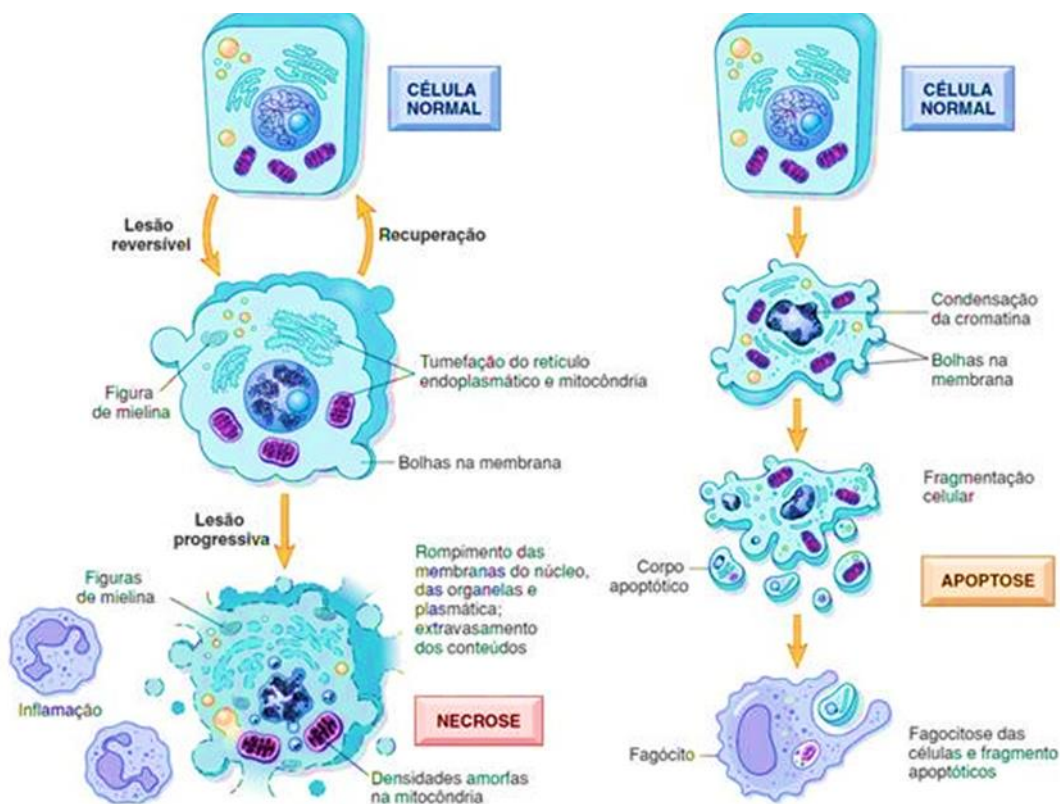


Figura 4 – Morte celular por apoptose e necrose. Na apoptose é possível identificar a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos. Por outro lado, na necrose observa-se a ruptura da membrana plasmática, das organelas e o núcleo. (Retirado de Steller, 2015).

O mecanismo de morte celular por necrose se distingue da apoptose por ser um tipo de morte celular considerada acidental, desprovida de controle genético. A necrose ocorre em resposta a danos físicos, como altas temperaturas e radiação, bem como a exposição a danos químicos no ambiente celular, como quimioterápicos, drogas ilícitas, podendo também ser acidental (VANDEN BERGHE *et al.*, 2013). As células submetidas à necrose

exibem alterações morfológicas que incluem inchaço do volume celular, ruptura extensa da membrana e organelas, formação de vacúolos citoplasmáticos, perda de integridade da membrana (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Este processo de morte celular não programada resulta em inflamação localizada. Diante disso, as variedades de morte celular previamente mencionada, é mais vantajoso que os agentes quimioterápicos atuem através de processos apoptóticos, visando a redução do impacto.

2.3. Tratamentos para manifestação clínica da Leishmaniose

Os medicamentos empregados no tratamento das leishmanioses são categorizados em duas classes: fármacos de primeira linha e de segunda linha. Entre os fármacos de primeira linha, destacam-se os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), os quais foram desenvolvidos há mais de seis décadas (SHYAM *et al.*, 2015). Esses medicamentos são reconhecidos por seus efeitos adversos, incluindo náuseas, cólicas abdominais, diarreia, erupções cutâneas, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Além disso, a administração por via parenteral (intravenosa - IV ou intramuscular - IM) requer que os pacientes se desloquem a uma unidade de saúde para receber as injeções, o que muitas vezes resulta em casos de abandono ou interrupção do tratamento (LIMA *et al.*, 2007).

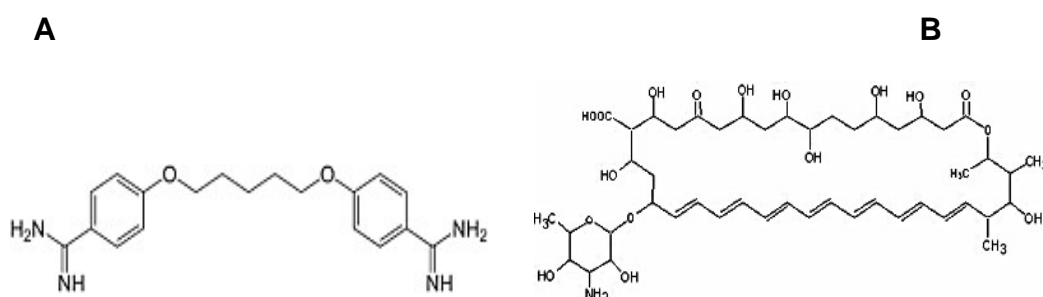


Figura 5 – Estrutura química dos compostos Pentamidina (A) e Anfotericina b (B). (Retirado de BERNE *et al.*, 2015).

Dentre os agentes quimioterápicos empregados como tratamento de segunda linha para a leishmaniose, a pentamidina (Figura 5 A) é comumente utilizada em casos de leishmaniose cutânea (BHANDARI *et al.*, 2012). No

entanto, este fármaco está associado a efeitos tóxicos em uma proporção significativa, afetando entre 30% a 50% dos pacientes tratados. Estes efeitos adversos incluem complicações graves como diabetes mellitus, hipoglicemia, miocardite e toxicidade renal, o que impõe limitações ao seu uso clínico (CROFT e OLLIARIO, 2011). A anfotericina B (Figura 5 B) é administrada por via endovenosa, sendo seu uso limitado devido à sua toxicidade, apresentando efeitos como trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (BERN *et al.*, 2006). Nesse contexto, a Leishmaniose foi descrita como um grande problema de saúde pública, até o momento não existe um tratamento satisfatório (WIZEMAN *et al.*, 2008) Portanto, é necessário desenvolver novos compostos ou combinações quimioterápicas mais seguras, eficazes e acessíveis com baixo custo.

2.4. Compostos Metalocomplexos

Os metalocomplexos são compostos com metais de transição, coordenados com o ligante que podem ter efeito contra parasitos (fármacos), e devido a isso apresentam possibilidades de coordenação com diferentes geometrias (VAN e SADLER, 2009). Esta coordenação permite interagir com o alvo molecular específico, principalmente com moléculas biológicas (FRICKER, 2007) permitindo o aumento da lipofilicidade (AHMAD *et al.*, 2006; BRUIJNINCX & SADLER, 2008). Além disso, estas coordenações podem alterar as características dos compostos utilizados, revertendo perfis de resistência da célula-alvo ao composto utilizado. Com isso, alguns efeitos colaterais gerados pelos compostos não coordenados podem ser reduzidos após a adição de um metal. Em alguns casos há sinergismo entre o metal e o ligante, levando à diminuição das concentrações necessárias para obter a ação biológica desejada (MENDES *et al.*, 2005; PÉREZ- Rebolledo *et al.*, 2005).

Os metais podem aumentar a lipofilicidade do fármaco, facilitando a difusão através das membranas biológicas (BRUIJNINCXB & SADLER, 2010). Além disso, elementos metálicos desempenham papéis essenciais em processos biológicos (FERNANDES, *et al.*, 2010). A compreensão da vasta gama de atividades exercidas por elementos inorgânicos tem impulsionado significativamente o progresso na pesquisa e no desenvolvimento de fármacos

que se baseiam em metais (MALDONADO *et al.*, 2022). Os metalocomplexos surgem como uma alternativa promissora na investigação de novos agentes quimioterápicos com atividade antiparasitária. Estudos *in vitro* conduzidos com *L. amazonensis* avaliaram a eficácia do composto de cobalto (II), revelando-se uma substância promissora para o desenvolvimento de futuros medicamentos anti-Leishmania (ROCHA *et al.*, 2023).

Os compostos metálicos desempenham um papel crucial no avanço da farmacologia, devido à sua utilidade em diversas áreas. Pesquisas sugerem que a coordenação de compostos com metais pode ser eficaz como agentes antiparasitários (ROCHA *et al.*, 2023). Um estudo específico testou o composto Zn(II) para avaliar sua eficácia na inibição do crescimento de *T. gondii* após 24 e 48 horas, resultando em um baixo índice de infecção (CARDOSO *et al.*, 2022). Devido à novidade molecular deste composto, há poucos trabalhos na literatura que abordem sua aplicabilidade no desenvolvimento de novas quimioterapias contra parasitas, especialmente *Leishmania amazonensis*. Por isso, escolhemos este complexo de zinco para investigar seu efeito e responder nossas hipóteses.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos *in vitro* do metalocomplexo ZnBS no tratamento contra promastigota de *Leishmania amazonensis*;

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da população de formas promastigota de *L. amazonensis* após tratamento com metalocomplexo;
- Analisar as alterações na ultraestrutura de formas promastigota de *L. amazonensis* tratados com metalocomplexo utilizando microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar o efeito do composto na morfologia do parasito, utilizando marcadores fluorescentes específicos através de microscopia de fluorescência;
- Avaliar o tipo de morte celular do parasito, causado pelo composto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Metalocomplexo

O composto utilizado na pesquisa foi sintetizado no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob a supervisão dos professores Adolfo Horn Júnior e Christiane Fernandes. Este composto, denominado ZnBS, possui um núcleo de Zinco e o ligante orgânico Cumarina. O ZnBS foi diluído em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma®), com adição direta ao meio de cultura. Os estoques foram mantidos em concentração de 10 mM e armazenados a -22 °C.

3.2. Manutenção das promastigotas *in vitro*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa Josefa) foram obtidas por meio da diferenciação de amastigotas isoladas de lesões de camundongos Balb/C (aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da UENF (protocolo 486). Essas formas foram cultivadas em meio (DMEM) (Sigma®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco-Thermo Fisher Scientific), 20 µg/mL de hemina e 10 µg/mL de ácido fólico(Sigma®). As passagens foram realizadas adicionando 5% do volume de inóculo em frascos de cultura de 25cm³, os quais foram mantidos a 28°C. Os parasitos passaram por um total de seis passagens, com passagens semanais, garantindo assim a manutenção da virulência ao longo do experimento.

3.3. Manutenção de células LLC-MK₂

As células epiteliais LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™, Rockville, MD, EUA) provenientes do rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) foram cultivadas em frascos de cultura de células de 25 cm², utilizando meio DMEM (Sigma Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O cultivo foi mantido a 37°C sob uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). A cada 48 horas ou após a formação de monocamadas confluentes, as culturas passaram por tratamento com solução de tripsina/EDTA (Sigma Aldrich, EUA) para obtenção de subculturas.

3.4. Ensaio de viabilidade celular

As células LLC-MK2, cultivadas por 24 horas em placas de 96 poços, foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do composto ZnBS: 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol/L}$. Para o controle negativo, as células foram cultivadas com DMEM suplementado sem adição do composto. Como controle positivo, as células foram tratadas com Triton X-100 a 10% em DMEM.

Após 48 horas, uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS) foi adicionada a todos os poços e incubada por 4 horas a 37°C. Posteriormente, a solução foi removida e o solvente MTT (DMSO em isopropanol na proporção de 1:1) foi adicionado aos poços. A placa foi coberta com papel alumínio e agitada por 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas VersaMax- (Molecular Devices) usando o software 6.0 SoftMax Pro. Os dados foram plotados usando o software GraphPad Prism 5.0.

3.5 Ensaios antiproliferativo com promastigotas (antileishmania)

O composto ZnBS foi diluído em DMEM para alcançar uma concentração de estoque 10 mM e armazenado a -22°C. Após um período de 24 horas de cultivo, o ZnBS em diferentes concentrações: 1; 10; 40; 60 e 80 μM foi adicionado diretamente ao meio de cultura contendo 1×10^5 de parasito. No grupo controle, o ZnBS não foi adicionado.

Os parasitos foram cultivados na presença do composto ZnBS por até 120 horas de tratamento. A cada intervalo de 24 horas, alíquotas de 10 μL foram retiradas e adicionadas a uma solução de formaldeído a 4% em PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01M/pH 7.1) para quantificação em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio de luz com contraste de fase.

Para determinar o IC_{50} , a porcentagem de inibição do crescimento foi plotada em função da concentração do ZnBS, e os valores foram ajustados por meio de análise de curva não linear. A análise de regressão foi realizada utilizando o programa Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Com o intuito de investigar a ultraestrutura dos parasitos em resposta à presença e ausência do composto em diferentes concentrações, realizamos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão com diferentes tempos de interação. Inicialmente, as amostras foram fixadas em uma solução

contendo glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram submetidos a duas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, cada uma com duração de 10 minutos. A pós- fixação foi realizada em uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) em ambiente protegido da luz, por 1 hora. Em seguida, os parasitos foram submetidos a duas lavagens com cacodilato de sódio 0,1 M, cada uma com duração de 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30% a 100%) seguidas de infiltração em resina epóxi. O material foi então submetido a um período de 48 horas à temperatura de 60°C para polimerização. Secções ultrafinas das amostras foram obtidas e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas e imagens foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400 Plus utilizando diferentes aumentos.

3.7 Análise de interferência do composto em organelas de *L. amazonensis* por microscopia de fluorescência

Com o objetivo de analisar o efeito do composto ZnBS em organelas do parasito,o mesmo foi tratado com concentrações de 1µM e 10µM do composto,por 72, 96 e 120 horas, nos moldes do item 3.5. Posteriormente incubados com o marcador fluorescente de células vivas. ER-Tracker Green é um marcador fluorescente de células vivas, altamente seletivas para o retículo endoplasmático (ER). Em frascos para cultivo de células foram adicionados 1×10^5 parasitos em 10 mL de solução contendo DMEM e 10% de SFB e após 24 horas foi adicionado o composto ZnBS em diferentes concentrações 1 µM e 10µM. Para o ensaio com o corante ER-Tracker foram selecionados as concentrações 1 µM, 10 µM e o Controle nos tempos de 72, 96 e 120h. Após 120 horas de tratamento,1 mL da cultura foi centrifugada em uma mini centrífuga por 10 min em 1.000 rpm, 0,9 mL do sobrenadante foi removido, os sedimentos resuspensos, 2,5 µl de ER-Tracker 100 µM foram adicionados, e as células incubadas por 2 horas a 28°C. Lâminas foram preparadas para observação e captura de imagens em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan (Excitação 490 nm/ Emissão 546 nm).

3.8 Análise de morte celular – Apoptose e Necrose

A morte celular do parasito tratados ou não com o composto ZnBS, por diferentes tempos, foram avaliadas por ensaio de TUNEL TMR red e marcação com Brometo de Etídio.

3.8.1 Detecção de fragmentação do DNA pelo ensaio TUNEL

A fragmentação do DNA do parasito foi avaliada por meio do ensaio TUNEL, utilizando o kit de detecção de morte celular in situ, TMR red (Sigma), conforme as orientações do fabricante. As promastigotas de *L. amazonensis*, mencionadas no item 3.7.1, foram coletadas após 72, 96 e 120 horas de tratamento. Posteriormente, foi fixado com PBS 1% de paraformaldeído durante 1 hora e lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado PBS contendo 3% de Triton X-100, e os parasitos foram incubados com 20 µL por eppendorf contendo uma mistura de 50 µL da enzima e 450 µL da solução de marcação por 1 hora a 27°C.

Os parasitos marcados foram analisados por citometria de fluxo, e a porcentagem de parasitos positivos para TUNEL foi calculada. Parasitos não marcados foram utilizados como controle no experimento.

3.8.2 Avaliação de indução de apoptose e necrose secundária com a marcação de Brometo Etídio

As promastigotas de *L. amazonensis*, conforme descrito no item 3.7.1, foram coletados após 72, 96 e 120 horas de tratamento com concentrações de 1 µM, 10 µM e um grupo controle não tratado. Posteriormente, as células foram submetidas à centrifugação a 500g por 10 minutos a 4°C, seguidas pela remoção do sobrenadante, deixando apenas o sedimento. Após duas lavagens com PBS e uma nova centrifugação para formação de sedimento, o brometo de etídio foi adicionado a uma concentração de 1 mg/ml em PBS por 5 minutos.

As lamínulas foram preparadas e observadas utilizando o microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan para análise de campos aleatórios. As células

foram discriminadas com base na presença de necrose secundária, seguindo os protocolos estabelecidos por Kosmider *et al.* (2004). Essa metodologia possibilitou uma avaliação detalhada do estado da morfologia sob diferentes condições de tratamento.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Cada experimento foi repetido três vezes e os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, através do software Graphpad Prism 5. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito no crescimento de promastigota de *Leishmania amazonensis*

Na análise das curvas de crescimento do parasito após o tratamento com o composto ZnBS (Figura 6), em concentrações de 1,10, 40, 60 e 80 μM ao longo de 24, 48 e 72 horas, observamos um controle significativo do crescimento a partir das 24 horas de tratamento. Os valores de IC_{50} para o composto ZnBS foram calculados como 1.2, 1.8 e 1.3 μM , correspondendo aos períodos de tratamento de 24,48 e 72 horas, respectivamente. Este resultado evidencia a eficácia do ZnBS em controlar o crescimento do parasito dentro do intervalo de tempo considerado.

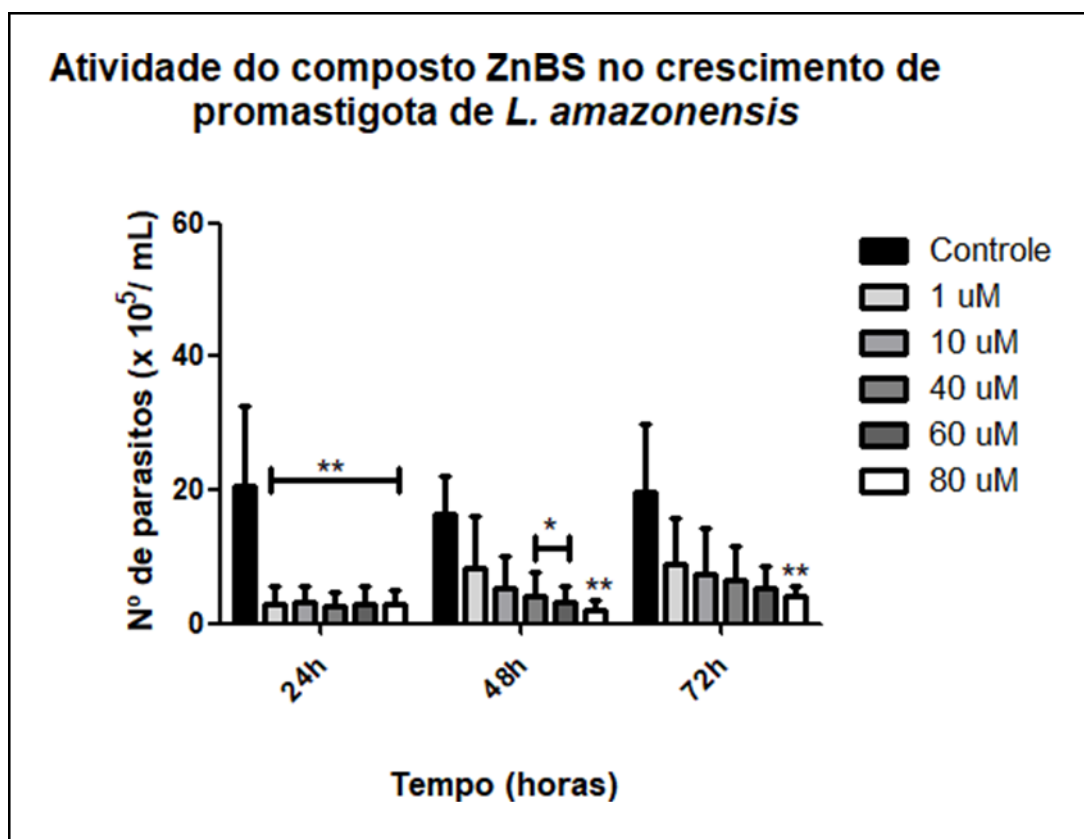


Figura 6 – Efeitos antiproliferativos do composto ZnBS em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Crescimento dos parasitos após o tratamento com o ZnBS em diferentes concentrações por até 72 horas. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$ em relação ao controle one-way ANOVA com pós-teste deTukey.

Após o tratamento com o composto ZnBS em diferentes concentrações 1,10, 40, 60 e 80 μM , durante 96 e 120 horas, notou-se uma significativa redução no crescimento do parasito, após 120 horas (Figura 7). Concentrações

mais altas do ZnBS mostraram resultados promissores na redução do crescimento do parasito. Os valores de IC₅₀ para o ZnBS foram baixos, registrando-se 0.98 e 1.7 µM para os tempos de 96 e 120 horas.

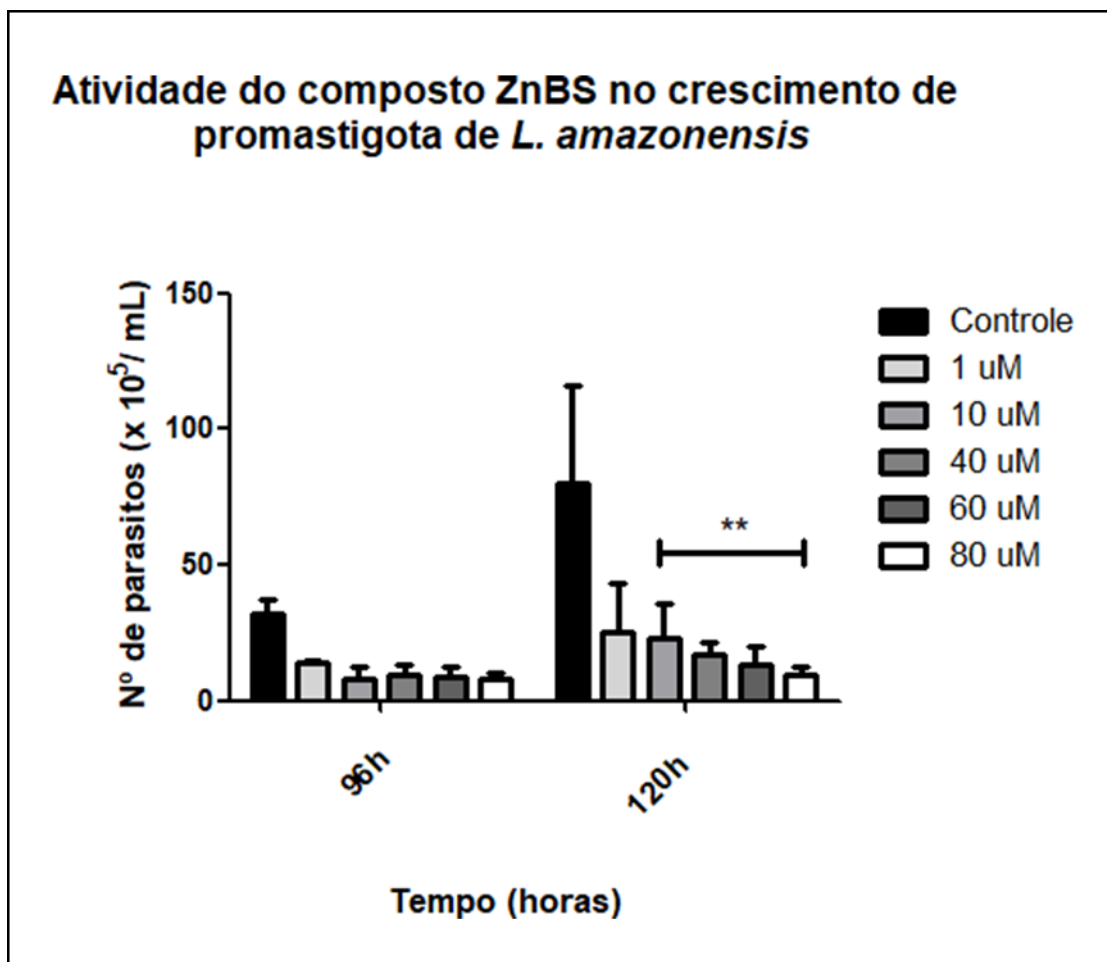


Figura 7 – Efeitos antiproliferativos do composto ZnBS em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Crescimento dos parasitos após o tratamento com o ZnBS em diferentes concentrações por até 120 horas. **P ≤ 0.01 em relação ao controle one-way ANOVA com pós-teste deTukey.

Para avaliar a viabilidade das células LLC-MK2 após o tratamento com o composto ZnBS, foi realizada uma análise da quantidade de formazan solúvel, medida pela absorbância a 570 nm, a fim de investigar a toxicidade do composto nas células hospedeiras de mamíferos.

Na análise da viabilidade das células LLC-MK2 pós-tratamento com o composto ZnBS (Figura 8), foram testadas concentrações variando de 100 µM a 500 µM ao longo de um período de 48 horas. Os resultados obtidos indicam que o composto ZnBS não apresentou toxicidade significativa sobre as células durante as 48 horas de exposição.

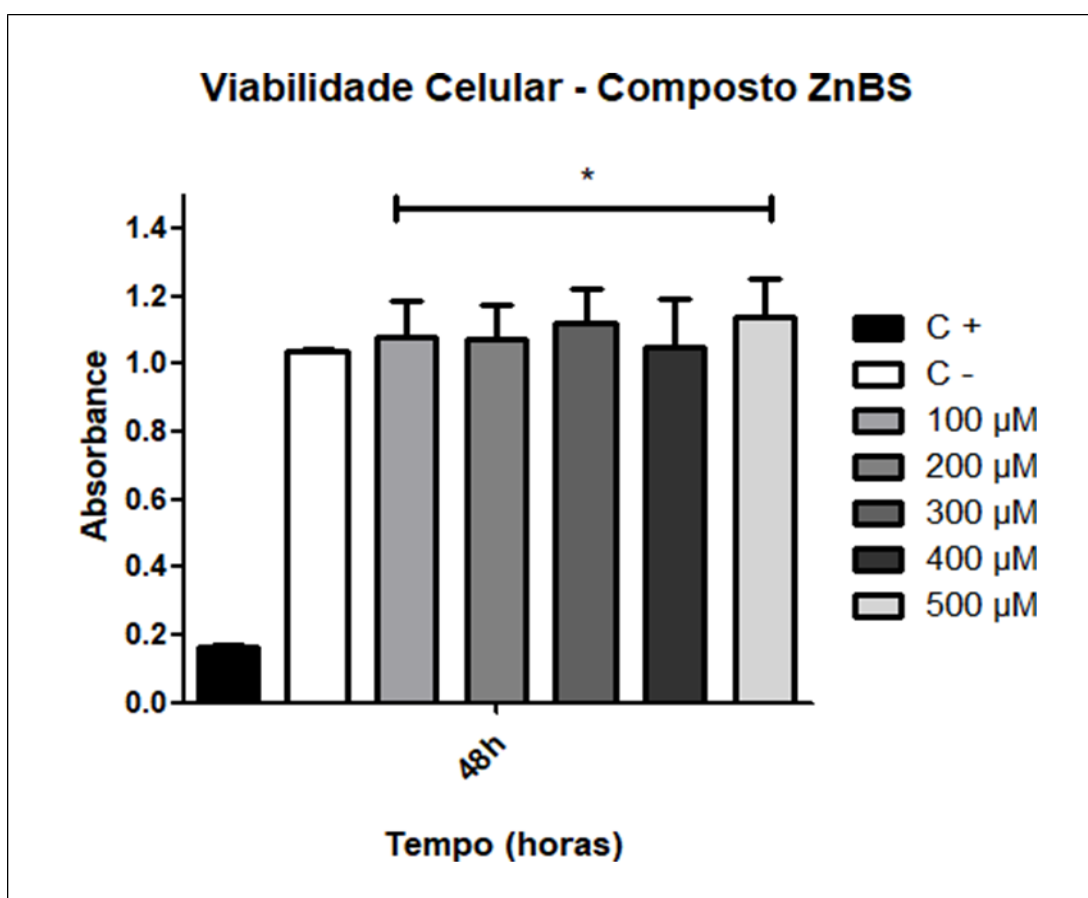


Figura 8 – Análise dos efeitos citotóxicos do composto ZnBS no tratamento de células LLC- MK₂. Controle negativo: as células foram cultivadas em meio DMEM com FBS sem complexo. Controle positivo: as células foram cultivadas com Triton X- 100 a 10% em meio DMEM. A quantificação da absorbância foi realizada para avaliar a produção de formazan solúvel pela redução celular após o tratamento com diferentes concentrações do composto ZnBS. A absorbância foi registrada a 570 nm.

4.2. Análise Ultraestrutural

Para elucidar possíveis mecanismos de ação do metalocomplexo sobre a *Leishmania amazonensis*, utilizou-se a análise ultraestrutural dos parasitos após o tratamento com o composto ZnBS. Os parasitos não tratados e cultivados nas mesmas condições apresentaram morfologia típica, com organelas bem preservadas, incluindo núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar e retículo endoplasmático (Figura 9A).

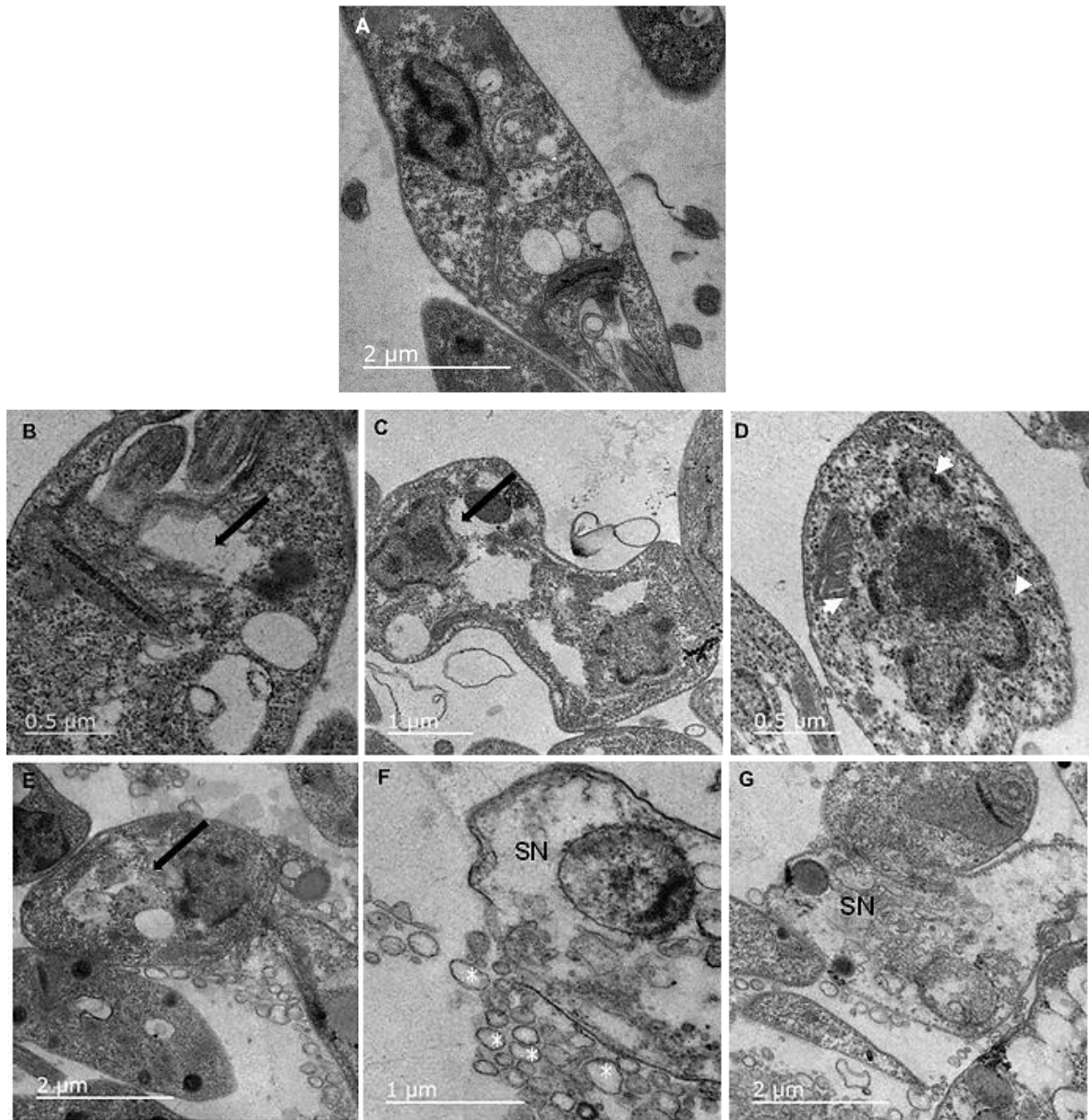


Figura 9 – Microscopia eletrônica de transmissão de *Leishmania amazonensis* controle e tratados com o composto ZnBS por 120 horas. Controle sem tratamento (A), com tratamento 1µM (B, C e D) e a 10 µM (E, F e G). Nota-se alterações no retículo endoplasmático (seta), condensação do DNA, indicativa de apoptose (cabeça de seta), presença de corpos apoptóticos (*) e sinais de necrose secundária (SN). Barras: 0,5 µm, 1 µm, 2 µm.

Durante a análise das promastigotas tratadas com o composto ZnBS por 120 horas, na concentração de 1µM, notamos alterações em organelas importantes, como o retículo endoplasmático, e a presença de condensação de DNA, sinalizando processo de apoptose. O retícul mostrou uma desorganização anormal (Figura 9B). Além disso, na concentração de 10 µM, observou-se a formação de corpos apoptóticos e sinais de necrose secundária.

4.3. Interferência do ZnBS no retículo endoplasmático de *L. amazonensis* com ER-Tracker por microscopia de fluorescência

A fim de observar a interferência do composto ZnBS sobre o retículo endoplasmático de *L. amazonensis*, foram conduzidas análises utilizando microscopia de fluorescência com o contraste interferencial diferencial (DIC), após a exposição das células a diferentes concentrações e durações de tratamento com o ZnBS (Figuras 10, 11 e 12). Este estudo utilizou o marcador específico para o retículo endoplasmático o ER-Tracker® (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. O ER-Tracker, devido à sua capacidade de atravessar livremente as membranas celulares, apresenta seletividade pela organela analisada, permitindo a marcação e subsequente visualização do retículo endoplasmático, cuja emissão fluorescente se manifesta na cor verde.

Na Figura 10A, representa-se o grupo controle. Na Figura 10C, que corresponde à concentração de 1 μM do ZnBS por 72 horas, observam-se alterações estruturais acompanhadas por uma intensa emissão de fluorescência na faixa verde, sugerindo a possibilidade de estresse no retículo endoplasmático do parasito induzido pelo composto. Na Figura 10E, associada à concentração de 10 μM , nota-se uma redução na fluorescência e uma perda de marcação.

Na figura 10C, que corresponde à exposição ao composto a uma concentração de 1 μM por 96 horas, são evidenciadas novamente alterações na estrutura, incluindo inchaço anormal. Por outro lado, no tratamento com 10 μM do composto, em contraste com o período de 72 horas, há uma intensificação no sinal de fluorescência marcada pelo ER-Tracker.

A figura 11C, ao empregar uma concentração de 1 μM do composto ZnBS por 120 horas, observa-se uma redução na marcação do retículo endoplasmático. Em contrapartida, o parasito tratado com 10 μM do composto, conforme ilustrado na Figura 11E, exibe uma intensa marcação do retículo endoplasmático.

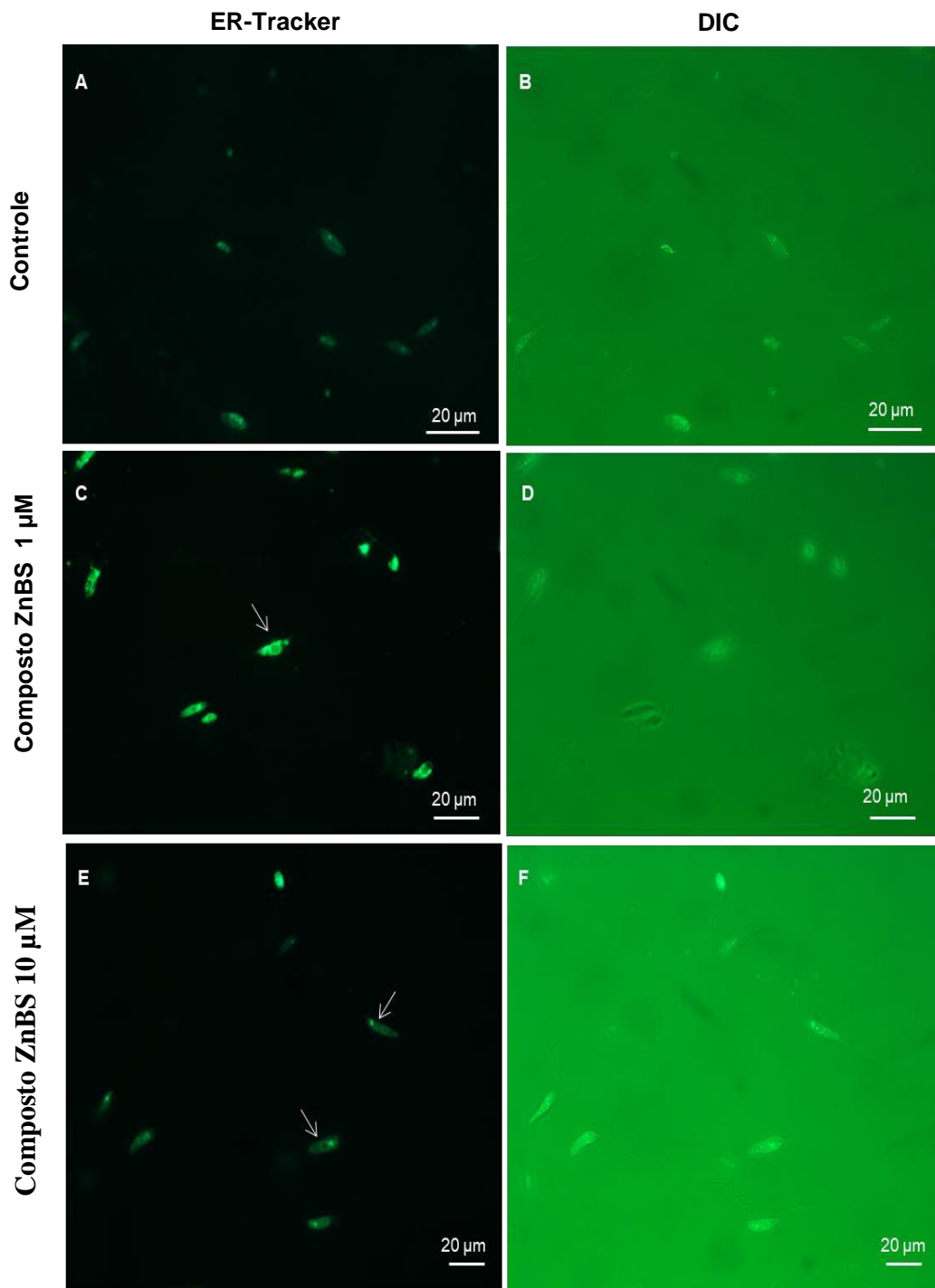


Figura 10 - Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS por 72 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1 μ M; E e F concentração de 10 μ M.; B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Barras: 20 μ m.

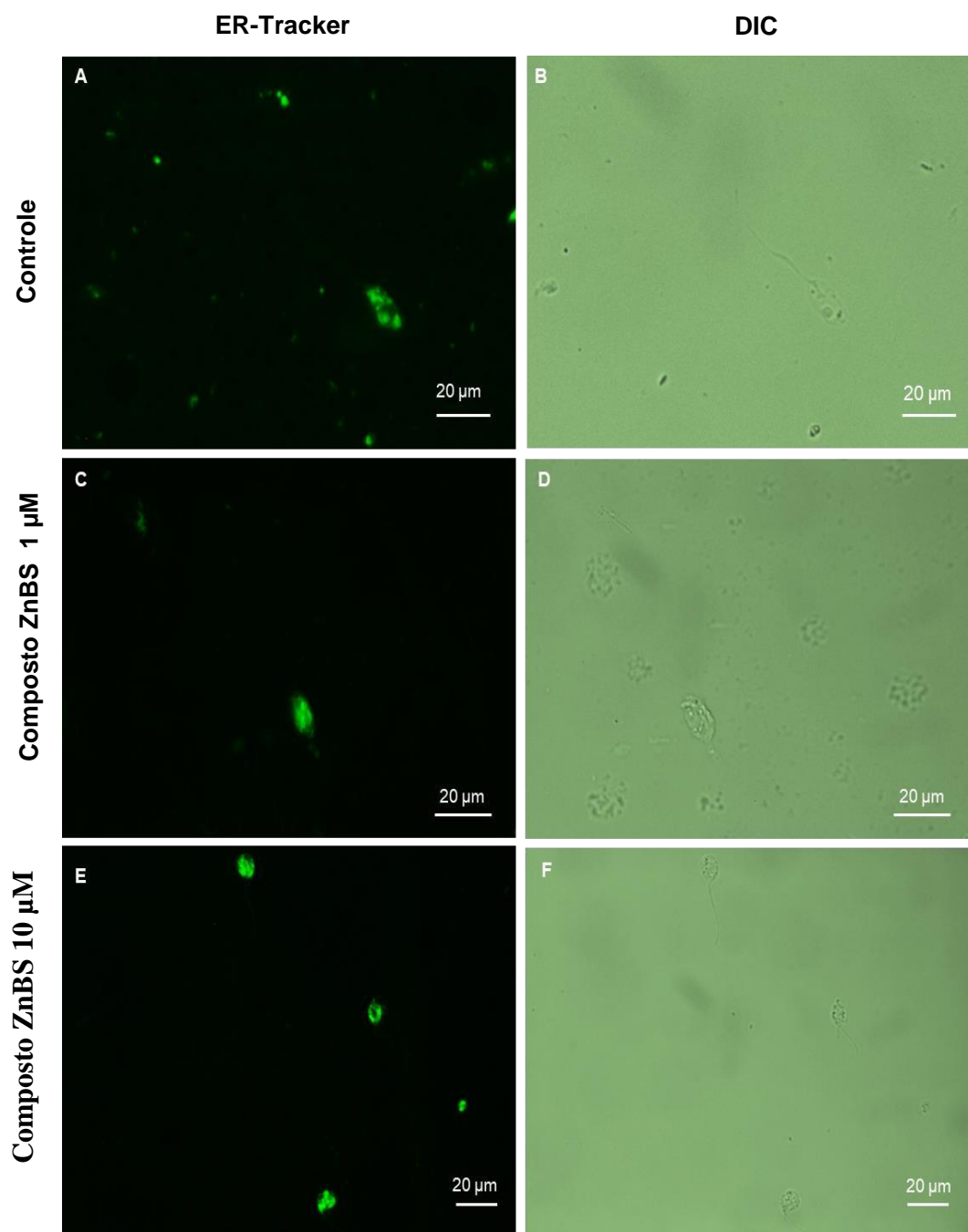


Figura 11 – Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 μM e 10 μM do composto ZnBS por 96 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1 μM ; E e F concentração de 10 μM . B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Barras: 20 μm .

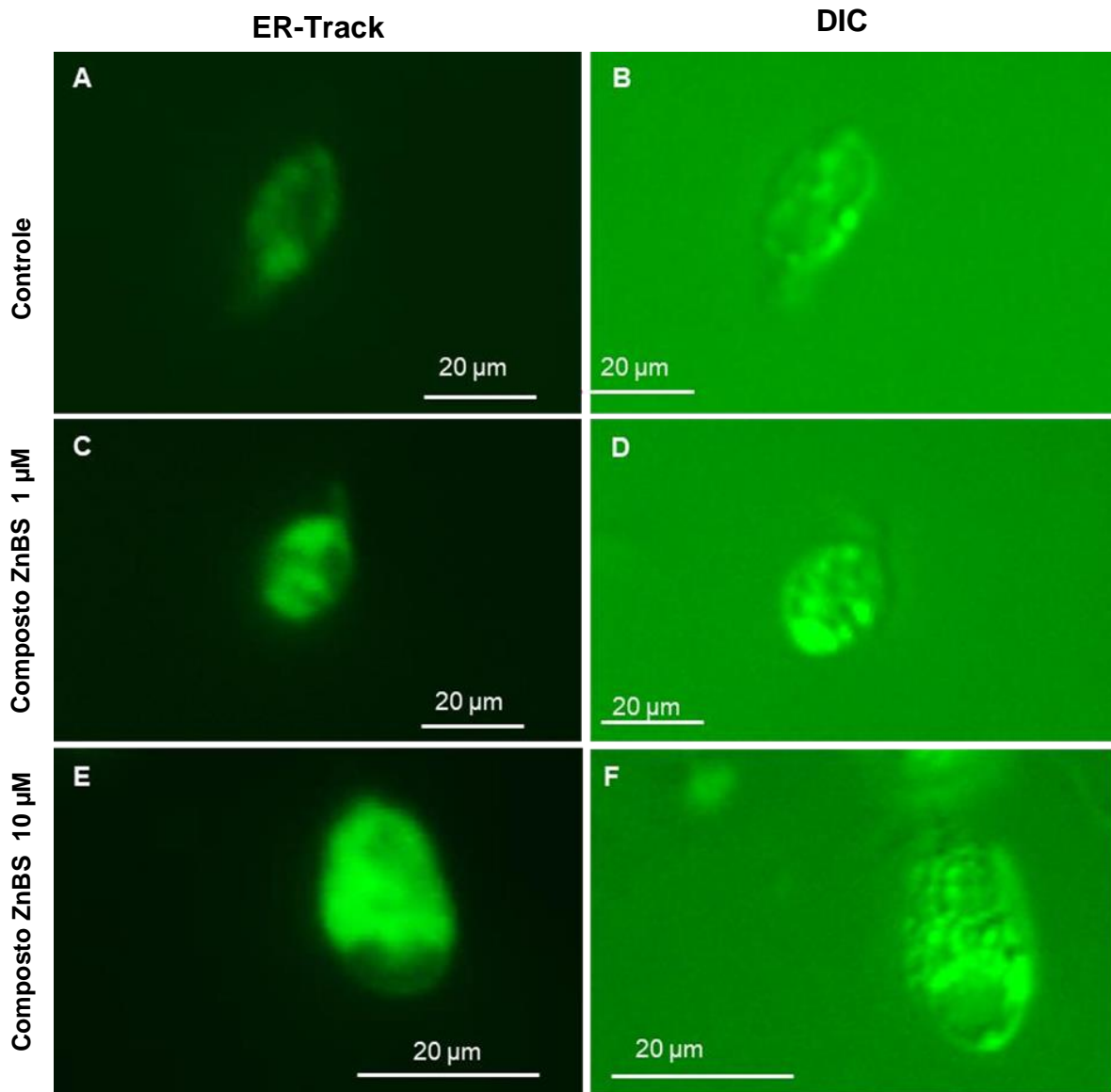


Figura 12 - Imagens de microscopia fluorescência de parasitos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS por 120 horas, posteriormente incubados com o marcador específico para o retículo endoplasmático ER-tracker. A-B controle; C-D concentração de 1 μ M; E e F concentração de 10 μ M. B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC) Barras: 20 μ m.

4.4. Análise de morte celular por apoptose e necrose: Utilização do kit TUNEL in situ e coloração com Brometo de Etídio

A análise de apoptose, mediante a citometria de fluxo, foi conduzida para quantificação de morte celular apoptótica. Utilizou-se o kit de detecção de morte celular in situ, TMR red, empregando ensaios de marcação terminal de “nicks” com biotina-dUTP e desoxinucleotidil transferase (TUNEL) para a detecção de apoptose. Observou-se que o grupo controle apresentou uma taxa

apoptótica de 3.5%. Por outro lado, a exposição ao composto ZnBS por 72 horas, resultou em taxas significativamente mais elevadas de apoptose, alcançando 63 e 65.6% para as concentrações de 1 μ M e 10 μ M (Figura 13). À medida que o tempo de exposição ao composto ZnBS aumentou para 96 horas, verificou-se que o grupo controle, a taxa de apoptose atingiu 9.4%, enquanto nas amostras tratadas com o composto ZnBS a 1 μ M e 10 μ M, as taxas foram de 38.2 e 86.6%, respectivamente (Figura 14). Após 120 horas de tratamento, a taxa de apoptose no grupo controle aumentou para 14.5%, quando submetidas às concentrações de 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS, apresentou 56.7 e 49,7% de apoptose (Figura 15).

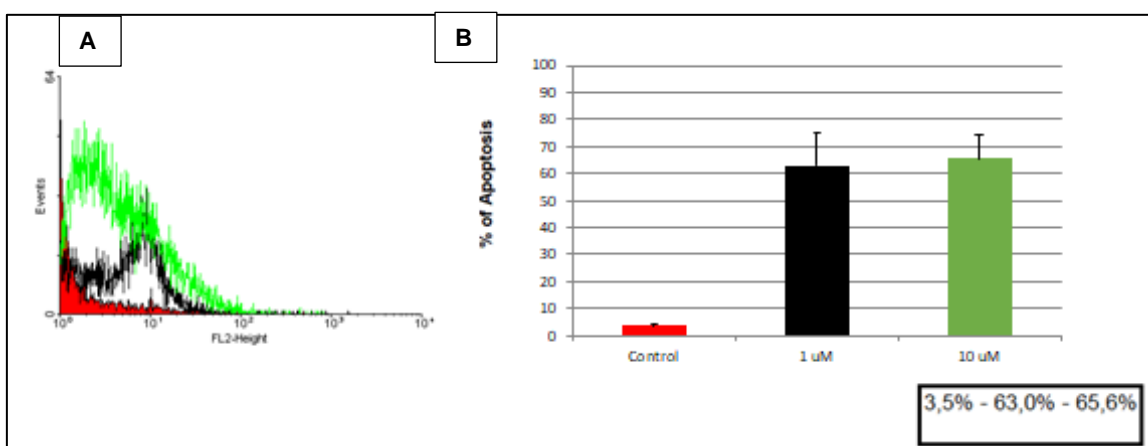


Figura 13 – Detecção de morte celular *in situ* foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 72 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 3.5%. Nos grupos tratados com 1 μ M e 10 μ M do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 63 e 65.6%.

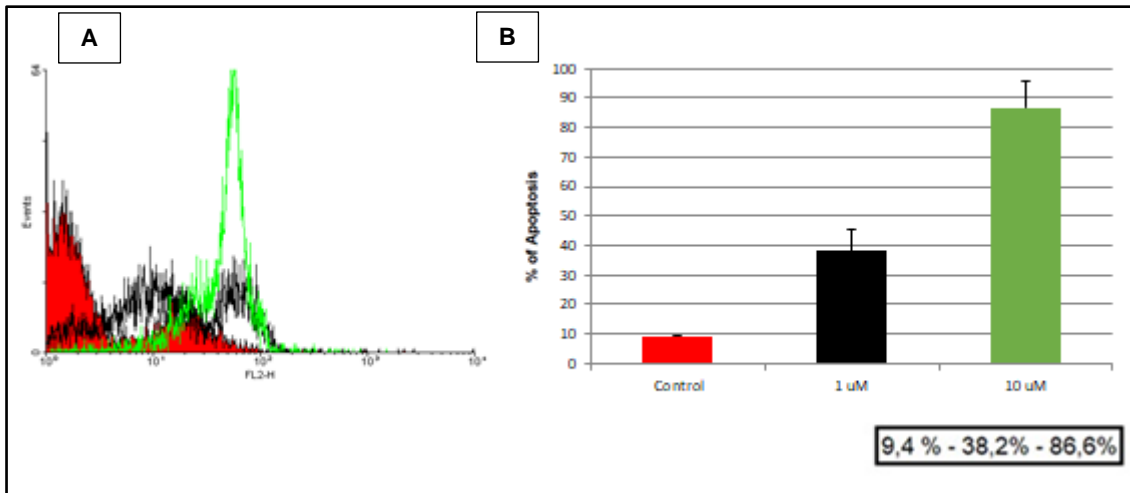


Figura 14 - Detecção de morte celular in situ foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 96 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 9.4%. Nos grupos tratados com 1μM e 10μM do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 38.2 e 86.6%.

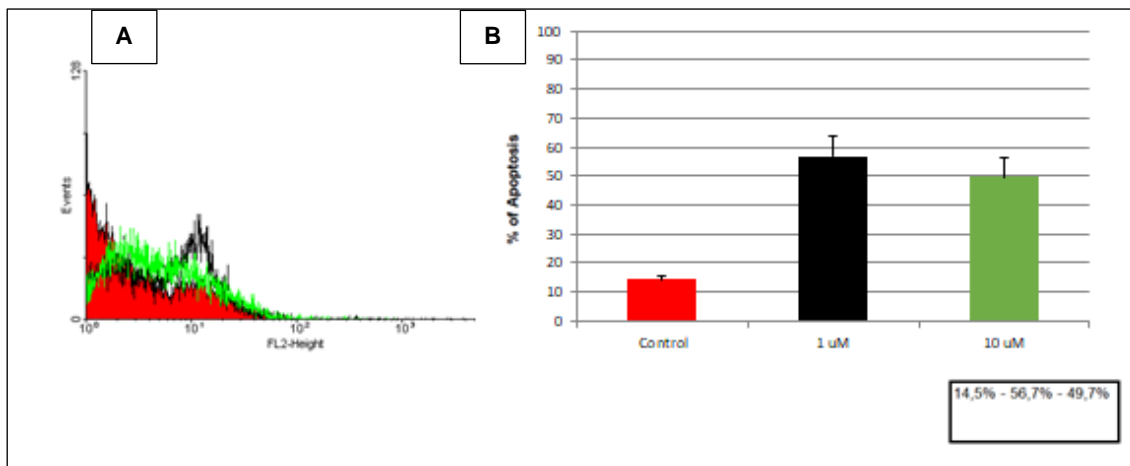


Figura 15 - Detecção de morte celular in situ foi realizada por meio do ensaio TUNEL utilizando citometria de fluxo em células de *L. amazonensis*, controle e tratados com ZnBS por 120 horas. Os eventos de histogramas de FL2-Height, que representam o conteúdo de DNA fluorescente vermelho (A), foram analisados. A análise estatística da porcentagem de apoptose (B) revelou que a taxa de apoptose no grupo controle foi de 14.5%. Nos grupos tratados com 1μM e 10μM do composto ZnBS, as taxas de apoptose foram de 56.7 e 49.7%.

A cultura com *L. amazonensis* foi tratados com o composto ZnBS (Figura 15), por 72 horas e submetidas a análise da indução de necrose secundária pela marcação com Brometo de Etídio. Nas figuras A e B, observam-se poucas

alterações na estrutura do parasito, mantendo sua integridade. No entanto, nas figuras C e D, com a concentração de 1µM do composto, observam-se um notável inchaço nuclear e um aumento do volume citoplasmático. Na imagem E/F é possível observar que o tratamento a 10µM induziu estágios que indicam ser morte celular por apoptose com necrose secundária, e a permeabilização da membrana plasmática com a entrada do Brometo de Etídio e fragmentação nucleares emitindo o sinal de fluorescência.

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto ZnBS durante 96 horas (Figura 16) apresentaram alterações morfológicas semelhantes ao tempo de 72 horas. Na imagem C, houve um aumento no volume citoplasmático, acompanhando pela perda da marcação do fluoróforo de Brometo de Etídio. Por outro lado, na (Figura 16E) observou-se o núcleo fragmentado.

Após a análise das promastigotas tratadas com o composto ZnBS por um período de 120 horas, nas concentrações de 1µM e 10µM, identificamos alterações morfológicas distintas em relação ao grupo controle. Enquanto os parasitos não tratados mantiveram a morfologia característica (Figura 17A e 17B), o tratamento com ZnBS na concentração de 1µM resultou em inchaço anormal do núcleo, tanto nas amostras tratadas com 1µM quanto com 10µM (Figura 17C e 17E). Nas células expostas à concentração de 10µM do composto, foi evidenciada a indução clara da morte celular do parasito por apoptose com necrose secundária, caracterizada pela fragmentação nuclear e uma intensa emissão de fluorescência (Figura 17E).

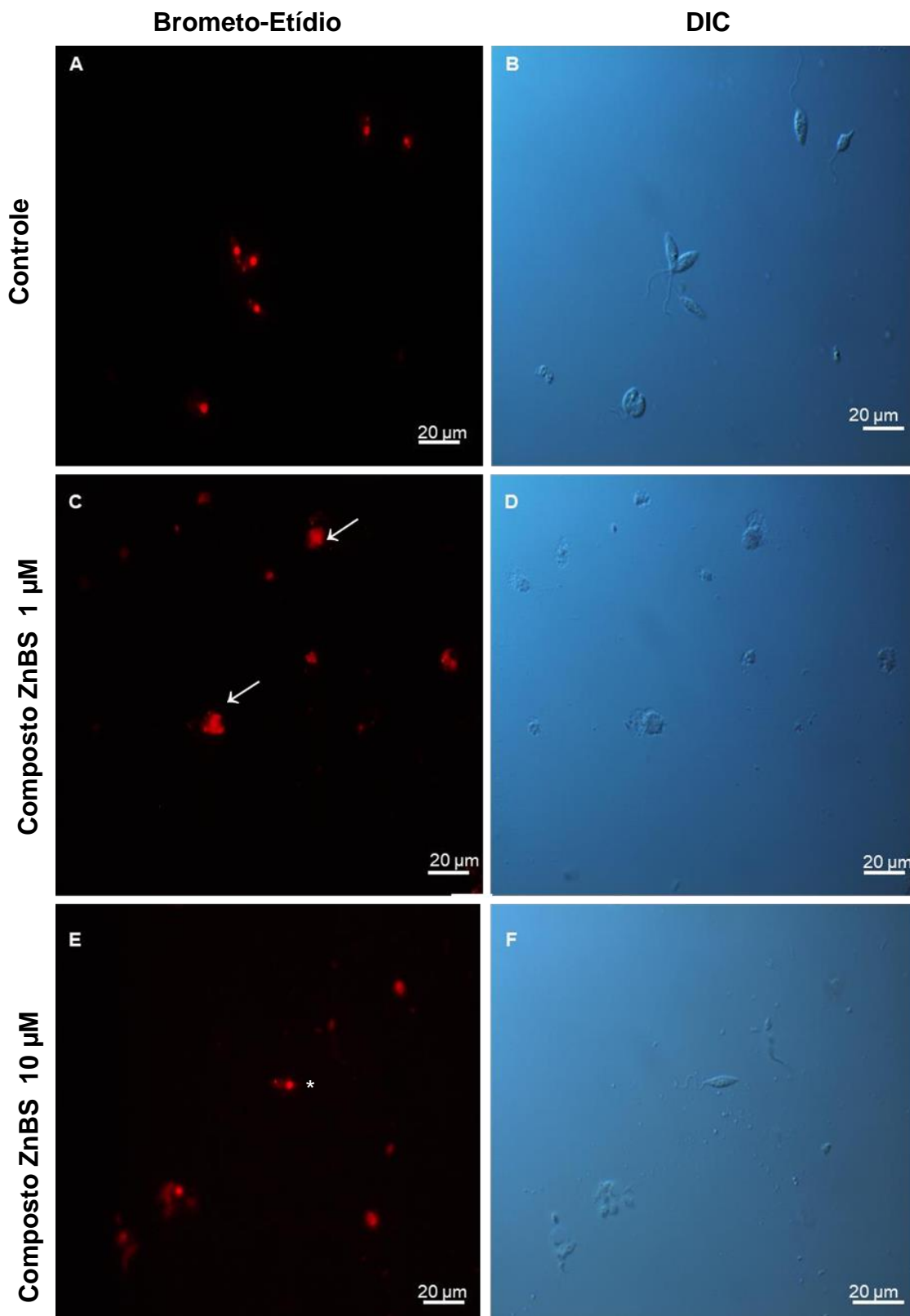


Figura 16 – Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1 μM de ZnBS; E-F tratamento com 10 μM do composto ZnBS; B, D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Nota-se a presença de inchaço nuclear e aumento do volume citoplasmático (seta); fragmentação nuclear emitindo sinal de fluorescência (*). Barras: 20 μm.

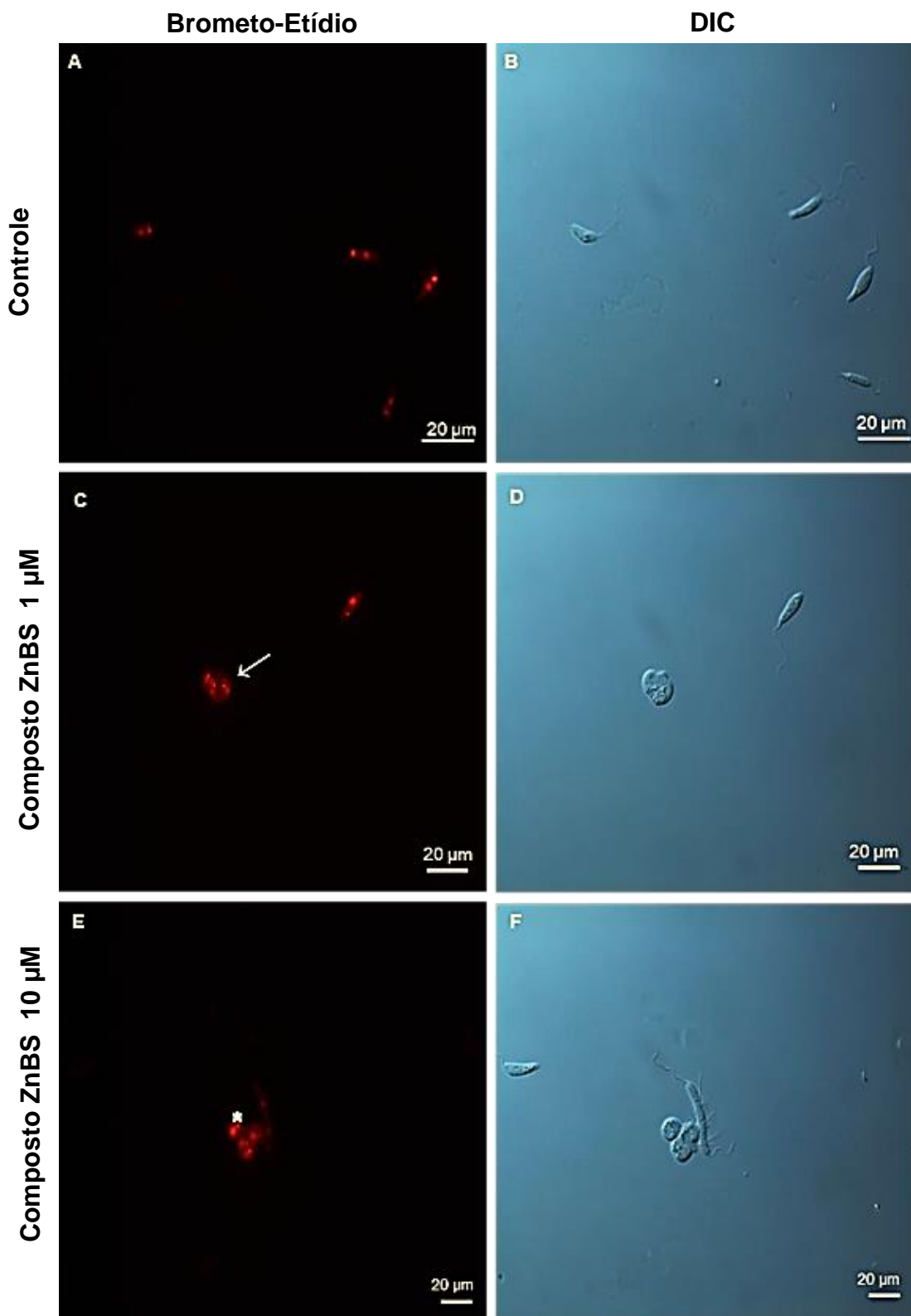


Figura 17 – Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 96 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1 μM de ZnBS; E-F tratamento com 10 μM do composto ZnBS; B,D e F- contraste interferencial diferencial (DIC). Nota-se o aumento do volume citoplasmático e redução da marcação do fluoróforo de Brometo de Etídio (seta); fragmentação do núcleo (*). Barras: 20 μm

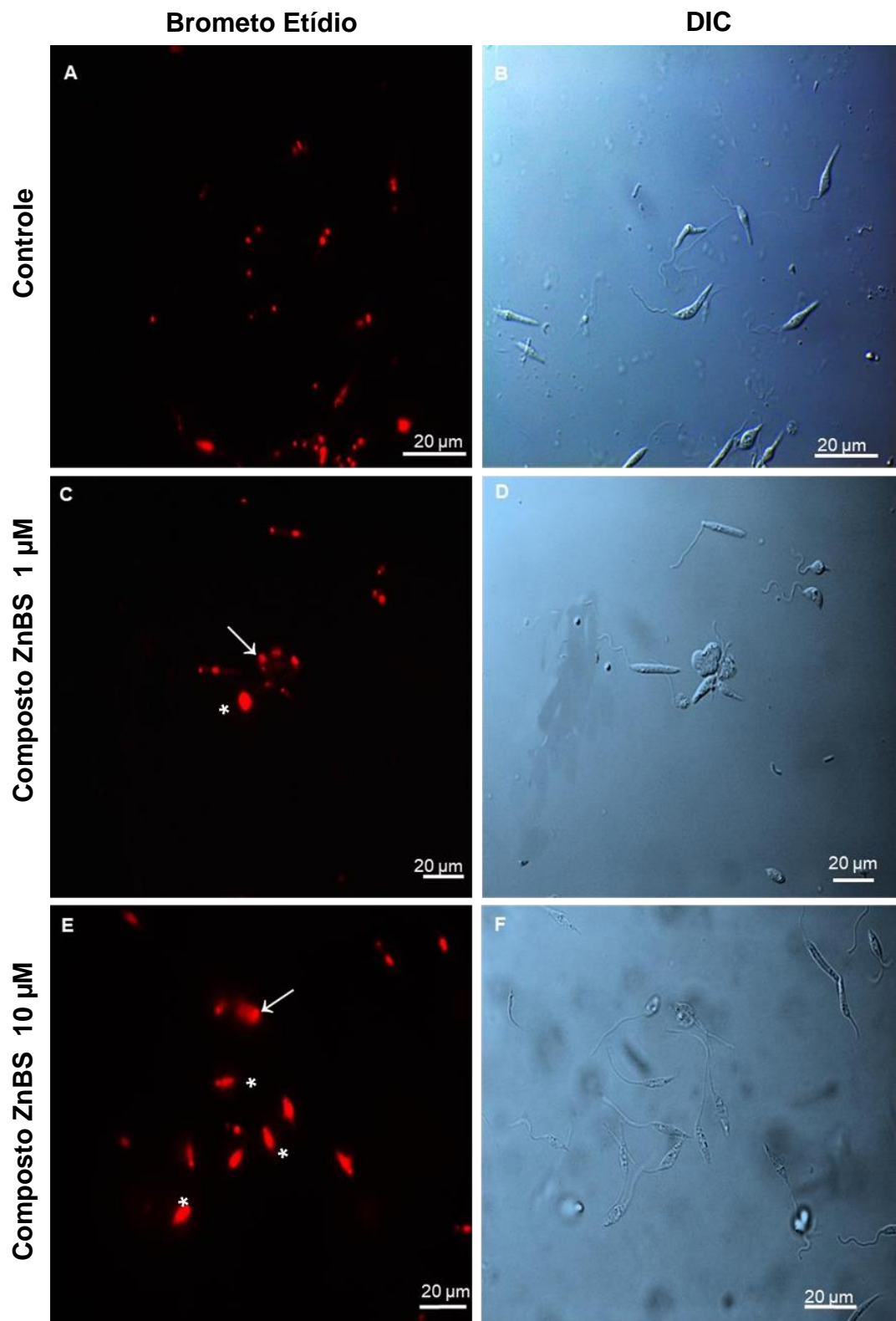


Figura 18 – Avaliação de indução da necrose secundária em promastigota de *L. amazonensis* após 120 horas de tratamento com o composto ZnBS, usando a marcação com Brometo de Etídio. A-B controle; C-D tratamento com 1 μM do ZnBS; E-F tratamento com 10 μM do ZnBS; B, D e F - contraste interferencial diferencial (DIC). Nota-se a presença de inchaço anormal do núcleo (seta) e aumento do volume citoplasmático (seta); fragmentação do núcleo e intensa emissão de fluorescência (*). Barras: 20 μm.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças tropicais originadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A infecção afeta aproximadamente 12 milhões de indivíduos em 88 países, com a incidência anual de 2,0 a 3,0 milhões de novos casos (KEDZIERSKI, 2010). Apesar das numerosas pesquisas realizadas, a terapia de primeira linha continua baseada em antimoniais pentavalentes, desenvolvidos há mais de 70 anos, os quais demonstram toxicidade e provocam diversos efeitos colaterais, resultando em taxas de cura insatisfatórias. Substâncias de segunda escolha, como a Anfotericina B, são ainda mais tóxicas, e embora exista uma formulação lipídica menos nociva, seu custo o torna impraticável para uso regular em países em desenvolvimento (MEHEUS *et al.*, 2010). Diante disso, surge uma necessidade de desenvolvimento de novos quimioterápicos que sejam seguros, acessíveis e eficazes contra as leishmanioses. Nesse contexto, a busca por novos compostos terapêuticos é fundamental. O processo de desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos há desafios, tais como a falta de interesse da indústria farmacêutica, a necessidade de identificar alvos moleculares relevantes e sua eficácia como alvo terapêutico, demanda de períodos prologados de desenvolvimento, necessidade de síntese de compostos inéditos para garantir a eficácia e a segurança, ampla diversidade de compostos, e uma infraestrutura robusta e bem organizada, isso inclui instalações de laboratório, equipamentos especializados (GIAROLLA & FERREIRA, 2012). Com base na necessidade de desenvolver e avaliar novas terapias para o tratamento da leishmaniose cutânea, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito de um composto metálico sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O composto em questão, denominado ZnBS, foi submetido à análise por microscopia eletrônica de transmissão, visando elucidar sua influência na ultraestrutura do parasito. Os resultados revelaram o composto ZnBS como promissor para o desenvolvimento de possíveis compostos anti-*Leishmania*.

Os compostos metálicos desempenham um papel fundamental no progresso da farmacologia, devido a utilidade em várias áreas. Pesquisas indicam que a coordenação de compostos com metais pode ser benéfica e eficaz como agentes antiparasitários (ROCHA *et al.*, 2023). O composto ZnBs

apresentou resultados interessantes em sua atividade biológica. Por ser um composto com molécula inédita, não há muitos trabalhos publicados na literatura que contenham dados referentes à sua aplicabilidade no desenvolvimento de novas quimioterapias contra parasitos, especificamente com *Leishmania amazonensis*. O composto Zn(II) foi testado no trabalho que analisou sua eficácia na inibição do crescimento de *T.gondii* após 24 e 48 horas, chegando ao resultado preliminar que o composto desenvolveu baixo índice de infecção em *T. gondii* (CARDOSO *et al.*,2022). Os resultados encontrados no presente trabalho após experimentos *in vitro*, mostraram que o composto ZnBS apresentou IC₅₀ de 1.2 µM (24h), 1.8 µM (48h), 1.3 µM (72h), 0.98 µM (96h) e 1.7µM (120h), o que podemos observar que é menor que os valores descritos no trabalho de ROCHA *et al.* (2023), que também analisou atividade anti- *Leishmania in vitro* com novos complexos isoméricos de cobalto (II), apresentando IC₅₀ de 4.90 µM (24h), 2.50 µM (48h), 3.80 µM (72h), 3.40 µM (96h). De modo a exceder a capacidade farmacológica do composto testado, foram feitas análises dos efeitos citotóxicos do composto em células LLC-MK₂, com até 48 horas de tratamento, com concentrações que variaram de 500 µM a 100 µM. Dessa maneira, os resultados do presente trabalho mostraram que o composto ZnBS não apresentou citotoxicidade significativa as células hospedeiras LLC-MK₂, o que é compatível com os resultados prévios obtidos usando células hospedeiras LLC-MK₂ em composto de ferro dinuclear (PORTES. *et al.*,2015).

Para analisar os efeitos do composto na ultraestrutura do parasito, optamos pela utilização da microscopia eletrônica de transmissão, que viabiliza a análise minuciosa de organelas e estruturas celulares. Esse tipo de análise desempenha um papel fundamental no esclarecimento dos mecanismos de ação dos quimioterápicos na ultraestrutura do parasito. Por exemplo, em um estudo realizado por Trahamane (2015), utilizou a microscopia eletrônica de transmissão para analisar as alterações celulares induzidas pela terapia de fotodinâmica em promastigotas. Os resultados revelaram mudanças significativas na morfologia mitocondrial, incluindo hipodensidade e desorganização das cristas mitocondriais.

Os efeitos da quimioterapia com metalocomplexo de zinco incluíram uma variedade de alterações que resultam na morte evidente do parasito, como

observado através dos danos ultraestruturais induzidos. O tratamento com o composto ZnBS ocasionou mudanças no retículo endoplasmático do parasito, condensação do DNA e a presença de corpos apoptóticos. O padrão de alterações observadas sugere um mecanismo de morte celular por apoptose. Além disso, Jiménez *et al.*, (2010) descreveram características que corroboram com as mencionadas acima. Parasitos tratados com compostos quimioterápicos de cobre por 48 horas, na concentração de 10 micromolar, exibiram blebs de membrana, assim como alterações no núcleo, cromatina e vesículas parecidas com corpos apoptóticos, indicativos de morte por apoptose.

As modificações na estrutura do retículo endoplasmático, induzidas pelo tratamento com o composto ZnBS, foram corroboradas por meio de experimentos utilizando o marcador fluorescente de células vivas ER-Tracker Green e avaliadas por microscopia de fluorescência. O marcador ER-Tracker foi concebido com baixa afinidade por outras organelas celulares, conferindo-lhe maior seletividade para o retículo endoplasmático (WARNES, 2015). A metodologia utilizando o ER-Tracker permitiu uma análise precisa da morfologia do retículo endoplasmático em células vivas, sem ser influenciada por outras estruturas celulares.

Com o intuito de verificar se o composto ZnBS induziu mecanismos de morte celular por apoptose, além das características observadas na microscopia de transmissão, como a presença de corpos apoptóticos, marcadores distintivos desse processo, realizamos o teste TUNEL (GEZER & SARI, 2021). Os resultados confirmaram que o composto utilizado neste estudo ativou mecanismos de morte celular por apoptose e, conseqüentemente, levou à necrose secundária. Outros estudos sobre *Leishmania*, como o de Aghaei *et al.*, (2020), relataram a ocorrência de vários tipos de morte celular, incluindo apoptose e necrose. Este fenômeno também foi observado em *L. amazonensis* após o tratamento com o composto ZnBS, como analisado neste trabalho.

Após a realização do teste de morte celular por apoptose utilizando o teste com o kit TUNEL, procedemos à análise dos estágios avançados da apoptose, denominados necrose secundária (ZIEGLER & GROSCUTH, 2005), por meio da microscopia de fluorescência. A coloração das células com Brometo de Etídio revelou que o composto ZnBS, nas concentrações de 1µM e

10µM, induziu um inchaço anormal resultando na coloração avermelhada do núcleo, indicando a permeabilização necrótica da membrana plasmática e permitindo a entrada do Brometo de Etídio, conforme descrito no trabalho de (KROEMER *et al.*, 2005).

Embora o composto de zinco tenha demonstrado eficácia contra promastigotas de *L. amazonensis* em experimentos *in vitro*, ainda há lacunas significativas no entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à sua ação contra o parasito. No entanto, esses resultados suscitam perspectivas para a investigação da eficácia do composto em modelos de infecção *in vivo*, além de uma análise mais aprofundada do mecanismo de ação do ZnBS sobre o parasito.

6. CONCLUSÕES

A partir de resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho e consultas à literatura recente é possível concluir que os compostos metalocomplexos de zinco são ativos contra promastigota de *L. amazonensis*, pois:

- ▶ O composto ZnBS foi capaz de controlar o crescimento do parasito na forma promastigota mantida *in vitro*.
- ▶ Os valores de IC₅₀ para o composto ZnBS foram 1.2, 1.8, 1.3, 0.98, 1.7 µM, para os tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de tratamento;
- ▶ O composto não apresentou citotoxicidade a células LLC-MK₂;
- ▶ O composto ZnBS gerou alterações em organelas do parasito, apresentando alterações no retículo endoplasmático. Observou-se também condensação do DNA, indicativa de apoptose e presença de corpos apoptóticos. Além disso, sinais de necrose secundária

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S., et al. **Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents**; Polyhedron, 25, 1633, 2006.

AGHAEI, M., et al. **The role of Bax in the apoptosis of leishmania-infected macrophages**. Microbial pathogenesis vol.139. 103892, 2020.

ALVARENGA, D. G. de; ESCALDA P. M. F.; COSTA, A. S. V. da; MONREAL, M. T.F. D. **Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n.2, p. 194- 197. 2010.

ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C., **Leishmaniasis and poverty**. Trends Parasitol. 22, 552–557. 2006

ANVERSA, L., et al. **‘Human leishmaniasis in Brazil: A general review’**, Rev. Assoc. Med. Bras. 64, 281–289, 2018.

ASHFORD R.W. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses**. International journal for parasitology 30: 1269–1281. 2000.

BAILEY, MS. LOCKWOOD, DNJ. **Cutaneous leishmaniasis**. ClinDermatol 25: 203-211.2007.

BARROSO, DH., et al. **PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by Leishmania (L.) amazonensis**. Front Immunol. 9: 1021, 2018.

BERN, C., et al. **Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis**. Clinical infectious diseases, v. 43, n.7, p.917-24. 2006.

BHANDARI, V., et al. **Drug susceptibility in leishmania isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis**. Plos Neglect. Trop. v. 6, p. 1-6, 2012.

BOULIKAS, T. PANTOS, A. BELLIS, E. CHRISTOFIS, P. **Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms**. Cancer Therapy, 5: 537- 583 2007.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSES. **Cenárias epidemiológicas Leishmanioses em humanos no Estado do Rio de Janeiro**. Nº 001, 2021.

BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. **Curr. Op. New trends for metal complexes with anticancer activity** Chem. Biol. 12, 197, 2008.

BRUIJNINCX, C.A.; SADLER, P.J. **New trends for metal complexes with anticancer activity.** Current Opinion in Chemical Biology. [S.l.], 12, 1–10, 2010.

CARDOSO, A. P., *et al.* **Desenvolvimento, estrutural, espectroscópico e in silico investigação de novos complexos relevantes como anti-toxoplasma metalofármacos.** Journal of Molecular Structure. Vol. 1265. 133380. 2022

COSTA, J.M., *et al.* **Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases.** J Trop Med Hyg. 89(6), 319-23, 1986.

CONITEC. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.** Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2018.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?** Nat. Rev. Microbiol. 5, 873–882. 2007

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. **Drug Resistance in Leishmaniasis.** Clin. Microbiol. Rev. v. 19, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L. & OLLIARO, P. **Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities.** Clin. Microbiol. Infec. v. 17, p. 1478-83, 2011.

DARZNIKIEWICZ, Z., JUAN, G., GORCZYCA, W., MURAKAMI, **Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and accidental cell death (Necrosis).** In Borges, L.J.H. **Atividade antineoplásica dos compostos de coordenação de cobre.** Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Tese de Mestrado. 103p; 2009.

DANIALI, N.N. KORSMEYER, S.J. **Cell death: critical control points.** Cell. 116. p.205.2004.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305–318, 2004.

FARIAS, A.C.*et al.*, **Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic ifn- γ signature.** PLoS Neglected Tropical Diseases. 2021.

FERNANDES, C., *et al.* **Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy.** Journal Inorganic Biochemistry, 104, 1214-1223, 2010.

FUCHS, Y; STELLER, H. **Live to die another way: modes of**

programmed cell death and the signals emanating from dying cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology 16:6, v. 16, n. 6, p. 329–344,2015.

FRICKER S. P. **Metal based drugs: from serendipity to design;** Dalton Trans. 147,4903, 2007.

GIAROLLA, J, *et al.* **Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasec and antileishmanial prodrugs.** Journal of molecular modeling vol. 18, 2012.

GILL, G. BEECHING, N. **Visceral Leishmaniasis.** Tropical Medicine 6th Edition. p. 74–79. 2009

HASSAN, M., *et al.* **Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer.**BioMed Research International, v. 2014.

KANE, M.M, MOSSER, D.M. **Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation.** Current Opinion in Hematology, v. 7, n. 1, p. 26- 31. 2000.

KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; SERPICO, R.; SINIGAGLIA, E.; SINHA, A. A.; NATALE, C.; SANTACROCE, S. SIMONE, S., BUCCI, R. FARBER, E. **Cell Death: Apoptosis versus necrosis** (review). International Journal of Oncology, 21: 165- 170, 2012;

KASSI, M, AFGHAN A.K, REHMAN, R. **Marring Leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous Leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan.** PLoS neglected tropical diseases 2: 2008.

KEDZIERSKI, L., *et al.* **Leishmaniasis: current treatment and prospect for new drug.** 2009.

KEDZIERSKI, L. **Leishmaniasis vaccine: where are we today?** J. Glob.Infect. Dis., v. 2, p. 177– 185, 2010.

KOSMIDER, B., *et al.* **Indução de apoptose e necrose em células A549 pelo complexo cis- Pt(II) de aminoflavona em comparação com cis-DDP.** V. 563, 2004.

KROEMER, G.,*et al.* **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.** Cell Death Differ 12:1463-1467, 2005.

KLATT, S.; SIMPSON, L.; MASLOV, D.A.; KONTHUR, Z. **Leishmania tarentolae: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host.** PLoS Neglected Tropical Disease, v. 25,

n. 7, p.13, 2019.

LESTINOVA, T *et al.*, **Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania**. PLoS neglected tropical diseases vol. 11,7 e0005600. 2017.

LESSA, M. M., *et al.*, **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v.73, n.6, p.843-847. 2007.

LIMA, E. B., *et al.* **Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, n. 2, p. 111–123, 2007.

LORETE, T. *et al.*, **In Vitro on Leishmania amazonensis Promastigote forms of a new Co (II) Coordination complex**. Brazilian Journal of Development. 7,14653-14668, 2021.

LORETE, T. *et al.*, **Evaluation of ultrastructural Changes And Cell Death On Leishmania amazonensis Promastigote forms induced By a New Coordinated Complex Co(II)**. Brazilian Journal of Development. 7, 20106-20118, 2021.

MALDONADO, Y. D., *et al.* **New silver(I) phosphino complexes: Evaluation of their potential as prospective agents against Mycobacterium tuberculosis**. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 227, p. 111683, 1 fev. 2022.

MARTINS, G. A. S.; LIMA, M. D. **Leishmaniose: Do Diagnóstico ao Tratamento**. Enciclopédia Biosfera, v. 9, n. 16, p. 2556-2569. 2013.

MEHEUS, F., *et al.* **Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent**. Plos. Negl. Trop. Dis. V. 4, p. 803-818, 2010.

MENDES, I.C. *et al.*, **Organotin (IV) complexes of 2-pyridineformamide- derived thiosemicarbazones: Antimicrobial and cytotoxic effects**. European Journal of Medicinal Chemistry. [S.I.], 43, 1454-1461, 2005.

MOREIRA, F.F., *et al.* **Development of new dinuclear Fe (III) coordination compounds with in vitro nanomolar antitrypanosomal activity**. Dalton transactions. Vol.50,35 12242-12264. 2021.

MUSKUS, C. E.; MARÍN VILLA, M. **Metacyclogenesis: a basic process in the biology of Leishmania**. Biomédica : revista Del Instituto Nacional de Salud, v. 22, n. 2, p. 167-77, jun. 2002.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses:**

Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C; 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis.** 2018

OZBILGIN, A. *et al.*, **Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey.** *Acta Tropica*, v. 173, n. Mat, p.90-96, 2017.

PÉREZ-REBOLLEDO, A. *et al.*, **Structural studies and cytotoxic activity of N(4)- phenyl-2- benzoylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes.** *European Journal of Medicinal Chemistry.* [S.l.], 40, 467-472, 2005.

PIMENTA PF, de Souza W. **The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations.** *PLoS Pathog.* 2013.

PIMENTA, P. F. P., and De Souza, W. **Fine structure of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *leishmania mexicana amazonensis*** *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 413–419. 1985.

PORTES, J A., *et al.* **Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 59,12. 7374-86, 2015.

PULKKANEN, K.J., *et al.* **False positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay.** *Apoptosis: an international journal on programmed cell death.* Vol.5,4. 329-33. 2000.

REBOUÇAS, S. J. *et al.*, **Evaluation of in vitro and in vivo Efficacy of a Novel Amphotericin B Loaded Nanostructured Lipid Carrier in the Treatment of *Leishmania braziliensis* Infection.** *Int J Nanomedicine*, 15, 8659-8672, 2020.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4^o edição. RJ. Guanabara Koogan. 2008.

REY L. **Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4^o edição. RJ. Guanabara Koogan; 2008.

ROCHA, S.M., *et al.* **In vitro anti-*Leishmania* activity of new isomeric cobalt(II) complexes and in silico insights: Mitochondria impairment and apoptosis-like cell death of the parasite.** *Journal of inorganic biochemistry*

vol. 240. 112088. 2023.

ROACH, H.I. CLARKE, N.M. **Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate.** The Journal of Bone and Joint Surgery. 82:601–613; 2000.

SINNANET Sistema de Informação de Agravos de Notificação. *Leishmaniose Cutânea*. 2019.

SUNDAR, N., KUMAR, M., SINGH, R.K., **Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets.** Asian Pac J Trop Med 5, 485– 497, 2012.

SHYAM *et al.*, **An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis.** Expert Opin Pharmacother. (16) 2. 2015.

TRAHAMANE, T.E.J. **Efeitos da terapia fotodinâmica antiparasitária em *Leishmania braziliensis* e na interação com macrófagos.** Salvador. F.51. 2015.

TEXEIRA, D.E. *et al.*, **The cell biology of Leishmania: how to teach using animations.** PLoS Pathog. 2013.

THALHOFER, C. J., *et al.* **Leukocytes infiltrating the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*.** Infect. Immun. v. 79, p. 108–117, 2010.

VAN RIJT SH. Sadler PJ. **Drug Discov Today.** 14(23-24), 1089-97, 2009.

VANDEN BERGHE, T. *et al.* **Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*.** Methods, v. 61, n. 2, p. 117–129, 1 jun. 2013.

VIEIRA R. *et al.*, **Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro.** International journal of dermatology, v.47,n.9, p. 926-932. 2008.

WARNES, G. **Flow cytometric assays for the study of autophagy.** Methods San Diego Calif. Vol.82. 21-8. 2015.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. **Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 1, p. 39–62. 2011.

WILHELM, T J. **Viszerale Leishmaniose Visceral leishmaniasis.** Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen vol. 90, 10,833-837.

2019.

WIZEMAN, M.S. *et al.*, **Control of phlebotomine sandflies in confined spaces using diffusible repellents and insecticides**. *Medical and Veterinary Entomology*. 22, 405–412, 2008.

WHO - **World Health Organization**. **Leishmaniasis** Fact Sheet. 2021.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. **Morphological features of cell death**. *News in Physiological Sciences*, v. 19, n. 3, p. 124–128. 2004.

ZIEGLER, U., GROSCURTH, P: **Morphological features of cell death**. *News Physiol Sci*, 19:124-128, 2005.