

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**THALLES HENRIQUE FARIA DE SOUZA**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Leishmania (L.)*  
*amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO DE FORMA DE VIDA**

**ALFENAS/MG**

**2026**

**THALLES HENRIQUE FARIA DE SOUZA**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Leishmania (L.)*  
*amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO DE FORMA DE VIDA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Identificação de novos agentes antimicrobianos e antiparasitários.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso

**ALFENAS/MG**

**2026**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

de Souza, Thalles Henrique Faria.

Estudo da alteração da susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* frente a alteração de forma de vida / Thalles Henrique Faria de Souza. - Alfenas, MG, 2026.

65 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Amastigotas axênicos. 3. Híbridos metronidazol-eugenol. 4. Susceptibilidade. I. Marques, Marcos José, orient. II. Título.

THALLES HENRIQUE FARIA DE SOUZA

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Leishmania (L.) amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO DE FORMA DE VIDA**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 23 de abril de 2026.

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

Prof. Dr. Marcell Crispim  
Instituição: Universidade de Barcelona - UB

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2026, às 08:34, 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](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1777538** e o código CRC **E48E27D9**.

Dedico este trabalho à dúvida, companheira incômoda, mas essencial, que me fez questionar cada resultado, refazer cada experimento e, por fim, entender que o erro nem sempre está no que se encontra, mas em como se busca.

## **AGRADECIMENTOS**

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

IMPERARE SIBI MAXIMUM IMPERIUM EST

(Seneca)

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e cujo controle ainda depende de quimioterápicos de significativa toxicidade, com relatos crescentes de resistência. Nesse cenário, modelos experimentais *in vitro* são essenciais na triagem de novas alternativas e compostos candidatos, de modo a reduzir custos, minimizar o uso de modelos animais e otimizar resultados. O presente estudo teve como objetivo avaliar criticamente o uso de amastigotas axênicos como modelo experimental, por meio da análise da atividade de híbridos metronidazol-eugenol contra *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/1973/M2269, comparando promastigotas e amastigotas axênicos, e examinando como o histórico (exposição subinibitória) e a mudança de forma de vida (axenização e reconversão) modulam a susceptibilidade. Também foi avaliada a citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) dos híbridos em macrófagos RAW 264.7 para determinação do índice de seletividade (IS). A viabilidade de promastigotas foi determinada por meio do teste da resazurina, enquanto amastigotas axênicos e macrófagos foram avaliados pelo teste do MTT. Os híbridos exibiram atividade leishmanicida relevante, com concentração efetiva de 50% ( $EC_{50}$ ) menores em amastigotas do que em promastigotas, indicando maior eficácia na forma clinicamente relevante. O composto AD08 se destacou como o mais efetivo ( $EC_{50-AA} = 11,94 \pm 2,19 \mu M$ ), porém o melhor índice de seletividade foi obtido com o híbrido AD06 (IS = 7,63), que foi também o menos tóxico ( $CC_{50} = 136,3 \pm 11,9 \mu M$ ). Na avaliação da susceptibilidade, o pré-tratamento com compostos resultou em aumento do  $EC_{50}$  (aumento médio de 25%), a axenização + reconversão reduziu o  $EC_{50}$  (diminuição média de 21%) e a combinação de ambos acentuou a queda (diminuição média de 49%). Com isso, os resultados evidenciam que a resposta a fármacos em *Leishmania* é estado-dependente e sujeita a histerese. Os híbridos metronidazol-eugenol — em especial AD06 — emergem como candidatos promissores contra *Leishmania (L.) amazonensis*; os achados em amastigotas axênicos são indicativos de tendência, mas exigem validação em amastigotas intracelulares, que permanecem como padrão-ouro na prospecção de novas alternativas contra a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose, amastigotas axênicos, híbridos metronidazol-eugenol, susceptibilidade

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, whose control still relies on chemotherapeutic agents with significant toxicity and increasing reports of resistance. In this context, *in vitro* experimental models are essential for the screening of new alternatives and candidate compounds, allowing cost reduction, minimization of animal model use, and optimization of results. The present study aimed to critically evaluate the use of axenic amastigotes as an experimental model by analyzing the activity of metronidazole–eugenol hybrids against *Leishmania (L.) amazonensis*, strain MHOM/BR/1973/M2269, comparing promastigotes and axenic amastigotes, and examining how history (subinhibitory exposure) and life-stage transition (axenization and reversion) modulate susceptibility. Cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) of the hybrids was also evaluated in RAW 264.7 macrophages to determine the selectivity index (SI). Promastigote viability was assessed using the resazurin assay, whereas axenic amastigotes and macrophages were evaluated using the MTT assay. The hybrids exhibited relevant leishmanicidal activity, with lower 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) values in amastigotes than in promastigotes, indicating greater efficacy in the clinically relevant form. Compound AD08 was the most potent (EC<sub>50-AA</sub> = 11.94 ± 2.19 μM), while hybrid AD06 showed the best selectivity index (SI = 7.63) and the lowest cytotoxicity (CC<sub>50</sub> = 136.3 ± 11.9 μM). In the susceptibility assays, pretreatment with compounds resulted in an increase in EC<sub>50</sub> (average increase of 25%), whereas axenization followed by reversion reduced EC<sub>50</sub> (average decrease of 21%), and the combination of both factors accentuated this reduction (average decrease of 49%). These results demonstrate that drug response in *Leishmania* is state-dependent and subject to hysteresis. Metronidazole–eugenol hybrids—particularly AD06—emerge as promising candidates against *Leishmania (L.) amazonensis*; however, findings obtained in axenic amastigotes are indicative of a trend and require validation in intracellular amastigotes, which remain the gold standard for the identification of new therapeutic alternatives against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, axenic amastigotes, metronidazole-eugenol hybrids, susceptibility

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Padrões de localização de <i>Leishmania</i> no trato digestório de flebotomíneos.....	15
<b>Figura 2</b> – Cladograma evolutivo dos principais subgêneros de <i>Leishmania</i> .....	16
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida heteroxeno de <i>Leishmania</i> .....	17
<b>Figura 4</b> - Promastigota de <i>Leishmania spp.</i> .....	26
<b>Figura 5</b> - Estrutura química dos compostos híbridos do eugenol e metronidazol .....	30
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da pentamidina .....	30
<b>Figura 7</b> - Amastigotas axênicos de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa PH8, em diferentes estágios de diferenciação.....	41
<b>Figura 8</b> - Amastigotas axênicos de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269, em diferentes estágios de diferenciação.....	41
<b>Figura 9</b> - Amastigotas axênicos de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , corados pelo método do panóptico rápido, evidenciando núcleo e cinetoplasto.....	42
<b>Figura 10</b> - Esquema representativo das condições e parâmetros utilizados no ensaio de susceptibilidade. ....	45
<b>Figura 11</b> – MEV de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269, pertencentes aos grupos do ensaio de susceptibilidade.....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269, em diferentes meios de cultura.....	37
<b>Gráfico 2</b> – Curva de crescimento de diferentes cepas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , em diferentes meios de cultura.....	39
<b>Gráfico 3</b> - Atividade anti- <i>Leishmania</i> de derivados eugenol-metronidazol, testados contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269. ....	42
<b>Gráfico 4</b> - Susceptibilidade de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> frente ao tratamento e a alteração na forma de vida. ....	46
<b>Gráfico 5</b> - Citotoxicidade de híbridos metronidazol-eugenol e da pentamidina em células da linhagem RAW 264.7 em 72 horas de incubação .....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais espécies de <i>Leishmania</i> por subgênero.....	15
<b>Tabela 2</b> - Valores de IS dos híbridos metronidazol-eugenol e da pentamidina contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269. ....	52

## LISTA DE SIGLAS

AA	Amastigota Axênico
AI	Amastigota Intracelular
ATP	Adenosina Trifosfato
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica de 50%
CPD	Secagem por Ponto Crítico
kDNA	DNA do Cinetoplasto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC <sub>50-AA</sub>	Concentração efetiva de 50% contra amastigotas axênicos
EC <sub>50-AI</sub>	Concentração efetiva de 50% contra amastigotas intracelulares
EC <sub>50-PRO</sub>	Concentração efetiva de 50% contra promastigotas
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IS	Índice de Seletividade
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LIT	<i>Liver Infusion-Tryptose</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NET	Rede Extracelular de Neutrófilos
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PSG	Gel Secretor de Promastigotas
SFB	Soro Fetal Bovino
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1	<i>Leishmania spp.</i> .....	14
2.2	Ciclo de Vida e Interação Patógeno-Hospedeiro.....	16
2.3	Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	19
2.4	Tratamento.....	20
2.5	Metronidazol.....	21
2.6	Eugenol.....	23
2.7	Desafios da Terapêutica .....	24
2.8	Modelos Experimentais .....	25
2.9	Metabolismo e Características Bioquímicas de <i>Leishmania</i> .....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
4.1	Objetivo Geral .....	28
4.2	Objetivos Específicos .....	28
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
5.1	Compostos .....	29
5.2	Culturas de <i>Leishmania</i> .....	31
5.3	Cultura de Macrófagos .....	31
5.4	Curva de Proliferação .....	31
5.5	Diferenciação de amastigotas axênicos .....	31
5.6	Teste anti-promastigota .....	32
5.7	Teste anti-amastigota axênico .....	32
5.8	Alteração da Susceptibilidade .....	32
5.9	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33

5.10	Avaliação da Citotoxicidade em Macrófagos.....	33
5.11	Índice de Seletividade.....	34
5.12	Análise estatística .....	34
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
6.1	Padronização de Meios de Cultura .....	35
6.2	Curva de Proliferação .....	38
6.3	Axenização .....	40
6.4	Atividade anti- <i>Leishmania</i> .....	42
6.5	Ensaio de Susceptibilidade .....	44
6.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
6.7	Ensaio de Citotoxicidade .....	50
6.8	Índice de Seletividade.....	51
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*. O parasito, que infecta células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros, é transmitido pela picada de flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (WHO, 2025). As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie do parasito e a resposta imune do hospedeiro, de modo que duas principais formas clínicas são observadas: a leishmaniose tegumentar (LT) — subdividida em cutânea, mucocutânea e cutânea difusa — e a visceral (LV), de evolução geralmente mais grave (Kaye; Scott, 2011, p. 1).

A leishmaniose está presente em mais de 90 países, de modo que a LT predomina nas Américas, com destaque para Brasil, Peru, Colômbia e Bolívia, enquanto a forma visceral é mais comum no subcontinente indiano e no leste da África (Perdomo *et al.*, 2021, p. 2). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas da doença, com uma média anual de 1 milhão de novos casos de LT e 30 mil de LV (WHO, 2025).

O ciclo da doença é heteroxeno e o parasito apresenta duas principais formas evolutivas – os promastigotas, que vivem no aparelho digestório dos flebotomíneos, e os amastigotas, intracelulares e adaptadas aos fagolisossomos das células imunes dos hospedeiros vertebrados (Burza; Croft; Boelaert, 2018, p. 2).

No Brasil, destaca-se a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, frequentemente associada a infecções crônicas e importante representante de formas clínicas atípicas, como a leishmaniose cutânea difusa, que é caracterizada por lesões nodulares, não ulceradas e persistentes com altíssima resistência ao tratamento (Ferreira *et al.*, 2024, p. 1; Martinez; Petersen, 2014, p. 3).

A quimioterapia permanece como o principal método de controle da leishmaniose desde o início do século XX, no Brasil. Antimoniais pentavalentes seguem como primeira linha terapêutica, apesar da toxicidade e das falhas terapêuticas associadas à resistência. Outras drogas incluem anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromicina (BRASIL, 2017). Contudo, essas opções ainda apresentam limitações associadas à toxicidade, custo e eficácia variável frente a parasitos resistentes. (Ponte-Sucre *et al.*, 2017, p. 3; Torres-Guerrero *et al.*, 2017, p. 11). Diante disso, a identificação de novos compostos leishmanicidas, com maior seletividade e menor toxicidade, se tornou uma das principais frentes de pesquisa na tentativa de superar as lacunas da quimioterapia atual (Passero *et al.*, 2018, p. 4).

Em tal cenário, modelos *in vitro* representam ferramentas fundamentais na triagem inicial de substâncias com potencial antiparasitário, permitindo a avaliação da atividade frente a diferentes formas evolutivas do parasito em condições controladas (Rosa *et al.*, 2021, p. 2). Sendo assim, a maioria dos estudos voltados à triagem se baseia na exposição de promastigotas aos compostos testados, em especial devido a facilidade de cultivo (Aucamp; Zuma; N'Da, 2020, p. 2; Saki; Biranvand; Arjmand, 2022, p. 2; Sarouey *et al.*, 2020, p. 1). No entanto, essa abordagem desconsidera significativas diferenças morfológicas, metabólicas e moleculares entre as duas formas de vida do parasito. Dessa maneira, ainda que a utilização de amastigotas intracelulares (AI) de macrófagos permaneça como o padrão-ouro na busca em questão, desafios intrínsecos permanecem quanto a sua aplicação, tais como uso animal, complexidade técnica, tempo de execução e sensibilidade (dos Santos; Coelho; Reimão, 2025, p. 2).

Dentre as estratégias empregadas para contornar esses desafios, distingue-se o uso de amastigotas axênicos (AA), diferenciados *in vitro* de modo a mimetizar o microambiente do fagolisossomo (Oliveira *et al.*, 2023, p. 1). Essas formas, em princípio, representam uma alternativa mais fidedigna àquelas de relevância clínica em função de apresentarem características morfológicas e metabólicas próximas às AI e estudos com sua utilização têm sido publicados desde as décadas de 70 e 80 (Oliveira *et al.*, 2024, p. 2). Todavia, apesar do volume de trabalhos com o modelo axênico, existem discrepâncias significativas quanto a representatividade funcional deste modelo, com críticas quanto a possibilidade de falsos-positivos em testes de triagem e a ausência do microambiente imunológico (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8).

A resposta de *Leishmania* a agentes quimioterápicos *in vitro* é frequentemente avaliada como uma propriedade intrínseca do parasito frente a determinado composto (Blanco *et al.*, 2021, p. 2). No entanto, esse comportamento pode ser influenciado por fatores associados ao modelo experimental, incluindo a forma de vida analisada e as condições de cultivo empregadas (De Oliveira Filho *et al.*, 2024, p. 2). Nesse contexto, diferenças fisiológicas entre promastigotas, AA e AI levantam questionamentos quanto à comparabilidade entre esses sistemas. Em particular, o uso de AA, embora amplamente difundido, ainda demanda uma avaliação mais criteriosa quanto à sua capacidade de representar de forma fidedigna o ambiente intracelular (De Oliveira Filho *et al.*, 2024, p. 2; Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 2).

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o entendimento dessa questão, avaliando a atividade da pentamidina — droga de referência — e de compostos candidatos, derivados do metronidazol e eugenol, frente a promastigotas e AA de *Leishmania (L.) amazonensis*. Em paralelo, foi avaliada a citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 para

cálculo do índice de seletividade (IS). Por fim também foi determinada a alteração da susceptibilidade do parasito aos compostos em função do pré-tratamento e da transição entre formas evolutivas *in vitro*, com foco na análise da dependência de estado e nas implicações do uso de AA como modelo experimental.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Leishmania spp.*

O gênero *Leishmania* abrange mais de 50 táxons de protozoários flagelados com ciclo heteroxeno que parasitam os fagolisossomos do sistema mononuclear fagocitário (SMF) de hospedeiros vertebrados e o trato intestinal de insetos flebotomíneos. Esses parasitos estão distribuídos por regiões tropicais e subtropicais, abrangendo as Américas (Norte, Central e Sul), a bacia do Mediterrâneo, o sudeste da Europa, o Oriente Médio, a Ásia Central e Meridional, o sudeste asiático, o subcontinente indiano e grande parte da África (Akhoundi *et al.*, 2016, p. 13). Dentre as espécies já identificadas, cerca de 30 conhecidamente infectam mamíferos e 20 são capazes de causar doença em humanos.

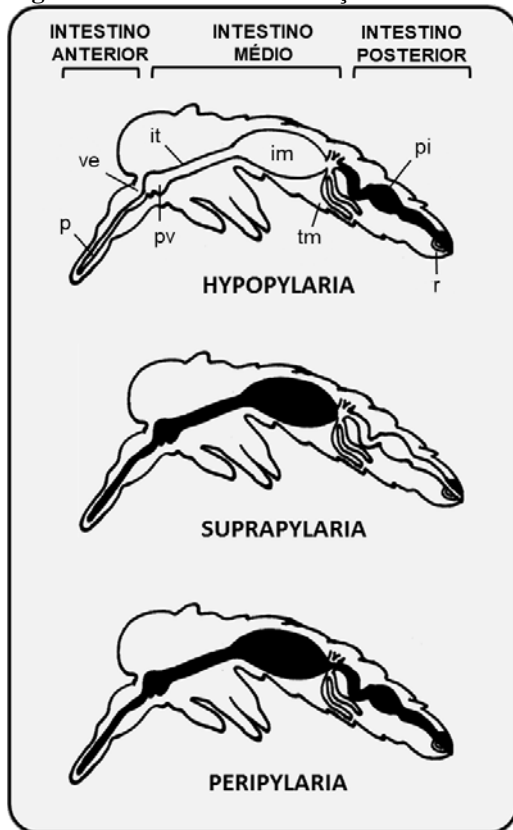
Três<sup>1</sup> principais subgêneros são reconhecidos dentro do clado, com base no local de desenvolvimento do parasito no trato intestinal dos flebotomíneos: *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* e *Leishmania (Sauroleishmania)*. Este último compreende exclusivamente espécies que infectam répteis — como sugere o elemento etimológico latino *saurus*, “lagarto” (Ramírez *et al.*, 2016, p. 2). Essa diferença influencia profundamente a transmissão e adaptação a vetores, uma vez que tal aspecto determina adaptações moleculares cruciais para a sobrevivência e migração do parasito (Kaufer *et al.*, 2017, p. 8–10). As espécies do subgênero *Sauroleishmania* colonizam preferencialmente o intestino posterior dos flebotomíneos, onde aderem a receptores específicos e enfrentam gradientes de pH, nutrientes e enzimas distintos dos encontrados no intestino médio, típico das espécies que infectam mamíferos (Sacks, 2001, p. 2–3). Em contraste, as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* estabelecem-se predominantemente no intestino médio e anterior, com a diferença que o segundo inicia o desenvolvimento nas paredes do piloro e íleo do flebotomíneo, enquanto a

---

<sup>1</sup> Um quarto subgênero já foi relatado, nomeado *Mundiania*, tendo como principal representante a espécie *Leishmania enrietti*, cujo vetor não foi identificado, mas que possui como principal suspeito o mosquito-pólvora ou maruim (Espinosa *et al.*, 2018, p. 10).

primeira não ultrapassa o intestino médio (Figura 1) (Akhoundi *et al.*, 2016, p. 18; Kaufer *et al.*, 2017, p. 8).

**Figura 1** – Padrões de localização de *Leishmania* no trato digestório de flebotomíneos.



Fonte: Adaptado de Kaufer *et al.*, 2017, p. 8. Legenda: p – probóscide; ve – válvula do estomodeu; pv – proventrículo; it – intestino médio torácico; im – intestino médio abdominal; tm – túbulos de Malpighi; pi – piloro; r – reto.

Essas diferenças exigem modificações na composição da membrana lipídica, na expressão de lectinas de superfície e na ativação de mecanismos de resistência ao estresse oxidativo, restringindo assim tanto o espectro de vetores quanto a capacidade de infectar hospedeiros não répteis (Sacks, 2001, p. 2–3). A tabela 1 apresenta as principais espécies de cada subgênero e seu padrão de vetorização.

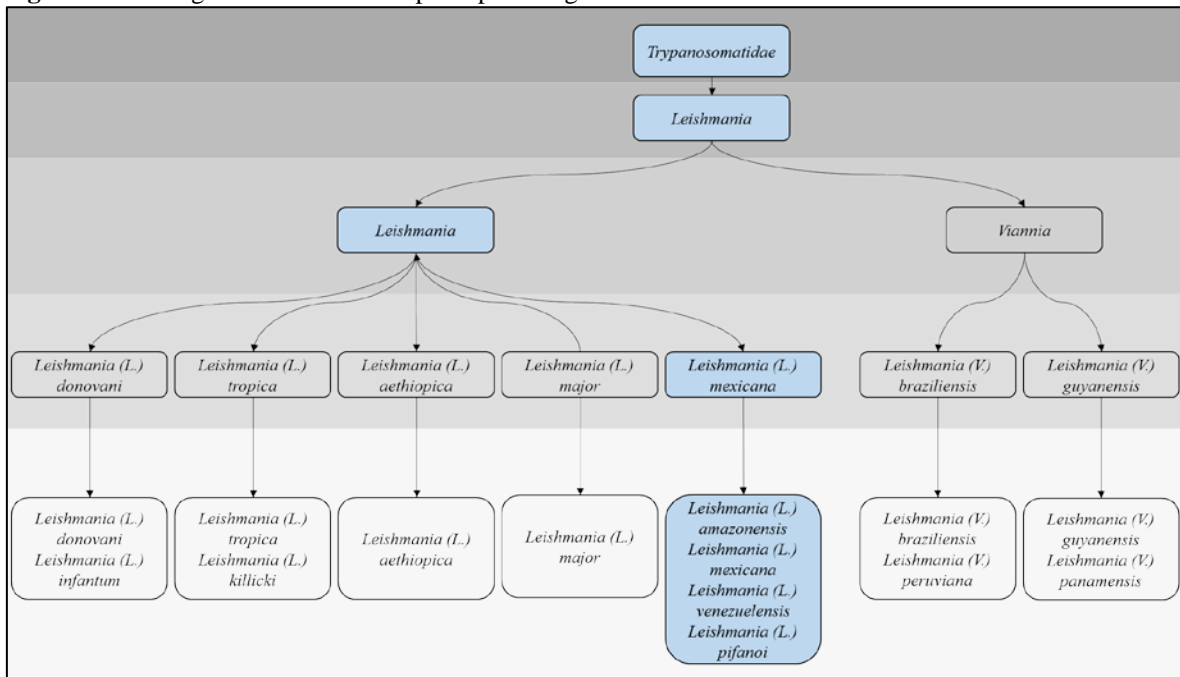
**Tabela 1** – Principais espécies de *Leishmania* por subgênero

Subgênero	Principais Espécies
<i>Leishmania (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i>
<i>Leishmania (Viannia)</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>
<i>Leishmania (Sauroleishmania)</i>	<i>L. tarentolae</i>

Fonte: Adaptado de Espinosa *et al.*, 2018, p. 4–5.

Observa-se na Tabela 1 a distribuição das espécies por subgênero e, para situar essas divisões em um contexto evolutivo e explicar as diferenças funcionais no trato digestório dos vetores, apresenta-se a seguir um dendrograma esquemático que ilustra as relações filogenéticas entre os subgêneros (Figura 2).

**Figura 2** – Cladograma evolutivo dos principais subgêneros de *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Espinosa *et al.*, 2018, p. 5.

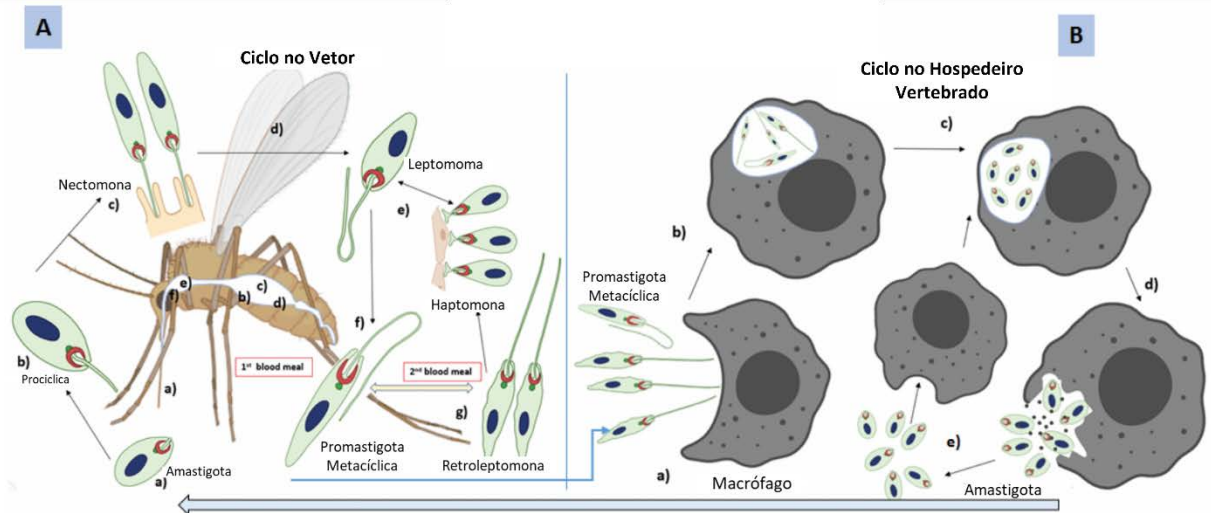
Outrossim, destaca-se por sua pertinência clínica o complexo *Leishmania (L.) mexicana*, ao qual pertence *Leishmania (L.) amazonensis*. Espécies desse grupo tendem a provocar infecções crônicas, diferente de *Leishmania (L.) major*, que acomete o Velho Mundo, o que é reflexo de diferenças na interação parasito–hospedeiro que ainda não estão plenamente esclarecidas. Essa lacuna no conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes às distintas apresentações clínicas justifica investigações comparativas direcionadas à biologia e à susceptibilidade farmacológica desses táxons (Martinez; Petersen, 2014, p. 3; McMahon-Pratt; Alexander, 2004, p. 2; Saha *et al.*, 2021, p. 5).

## 2.2 Ciclo de Vida e Interação Patógeno-Hospedeiro

O ciclo biológico de *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo alternância entre um hospedeiro invertebrado (fêmea de flebotomíneo) e um vertebrado. Apesar das diferenças entre espécies e subgêneros, duas formas morfológicas são conservadas: promastigotas no vetor e amastigotas no vertebrado (Neves, 2016, p. 43).

Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere células de um hospedeiro infectado contendo amastigotas, células pequenas, imóveis e arredondadas, medindo cerca de 3 a 5 micrometros (Figura 3A) (Giraud *et al.*, 2019, p. 2).

**Figura 3** - Ciclo de vida heteroxeno de *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Yasmin *et al.*, 2022. Nota - No vetor flebotomíneo (A): (a) amastigota; (b) promastigota prociclica; (c) nectomona; (d) leptomona; (e) haptomona; (f) promastigota metacíclicas; (g) retroleptomona. No hospedeiro vertebrado (B): (a) macrófago; (b) fagocitose das promastigotas metacíclicas; (c) diferenciação em amastigotas; (d) lise e morte do macrófago infectado; (e) infecção de nova célula sadia.

No interior do intestino do inseto, essas células se rompem e liberam os parasitos, que se diferenciam em promastigotas procíclicos, de pouca motilidade, medindo de 3 a 12 micrometros e com flagelo curto, que emerge da porção anterior do parasito. A proliferação se inicia no interior da matriz peritrófica que envolve o sangue ingerido (Tom *et al.*, 2023, p. 2). Após 48 a 72 horas, a taxa de replicação cai e as formas procíclicas escapam da matriz e se diferenciam, sequencialmente, em promastigotas nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclicas, esta que compreende a principal forma infectiva do parasito. No entanto, essa diferenciação compreende um ponto sem retorno, de modo que uma vez diferenciadas em haptomonas e posteriormente metacíclicas, os parasitos não mais se dividem e eventualmente morrem caso a infecção do hospedeiro vertebrado não ocorra. Uma vez diferenciadas, essas células, alongadas e de flagelo muito longo, colonizam a válvula do estomodeu do flebotomíneo, o que permite sua regurgitação durante o repasto sanguíneo. Ao longo de todo o processo de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, o parasito de *Leishmania* emprega uma série de mecanismos bioquímicos e biomoleculares para sobreviver e colonizar o flebotomíneo (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022, p. 3; Giraud *et al.*, 2019, p. 2; Tom *et al.*, 2023, p. 2).

Acima de tudo, a mudança de temperatura, de 36,5°C para ≈25°C, e de pH, de ≈5,0 para ≈7,5, constituem os principais moduladores da diferenciação das formas amastigotas em promastigotas. Tais fatores levam à alteração da maquinaria celular e a ativação de mecanismos de sobrevivência que serão responsáveis pela adaptação do parasito a microambientes completamente diferentes (Goyzueta-Mamani *et al.*, 2024, p. 3).

Para uma colonização bem sucedida do flebotomíneo, a primeira barreira a ser superada é o próprio sistema digestivo do inseto, o que o parasito alcança inibindo a ativação das enzimas digestivas do hospedeiro e secretando moléculas protetoras (Tom *et al.*, 2023, p. 4). Concomitante a isso, as promastigotas em estágios iniciais de diferenciação liberam enzimas proteolíticas próprias que levarão ao rompimento da matriz peritrófica e consequentemente ao escape e migração dos parasitos para o intestino médio (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022, p. 6). A partir daí, três principais componentes se destacam na persistência e manutenção do ciclo de *Leishmania*: o gel secretor de promastigotas (PSG), a proteína gp63 e o lipofosfoglicano (LPG) (Giraud *et al.*, 2019, p. 2; Kaye; Scott, 2011, p. 6). O PSG atua principalmente no flebotomíneo e criando um plugue parasitário na válvula do estomodeu, propiciando a regurgitação e alterando os hábitos alimentares do inseto, que se alimentará mais vezes e de mais hospedeiros diferentes (Tom *et al.*, 2023, p. 4). Por outro lado, a gp63 e o LPG serão de maior importância no estágio inicial da infecção do hospedeiro vertebrado, protegendo o parasito da ação do sistema imune, propiciando sua adesão a células hospedeiras e modulando sinalização dessas (Devsani; Vemula; Bhandari, 2023, p. 3).

Paralelamente, a infecção por *Leishmania* do hospedeiro vertebrado se inicia com o repasto sanguíneo por um flebotomíneo infectado, em que uma série de fatores será de importância crucial para o sucesso e persistência do parasito. Inicialmente, a regurgitação de promastigotas metacíclicas e, particularmente, da saliva do inseto, leva a ativação de inflamação no local da picada (Figura 3B) (Goyzueta-Mamani *et al.*, 2024, p. 3). Associado a isso, o dano mecânico, quimiocinas e interleucina 8 (IL-8) liberadas pelas células locais levam ao recrutamento quase imediato de leucócitos para o foco da infecção, sendo esses majoritariamente neutrófilos (Silva-Moreira *et al.*, 2025, p. 4). Concomitantemente, a espessa camada de LPG atuará protegendo o parasito de componentes inatos da resposta imune, como o sistema complemento e redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (Kaye; Scott, 2011, p. 3).

Assim, uma vez que as principais células hospedeiras para *Leishmania* são aquelas do SMF, em especial macrófagos, é de suma importância que o parasito seja capaz de estabelecer residência nessas sem que ocorra nelas a ativação do sistema antimicrobiano inato. Para tanto, os neutrófilos pioneiros do local da picada exercem então papel fundamental para a

sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (Silva-Moreira *et al.*, 2025, p. 4). Nesse sentido, após a fagocitose das formas promastigotas pelos neutrófilos, a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), a temperatura corporal e o baixo pH dos fagolisossomos leva a ativação de fatores de sinalização e transcrição para a diferenciação na forma amastigota. Associado a isso, o parasito modula a atividade da célula hospedeira, dentre outros meios, pela ativação e extrusão de NETs e aceleração ou retardo do apoptose, o que leva a morte do fagócito e persistência das amastigotas (Silva-Moreira *et al.*, 2025, p. 5; Yasmin *et al.*, 2022, p. 6). Com isso, o neutrófilo passa então a se comportar como um Cavalo de Tróia, de modo que macrófagos, ao fagocitar os restos celulares da célula apoptótica, internaliza também as amastigotas de *Leishmania*, porém sem a ativação de vias mediadas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Kaye; Scott, 2011, p. 2). A consequência disso é que diversos mecanismos imunes do fagócito mononuclear não serão empregados, como o *burst* oxidativo, secreção de citocinas pró-inflamatórias, interferons e apresentação de antígenos, levando ao estabelecimento “permanente” das amastigotas no interior da célula. Não obstante, o parasito e seus fatores de virulência atuam modulando ainda mais a atividade dos macrófagos. Isso ocorre pela alteração de seu comportamento endo-fagocítico, do estímulo da produção de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10, e promoção de sua polarização para o tipo M2, classicamente associado ao reparo tecidual e não à atividade antimicrobiana (Kaye; Scott, 2011, p. 3; Yasmin *et al.*, 2022, p. 11).

Tais mecanismos de evasão e manipulação imunológica explicam em grande parte a persistência do parasito no hospedeiro vertebrado. Em se tratando do complexo *Leishmania (L.) mexicana* e, mais especificamente do táxon *Leishmania (L.) amazonensis*, destaca-se a capacidade singular de modular a via de sinalização MAPK de macrófagos infectados. Isso ocorre por meio da ativação das proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), que conecta grande parte dos sinais extracelulares a respostas intracelulares, promovendo a infecção crônica e refratária ao tratamento (CDC, 2024; Martinez; Petersen, 2014, p. 3)

### **2.3 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar**

Segundo a OMS, a infecção por protozoários do gênero *Leishmania* é caracterizada pelo parasitismo de células do SMF, apresentando-se clinicamente em duas grandes formas: LT e LV. A LT subdivide-se em três apresentações: cutânea (LC), cutâneo-difusa (LCD) e mucocutânea (LM) (WHO, 2025).

A LC manifesta-se tipicamente por lesões ulceradas no local da picada do flebotomíneo, podendo ser única ou múltipla, geralmente com base granulomatosa, bordas infiltradas e apresenta tendência à cura espontânea (BRASIL, 2017, p. 42). A LCD, mais rara e de maior gravidade, decorre da disseminação hematogênica ou linfática do parasito e é caracterizada por múltiplas lesões disseminadas, frequentemente não ulcerativas, associadas a uma falha da resposta imune celular contra antígenos de *Leishmania*, do tipo Th2. Essa forma clínica apresenta elevada refratariedade terapêutica e evolução crônica (Kaye; Scott, 2011, p. 1; Torres-Guerrero *et al.*, 2017, p. 8–9). Já a LM acomete principalmente mucosas da face e regiões oro-respiratórias, podendo surgir meses ou anos após a infecção cutânea inicial, fortemente ligada a uma resposta Th1 exacerbada. Trata-se de uma forma altamente mutilante, que demanda tratamento prolongado e agressivo (Muraille; Leo; Moser, 2014, p. 8; Scorza; Carvalho; Wilson, 2017, p. 3).

No Brasil, as espécies mais frequentemente associadas às formas tegumentares são *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, responsáveis por uma elevada carga anual de casos, que chegam a aproximadamente 30 mil, sendo a primeira associada a possibilidade de desenvolvimento de LM e a segunda de LCD (BRASIL, 2024, p. 432; Torres-Guerrero *et al.*, 2017, p. 9).

## 2.4 Tratamento

A LCD e LM compõem as formas clínicas mais relevantes da LT, seja pela falha de cura espontânea ou gravidade associada. O tratamento tem como propósito acelerar a resolução das lesões, reduzir a formação de cicatrizes e evitar recaídas. Para isso, a estratégia consiste em eliminar a maior parte dos parasitos por meio de quimioterapia, permitindo que os mecanismos imunológicos do hospedeiro complementem a resposta e controlem a infecção residual (DNDi, 2018)

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda os antimoniais pentavalentes como primeira escolha terapêutica, com exceção de gestantes e pacientes soropositivos para HIV. Nos casos de falha ou intolerância ao tratamento, são indicadas drogas alternativas, como a anfotericina B, miltefosina ou o isetionato de pentamidina, este particularmente indicada para os casos de LCD, classificada como forma clínica grave (BRASIL, 2024, p. 436). A administração de tais drogas, com exceção da miltefosina, é feita por via intramuscular e/ou intravenosa, abordagens notadamente invasivas.

Atualmente, existem duas formulações principais de antimoniais pentavalentes: o antimonato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Contudo, apenas o primeiro é disponibilizado no país. O esquema terapêutico segue a padronização da OMS, que preconiza a administração da dose em função do peso corporal, sendo calculada em miligramas de antimônio pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) por quilograma de peso ao dia (BRASIL, 2017, p. 73)

Os antimoniais pentavalentes são classificados como pró-fármacos, isto é, requerem a redução do antimonial pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) a antimonial trivalente ( $Sb^{+3}$ ) por ação de enzimas do parasito (Pramanik *et al.*, 2019, p. 3). Altas concentrações dos antimoniais trivalentes atuam inibindo o catabolismo da glicose e a oxidação dos ácidos graxos, prejudicando a síntese de ATP. Atua também na mitocôndria do parasito, levando simultaneamente à formação de EROs e ao efluxo e inibição de componentes de seu sistema antioxidante, mais especificamente tióis, como a tripanotona (Aït-Oudhia *et al.*, 2011, p. 2; Goto; Lindoso, 2010).

Por outro lado, a pentamidina ainda não teve seu mecanismo de ação totalmente elucidado. Evidências apontam que a droga interage com o balanço de cálcio mitocondrial e com o DNA do cinetoplasto (kDNA), em regiões ricas em adenina e timina, ambos fatores levando a desorganização estrutural da organela (Fidalgo; Gille, 2011, p. 8). Estudos também mostraram que a pentamidina interfere no ciclo biológico de *Leishmania (L.) amazonensis*, atrasando a diferenciação de formas amastigotas em promastigotas (Piccica *et al.*, 2021, p. 8; Pramanik *et al.*, 2019, p. 4). Outrossim, a droga induz alterações profundas na morfologia mitocondrial, levando a perda do potencial de membrana e inibindo a síntese de poliaminas, ambos essenciais para a sobrevivência do parasito (Chakravarty; Sundar, 2010, p. 9)

No contexto da resistência, e em especial para o complexo *Leishmania (L.) mexicana* e comum aos antimoniais pentavalentes e a pentamidina, é a redução de sua acumulação mitocondrial em parasitos resistentes, com aumento do efluxo das drogas para fora da célula. (Basselin *et al.*, 2002, p. 7; Chakravarty; Sundar, 2010, p. 9; Uliana; Trinconi; Coelho, 2018, p. 6)

Estratégias experimentais como a seleção *in vitro* de parasitos resistentes, mediante exposição progressiva a concentrações crescentes da droga, têm sido fundamentais para desvendar esses mecanismos.

## 2.5 Metronidazol

O metronidazol é um derivado nitroimidazólico que é amplamente utilizado contra protozoários anaeróbios e bactérias microaerófilas, como *Trichomonas vaginalis*, *Giardia*

*lamblia*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium spp.*, entre outros (De Souza *et al.*, 2023, p. 2; Sun *et al.*, 2024, p. 2). Seu mecanismo clássico de ação envolve a redução do grupo nitro por enzimas nitroredutases, resultando na formação de radicais nitro-reativos que causam danos ao DNA, a oxidação de proteínas e desorganização de membranas (Alauzet; Lozniewski; Marchandin, 2019, p. 2–3). Essa ativação depende de ambientes redutores com baixa pressão de oxigênio, motivo pelo qual o fármaco é utilizado quase estritamente em organismos com metabolismo anaeróbico ou microaerófilo. No contexto de *Leishmania*, cuja fisiologia intracelular combina condições de estresse oxidativo com zonas localmente hipóxicas (como o interior do fagolisossomo), essa característica bioquímica o torna um candidato plausível para exploração terapêutica (Somaratne *et al.*, 2019, p. 10).

Apesar de não ser uma droga de uso convencional no tratamento da leishmaniose, diversos estudos experimentais têm demonstrado potencial do metronidazol e de seus derivados frente a espécies do gênero *Leishmania*. Suspeita-se que o composto atue interferindo diretamente no metabolismo mitocondrial do parasito, promovendo a geração de ERNs e levando à despolarização da membrana mitocondrial (Upadhyay *et al.*, 2019, p. 1).

Do ponto de vista farmacológico, o metronidazol apresenta vantagens logísticas — baixo custo, ampla disponibilidade e perfil de segurança bem estabelecido —, mas sua eficácia isolada contra *Leishmania* é inconsistente. Ensaio clínico em leishmaniose cutânea relatam taxas de cura entre 40% e 60%, inferiores às obtidas com antimoniais, embora indiquem resposta parcial em infecções refratárias (*L. major*, *L. donovani*) (Somaratne *et al.*, 2019, p. 2; Ullah; Saleem; Ali, 2022, p. 1). A limitação parece residir na necessidade de ativação redutiva intracelular: a eficiência do fármaco depende da presença de nitroredutases específicas e do potencial redox do microambiente. Um dos principais obstáculos associados a essa dependência é o fato de o parasito residir em um ambiente de difícil acesso aos fármacos, que devem atravessar as membranas dos macrófagos, seus fagolisossomos e por fim, a própria membrana do parasito, com bruscas alterações de pH ao longo do percurso (Frézard *et al.*, 2022, p. 2; Zilberstein, 2021, p. 2).

Para tanto, o metronidazol tem recebido destaque principalmente como plataforma para o desenvolvimento de compostos híbridos, nos quais a porção nitroimidazólica atua como unidade geradora de espécies reativas e a molécula acoplada modula seletividade ou permeabilidade (Gonçalves-Santos *et al.*, 2023, p. 2). Essa estratégia busca potencializar sua bioatividade contra formas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, explorando sinergia entre dano redox e disfunção mitocondrial. Consequentemente, mais do que um agente leishmanicida isolado, o metronidazol representa um “braço” farmacofórico versátil, cujo

aproveitamento racional pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos seletivos e menos tóxicos, particularmente quando combinados a outros componentes com ação antimicrobiana.

## 2.6 Eugenol

O eugenol, por sua vez, é um fenilpropanoide presente em óleos essenciais, como o do cravo, e que apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, com estudos acerca de sua ação antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (Marchese *et al.*, 2017, p. 1). Seus mecanismos biológicos de ação envolvem principalmente a ruptura de membranas celulares, a indução de estresse oxidativo e a inibição de enzimas essenciais de patógenos.

Em fungos e bactérias, o composto fenólico se intercala na bicamada lipídica da membrana plasmática, levando a desestruturação e ao aumento da permeabilidade, o que por sua vez leva ao desbalanço eletrolítico e osmótico, levando a lise e morte microbiana (Nisar *et al.*, 2021, p. 5). Além disso, inibe enzimas-chave do microrganismo, como proteases e outras hidrolases, comprometendo vias metabólicas vitais e a virulência do agente infeccioso (Jeyakumar; Lawrence, 2021, p. 4). O eugenol também pode desencadear estresse oxidativo no patógeno: em *Leishmania*, por exemplo, observa-se geração de ERO e danos oxidativos associados à perda do potencial de membrana mitocondrial, culminando em morte celular por mecanismos análogos à apoptose (Islamuddin; Sahal; Afrin, 2014, p. 1). Nesse sentido, a substância desponta como potencial agente leishmanicida. Estudos *in vitro* demonstram atividade significativa contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, com concentrações inibitórias medianas na faixa de microgramas por mililitro e elevado índice de seletividade frente a células hospedeiras (Hughes *et al.*, 2023, p. 1). Adicionalmente, ensaios pré-clínicos indicam possível aplicabilidade terapêutica do eugenol: formulações à base dessa molécula mostraram redução da carga parasitária em modelos experimentais e modulação imunológica favorável no hospedeiro, estimulando citocinas do perfil Th1 (como interferon-gama e IL-12) e suprimindo citocinas Th2 (Hughes *et al.*, 2023, p. 4; Mohamadi *et al.*, 2025, p. 1). Em conjunto, essas evidências respaldam a relevância do eugenol como um agente leishmanicida promissor, justificando futuras investigações sobre seu uso terapêutico na leishmaniose.

## 2.7 Desafios da Terapêutica

Embora a LT seja uma doença tratável, com significativo potencial de cura, a resposta terapêutica depende fortemente da competência imunológica do hospedeiro (Martinez; Petersen, 2014, p. 3; Yasmin *et al.*, 2022, p. 4). Na prática, o manejo clínico permanece desafiador, em razão da significativa toxicidade dos fármacos associados, sua difícil via de administração e o uso prolongado e muitas vezes inadequado desses, fator que tem favorecido o surgimento de parasitos resistentes. Soma-se a isso a toxicidade significativa e os efeitos colaterais associados aos fármacos disponíveis, que limitam sua utilização em diferentes grupos de pacientes. Ademais, determinados grupos populacionais apresentam risco elevado para evolução clínica grave da leishmaniose, como imunossuprimidos (particularmente portadores de HIV/AIDS), crianças, idosos e gestantes (Saha *et al.*, 2021, p. 1–2; Uliana; Trinconi; Coelho, 2018, p. 4–5). Nesses casos, o tratamento torna-se mais complexo, seja pela resposta imunológica debilitada ou a toxicidade e as reações adversas das drogas disponíveis, que limitam sua utilização e demandam ajustes rigorosos de dose. Em pacientes coinfectados por HIV, por exemplo, a taxa de recidiva é significativamente maior e a mortalidade mais elevada, refletindo a dificuldade de alcançar uma cura definitiva (Ferreira *et al.*, 2024; Ponte-Sucre *et al.*, 2017, p. 8). Portanto, a necessidade de terapias mais seguras e eficazes se faz especialmente urgente nesses grupos vulneráveis, onde as opções atuais são insuficientes para garantir controle clínico adequado.

Ademais, a variabilidade clínica — isto é, a capacidade de uma mesma espécie de *Leishmania* gerar manifestações clínicas tão distintas (LC, LCD) — dificulta a padronização terapêutica e exige abordagens individualizadas. Soma-se a esses fatores a heterogeneidade genética tanto dos parasitos quanto dos hospedeiros e vetores, que gera diferenças de resposta aos fármacos, seletividade e resistência (Ponte-Sucre *et al.*, 2017, p. 4).

Destarte, cresce o interesse por alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes, com destaque para a investigação de compostos naturais, híbridos, terapias combinadas, bem como de novas moléculas sintéticas com ação antiparasitária (Passero *et al.*, 2018, p. 2). Assim, essa “febre-do-ouro” na busca por alternativas à quimioterapia atual se faz presente como principal esforço global no combate da leishmaniose, o que demanda, crucialmente, de uma base de pesquisa eficaz e organizada.

## 2.8 Modelos Experimentais

Na atual conjuntura da busca por novas drogas contra *Leishmania*, diferentes modelos experimentais são adotados para a triagem de compostos terapêuticos, comumente balanceando simplicidade, relevância biológica e viabilidade experimental. Nesse sentido, o modelo mais acessível e usado com frequência é o ensaio com cultura de promastigotas, de fácil manutenção, crescimento rápido e baixo custo operacional. Entretanto, a forma de vida corresponde ao estágio no vetor, livre às pressões metabólicas e imunológicas do hospedeiro vertebrado, com metabolismo expressivamente diferente — o que pode ocasionar resultados que não se traduzem para a infecção real (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 2).

Para superar essa limitação, o modelo de amastigotas intracelulares, cultivadas dentro de macrófagos, é considerado o padrão-ouro em avaliação de fármacos anti-leishmania (Sifontes-Rodríguez *et al.*, 2023, p. 2). Nesse sistema, compostos precisam atravessar a barreira celular do hospedeiro, alcançar o fagolisossomo e superar mecanismos de evasão do parasito. Apesar dessa maior precisão, o ensaio intracelular também sofre de limitações práticas: exige infraestrutura celular, pode haver variações entre lotes celulares ou animais, menor reprodutibilidade e menor *throughput*<sup>2</sup> para testar grandes bibliotecas de compostos. Trata-se de um modelo laborioso, dependente de grande quantidade de variáveis e sujeito a erros analíticos no modelo convencional de contagem de células sob microscopia óptica (Gopu *et al.*, 2023, p. 3; Zulfiqar; Avery, 2022, p. 2).

Intermediando essas duas abordagens, há o modelo de AA, que consiste em promover a diferenciação *in vitro* de promastigotas para formas amastigotas, simulando parte do ambiente intracelular (do hospedeiro vertebrado) sem depender de macrófagos infectados (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 2). O uso de AA permite ensaios com maior *throughput* e custos reduzidos, o que representa uma vantagem em etapas de triagem. Contudo, o modelo apresenta críticas conhecidas: a ausência direta de sinais imunes, diferenças metabólicas e de expressão proteica entre formas axênicas e intracelulares, alterações de virulência com passagens sucessivas e risco de resultados falsamente positivos (De Rycker *et al.*, 2013, p. 7; Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 7; Uliana; Trinconi; Coelho, 2018; Vermeersch *et al.*, 2009, p. 4).

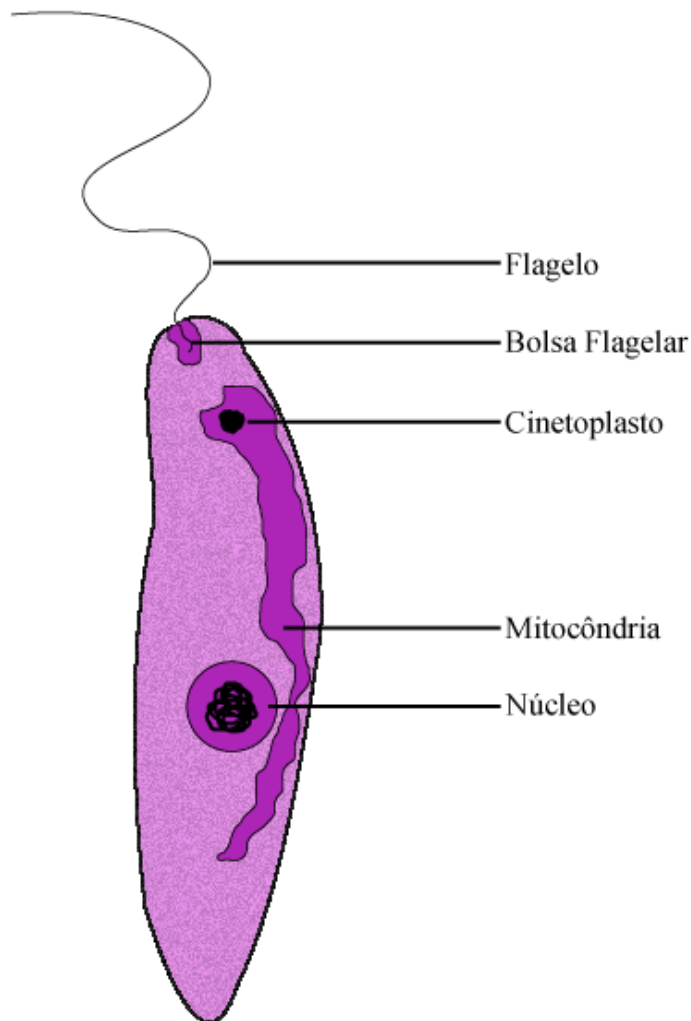
---

<sup>2</sup> Rendimento, volume, quantidade de resultados.

## 2.9 Metabolismo e Características Bioquímicas de *Leishmania*

O metabolismo do parasito apresenta peculiaridades que o distinguem fortemente de células de mamíferos, sendo essas diferenças os principais no contexto da quimioterapia. Um aspecto central é a presença de uma única mitocôndria tubular, que abriga o cinetoplasto — uma rede compacta de DNA mitocondrial (kDNA), essencial para manutenção do parasito e alvo de drogas como a pentamidina (Figura 4) (Michieletto, 2025, p. 2).

**Figura 4** - Promastigota de *Leishmania* spp.



Fonte: Do autor (2025).

Nas formas promastigotas, a principal fonte de energia é a glicose, metabolizada via glicólise em compartimentos especializados denominados glicossomos. Entretanto, em amastigotas, há uma reprogramação metabólica marcada: a reduzida disponibilidade de carboidratos no ambiente intracelular leva ao maior aproveitamento de aminoácidos, ácidos graxos e outros metabólitos como fonte energética, sendo a  $\beta$ -oxidação e o ciclo do ácido

tricarboxílico (TCA) cruciais para a sobrevivência no interior do fagolisossomo (Leroux *et al.*, 2023, p. 6; McConville *et al.*, 2015, p. 4).

Outro eixo metabólico de grande importância no parasito é o metabolismo de poliaminas — compostos como putrescina, espermidina e espermina — que regulam proliferação celular, síntese de ácidos nucleicos e resistência ao estresse oxidativo. Enzimas envolvidas em tais vias, como a ornitina descarboxilase, desmetilases de S-adenosilmetionina e espermidina sintetase têm sido propostas como alvos terapêuticos promissores, dado seu papel fundamental na sobrevivência de *Leishmania* (Carter *et al.*, 2022, p. 3–4). A síntese dessas moléculas se inicia, em especial, com a conversão de aminoácidos, como a arginina, da célula hospedeira pela ação da arginase, enzima presente tanto no macrófago infectado como no tripanosomatídeo, constituindo nesse sentido, um dos principais fatores de virulência de *Leishmania* (Carter *et al.*, 2022, p. 4; McConville *et al.*, 2015, p. 5).

Em síntese, o metabolismo de *Leishmania* é marcado por elevada plasticidade, permitindo que o parasito ajuste suas rotas energéticas de acordo com a forma evolutiva e o ambiente em que se encontra (Muxel *et al.*, 2019, p. 11). Essa flexibilidade, embora essencial para a sobrevivência, também influencia sua resposta diferencial a compostos leishmanicidas. Isso torna a avaliação de vias metabólicas de grande valia nos estudos de bioquímica comparada, principalmente entre hospedeiros e parasitos (Jain *et al.*, 2022, p. 2). Esta compreensão permite, por exemplo, o aperfeiçoamento de meios de cultura e a melhora na qualidade de ensaios e pesquisas.

### 3 JUSTIFICATIVA

A infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* possui elevada relevância médica por sua associação a casos crônicos e refratários, somando-se ao fato de a leishmaniose integrar o grupo das doenças negligenciadas (Ferreira *et al.*, 2024, p. 2). Tal cenário expõe as limitações do atual arsenal terapêutico, restrito a poucos fármacos de alta toxicidade (Burza; Croft; Boelaert, 2018, p. 2; Saha *et al.*, 2021, p. 1). Nesse cenário, modelos *in vitro* são fundamentais para triagem de compostos. Entretanto, cada forma evolutiva apresenta limitações: promastigotas são de fácil manejo, mas refletem pouco a forma de relevância clínica; AI reproduzem melhor a infecção, porém seu uso é laborioso, caro, apresenta alta variabilidade experimental e frequentemente depende do uso de vidas animais. Dessa forma, AA surgem como uma alternativa intermediária: mantém características morfológicas e fisiológicas das AI, mas com maior reprodutibilidade, menor custo e maior rendimento experimental, permitindo triagem comparativa entre as formas de vida. (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 2; Michels; Ginger; Zilberstein, 2020, p. 39–41; Passero *et al.*, 2018, p. 2; Zilberstein; Nitzan Koren, 2019, p. 1). Paralelamente, a hibridização química de moléculas conhecidas, como análogos de metronidazol e eugenol, tem gerado compostos com elevada potência e seletividade frente a tripanossomatídeos (Pelozo *et al.*, 2024, p. 2). Isso estabelece um racional sólido na busca por novos agentes leishmanicidas mais eficazes e seguros e no prospecto da comparação da atividade entre diferentes formas de vida e no potencial de originar alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras frente à leishmaniose.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade da pentamidina e de compostos híbridos derivados de eugenol e metronidazol frente a diferentes formas evolutivas de *Leishmania (L.) amazonensis*, com ênfase na análise crítica da pertinência do uso de AA como modelo experimental.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- a) Padronizar as condições de cultivo das cepas M2269 e PH8 de *Leishmania (L.) amazonensis* nos meios LIT e 199.
- b) Determinar a curva de proliferação das cepas M2269 e PH8 de *Leishmania (L.) amazonensis* nos meios LIT e 199

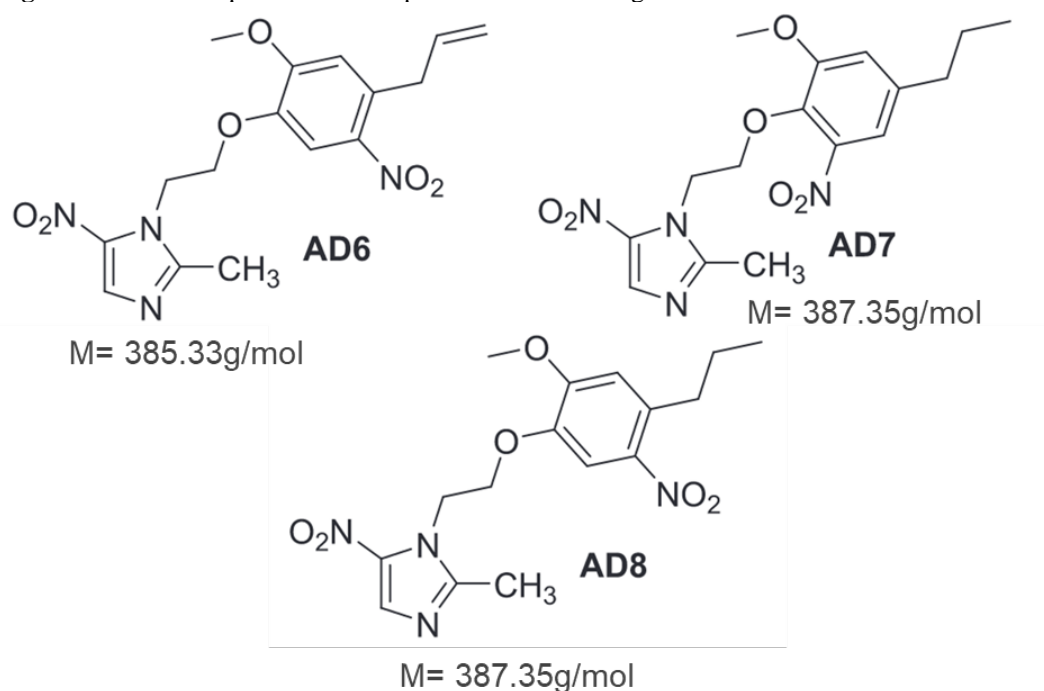
- c) Padronizar o processo de axenização e cultivo de AA das cepas M2269 e PH8 de *Leishmania (L.) amazonensis* em meio 199.
- d) Determinar a atividade leishmanicida *in vitro* de compostos híbridos derivados do eugenol e metronidazol e da pentamidina em diferentes formas de vida do parasito, de forma a obter a concentração efetiva de 50% para cada uma (EC<sub>50</sub>-promastigota; EC<sub>50</sub>-AA)
- e) Avaliar a alteração da susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* a compostos híbridos derivados do eugenol e do metronidazol e da pentamidina em função do pré-tratamento e da transição entre formas evolutivas *in vitro* (promastigotas ↔ AA).
- f) Caracterizar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as alterações morfológicas de *Leishmania (L.) amazonensis* associadas ao pré-tratamento e à transição entre formas promastigotas e AA.
- g) Avaliar a citotoxicidade pelo valor da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) em macrófagos tratados com os compostos híbridos derivados do eugenol e metronidazol e a pentamidina;
- h) Determinar o Índice de Seletividade (IS) dos compostos utilizados.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Compostos

Os compostos testados neste trabalho, híbridos do metronidazol e eugenol (AD06, AD07, AD08), foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. A síntese foi feita a partir do acoplamento direto por eterificação entre as subunidades do metronidazol e eugenol, sendo os produtos fornecidos para a realização dos testes.

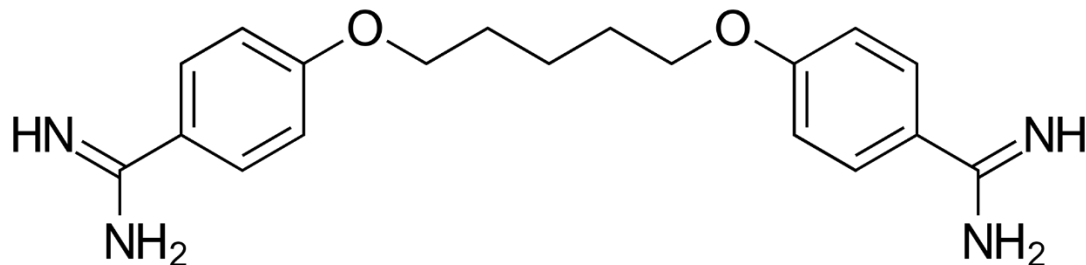
**Figura 5** - Estrutura química dos compostos híbridos do eugenol e metronidazol



Fonte: Pelozo *et al.*, 2024

A pentamidina, nomenclatura IUPAC: 4-[5-(4-carbamimidofenoxi) pentoxi] benzenocarboximidamida, fórmula molecular:  $C_{19}H_{24}N_4O_2$  (Figura 6), foi empregada como droga de referência nos ensaios desta pesquisa. Sua utilização deve-se ao fato de ser uma das principais opções terapêuticas no tratamento da LC, com eficácia comprovada, porém limitada por efeitos tóxicos. Piccica *et al.* (2021) destacam sua eficácia contra várias espécies de *Leishmania*, inclusive *Leishmania (L.) amazonensis*, o que justifica sua escolha como padrão comparativo nos experimentos de atividade leishmanicida.

**Figura 6** - Estrutura química da pentamidina



Fonte: Software ACD/ChemSketch.

## 5.2 Culturas de *Leishmania*

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269 e IFLA/BR/1967/PH8) foram cultivados em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) pH 7.4 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco), 0.1% de hemina bovina e 4% de urina masculina humana estéril. As culturas foram mantidas a 26°C em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e 4mL de meio de cultura. Passagens foram feitas regularmente a cada 7 dias. Nenhuma cultura com mais de 10 passagens foi utilizada nos experimentos. Para AA foi utilizado o meio 199, em pH 7.2 e 4.8, suplementado com 15% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina, 10mM de adenina, 0.1% de hemina bovina e 4% de urina masculina humana estéril. (VICTOR *et al.*, 2025).

## 5.3 Cultura de Macrófagos

A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC: TIB-71) foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 24mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor (Sigma Aldrich Co., St Louis, EUA), HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Van den Bogaart *et al.*, 2017, p. 2).

## 5.4 Curva de Proliferação

A curva de proliferação foi feita a partir de um inóculo inicial de 10<sup>6</sup> céls/mL de culturas de 3 dias em uma placa de 24 poços. O número de células foi contado diariamente a partir de poços diferentes, utilizando uma câmara de Neubauer, até o 14<sup>o</sup> dia em todos os meios de cultura (De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020, p. 4).

## 5.5 Diferenciação de amastigotas axênicos

Promastigotas em fase estacionária de crescimento (7 dias) em meio 199 pH 7.2 tiveram metade do volume das culturas substituído por fração igual de meio 199 pH 4.8 e incubadas *overnight* a 26°C. Após incubação, 80% do volume foi substituído por meio 199 pH 4.8 e as culturas foram então incubadas a 32.8°C. Quatro dias após a incubação, os AA foram lavados

em PBS (3000 rpm e 4°C) e contados em uma câmara de Neubauer para confirmação da morfologia característica (Miguel *et al.*, 2013, p. 2).

### 5.6 Teste anti-promastigota

A fim de determinar a concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo esperado (EC<sub>50</sub>) dos compostos avaliados, promastigotas em fase *log* de crescimento foram lavados em PBS (3000 rpm e 4°C), ressuspensos em 4mL de meio LIT e contados em uma câmara de Neubauer. Células foram então tratadas ( $1 \times 10^6$  céls/poço) em uma placa de 96 poços com compostos em diferentes concentrações (100 a 0,7 µg/mL), solubilizados em DMSO estéril e incubadas por 72h a 26°C. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina. Após a incubação, 20µL de resazurina na concentração de 3mM foi adicionado aos poços e a placa foi incubada novamente por 5 horas. Em seguida, a absorbância foi quantificada a 570 e 600 nm, em um espectrofotômetro (Alves *et al.*, 2024, p. 3)

### 5.7 Teste anti-amastigota axênico

AAs de *Leishmania (L.) amazonensis* ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubados com concentrações decrescentes dos compostos testados (100 a 0,7 µg/mL), solubilizados em DMSO estéril, em placas de 96 poços. Após 72 h de incubação, foram adicionados 20 µL de solução de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT); Sigma-Aldrich) a 5 mg/mL em cada poço, seguida de incubação por 4 h. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm a 4° C, o meio de cultura foi removido e as células lisadas com DMSO, com posterior incubação a 37° C ao abrigo da luz para solubilização dos cristais de formazan. A formação do produto da redução do MTT foi quantificada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 570nm (De Oliveira Filho *et al.*, 2024a, p. 8).

### 5.8 Alteração da Susceptibilidade

Para investigar a alteração da susceptibilidade, promastigotas em fase *log* de crescimento foram inicialmente submetidas ou não (controle) a tratamento com o EC<sub>50-PRO</sub> dos compostos, sendo incubadas por 72 h a 26°C, de modo a estabelecer um histórico de exposição. Após esse período, as células foram lavadas em PBS (3000 rpm, 4°C) e redistribuídas em condições que permitiram a definição de dois fatores experimentais: pré-tratamento (presente

ou ausente) e axenização (presente ou ausente). Dessa forma, foram obtidos quatro grupos: controle duplo negativo, pré-tratado, axenizado e pré-tratado + axenizado.

Após o período inicial, todas as células foram lavadas e transferidas para meio 199 pH 7,2. A partir desse ponto, os grupos destinados à axenização foram submetidos à diferenciação por meio da transferência para meio 199 acidificado, sendo mantidos por 7 dias a 32,8°C, enquanto os demais permaneceram em meio neutro a 26°C. Após esse período, os grupos axenizados foram novamente transferidos para meio 199 pH 7,2 para reconversão em promastigotas. Em seguida, todas as células foram lavadas e retornadas ao meio LIT e os parasitos foram novamente expostos ao EC<sub>50-PRO</sub> dos compostos, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina.

## 5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a caracterização morfológica, os grupos experimentais obtidos no ensaio de alteração da susceptibilidade (controle, pré-tratado, axenizado e pré-tratado + axenizado) foram processados para MEV. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato por 4 h a 4 °C, lavadas em tampão fresco e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 1 h. Em seguida, 10<sup>5</sup> céls foram adicionadas sobre lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, a fim de garantir a adesão dos parasitos a superfície do vidro. As amostras foram então submetidas à desidratação em série crescente de etanol (10–100%) e ao processo de secagem por ponto crítico de CO<sub>2</sub> (CPD). Posteriormente, os espécimes foram montados em suportes metálicos (*stubs*) com fita de carbono condutiva e recobertos com uma camada de ouro (~15 nm) por *sputtering*. As análises foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN MIRA4 – FEG) operando em 10 kV, em modo de alto vácuo e utilizando um detector *Through-the-Lens* de Elétrons Secundários e um detector *Everhart-Thornley* de Elétrons Secundários. Foram adquiridas imagens em igual ampliação, com campo de 20 µm de características morfológicas gerais (forma celular, comprimento flagelar, integridade da membrana plasmática) e na identificação de alterações estruturais.

## 5.10 Avaliação da Citotoxicidade em Macrófagos

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT utilizando a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 para a determinação do CC<sub>50</sub>. A metodologia foi adaptada a partir de (Koutsoni; Karampetsou; Dotsika, 2019, p. 9). As células foram cultivadas até atingirem 90%

de confluência, em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e semeadas em placa de 24 poços na razão de 5 x 10<sup>5</sup> por poço e incubadas por 24h para adesão das células. No dia seguinte foram adicionados os compostos a serem avaliados em diferentes concentrações (100 a 1µg/mL) e incubados por 72 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL de MTT a cada poço, com nova incubação por 4 horas. As células foram então lisadas com DMSO, com nova incubação de 30min, a 37° C ao abrigo da luz para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi quantificada a 570 nm para determinação do CC<sub>50</sub> por comparação ao controle sem adição de compostos.

### 5.11 Índice de Seletividade

O IS é uma razão estabelecida entre os valores de CC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> de uma substância, representado pela equação 1 (Perdomo *et al.*, 2021, p. 4).

Equação (1):

$$IS = \frac{CC_{50}}{EC_{50}}$$

### 5.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando regressão não linear para obter os valores de EC<sub>50-PRO</sub>, EC<sub>50-AA</sub> e CC<sub>50</sub> seguida pelos testes de Tukey e análises de variância. As diferenças nos valores de EC<sub>50-PRO</sub>, EC<sub>50-AA</sub> e CC<sub>50</sub> entre o fármaco padrão e os compostos foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi inferior a 0,05. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por novos compostos leishmanicidas tem como objetivo identificar moléculas com maior seletividade ao parasito e menor toxicidade ao hospedeiro. Frente a esse cenário, derivados híbridos de eugenol e metronidazol foram avaliados frente a diferentes formas evolutivas de *Leishmania (L.) amazonensis*, com destaque para o modelo de AA. Além de explorar a eficácia desses compostos, este estudo buscou compreender a pertinência do modelo axênico na triagem in vitro, bem como a influência da transição entre as formas de vida e do pré-tratamento na susceptibilidade do parasito.

## 6.1 Padronização de Meios de Cultura

A composição do meio de cultivo exerce influência direta sobre a taxa de crescimento, a estabilidade das culturas e a diferenciação das formas evolutivas de *Leishmania*. Pequenas variações na concentração de SFB, pH, fontes de carbono e cofatores metabólicos podem alterar profundamente o metabolismo do parasito, influenciando a expressão de genes relacionados à virulência e à suscetibilidade a fármacos (Castelli *et al.*, 2023, p. 3–4; De Oliveira Filho *et al.*, 2024b, p. 2). Por essa razão, a padronização e otimização dos meios utilizados constituem etapa essencial para a reprodutibilidade dos ensaios e a obtenção de formas viáveis e fisiologicamente estáveis.

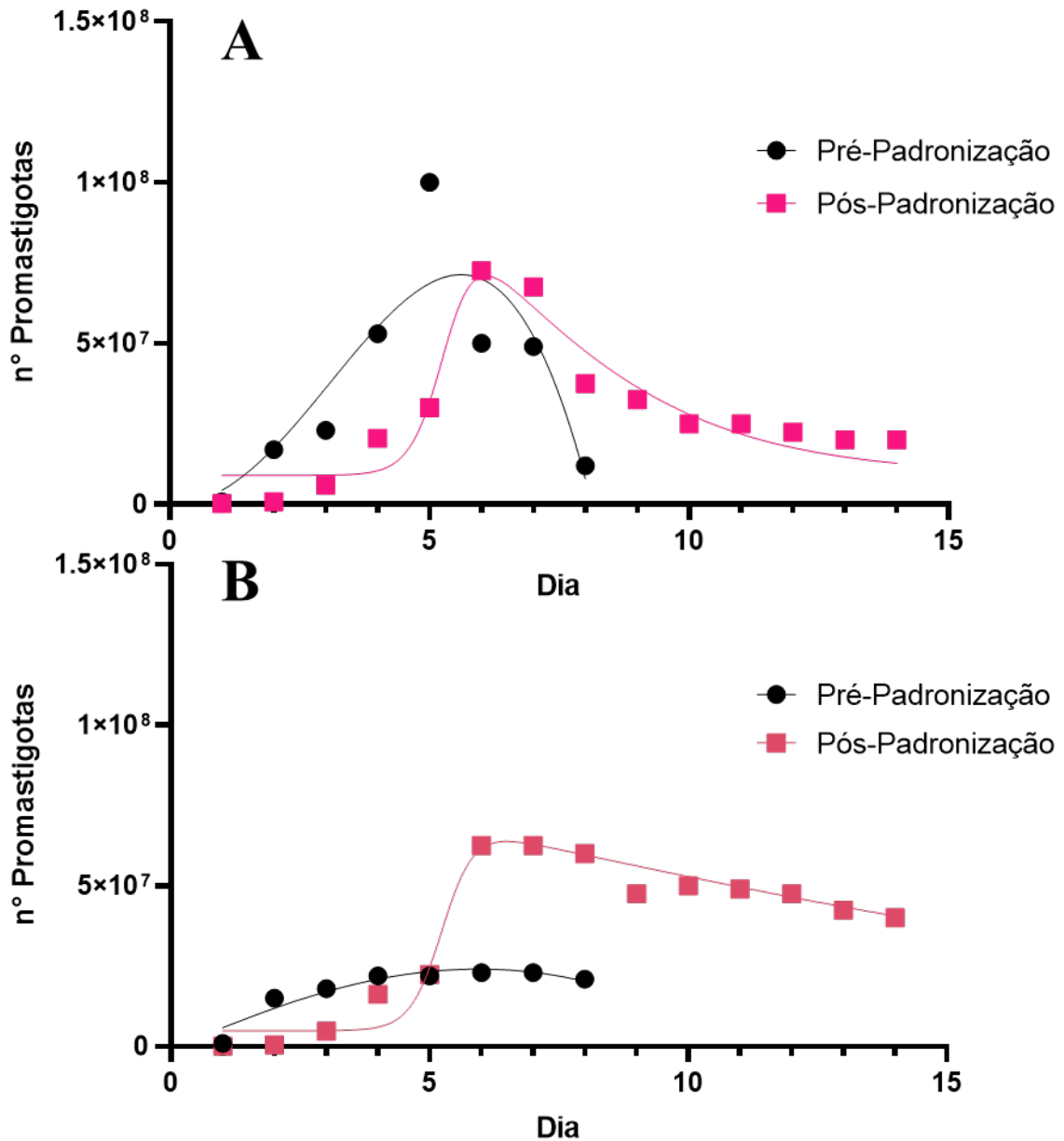
No presente trabalho, o meio LIT foi otimizado visando reduzir o ritmo de crescimento excessivamente rápido, que anteriormente resultava em saturação do meio, acúmulo de *debris*<sup>3</sup> e morte das culturas — fatores que comprometiam a obtenção de formas metacíclicas, capazes de infectar macrófagos e se diferenciarem em AA e AI. Para manutenção de grande parte dos meios de cultura, em especial para células eucariotas e heterotróficas, é feita uma suplementação com SFB que é rico em fatores de crescimento (Esfandiari *et al.*, 2020, p. 1). Apesar disso, sua utilização carrega implicações logísticas, econômicas e biológicas relevantes, como o alto custo, variabilidade entre lotes e risco de contaminação por fatores indesejados, o que compromete a reprodutibilidade e dificulta a padronização de experimentos *in vitro* (Costa *et al.*, 2020, p. 2; Esfandiari *et al.*, 2020, p. 2). Com isso, dado o caráter negligenciado da leishmaniose e de outras doenças tropicais, a otimização de recursos e resultados é de suma importância para o avanço da pesquisa. Logo, cresce o interesse por substitutos parciais ou totais do soro, capazes de reduzir custos e aumentar a padronização dos cultivos, sem comprometer a viabilidade parasitária. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de suplementos alternativos, como urina humana, extratos vegetais ou fontes definidas de aminoácidos e vitaminas, que reproduzem de forma satisfatória o efeito trófico do SFB (Allahverdiyev *et al.*, 2011; De Oliveira Filho *et al.*, 2024b, p. 8). Desse modo, foram realizadas as modificações: a concentração de SFB foi reduzida de 20% para 10%, enquanto a urina masculina humana, fonte alternativa e de baixo custo de aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento, foi elevada de 1% para 4%, em concordância com estudos que demonstram seu potencial substitutivo ao soro sem prejuízo ao crescimento (Allahverdiyev *et al.*, 2011, p. 1)

---

<sup>3</sup> Restos celulares e agregados de metabólitos

Promastigotas de *Leishmania* apresentam altas taxas de consumo de glicose e aminoácidos não-essenciais que são destinados ao metabolismo energético, à síntese de nucleotídeos e poliaminas (Carter *et al.*, 2022, p. 5; McConville *et al.*, 2015, p. 4). Somado a isso, dada a natureza de intensa proliferação das formas promastigotas não-metacíclicas, o metabolismo intensamente glicolítico leva à produção de ácidos orgânicos como succinato, lactato e acetato, que promovem a acidificação progressiva, em ambiente axênico, do meio e a subsequente perda de viabilidade da cultura (Da Luz *et al.*, 2009, p. 5; McConville *et al.*, 2015, p. 3). Em contrapartida, no interior do vetor, *Leishmania* modula o metabolismo de açúcares, o que permite ao parasito sobreviver tanto em períodos de abundância e escassez (Hendrickx; Caljon, 2022, p. 10; Nayak *et al.*, 2018, p. 2). Sendo assim, o pH inicial do meio foi ajustado de 7,2 para 7,4, evitando acidificação precoce e prolongando a viabilidade da cultura, que passou a ter uma população estável de promastigotas em fase estacionária por pelo menos três dias. Além disso, a concentração de glicose foi reduzida de 0,4 g para 0,2 g/100 mL, de modo a diminuir a velocidade de proliferação, retardando o colapso da cultura. Essas alterações resultaram em culturas mais estáveis em meio LIT, com crescimento controlado, menor formação de *debris* e reprodutibilidade experimental (Gráfico 1A).

**Gráfico 1** - Curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, em diferentes meios de cultura.



Fonte: Do autor (2025). Nota: O gráfico A corresponde a curva de crescimento de promastigotas em meio LIT. O gráfico B corresponde a curva em meio 199.

De modo análogo, o meio 199 também foi ajustado. A concentração de hemina foi reduzida de 0,2% para 0,1%, dado que concentrações elevadas podem induzir estresse oxidativo e prejudicar a proliferação (Tafuri et al., 2021). O SFB foi reduzido de 20% para 15%, e a urina foi igualmente aumentada para 4%, mantendo o equilíbrio nutricional e reduzindo custos de cultivo (De Oliveira Filho *et al.*, 2024b, p. 6–8). Essa composição resultou em maior proliferação e estabilidade da população, que se manteve em fase estacionária por quase 10 dias (Gráfico 1B). Em conjunto, as modificações aplicadas aos meios LIT e 199 melhoraram a

reprodutibilidade dos experimentos e prolongaram as culturas, garantindo melhores condições para a obtenção de formas metacíclicas, essenciais para a diferenciação em AA, e a execução dos ensaios subsequentes.

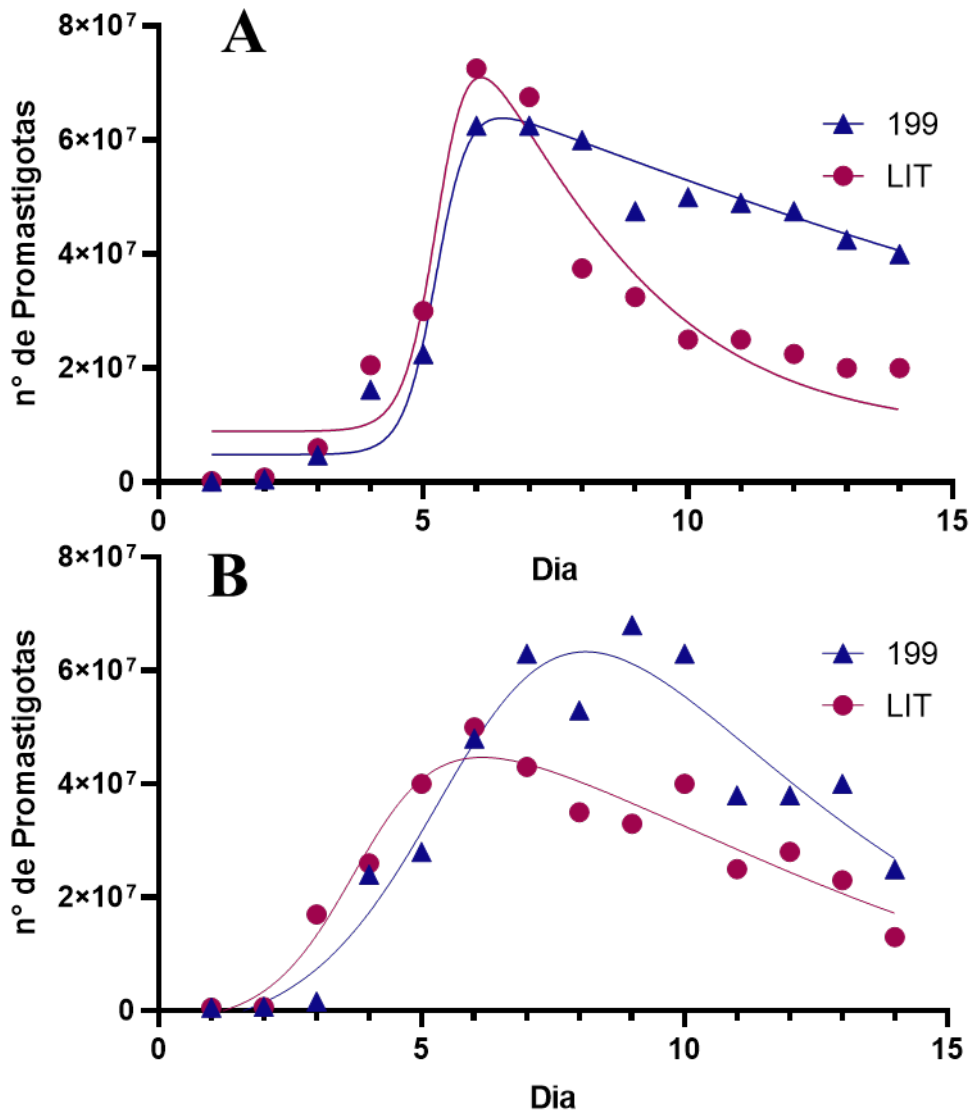
## 6.2 Curva de Proliferação

Durante a progressão da cultura, a população de promastigotas se torna heterogênea: parte continua a dividir, enquanto uma fração entra em metaciclogênese e outra declina/morre à medida que o microambiente se satura. Isso se alinha ao mecanismo de morte celular conhecido como altruísmo egoísta, que visa conservar os substratos do meio de modo a favorecer os parasitos com maiores chances de sobrevivência (Basmacıyan; Casanova, 2019, p. 3). Já a metaciclogênese é um processo de diferenciação estimulado principalmente pela limitação nutricional, como a escassez de purinas, a queda de pH e alta densidade celular, condições que surgem naturalmente no ciclo natural da doença e no intestino do flebotomíneo; o resultado é o surgimento de promastigotas metacíclicas — mais longas e finas, mais infectivas e resistentes ao complemento, enquanto o restante da população gradualmente perde a viabilidade (Serafim *et al.*, 2012, p. 1).

A curva de proliferação obtida para *Leishmania (L.) amazonensis* (Gráfico 2A) evidencia o padrão característico de crescimento em cultura axênica, permitindo distinguir claramente as fases do ciclo celular (Howell *et al.*, 2024, p. 2). Para a cepa M2269, cultivada em meio LIT, as promastigotas permaneceram em fase de adaptação (*lag*) até o terceiro dia, alcançando a fase logarítmica a partir de então e atingindo o platô estacionário entre o sexto e o sétimo dia. A partir do oitavo dia, observou-se o início da fase de declínio, caracterizada pela redução progressiva da densidade populacional. No meio 199, o comportamento foi semelhante, porém com uma transição mais gradual entre as fases estacionária e de declínio, sem uma fronteira claramente definida.

Para a cepa PH8 (Gráfico 2B), em meio LIT, as promastigotas permaneceram em fase *lag* até o terceiro dia, quando se inicia o crescimento exponencial até o quinto. A fase estacionária estendeu-se, em seguida, até o décimo dia, seguida da de declínio, mais lenta e sustentada. Já no meio 199, a curva demonstrou um crescimento mais expressivo, com pico mais tardio, de modo que a fase de morte se inicia por volta do décimo primeiro dia.

**Gráfico 2** – Curva de crescimento de diferentes cepas de *Leishmania (L.) amazonensis*, em diferentes meios de cultura



Fonte: Do autor (2025). Nota: O gráfico A corresponde a curva de crescimento de promastigotas da cepa M2269. O gráfico B corresponde a curva da cepa PH8.

Para *Leishmania*, a fase *lag* representa o período de adaptação das promastigotas ao meio, durante o qual há intensa atividade metabólica, mas pouca divisão celular. Na fase logarítmica (ou exponencial), observa-se a máxima taxa de multiplicação, associada à alta disponibilidade de nutrientes e estabilidade físico-química do meio (Arjmand *et al.*, 2016, p. 1; Jara *et al.*, 2022, p. 6). Por fim, a fase estacionária se caracteriza pela redução da taxa de divisão, reflexo do esgotamento parcial dos nutrientes e do acúmulo de metabólitos ácidos, enquanto o número total de células se mantém relativamente constante. Por fim, a fase de declínio reflete a perda de viabilidade celular em virtude da acidificação do meio e do acúmulo de *debris* e produtos metabólicos (Howell *et al.*, 2024, p. 2; Jara *et al.*, 2022, p. 1).

Assim, o reconhecimento dessas fases é essencial para a padronização de ensaios biológicos, uma vez que a resposta a fármacos e a capacidade de diferenciação do parasito variam de forma significativa entre elas (Arjmand *et al.*, 2016, p. 2).

### 6.3 Axenização

A padronização de AA cumpre duas funções: prática, por oferecer uma alternativa mais simples, direta e de baixo custo em relação ao uso de AI obtidas por infecção de linhagens celulares ou modelos murinos; biológica, ao mimetizar propriedades-chave das AI, como morfologia, metabolismo energético e tolerância a estresse oxidativo ou ácidos (Chanmol *et al.*, 2019, p. 2). Em teoria, isso torna o AA um modelo útil para triagem: mais próximo do fenótipo relevante que promastigotas, porém mais simples e barato que AI (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8; Oliveira *et al.*, 2024, p. 2; Zilberstein; Nitzan Koren, 2019, p. 1). É também o ponto certo para testar hipóteses dependentes de estágio (compostos que exploram vulnerabilidades redox ou mitocondriais podem se comportar de modo distinto em AA vs. promastigotas) ou a própria ação de compostos em pH ácido (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 7–8). Finalmente, a padronização do protocolo (condições, janela temporal e critérios morfológicos) permite comparar resultados entre diferentes ensaios e cruzar, com rigor, a suscetibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* em suas diferentes formas de vida - o objetivo desta dissertação.

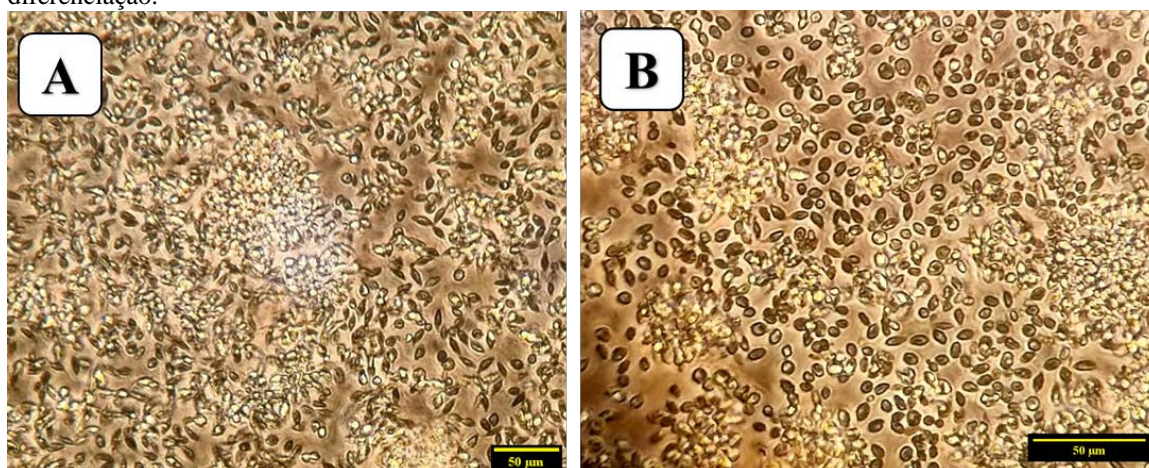
Assim, a axenização foi realizada a partir de promastigotas em fase estacionária (7º dia), em meio 199, com transição gradual de pH. O processo foi adaptado a partir do método descrito por Miguel *et al.* (2013). Gradativamente, após o início da axenização, foi possível observar mudanças claras e progressivas na morfologia e comportamento dos parasitos, tanto da cepa PH8 (Figura 7) como M2269 (Figura 8).

O meio de cultura escolhido e padronizado para a axenização foi o M199, em virtude da longa duração da fase estacionária das populações cultivadas, o que é compatível com as exigências do modelo, que exige quantidades elevadas de promastigotas metacíclicas, capazes de resistir ao pH ácido e diferenciarem-se em amastigotas (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 5–6).

Imediatamente antes do início da axenização, as promastigotas, em cultura, apresentavam sinais nítidos de metaciclogênese - células alongadas, com corpo fusiforme, flagelo livre proeminente e alta motilidade. Vinte e quatro horas após o início do processo, foi possível observar uma redução rápida do comprimento flagelar, arredondamento progressivo do corpo celular e queda de motilidade, tanto para a cepa PH8 (Figura 7A), como M2259 (Figura 8A) (Santarém *et al.*, 2014, p. 10). 48-72 h depois, as células apresentavam morfologia

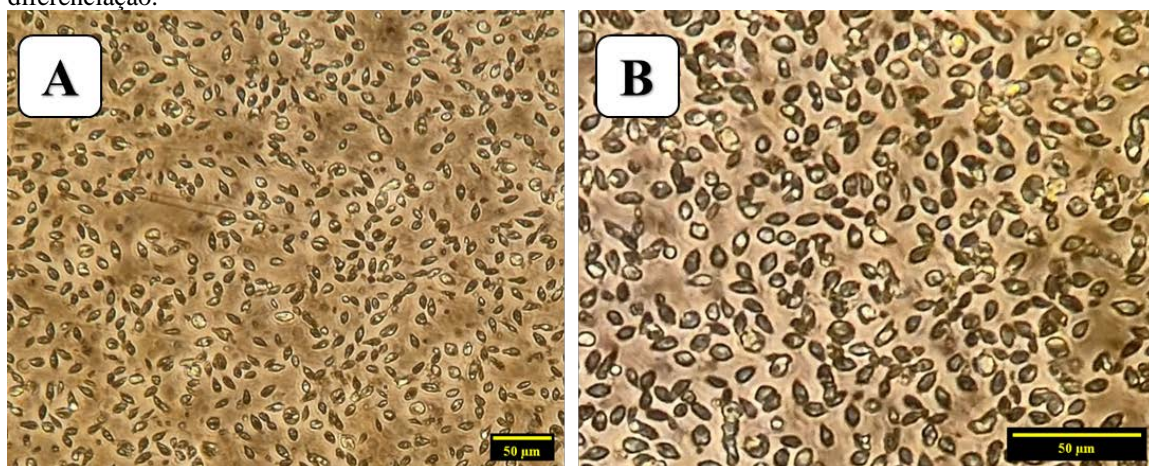
típica de amastigotas: forma pequena e ovalada/arredondada, flagelo não emergente (ou vestigial), citoplasma mais denso, com núcleo e cinetoplasto compactos (Figuras 7B e 8B). A estabilidade desse fenótipo se mantém sob manutenção contínua a 32–33 °C por 7 dias, quando a cultura entra em declínio e posterior morte, o que é coerente com o microambiente-alvo e com a finalidade do modelo. Ambas as cepas apresentam estágios semelhantes, sendo a única diferença observada o fato de as células da cepa PH8 terem uma forte tendência de aglutinar-se.

**Figura 7** - Amastigotas axênicos de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa PH8, em diferentes estágios de diferenciação.



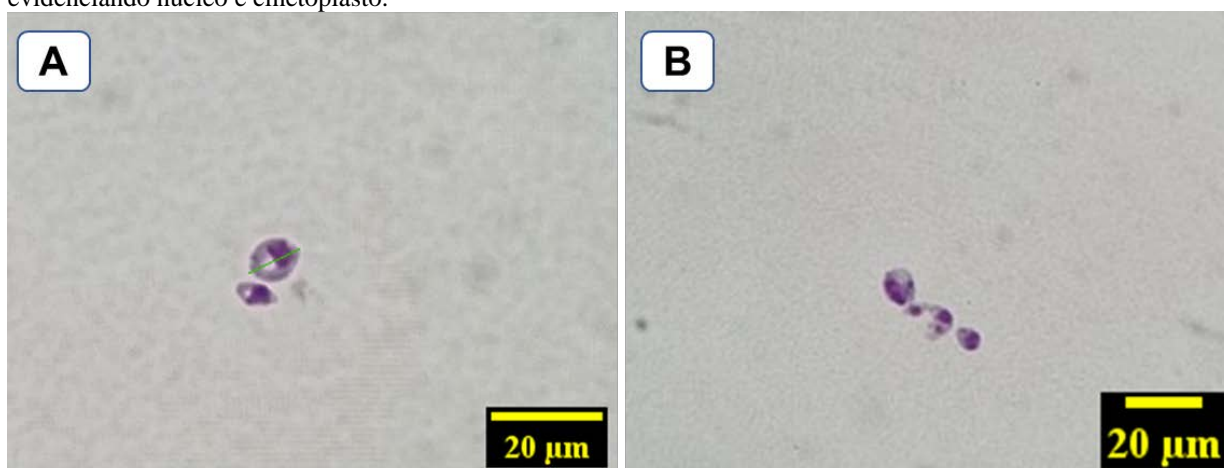
Fonte: Do autor (2025). Nota – A: Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa PH8, no segundo dia de diferenciação; B - Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa PH8, no terceiro dia de diferenciação.

**Figura 8** - Amastigotas axênicos de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, em diferentes estágios de diferenciação.



Fonte: Do autor (2025). Nota - A: Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no segundo dia de diferenciação; B - Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no terceiro dia de diferenciação.

**Figura 9** - Amastigotas axênicos de *Leishmania (L.) amazonensis*, corados pelo método do panóptico rápido, evidenciando núcleo e cinetoplasto.

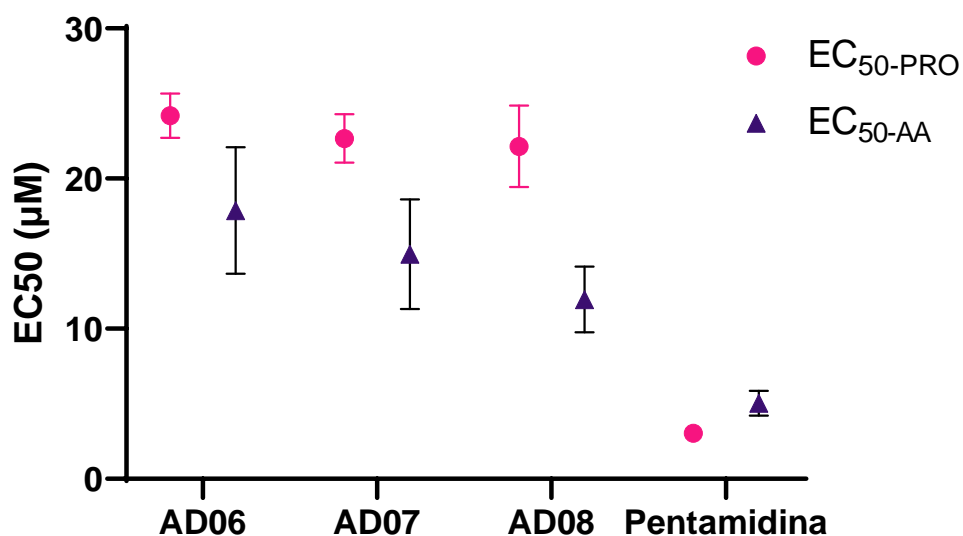


Fonte: Do autor (2025). Nota – A: Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269; B - Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa PH8.

#### 6.4 Atividade anti-*Leishmania*

Ensaio de viabilidade por resazurina foram conduzidos conforme descrito na metodologia. Os híbridos metronidazol-eugenol foram testados sobre promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no tempo de incubação de 72h, na fase *log* da curva de proliferação. A partir dos resultados foi possível determinar o EC<sub>50</sub>-PRO (Gráfico 3). A pentamidina foi utilizada como controle de referência. Os experimentos com a cepa PH8 foram interrompidos devido a dificuldades na padronização de ensaios de viabilidade

**Gráfico 3** - Atividade anti-*Leishmania* de derivados eugenol-metronidazol, testados contra *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269.



Fonte: Do autor (2025).

Similarmente, também foi avaliada a viabilidade de AA de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, por meio do ensaio do MTT. Híbridos do eugenol-metronidazol e a pentamidina foram testados sobre AA com 5 dias após o início da axenização para determinação do EC<sub>50-AA</sub>.

A partir dos resultados, observou-se que os compostos híbridos apresentaram maior atividade frente às formas amastigotas, com EC<sub>50</sub> inferiores aos observados em promastigotas, indicando sensibilidade aumentada da forma clinicamente relevante ou maior seletividade dos híbridos. Entre eles, o composto AD08 destacou-se por apresentar a menor concentração efetiva e, portanto, maior potência contra AA (EC<sub>50-AA</sub> = 11,94 ± 2,19 µM), se aproximando do fármaco de referência (EC<sub>50-AA-Pentamidina</sub> = 5,04 ± 0,8 µM), cujo EC<sub>50</sub> se aproxima dos valores da literatura (Mendes *et al.*, 2019, p. 7). O uso da pentamidina como fármaco de referência se baseia em protocolos previamente estabelecidos pelo grupo de pesquisa e, sobretudo, em sua eficácia contra *Leishmania (L.) amazonensis*, frente a alternativas como anfotericina B e miltefosina (Piccica *et al.*, 2021, p. 8). Embora os antimoniais pentavalentes sejam considerados o padrão terapêutico clássico, sua atividade depende do metabolismo do organismo hospedeiro e, por consequência, não é adequadamente reproduzida *in vitro*.

No entanto, apesar do efeito observado em AA, a interpretação desses dados requer cautela. O modelo axênico acelera triagens e poupa vidas animais, mas não reproduz o vacúolo parasitóforo, nem a pressão imune. Além disso, há variações marcantes de protocolo (pH/temperatura) e lacunas de consenso, o que compromete parcialmente as comparações entre experimentos (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8). Em análises ômicas, AA diferem de amastigotas de lesão e de macrófagos em vias imunes e metabólicas, como a taxa de captação de glicose, atividade glicolítica e de beta-oxidação (Pacakova *et al.*, 2022, p. 5–6). Além disso, McConville e colaboradores evidenciaram como ocorre o *scavenging*<sup>4</sup> de nutrientes e fontes de carbono no interior do fagolisossomo por AI de *Leishmania (L.) mexicana*, com ênfase na modulação exercida pelo parasito sobre o macrófago parasitado, delineando vias metabólicas e um estado de quiescência dependentes da resposta imune e da escassez de fontes energéticas (McConville *et al.*, 2015, p. 5–7). Há também um fator espécie/cepa: condições que induzem amastigogênese em uma espécie podem não servir para outra. Tal fator demanda o uso de biomarcadores de estágio, como a proteína A2, amastinas e elongases, de modo a fortalecer a identificação fenotípica e reduzir o risco de arredondamentos e, conseqüentemente, de

---

<sup>4</sup> Garimpo, vasculha, coleta em meio aos restos

resultados falso-positivos (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 7–8; Oliveira *et al.*, 2024, p. 8; Pacakova *et al.*, 2022, p. 6–7). Em paralelo, trabalhos recentes com *Leishmania (L.) amazonensis* reforçam que AA são úteis como instrumentos de triagem, desde que os achados sejam validados em AI (Garcia *et al.*, 2023, p. 16; Oliveira *et al.*, 2024, p. 8; Zilberstein; Nitzan Koren, 2019, p. 2). A partir de tais estudos, percebe-se que ainda não há um consenso bem estabelecido na literatura quanto a pertinência e aplicabilidade de AA na triagem de grandes bibliotecas de substâncias.

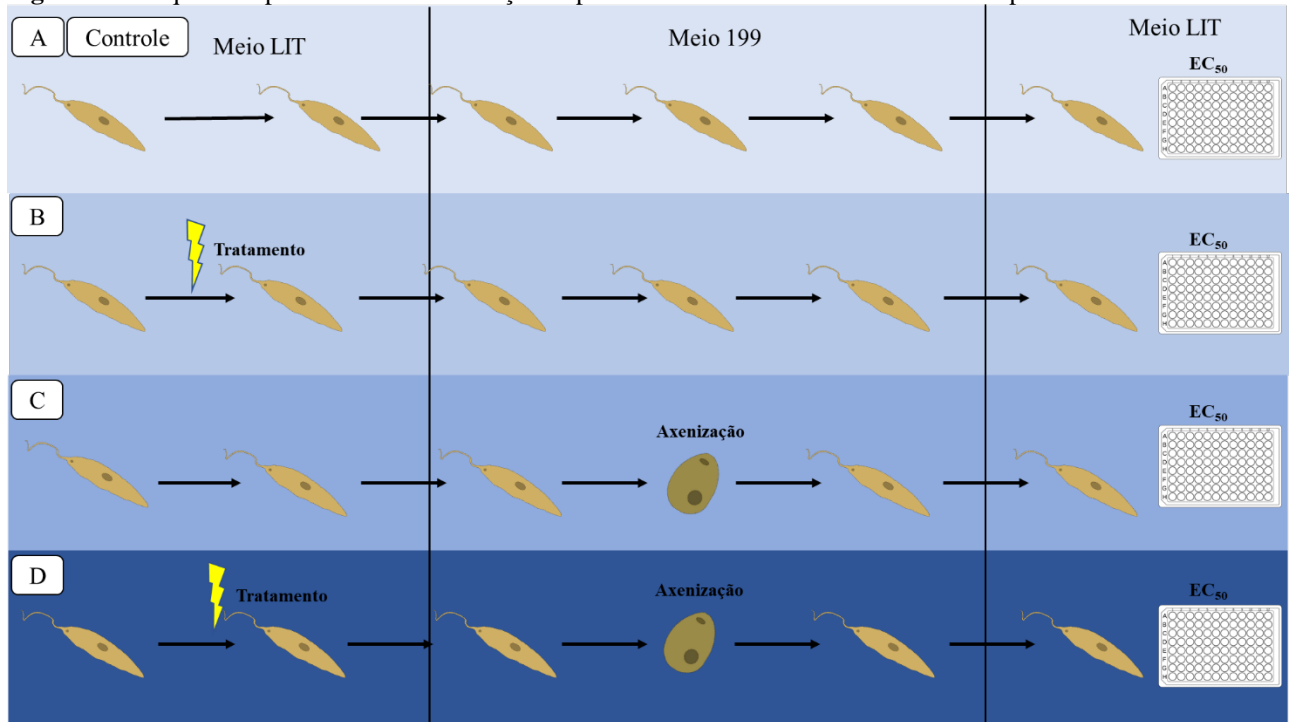
Assim, os EC<sub>50-AA</sub> encontrados com os híbridos metronidazol-eugenol foram então tratados como indicadores de tendência. Apesar disso, esses resultados preliminares permitem a progressão experimental, servindo como base para o ensaio de susceptibilidade subsequente, o qual avaliou a influência de diferentes condições experimentais e formas evolutivas sobre a resposta aos compostos.

## 6.5 Ensaio de Susceptibilidade

A fim de avaliar se o histórico de exposição ou diferenciação influenciava a resposta aos compostos, foram conduzidos ensaios comparativos de susceptibilidade (Figura 10). As culturas foram divididas em quatro grupos experimentais:

- (A) Controle – promastigotas sem manipulação prévia, mantidas no mesmo meio de cultura que os demais grupos, com passagens a cada 7 dias, utilizadas no ensaio de EC<sub>50</sub>;
- (B) Tratamento – promastigotas previamente expostas ao EC<sub>50-PRO</sub> dos compostos, e posteriormente reavaliadas;
- (C) Axenização – promastigotas submetidas à diferenciação em AA e reconvertidas para promastigotas antes da avaliação;
- (D) Tratamento + axenização – combinação dos dois fatores anteriores.

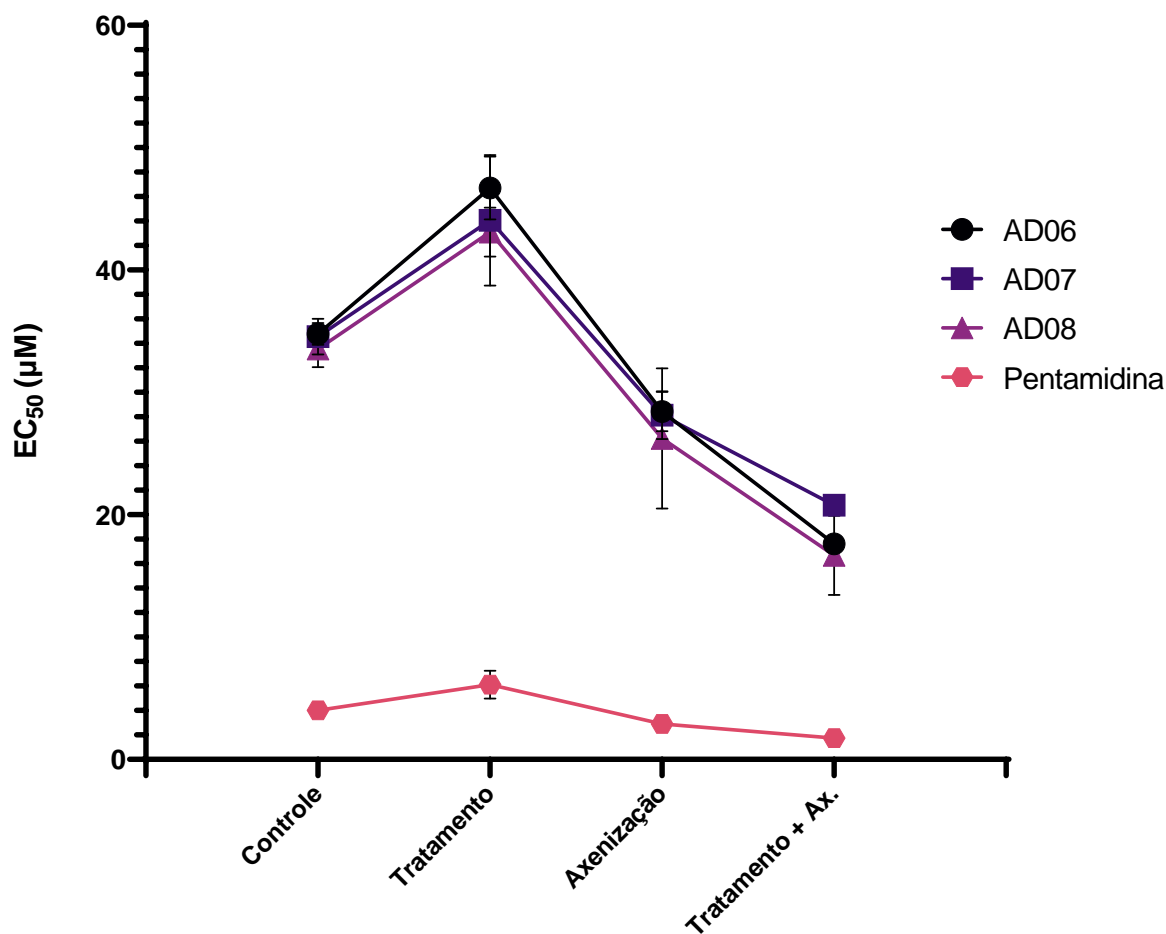
**Figura 10** - Esquema representativo das condições e parâmetros utilizados no ensaio de susceptibilidade.



Fonte: Do Autor (2025)

Os resultados (Gráfico 4) demonstram um padrão nítido de modulação da susceptibilidade.

**Gráfico 4** - Susceptibilidade de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* frente ao tratamento e a alteração na forma de vida.



Fonte: Do autor (2025).

O grupo tratado (B) apresentou aumento do  $EC_{50}$  em relação ao controle (A), com uma média de 25% de elevação, indicando redução da sensibilidade aos compostos após a exposição inicial — comportamento compatível com mecanismos adaptativos de tolerância transitória. Essa elevação do  $EC_{50}$  sugere ajustes metabólicos e maior expressão de tióis e proteínas transportadoras e de efluxo, estas que bombeiam os fármacos e compostos para fora da célula, elevando a capacidade do parasito de resistir ao estresse químico subsequente (Ferreira *et al.*, 2024, p. 12–13; Pramanik *et al.*, 2019, p. 6–7; Uliana; Trinconi; Coelho, 2018, p. 5). Outro mecanismo é a diminuição da expressão de aquagliceroporinas, como a AQP1, o que se associa a uma menor captação dos compostos (Uliana; Trinconi; Coelho, 2018, p. 5). Alternativamente, o tratamento inicial com o  $EC_{50-PRO}$  pode ter sido responsável pela eliminação de parasitos mais suscetíveis, favorecendo a sobrevivência dos mais adaptados.

Em contraste, o grupo axenizado exibiu redução acentuada do EC<sub>50</sub>, com uma queda média de 21% em relação ao controle, refletindo maior susceptibilidade dos parasitos reconvertidos após o ciclo amastigota/promastigota. Essa queda na concentração efetiva poderia indicar que o processo de diferenciação comprometeu temporariamente a robustez fisiológica da forma promastigota. Estudos recentes têm mostrado que a transformação de *Leishmania* em AA pode não ocorrer de maneira eficiente, de modo que as vias antioxidantes não são completamente reprogramadas, sendo que a expressão de diversas proteínas ligadas a sobrevivência e resistência só se expressam nas formas AI (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 7; Sette *et al.*, 2025, p. 10).

O efeito mais pronunciado foi observado no grupo pré-tratamento + axenização, no qual o EC<sub>50</sub> foi o menor entre todos os grupos, cuja redução média em relação ao controle foi de 49%. Essa combinação parece potencializar a vulnerabilidade induzida pelo processo de diferenciação, evidenciando que o histórico de exposição somado à mudança na forma de vida torna o parasito ainda mais sensível a novos desafios químicos.

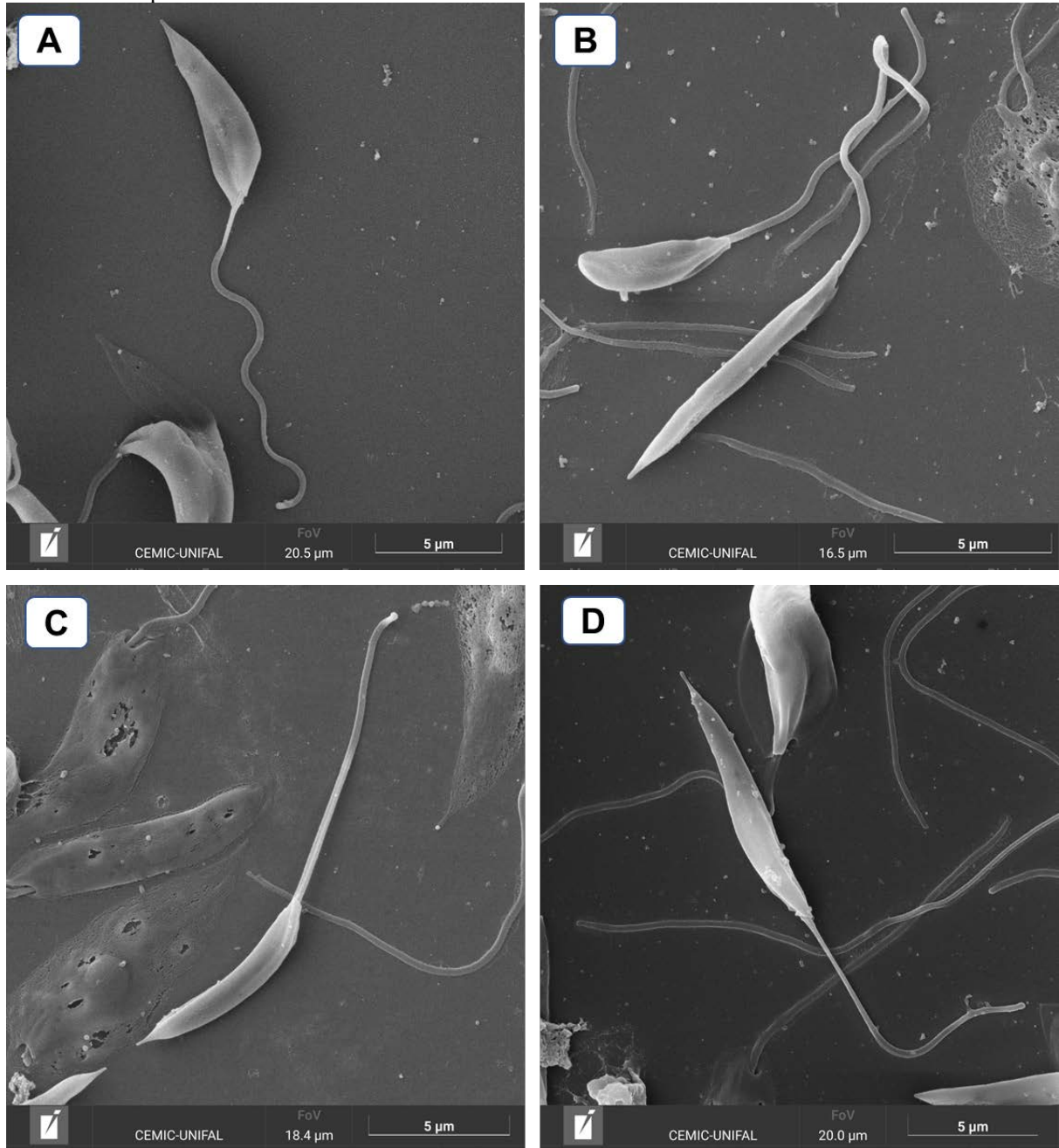
A leitura plausível é de uma histerese regulatória, em que o tratamento selecionou promastigotas mais tolerantes, com maior efluxo e menor absorção, mas a passagem forçada por amastigota exige uma reprogramação pós-transcricional maciça, que talvez demande uma janela de tempo maior para consolidação das vias de sobrevivência do parasito (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8; Fiebig; Kelly; Gluenz, 2015, p. 3). A pentamidina seguiu o mesmo padrão de variação observado para os híbridos, porém com menor amplitude entre os grupos. De modo geral, os resultados evidenciam que a susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* é influenciada pelo histórico de exposição, destacando o papel da plasticidade adaptativa e metabólica na resposta aos fármacos. Nesse sentido, estudos complementares de expressão proteica, metabólica e de virulência poderão elucidar como esses mecanismos são regulados e influenciados pela mudança na forma de vida.

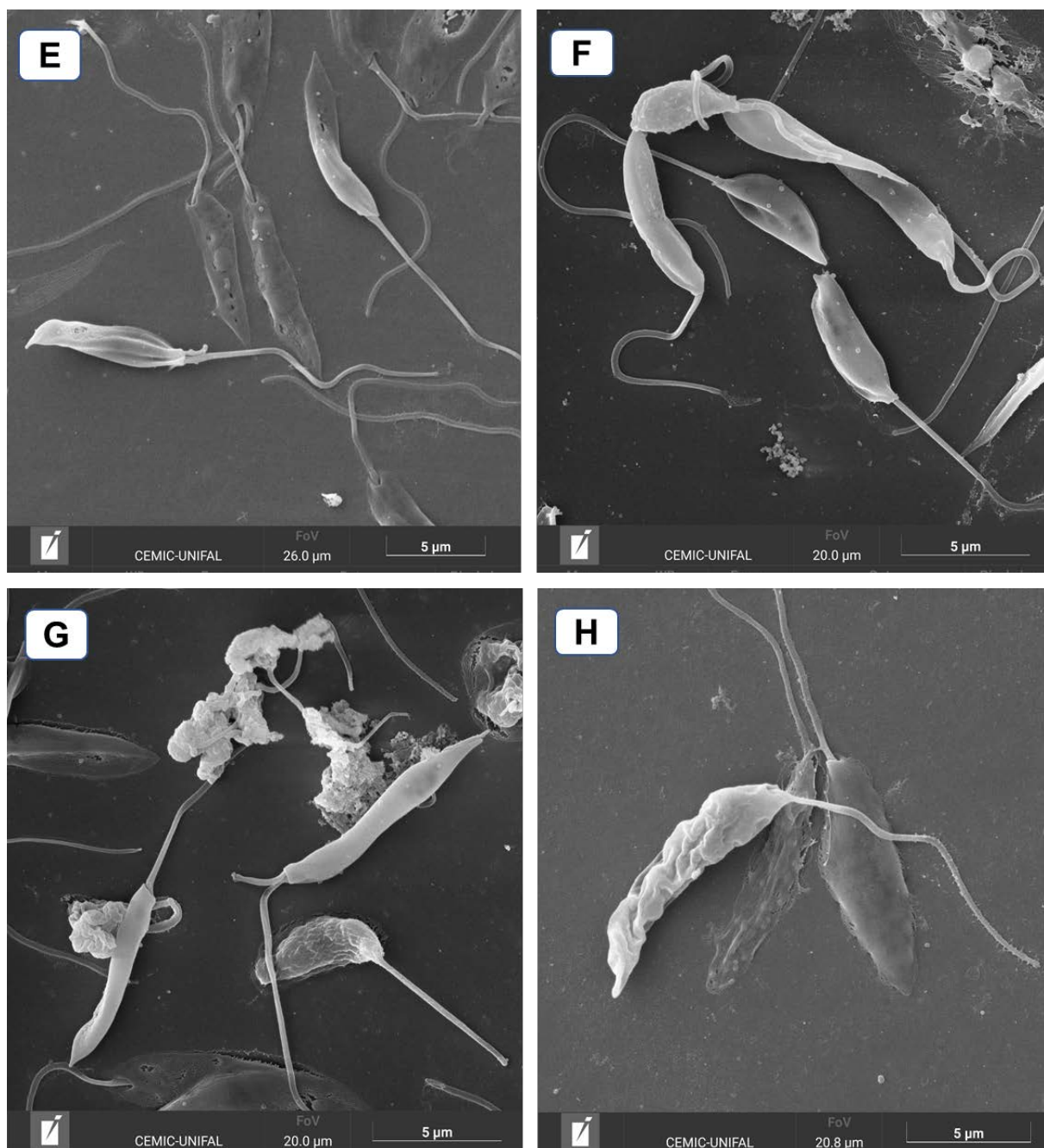
## 6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização morfológica dos grupos experimentais do ensaio de susceptibilidade foi realizada por MEV. Observou-se que o grupo controle apresentou morfologia preservada, com promastigotas de aspecto típico (Figura 11A), alongadas e de membrana homogênea, com ou sem a presença de vesículas extracelulares (Figura 11B). De modo semelhante, os grupos submetidos apenas ao pré-tratamento (Figura 11C e Figura 11D) ou apenas à axenização (Figura 11E e Figura 11F) não exibiram alterações morfológicas relevantes. Em contraste, o

grupo submetido à combinação de pré-tratamento e axenização apresentou frequentes alterações estruturais, com presença de células retraídas, com morfologia sugestiva de processos degenerativos (Figura 11G). Além disso, também foi possível observar alterações na membrana celular, que apresentou significativas invaginações (Figura 11H).

**Figura 11** – MEV de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, pertencentes aos grupos do ensaio de susceptibilidade.





Fonte: Do Autor (2026).

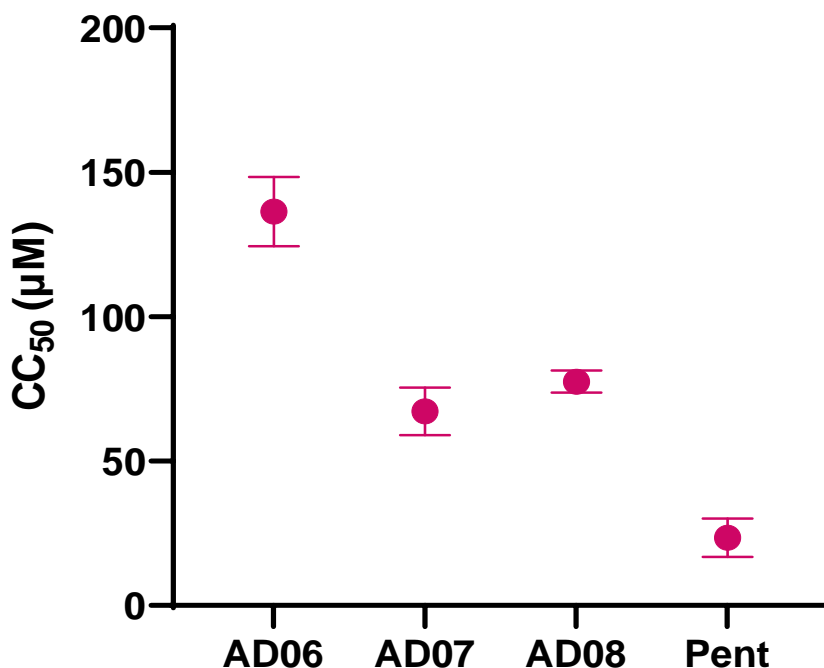
A ocorrência dessas alterações exclusivamente na condição combinada indica que o impacto sobre o parasito não decorre de um único fator isolado, mas da interação entre histórico de exposição e mudança de estado fisiológico, evidenciando um efeito sinérgico entre esses fatores. Esse comportamento parece sugerir que a exposição prévia aos compostos compromete a capacidade adaptativa do parasito frente às exigências metabólicas e estruturais impostas pela axenização, amplificando danos que não se manifestam quando os estímulos são aplicados de forma independente (Alcolea *et al.*, 2010, p. 21; Crepaldi *et al.*, 2019, p. 15).

Nesse contexto, a transição promastigota–amastigota–promastigota, quando conduzida em condições exclusivamente *in vitro*, parece induzir, na janela de tempo envolvida, alterações fisiológicas persistentes, de modo que o parasito não retorna plenamente ao seu estado original após a rediferenciação. Essa perda de reversibilidade fenotípica implica modificações duradouras em sua organização estrutural e funcional, possivelmente associadas a reprogramações metabólicas, alterações na dinâmica de membrana e comprometimento de mecanismos de resposta ao estresse (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8; Gluenz *et al.*, 2015, p. 3). Tais observações novamente dialogam com evidências da literatura que apontam que formas axênicas, embora compartilhem algumas características com AI, não recapitulem integralmente o microambiente do hospedeiro, podendo apresentar diferenças relevantes de sinalização e estabilidade fenotípica ao longo de passagens sucessivas ou mudanças de forma de vida (Crepaldi *et al.*, 2019, p. 9; Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 9; Zilberstein; Nitzan Koren, 2019, p. 5). Esses achados reforçam a ideia de limitações do modelo de AA, indicando que parte das alterações observadas pode decorrer não apenas da ação dos compostos testados, mas também de adaptações induzidas pelo próprio sistema experimental e pela trajetória recente do parasito (Fiebig; Kelly; Gluenz, 2015, p. 3). Assim, embora o modelo axênico permaneça útil como ferramenta de triagem inicial, sua capacidade preditiva deve ser interpretada com cautela, especialmente em estudos que envolvem transições entre formas de vida, nos quais efeitos dependentes de histórico e estado fisiológico podem introduzir vieses relevantes e resultados falsos positivos (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 9).

## **6.7 Ensaio de Citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade dos compostos híbridos eugenol–metronidazol foi conduzida sobre células da linhagem RAW 264.7, empregando o ensaio de viabilidade por MTT após 72 h de exposição (Gráfico 5). A pentamidina foi utilizada como controle de referência, e as condições de cultivo e tratamento seguiram os parâmetros descritos na metodologia.

**Gráfico 5** - Citotoxicidade de híbridos metronidazol-eugenol e da pentamidina em células da linhagem RAW 264.7 em 72 horas de incubação



Fonte: Do autor (2025).

Os resultados indicaram que os compostos apresentaram variada citotoxicidade frente à linhagem avaliada, de modo que o composto AD06 se mostrou como menos danoso às células ( $CC_{50} = 136,3 \pm 11,9 \mu\text{M}$ ). A pentamidina, como esperado, apresentou maior citotoxicidade relativa, com  $CC_{50}$  inferior aos híbridos ( $CC_{50} = 23,4 \pm 6,6 \mu\text{M}$ ), o que reforça a potencialidade dos compostos no âmbito da segurança e efeitos colaterais. Além disso, os resultados reforçam também a utilização de tal abordagem no descobrimento de novas alternativas terapêuticas, isto é, da hibridização de moléculas candidatas para obtenção de compostos com maior eficácia e seletividade (Pelozo *et al.*, 2024, p. 12).

## 6.8 Índice de Seletividade

O IS avalia a especificidade de uma substância sobre o organismo de interesse, isto é, sua capacidade de interagir seletivamente com alvos no parasito, e não do hospedeiro, o que na prática se traduz em menos efeitos colaterais e toxicidade. Compostos com IS acima de 10 são considerados eficazes e seguros. A Tabela 1 exhibe os valores de IS para promastigotas ( $IS_{\text{PRO}}$ ) e AA ( $IS_{\text{AA}}$ ) dos híbridos metronidazol-eugenol e da pentamidina.

**Tabela 2** - Valores de IS dos híbridos metronidazol-eugenol e da pentamidina contra *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269.

<b>Composto</b>	<b>IS<sub>PRO</sub></b>	<b>IS<sub>AA</sub></b>
AD06	5.64	7.63
AD07	2.96	4.49
AD08	3.50	6.49
Pentamidina	7.73	4.65

Fonte: Do autor (2025).

Com base nos resultados acima, evidencia-se que os híbridos AD06 e AD08 apresentaram IS<sub>AA</sub> maior que a pentamidina, indicando boa margem terapêutica in vitro, especialmente o composto AD06, que combinou maior potência antiparasitária e menor toxicidade aparente.

A avaliação da atividade leishmanicida em AI, considerada etapa essencial para validação mais fidedigna do IS, foi inicialmente proposta no delineamento deste trabalho. No entanto, devido a dificuldades experimentais, como contaminações, viabilidade e atividade fagocítica das células hospedeiras e infectividade do parasito, não foi possível obter resultados consistentes dentro do período experimental disponível.

Nesse contexto, a determinação do IS em AI permanece como etapa necessária para validação dos achados obtidos, uma vez que esse modelo constitui o padrão-ouro na identificação de novos candidatos contra a leishmaniose (Dias-Lopes *et al.*, 2021, p. 8; Pacakova *et al.*, 2022, p. 6; Passero *et al.*, 2018, p. 4). Assim, a complementação desses dados será fundamental não apenas para confirmar o potencial dos híbridos avaliados, mas também para verificar em que medida os resultados obtidos em AA se traduzem para o modelo intracelular, considerando as limitações inerentes a cada sistema. Essa perspectiva constitui então relevante ponto de partida para estudos futuros, visando aprofundar a validação biológica dos compostos investigados.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que a susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* é dependente do histórico recente do parasito, seja para estresse químico ou mudança na forma de vida. Os híbridos eugenol–metronidazol exibiram atividade relevante, com maior eficácia em AA; entre eles, o composto AD06 se destacou, com bom IS. Nos ensaios de susceptibilidade, o pré-tratamento elevou o EC<sub>50</sub> (tolerância transitória), enquanto a passagem por amastigota e reconversão reduziu o EC<sub>50</sub>; a combinação de ambos acentuou a queda, indicando vulnerabilidade pós mudança. A pentamidina acompanhou o padrão com menor amplitude. Em macrófagos RAW 264.7, os híbridos apresentaram citotoxicidade variada. Adicionalmente, a análise por MEV revelou alterações morfológicas consistentes exclusivamente na condição combinada, reforçando de forma independente o impacto da interação entre histórico de exposição e transição de forma de vida sobre a integridade estrutural do parasito. Esses achados reforçam que a avaliação farmacológica em *Leishmania* deve considerar a forma de vida e o histórico experimental, sob risco de estimar de modo enviesado a eficácia de candidatos a fármacos. Os resultados com AA oferecem evidência preliminar robusta, mas requerem cautela e validação em AI. Em síntese, os dados sustentam os híbridos — em especial o AD06 — como candidatos promissores. Com isso, mais estudos e experimentos são necessários para cobrir as lacunas no conhecimento referente a resposta do parasito em diferentes formas de vida, de modo a permitir mais eficientes e diretas buscas por alternativas contra a leishmaniose.

## REFERÊNCIAS

- AÏT-LOUDHIA, Khatima *et al.* **Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field.** Parasitology Research, v. 109, n. 5, p. 1225–1232, nov. 2011.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies.** PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALAUZET, Corentine; LOZNIEWSKI, Alain; MARCHANDIN, Hélène. **Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review.** Anaerobe, v. 55, p. 40–53, fev. 2019.
- ALCOLEA, Pedro J. *et al.* **Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*.** BMC Genomics, v. 11, n. 1, p. 31, 14 jan. 2010.
- ALLAHVERDIYEV, Adil M. *et al.* **Effect of Human Urine on Cell Cycle and Infectivity of *Leishmania* Species Promastigotes In Vitro.** 1 out. 2011.
- ALVES, Marcilene 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, p. e, 11 mar. 2024.
- ARJMAND, Mohammad *et al.* **Metabolomics-Based Study of Logarithmic and Stationary Phases of Promastigotes in *Leishmania major* by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy.** Iranian Biomedical Journal, v. 20, n. 2, p. 77–83, abr. 2016.
- AUCAMP, Janine; ZUMA, Nonkululeko H.; N'DA, David D. **In vitro efficacy of synthesized artemisinin derivatives against *Leishmania* promastigotes.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 30, n. 22, p. 127581, 15 nov. 2020.
- BASMACIYAN, Louise; CASANOVA, Magali. **Cell death in *Leishmania*.** Parasite (Paris, France), v. 26, 2019.
- BASSELIN, Mireille *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, dez. 2002.
- BLANCO, Zuleima *et al.* **In vitro evaluation and in vivo efficacy of nitroimidazole-sulfanyl ethyl derivatives against *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) mexicana*.** Parasitology Research, v. 120, n. 9, p. 3307–3317, set. 2021.
- BRASIL, Ministério da. **Guia de vigilância em saúde.** 6. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar.** Brasília: Ms, 2017.
- BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. **Leishmaniasis.** Lancet (London, England), v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CARTER, Nicola S. *et al.* **Polyamine Metabolism in *Leishmania* Parasites: A Promising Therapeutic Target.** Medical Sciences, v. 10, n. 2, p. 24, jun. 2022.

CASTELLI, Germano *et al.* **Cultivation of Protozoa Parasites In Vitro: Growth Potential in Conventional Culture Media versus RPMI-PY Medium.** Veterinary Sciences, v. 10, n. 4, p. 252, 27 mar. 2023.

CDC, DPDx. ***Leishmaniasis.*** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html#print>>. Acesso em: 18 set. 2025.

CECÍLIO, Pedro; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; OLIVEIRA, Fabiano. **Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites.** Communications Biology, v. 5, n. 1, p. 305, 4 abr. 2022.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. **Drug Resistance in Leishmaniasis.** Journal of Global Infectious Diseases, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010.

CHANMOL, Wetpisit *et al.* **Axenic amastigote cultivation and in vitro development of *Leishmania orientalis*.** Parasitology Research, v. 118, n. 6, p. 1885–1897, jun. 2019.

COSTA, Ana Flávia Pereira *et al.* **Liver infusion tryptose (LIT): the best choice for growth, viability, and infectivity of *Leishmania infantum* parasites.** Parasitology Research, v. 119, n. 12, p. 4185–4195, 2020.

CREPALDI, Frederico *et al.* **Mapping Alterations Induced by Long-Term Axenic Cultivation of *Leishmania amazonensis* Promastigotes With a Multiplatform Metabolomic Fingerprint Approach.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 9, 4 dez. 2019.

DA LUZ, Raquel Inocência *et al.* **In Vitro Sensitivity Testing of *Leishmania* Clinical Field Isolates: Preconditioning of Promastigotes Enhances Infectivity for Macrophage Host Cells.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, n. 12, p. 5197–5203, dez. 2009.

DE FIGUEIREDO PELOSO, Eduardo *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 antileishmanial agent.** Molecular Biology Reports, v. 47, n. 11, p. 8465–8474, nov. 2020.

DE OLIVEIRA FILHO, Virlânio A. *et al.* **In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of Beauvericin.** Journal of Natural Products, v. 87, n. 12, p. 2829–2838, 27 dez. 2024a.

DE OLIVEIRA FILHO, Virlânio Alves *et al.* **An Overview of *Leishmania* In Vitro Cultivation and Implications for Antileishmanial Screenings against Promastigotes.** Parasitologia, v. 4, n. 4, p. 305–318, dez. 2024b.

DE RYCKER, Manu *et al.* **Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, n. 7, p. 2913–2922, jul. 2013.

DE SOUZA, Tatiana Guinancio *et al.* **Effects of SQ109 on *Trichomonas vaginalis*.** Experimental Parasitology, v. 250, p. 108549, jul. 2023.

DEVSANI, Namrata; VEMULA, Divya; BHANDARI, Vasundhra. **The glycoprotein gp63– a potential pan drug target for developing new antileishmanial agents.** *Biochimie*, v. 207, p. 75–82, 1 abr. 2023.

DIAS-LOPES, Geovane *et al.* **Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies.** *Acta Tropica*, v. 220, p. 105956, ago. 2021.

DNDI, DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **Towards a new generation of treatments for leishmaniasis.** INFOLEISH, , 2018.

DOS SANTOS, Gabriela P.; COELHO, Adriano C.; REIMÃO, Juliana Q. **The latest progress in assay development in leishmaniasis drug discovery: a review of the available papers on PubMed from the past year.** *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 20, n. 2, p. 177–192, 1 fev. 2025.

ESFANDIARI, Frideh *et al.* **Comparison of camel, dog and the laboratory animals' sera with the fetal calf serum (FCS) for cultivation of *Leishmania major*.** *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, v. 44, n. 2, p. 299–304, jun. 2020.

ESPINOSA, O. A. *et al.* **An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*.** *Parasitology*, v. 145, n. 4, p. 430–442, abr. 2018.

FERREIRA, Bianca *et al.* **Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: In vitro and in vivo characterization of a Brazilian clinical isolate.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 5, p. e0012175, 2024.

FIDALGO, Lianet Monzote; GILLE, Lars. **Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs.** *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, nov. 2011.

FIEBIG, Michael; KELLY, Steven; GLUENZ, Eva. **Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates.** *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 10, p. e1005186, 9 out. 2015.

FRÉZARD, Frédéric *et al.* **Liposomal Amphotericin B for Treatment of Leishmaniasis: From the Identification of Critical Physicochemical Attributes to the Design of Effective Topical and Oral Formulations.** *Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 99, 28 dez. 2022.

GARCIA, A. R. *et al.* **Anti-*Leishmania amazonensis* Activity, Cytotoxic Features, and Chemical Profile of *Allium sativum* (Garlic) Essential Oil.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 7, 2023.

GIRAUD, Emilie *et al.* **Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission.** *Communications Biology*, v. 2, n. 1, p. 84, 28 fev. 2019.

GLUENZ, Eva *et al.* **Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella.** *Methods in cell biology*, v. 127, p. 509–542, 2015.

GONÇALVES-SANTOS, Elda *et al.* **Pharmacological potential of new metronidazole/eugenol/dihydroeugenol hybrids against *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo.** *International Immunopharmacology*, v. 121, p. 110416, ago. 2023.

GOPU, Boobalan *et al.* **Insights into the drug screening approaches in leishmaniasis.** *International Immunopharmacology*, v. 114, p. 109591, 1 jan. 2023.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 8, n. 4, p. 419–433, abr. 2010.

GOYZUETA-MAMANI, Luis Daniel *et al.* **Targeting *Leishmania infantum* Mannosyl-oligosaccharide glucosidase with natural products: potential pH-dependent inhibition explored through computer-aided drug design.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, 30 maio 2024.

HENDRICKX, Sarah; CALJON, Guy. **The effect of the sugar metabolism on *Leishmania infantum* promastigotes inside the gut of *Lutzomyia longipalpis*: A sweet relationship?** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 4, p. e0010293, 6 abr. 2022.

HOWELL, J. *et al.* **Analysis of the *Leishmania mexicana* promastigote cell cycle using imaging flow cytometry provides new insights into cell cycle flexibility and events of short duration.** *PLoS ONE*, v. 19, n. 10 October, 2024.

HUGHES, Kristelle *et al.* **The Antileishmanial Activity of Eugenol Associated with Lipid Storage Reduction Rather Than Membrane Properties Alterations.** *Molecules*, v. 28, n. 9, p. 3871, jan. 2023.

ISLAMUDDIN, Mohammad; SAHAL, Dinkar; AFRIN, Farhat. **Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 74–85, 2014.

JAIN, Surbhi *et al.* **Metabolic Pathways of *Leishmania* Parasite: Source of Pertinent Drug Targets and Potent Drug Candidates.** *Pharmaceutics*, v. 14, n. 8, p. 1590, 30 jul. 2022.

JARA, Marlene *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, jan. 2022.

JEYAKUMAR, G. Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. **Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*.** *Journal of Herbal Medicine*, v. 26, p. 100406, 1 abr. 2021.

KAUFER, Alexa *et al.* **The evolution of trypanosomatid taxonomy.** *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 287, 8 jun. 2017.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. **Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–615, ago. 2011.

KOUTSONI, Olga S.; KARAMPETSOU, Kalliopi; DOTSIKA, Eleni. **In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> and SI Values.** *Bio-protocol*, v. 9, n. 21, p. e3410, 5 nov. 2019.

LEROUX, Marine *et al.* **Fatty Acid Composition and Metabolism in *Leishmania* Parasite Species: Potential Biomarkers or Drug Targets for Leishmaniasis?** International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 5, p. 4702, 28 fev. 2023.

MARCHESE, Anna *et al.* **Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint.** Critical Reviews in Microbiology, v. 43, n. 6, p. 668–689, 2 nov. 2017.

MARTINEZ, Pedro A.; PETERSEN, Christine A. **Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms.** Immunologic research, v. 59, n. 0, p. 153–165, ago. 2014.

MCCONVILLE, Malcolm J. *et al.* ***Leishmania* carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine?** F1000Research, v. 4, p. 938, 1 out. 2015.

MCMAHON-PRATT, Diane; ALEXANDER, James. **Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?** Immunological Reviews, v. 201, n. 1, p. 206–224, 2004.

MENDES, Edinéia Pastro *et al.* **Evaluation of Novel Chalcone-Thiosemicarbazones Derivatives as Potential Anti-*Leishmania amazonensis* Agents and Its HSA Binding Studies.** Biomolecules, v. 9, n. 11, p. 643, 23 out. 2019.

MICHELS, Paul A. M.; GINGER, Michael L.; ZILBERSTEIN, Dan (ORGS.). **Trypanosomatids: Methods and Protocols.** New York, NY: Springer US, 2020. v. 2116

MICHIELETTO, Davide. **Kinetoplast DNA: a polymer physicist's topological Olympic dream.** Nucleic Acids Research, v. 53, n. 2, p. gkae1206, 27 jan. 2025.

MIGUEL, Danilo C. *et al.* **Heme Uptake Mediated by LHR1 Is Essential for *Leishmania amazonensis* Virulence.** Infection and Immunity, v. 81, n. 10, p. 3620–3626, out. 2013.

MOHAMADI, Neda *et al.* **In Vitro Anti-Leishmanial Activity and Molecular Docking of Eugenol as a Potential Agent Against *Leishmania major*.** Acta Parasitologica, v. 70, n. 4, p. 147, 7 jul. 2025.

MURAILLE, Eric; LEO, Oberdan; MOSER, Muriel. **Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism?** Frontiers in Immunology, v. 5, p. 603, 26 nov. 2014.

MUXEL, Sandra Marcia *et al.* **Metabolomic Profile of BALB/c Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*: Deciphering L-Arginine Metabolism.** International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 24, p. 6248, 11 dez. 2019.

NAYAK, Archana *et al.* **A defined medium for *Leishmania* culture allows definition of essential amino acids.** Experimental Parasitology, v. 185, p. 39–52, fev. 2018.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

NISAR, Muhammad Farrukh *et al.* **Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2021, p. 2497354, 3 ago. 2021.

OLIVEIRA, Simone S. C. *et al.* **Susceptibility of *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes to the Calpain Inhibitor MDL28170.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 11, p. 259, 31 out. 2024.

OLIVEIRA, Thamara K. F. *et al.* ***Leishmania infantum* Axenic Amastigotes Induce Human Neutrophil Extracellular Traps and Resist NET-Mediated Killing.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 7, p. 336, 25 jun. 2023.

PACAKOVA, Lenka *et al.* **Three types of *Leishmania mexicana* amastigotes: Proteome comparison by quantitative proteomic analysis.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 9 nov. 2022.

PASSERO, Luiz Felipe Domingues *et al.* **Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 15, p. 1275–1286, 2018.

PELOZO, Mônica Fraccarolli *et al.* **Synthesis of new trypanocidal agents from the hybridisation of metronidazole and eugenol analogues.** *Bioorganic Chemistry*, v. 146, p. 107288, maio 2024.

PERDOMO, Cintya *et al.* **Preclinical Studies in Anti-Trypanosomatidae Drug Development.** *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 7, p. 644, 5 jul. 2021.

PICCICA, Matteo *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, 27 ago. 2021.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 12, p. e0006052, dez. 2017.

PRAMANIK, Pijush Kanti *et al.* **Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 18, p. 1–11, set. 2019.

RAMÍREZ, Juan David *et al.* **Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study.** *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 28266, 22 jun. 2016.

ROSA, Leticia B. *et al.* **A “Golden Age” for the discovery of new antileishmanial agents: Current status of leishmanicidal gold complexes and prospective targets beyond the trypanothione system.** *ChemMedChem*, v. 16, n. 11, p. 1682–1696, 7 jun. 2021.

SACKS, David L. ***Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Microreview.** *Cellular Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 189–196, abr. 2001.

SAHA, Baibaswata *et al.* **Conundrums in leishmaniasis.** *Cytokine*, v. 145, p. 155304, set. 2021.

SAKI, Jasem; BIRANVAND, Elaheh; ARJMAND, Reza. **The in vitro anti-*Leishmania* Effect of *Zingiber officinale* Extract on Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*.** *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, v. 46, n. 2, p. 91–96, 23 maio 2022.

SANTARÉM, Nuno *et al.* **The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity.** *Parasitology*, v. 141, n. 2, p. 192–205, fev. 2014.

SAROUÉY, Lima Asgharpour *et al.* **Evaluating the Effect of Cinnarizine on Promastigotes and Amastigotes forms of *Leishmania major*.** *Infectious Disorders Drug Targets*, v. 20, n. 4, p. 550–555, 2020.

SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E. **Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, p. 1296, jun. 2017.

SERAFIM, Tiago Donatelli *et al.* ***Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 9, p. e1833, 2012.

SETTE, Kamila M. *et al.* **Meliponini Geopropolis Extracts Induce ROS Production and Death in *Leishmania amazonensis* Promastigotes and Axenic Amastigotes In Vitro.** *Biology*, v. 14, n. 2, p. 162, 6 fev. 2025.

SIFONTES-RODRÍGUEZ, Sergio *et al.* **Detergent-free parasite transformation and replication assay for drug screening against intracellular *Leishmania* amastigotes.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 215, p. 106847, 1 dez. 2023.

SILVA-MOREIRA, Anna Luiza *et al.* **New insights into the life cycle, host cell tropism, and infection amplification of *Leishmania* spp.** *Infection and Immunity*, v. 93, n. 7, p. e00123-25, 13 jun. 2025.

SOMARATNE, Vijani N. *et al.* **Randomized, double-blind study on intralesional metronidazole versus intralesional sodium stibogluconate in *Leishmania donovani* cutaneous leishmaniasis.** *The Journal of Dermatological Treatment*, v. 30, n. 1, p. 87–91, fev. 2019.

SUN, Lu *et al.* **Rapid Antimicrobial Susceptibility Test of *Helicobacter pylori* to Metronidazole via Single-Cell Raman Spectrometry.** *Helicobacter*, v. 29, n. 5, p. e13136, 2024.

TOM, Anns *et al.* **Interactions between *Leishmania* parasite and sandfly: a review.** *Parasitology Research*, v. 123, n. 1, p. 6, 6 dez. 2023.

TORRES-GUERRERO, Edoardo *et al.* **Leishmaniasis: a review.** *F1000Research*, , 26 maio 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-750>>. Acesso em: 31 jul. 2025

ULIANA, Silvia R. B.; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. **Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges.** *Parasitology*, v. 145, n. 4, p. 464–480, abr. 2018.

ULLAH, Ghafoor; SALEEM, Tariq; ALI, Farhad. **The efficacy of intralesional metronidazole compared to intralesional glucantime in the therapeutic therapy of cutaneous leishmaniasis.** *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, v. 32, n. 2, p. 348–352, 1 jun. 2022.

UPADHYAY, Akanksha *et al.* **Synthesis, Biological Evaluation, Structure-Activity Relationship, and Mechanism of Action Studies of Quinoline-Metronidazole Derivatives**

**Against Experimental Visceral Leishmaniasis.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, n. 11, p. 5655–5671, 13 jun. 2019.

VAN DEN BOGAART, Erika *et al.* **Phagocytosis of hemozoin by RAW 264.7 cells, but not THP-1 cells, promotes infection by *Leishmania donovani* with a nitric oxide-independent mechanism.** *Parasitology International*, v. 66, n. 2, p. 196–206, 1 abr. 2017.

VERMEERSCH, Marieke *et al.* **In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, set. 2009.

WHO. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 jul. 2025.

YASMIN, Hadida *et al.* **Host–Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies.** *Immuno*, v. 2, n. 1, p. 218–254, mar. 2022.

ZILBERSTEIN, Dan. **Lysosome Sensing Is a Key Mechanism in *Leishmania* Intracellular Development.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 667807, 7 maio 2021.

ZILBERSTEIN, Dan; NITZAN KOREN, Roni. **Host-Free Systems for Differentiation of Axenic *Leishmania*.** *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, v. 1971, p. 1–8, 2019a.

ZULFIQAR, Bilal; AVERY, Vicky. M. **Assay development in leishmaniasis drug discovery: a comprehensive review.** *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 17, n. 2, p. 151–166, 1 fev. 2022.