



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fernanda da Silva

**FÁRMACOS ANTILEISHMANIAIS: ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA E MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE
USNATO COM ÍONS LANTANÍDEOS E DROGAS DE REFERÊNCIA**

CAMPO GRANDE

2025

Fernanda da Silva

**FÁRMACOS ANTILEISHMANIAIS: ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA E MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE
USNATO COM ÍONS LANTANÍDEOS E DROGAS DE REFERÊNCIA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas, no programa de Pós-Graduação em Farmácia. Na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Prof. Dr^a. Carla Cardozo Pinto de Arruda.

Coorientadora: Prof. Dr^a. Adriana Pereira Duarte

CAMPO GRANDE

2025

Fernanda da Silva

**FÁRMACOS ANTILEISHMANIAIS: ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA E MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE
USNATO COM ÍONS LANTANÍDEOS E DROGAS DE REFERÊNCIA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas, no programa de Pós-Graduação em Farmácia. Na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Banca avaliadora

Presidente: Prof. Dr^a. Carla Cardozo Pinto de Arruda. -Orientador, UFMS

Examinador Interno: Prof. Dr^a. Thalita Bachelli Riul

Examinador Externo: Prof. Dr^a. Marcos Antonio Utrera Martines

Examinador Interno: Prof. Dr^a. Alda Maria Teixeira Ferreira

Suplente

Examinador Interno: Prof. Dr^a. Aline Etelvina Casaril Arrua

Examinador Interno: Prof. Dr^a. Eliane Mattos Piranda

CAMPO GRANDE

2025

Dedico este trabalho a todas as pessoas maravilhosas que Deus me apresentou durante este percurso de muito aprendizado...

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir o dom do aprendizado e a graça da sabedoria. Por sempre abrir os caminhos e colocar pessoas necessárias para alcançar mais esse objetivo.

À minha família e em especial meu marido Thiago, por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis apesar da ausência e dos muitos compromissos.

Em especial à minha orientadora, Carla Cardozo, que confiou mais uma vez em mim e me orientou com muito carinho e compreensão, pelo melhor caminho.

Às minhas amigas Amarith e Estela, que me ajudaram nas etapas do desenvolvimento desse trabalho, com muitas risadas e companheirismo.

À toda Família Parasito, em especial a Natália, por toda a ajuda técnica em todas as etapas do trabalho.

Ao meu amigo Rafael por toda ajuda nas últimas etapas do trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Biofisiofarmacologia, em especial à Profa. Mônica Kadri e minha colega Veruska, pela colaboração nas análises.

Ao Laboratório de Química, em especial a Prof. Adriana, pela doação das amostras de complexos de lantanídeos.

Ao LabImunoBio (Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios), em especial a Prof. Alda pela parceria e ensinamentos durante as análises.

Aos mestres grandiosos que compartilharam seus conhecimentos durante as disciplinas e orientações durante o trabalho, em especial a Prof. Thalita.

Ao meu querido ex-gerente Valdir Almeida, que durante esses anos me deu todo o apoio para continuar a minha caminhada.

À FUNDECT e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Em geral a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho.

“Feliz o Homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento, porque a sabedoria vale mais do que prata, e dá mais lucro que o ouro.”

(Provérbios 3, 13-14)

RESUMO

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania* sp. e endêmicas em diversos países, incluindo o Brasil, onde representam um grave problema de saúde pública. A necessidade de hospitalização e as reações adversas provocadas pelos medicamentos trazem limitações à adesão ao tratamento e ao sucesso terapêutico, resultando em numerosas reincidências e até mesmo óbitos. As espécies causadoras das leishmanioses estão associadas a um amplo espectro de formas clínicas, o que impacta no tempo de diagnóstico. *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* é uma das principais espécies encontradas nas Américas. Ela apresenta diferentes fenótipos de infecciosidade, podendo ocasionar desde lesão cutânea localizada (Leishmaniose Cutânea, LC), até lesões disseminadas e, em casos mais graves, visceralização. Estudos anteriores utilizando o ácido úsnico mostraram resultados eficazes e promissores contra espécies de *Leishmania* sp. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antileishmania do usnato de sódio (forma solúvel do ácido úsnico - SAU) complexado aos íons lantanídeos Lantânio- La(III), Neodímio- Nd(III), Gadolínio- Gd(III), Térbio- Tb(III), Európio- Eu(III) e Samário- Sa(III) e esclarecer seus possíveis mecanismos de ação leishmanicida. Adicionalmente, objetivou-se analisar o comportamento “in vitro” de três cepas de *L. amazonensis* frente aos fármacos de referência utilizados na prática clínica, sendo duas cepas isoladas de pacientes - uma de um caso de LC e outra de um caso clínico de leishmaniose visceral (LV) - e uma cepa de referência. Os complexos de lantanídeos foram altamente ativos contra as formas promastigotas ($CI_{50} < 1,50 \mu M$) e amastigotas intracelulares ($CI_{50} < 7,52 \mu M$). Os complexos $EuL_3 \cdot 3H_2O$ ($CI_{50}=2,98 \mu M$; índice de seletividade, $IS=6,73$) e $NdL_3 \cdot 3H_2O$ ($CI_{50}=2,83 \mu M$; $IS=6,97$) apresentaram as maiores atividades, com maior seletividade sobre a forma amastigota. Na investigação do mecanismo leishmanicida, foi detectado o aumento da liberação de óxido nítrico (NO) pelas células infectadas com *L. amazonensis* e tratadas com $EuL_3 \cdot 3H_2O$ ($6,25 \mu g/mL$), podendo este ser um dos mecanismos envolvidos. Foram detectadas alterações no potencial de membrana mitocondrial nos parasitos tratados com $SmL_3 \cdot 4H_2O$ e $GdL_3 \cdot 2H_2O$, sugerindo que os lantanídeos complexados com o usnato de sódio podem potencializar sua ação antileishmania, tendo como principal alvo as mitocôndrias do parasito. Em relação à eficácia dos medicamentos de referência sobre as diferentes cepas de *L. amazonensis*, destaca-se a alta atividade da Anfotericina B sobre ambas as formas evolutivas dos parasitos. A atividade da pentamidina se destacou sobre a cepa MHOM/BR/2022/LV045_22 ($CI_{50}= 0,0429 \mu M$), isolada do indivíduo com LV, evidenciando o potencial da pentamidina na investigação de tecnologias voltadas à redução dos efeitos adversos, a fim de otimizar o tratamento.

Palavras-chave: Complexos lantanídeos, *Leishmania amazonensis*, ácido úsnico, potencial de membrana mitocondrial, cepas isoladas de pacientes, drogas de referência.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of infectious, parasitic diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* sp. These diseases are endemic in several countries, including Brazil, where they pose a significant public health threat. The complexity of the disease, characterized by its diverse clinical manifestations, poses a substantial challenge in the diagnosis and treatment of leishmaniasis. Adherence to treatment regimens is hindered by adverse reactions to medications, which can lead to therapeutic failure, recurrent infections, and even fatal outcomes. *Leishmania (L.) amazonensis*, a prominent species in the American continent, exhibits diverse infectivity phenotypes, manifesting as anything from localised cutaneous lesions (Cutaneous Leishmaniasis, CL) to disseminated lesions, and, in more severe cases, visceralization. Previous studies using usnic acid have shown effective and promising results against species of *Leishmania* sp. The aim of this study was to evaluate the anti-leishmanial action of sodium usnate (soluble form of usnic acid - SAU) complexed with the lanthanide ions lanthanum - La(III), neodymium - Nd(III), gadolinium - Gd(III), terbium - Tb(III), europium - Eu(III) and samarium - Sm(III) and to clarify their possible mechanisms of leishmanicidal action. In addition, the aim was to analyse the in vitro behaviour of three strains of *L. amazonensis* against the reference drugs used in clinical practice, two strains isolated from patients - one from a case of CL and the other from a clinical case of visceral leishmaniasis (VL) - and one reference strain. The lanthanide complexes were highly active against promastigote forms ($IC_{50} < 1.50 \mu M$) and intracellular amastigotes ($IC_{50} < 7.52 \mu M$). The $EuL_3 \cdot 3H_2O$ ($IC_{50} = 2.98 \mu M$; selectivity index, $SI=6.73$) and $NdL_3 \cdot 3H_2O$ ($IC_{50} = 2.83 \mu M$; $SI=6.97$) complexes showed the highest activities, with greater selectivity in amastigote forms. In the course of investigating the mechanism of leishmanicidal action, an increase in the release of nitric oxide (NO) was detected in cells infected with *L. amazonensis* and treated with $EuL_3 \cdot 3H_2O$ ($6.25 \mu g/mL$). This finding suggests that this may be one of the mechanisms involved. Furthermore, alterations in mitochondrial membrane potential were evident in parasites exposed to $SmL_3 \cdot 4H_2O$ and $GdL_3 \cdot 2H_2O$, suggesting that lanthanides complexed with sodium usnate can enhance their anti-leishmania activity, with the parasite's mitochondria serving as the primary target. With respect to the efficacy of the reference drugs on the various strains of *L. amazonensis*, it is noteworthy that Amphotericin B exhibited high activity against both evolutionary forms of the parasites. Pentamidine demonstrated notable activity against the MHOM/BR/2022/LV045_22 strain ($IC_{50} = 0.0429 \mu M$), which was isolated from a patient with visceral leishmaniasis (VL), underscoring the potential of pentamidine in the development of technologies aimed at mitigating adverse effects to enhance treatment efficacy.

Keywords: Lanthanide complexes, *Leishmania amazonensis*, usnic acid, membrane potential, apoptosis, reference drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS

AnfoB - Anfotericina B

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde

LC - Leishmaniose Cutânea

LV - Leishmaniose Visceral

LM - Leishmaniose Mucosa

LD - Leishmaniose Difusa

OMS - Organização Mundial de Saúde

RNA - Ácido ribonucleico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Cl₅₀ - Concentração inibitória de 50%

IM - Intramuscular

IV - Intravenosa

NO- Óxido nítrico

IS- Índice de seletividade

NRF2- Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> sp.....	16
Figura 2. Estrutura química do Antimoniato de <i>N</i> -metil glucamina.....	26
Figura 3. Estrutura química da Anfotericina B.....	28
Figura 4. Estrutura química da miltefosina.....	31
Figura 5. Líquens de <i>Usnea longissima</i> e ácido úsnico.....	33
Figura 6. Íons lantanídeos complexados com o usnato de sódio.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais recomendações da OMS para o tratamento das leishmanioses nas Américas baseado nas diretrizes publicadas em 2022.....	23
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica:

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.2 Leishmanioses	14
1.2.1 Leishmaniose visceral.....	16
1.2.2 Leishmaniose cutânea e mucocutânea.....	17
1.2.3. Imunopatogenia da leishmaniose cutânea	19
1.2.4 Fatores de virulência de <i>L. (L.) amazonensis</i>	20
1.3 Epidemiologia das Leishmanioses.....	21
1.4 Tratamentos	22
1.4.1 N-metil glucamina (Glucantime®)	25
1.4.2 Anfotericina B.....	27
1.4.3 Paromomicina	29
1.4.4 Pentamidina.....	30
1.4.5 Miltefosina	30
2.0 Ácido úsnico.....	32
3.0 Lantanídeos.....	34
4.0 Técnicas para detecção da morte celular.....	35
5. OBJETIVOS	
5.1. Objetivo Geral.....	39
5.2. Objetivos específicos.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO II:	
ARTIGO 1- Antileishmanial Activity, Toxicity and Mechanism of Action of Complexes of Sodium Usnate with Lanthanide Ions: Eu(III), Sm(III), Gd(III), Nd(III), La(III) and Tb(III).....	46
CAPÍTULO III:	
Artigo 2- Exploring Drug Resistance: A Comparative Analysis of Drug Action Between a Reference Strain and Clinical Isolates of <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	67
Perspectivas finais.....	77

CAPÍTULO I: Fundamentação teórica

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) representam um grupo de enfermidades com alta prevalência em países tropicais, atingindo 1,7 bilhões de pessoas em 150 países, onde afetam principalmente pessoas mais vulneráveis economicamente. Essas doenças possuem sintomatologia aguda e crônica, muitas são zoonóticas e potencialmente fatais (Gyorkos et al., 2023). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no período de 2000-2019, o Brasil registrou uma elevada taxa de mortalidade por DTNs, com a região Centro-Oeste apresentando a maior taxa letalidade, alcançando 8,68 óbitos a cada 100 mil habitantes. Dentre as DTNs, a leishmaniose foi a 4ª doença com maior letalidade no Brasil, atingindo principalmente crianças e jovens de 0-19 anos (46,4%) (Rocha et al., 2023).

Desde 2016, a OPAS apoia medidas de controle contra as DTNs, porém, em 2019, o programa sofreu intercorrências devido à pandemia da COVID-19, como o impedimento de pesquisas e da administração de tratamentos em massa (OPAS, 2024). Com o apoio da OPAS, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou novo plano de ação, tendo como meta até 2030 eliminar as leishmanioses como problema de saúde pública. Para isso, é necessário a implementação de medidas voltadas à contenção da disseminação da doença, tais como o controle vetorial, diagnóstico rápido e eficiente, além da melhora no tratamento clínico e maior acesso aos medicamentos (WHO, 2020; OPAS, 2024).

As leishmanioses são DTNs causadas por diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, tendo como manifestações clínicas principais a forma cutânea, de maior prevalência, e a forma visceral, sistêmica e de maior letalidade (OPAS, 2022). Os medicamentos disponíveis para o tratamento são, principalmente, os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina. Com exceção da miltefosina, esses medicamentos dependem de administração ambulatorial, e que, aliado às possíveis reações adversas, dificulta ainda mais a adesão ao tratamento. Além de todas as opções apresentarem um alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS) (OPAS, 2022; Santiago; Pita; Guimarães, 2021). Desta forma, a pesquisa

de novas opções terapêuticas com menor toxicidade, menor custo e com administração simplificada é de extrema importância para otimizar o tratamento das leishmanioses

O ácido úsnico é um composto metabólito sintetizado pelos líquens, que são organismos de origem simbiótica (interação entre fungo e alga ou cianobactéria). Os líquens são encontrados em várias regiões do mundo, onde possibilitou a pesquisa de seus metabólitos secundários, como o ácido úsnico que apresentou atividades farmacológicas, como a ação antiproliferativa sobre células tumorais e a antiprotozoária contra *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* (De Carvalho et al., 2005; Da Luz et al., 2015; Krajka-Kuźniak et al., 2021; Wang et al., 2022). A ação antiprotozoária também foi atribuída a íons lantanídeos (Lantânio, Európio, Térbio e Érbio) complexados à triazolopirimidina, com resultados significativos e alta seletividade contra *L. infantum*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* (Caballero et al., 2014).

Os íons lantanídeos são elementos de transição interna com características eletrônicas e físico-químicas exclusivas, como a fluorescência, condutividade elétrica e magnetismo, além de importantes propriedades farmacológicas já descobertas. A fim de permitir melhor biodisponibilidade de suas aplicações biológicas, sua complexação a outras moléculas se torna necessária (Joseph e Cotruvo, 2019).

Nesse contexto, Nunes e colaboradores (2020) realizaram a complexação entre íons lantanídeos e o ácido úsnico a fim de potencializar as funções farmacológicas de ambas as moléculas, obtendo resultados promissores contra células tumorais responsáveis pelo câncer de mama (0162-MCF7). Desta forma surgiu o interesse em novos testes utilizando esses complexos lantanídeos, principalmente em relação à atividade antileishmania.

Além da verificação da atividade, é fundamental o esclarecimento do mecanismo de ação sobre os parasitos estudados. Os principais mecanismos de ação leishmanicida analisados em testes “in vitro” são relacionados ao estresse oxidativo e alterações na estrutura do parasito, como a da permeabilidade de membrana e funcionalidade mitocondrial (Carneiro et al., 2016; Arruda et al. 2020).

Leishmania (Leishmania) amazonensis possui a capacidade de causar diferentes manifestações clínicas, como leishmaniose cutânea, difusa e

disseminada, além de alguns casos de leishmaniose visceral (PAHO, 2019; Porto et al., 2022).

Mediante o exposto, a investigação exaustiva da atuação das drogas já utilizadas na rotina do tratamento contra as leishmanioses é fundamental para subsidiar novas pesquisas com futuras moléculas promissoras (Zulfiqar; Shelper; Avery, 2017).

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infectoparasitárias ocasionadas por 22 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* spp. pertencentes à Família Trypanosomatidae e agrupadas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. O ciclo biológico desse protozoário envolve a participação de um inseto vetor (flebotomíneo), com a presença de duas formas evolutivas distintas: a promastigota, que é extracelular, fusiforme (20-30µm) e flagelada, permitindo sua mobilidade no intestino do vetor; e a forma amastigota, que é intracelular, oval ou esférica (2-5 µm), desprovida de flagelo livre. Ambas as formas apresentam o cinetoplasto evidente, uma característica da família dos tripanossomatídeos, que contém material genético mitocondrial (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024).

Os vetores responsáveis pela transmissão de *Leishmania* sp. são os flebotomíneos fêmeas, hematófagos, devido à necessidade de maturação dos ovos. Pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae, sendo popularmente chamados de “tatuquira”, “asa branca”, “birigui” ou “mosquito-palha” (Burza; Croft; Boelaert, 2018). O gênero *Lutzomyia* sp. é o principal responsável pela transmissão desse parasito nas Américas, sendo a espécie *Lu. longipalpis* a mais prevalente no Brasil (Costa et al., 2019; De Souza Fernandes et al., 2022).

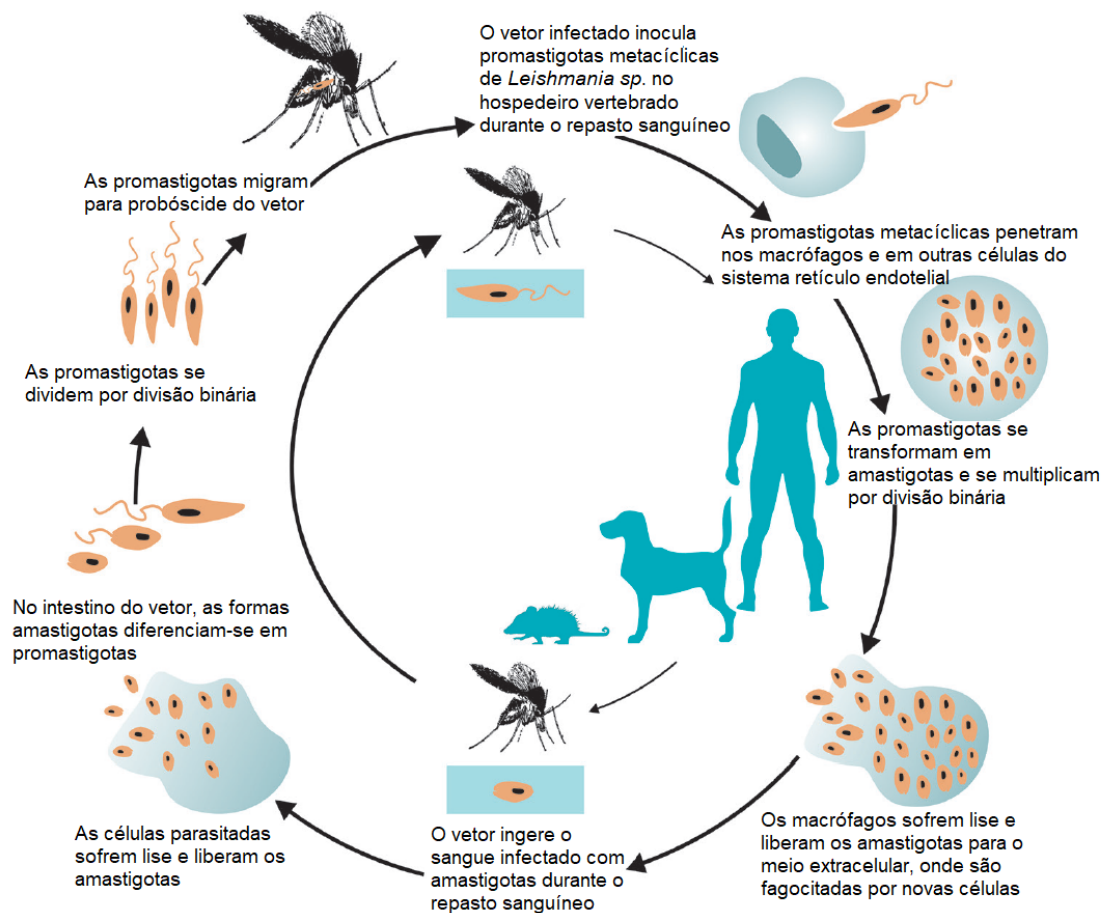
A forma promastigota é a encontrada no intestino do vetor, onde depois de alguns estágios de diferenciação, torna-se metacíclica, forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo do vetor, as formas promastigotas penetram na pele do hospedeiro vertebrado (mamífero) e rapidamente infectam os macrófagos no sítio de infecção, diferenciando-se em formas amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (figura-1). A multiplicação do

parasito ocorre por divisão binária até haver o rompimento celular e a infecção de novas células, ocorrendo a continuidade do ciclo biológico. Com o avanço da carga parasitária no hospedeiro há possibilidade de novos vetores serem infectados, através da ingestão do sangue periférico contendo as células parasitadas durante um novo repasto sanguíneo. No intestino do vetor, as formas amastigotas são diferenciadas novamente em promastigotas, onde também se multiplicam por divisão binária até se tornarem metacíclicas, com maior infectividade e mobilidade para migrar até a probóscide do vetor e haver uma nova transmissão (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024).

As características zoonóticas do Novo Mundo dificultam a implantação de medidas eficazes contra a transmissão do parasito. A alimentação dos flebotomíneos não é restritiva, portanto, temos a possível infecção de vários mamíferos além dos humanos. Animais silvestres e domésticos como os cães, gatos e roedores são chamados de hospedeiros/reservatórios na Américas, ou seja, são os responsáveis pela infecção dos vetores, por serem mais acessíveis (Baneth e Solano-Gallego, 2022; Maia et al., 2022; Sapaterra et al., 2022).

O aumento do número de cães infectados serve como um indicador do avanço de casos em humanos. Entretanto, o tratamento de cães domésticos não é considerado uma medida eficaz de controle de saúde pública, uma vez que não se pode garantir o impedimento da infecção pelo vetor. Portanto, ações de educação em saúde para o controle do vetor e medidas preventivas são de extrema urgência para o controle da infecção (MS, 2023).

Figura 1- Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* sp.



Fonte: Manual de procedimentos para vigilância e controle da leishmaniose na Região das Américas (PAHO, 2024).

1.2.1 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave e sistêmica da doença. Nas Américas, no Oriente Médio, na Bacia do Mediterrâneo e na China é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*; já na África Oriental, Índia e Nepal, a *L. donovani* é a espécie prevalente. Na LV, a disseminação é hematogênica, afetando células do sistema mononuclear fagocitário dos linfonodos, medula óssea, baço e fígado, dentre outros órgãos (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Van Griensven e Diro, 2019).

O período de incubação na LV varia de duas semanas a dois meses, com manifestações clínicas que podem ser leves, moderadas ou graves. No início, os sintomas são facilmente confundidos com outros processos infecciosos,

devido à presença de febre constante ou irregular e esplenomegalia discreta. Na maioria dos casos, observa-se hepatomegalia, linfadenopatia com nódulos firmes e móveis geralmente disseminados, porém indolores ao toque, além de palidez mucocutânea, anemia severa e perda de peso gradual e progressiva (PAHO, 2024).

Muitos hospedeiros permanecem assintomáticos ou subclínicos, porém alguns indicadores estão associados aos casos mais graves. Como pacientes menores de 5 anos e maiores que 50 anos, com comorbidades e principalmente coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OPAS, 2022).

Os pacientes imunocomprometidos não apresentam sintomatologia clássica, raramente apresentam hepatoesplenomegalia e febre, enquanto sintomas gastrointestinais são mais comuns e intensos. No Brasil, a coinfeção do vírus HIV e espécies de *Leishmania* sp. representa 17% dos casos de LV. A susceptibilidade desses pacientes a infecções oportunistas dificulta ainda mais o diagnóstico precoce da leishmaniose, tornando o prognóstico desses pacientes mais desafiador (OPAS, 2024; Lindoso et al., 2018).

O exame clínico geralmente é complementado por exames laboratoriais para a confirmação diagnóstica. A técnica padrão-ouro é a visualização das formas amastigotas, na análise direta do tecido, ou na observação de formas promastigotas, em cultivo axênico. No entanto, o material analisado é obtido por meio de procedimentos invasivos que requerem mão de obra especializada, como aspiração de medula óssea, aspirados de linfonodos e biópsias de baço ou fígado (Van Griensven e Diro, 2019).

Os métodos sorológicos também são utilizados na prática diagnóstica, como os ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta); entretanto, dependem da resposta humoral específica do hospedeiro. Já os testes moleculares possuem maior sensibilidade e exatidão, porém são mais onerosos, tornando a busca por testes rápidos com maior sensibilidade e baixo custo ainda mais intensa (Van Griensven e Diro, 2019; Kumar; Pandey; Samant, 2020).

1.2.2. Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea

A Leishmaniose Cutânea (LC) se desenvolve clinicamente na pele do hospedeiro a partir do local da picada do flebotomíneo, iniciando-se como uma pápula e evoluindo na forma de nódulos ou feridas ulceradas (Burza; Croft; Boelaert, 2018). No Brasil, sete espécies do parasito podem causar LC: *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*. Entre elas, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* são as espécies mais comuns e identificadas em casos de disseminação metastática, seja via linfática ou sanguínea, característica encontrada na Leishmaniose Mucosa (LM) ou Mucocutânea (LMC) e na forma disseminada e difusa (PAHO, 2024).

O surgimento dos sinais clínicos da LC pode levar de duas semanas a dois meses após a picada do flebotomíneo, iniciando com um pequeno granuloma dérmico e evoluindo para nódulo circular e indolor, com a formação de uma crosta, que quando retirada, frequentemente sangra, e ao cair forma a úlcera clássica. Essa lesão clássica possui margens elevadas e circulares, com base endurecida e fundo granuloso, podendo haver secreções devido a infecções secundárias. Quando a infecção atinge a região auricular, a lesão pode causar mutilações das extremidades (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024).

Na LM ou LMC, quando o parasito (notadamente *L. braziliensis*) possui tropismo para mucosas da face ou há picada diretamente na região do septo nasal, a lesão evolui rapidamente para casos graves, com perda da arquitetura e da função do tecido da nasofaringe. Este processo pode levar à amputação parcial da garganta e/ou sinequias no palato mole e rinofaringe, causando deformidades que trazem transtornos psicológicos e sociais ao paciente (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024).

A forma disseminada, onde há múltiplas lesões, se inicia com lesões clássicas e provavelmente por mecanismos metastáticos se espalha por toda a extensão da pele do hospedeiro, podendo chegar a centenas de lesões. Já a difusa, encontrada no Brasil (causada principalmente por *L. amazonensis*) e países próximos, se manifesta com numerosas lesões na forma nodular, estendendo-se para todas as partes do sistema tegumentar. Essa forma clínica é grave e envolve o estado anérgico do hospedeiro, que impede a resposta adequada à infecção, podendo estar relacionada ao efeito do parasito e/ou a uma condição imunológica subjacente (PAHO, 2024).

1.2.3 Imunopatogenia da leishmaniose cutânea

A imunopatogenia da leishmaniose cutânea possui uma enorme influência na resposta clínica da infecção. A origem das diferentes formas clínicas é o resultado da relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a espécie do parasito (Carneiro e Peters, 2021).

As citocinas pró-inflamatórias desenvolvem um papel importante na imunoproteção e imunopatologia da leishmaniose cutânea (LC). Secretado pelos linfócitos T citotóxicos Th1, o interferon gama (IFN- γ) é a principal citocina envolvida no estímulo à produção de óxido nítrico (NO). Já a falta de IFN- γ está associada ao aumento da carga parasitária, lesões maiores e o desenvolvimento de resposta do tipo Th2 em infecções por *L. amazonensis* (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016).

Em infecção por *L. major*, o IFN- γ e o TNF- α (fator de necrose tumoral) possuem um efeito sinérgico no estímulo da produção de NO no macrófago. Porém sua predominância está associada ao aumento do dano tecidual no local da infecção, encontrados em casos de LC por *L. braziliensis* (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016).

Já as citocinas anti-inflamatórias como a IL-6 (interleucina-6) e TGF- β (fator de crescimento transformador beta-1) estimulam a resposta Th17 (célula T Helper 17) que produzem IL-17 (interleucina-17) e IL-10 (interleucina-10). A IL-10 inibe a ativação do macrófago e a maturação de células dendríticas, estando associada à persistência do parasito no local da infecção. Porém, por outro lado, inibe a imunopatologia exacerbada e dano tecidual após a produção de citocinas inflamatórias, facilitando a cicatrização da lesão (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016). Portanto, o equilíbrio dessas citocinas é de extrema importância para o controle do parasito e de distúrbios imunopatológicos.

Já em casos de leishmaniose cutânea difusa, a infecção por *L. amazonensis* possui algumas particularidades na expressão do IFN- γ que, por sua vez, produz quimiocinas que recrutam um número maior de monócitos para a área infectada, favorecendo o avanço da doença. Outro ponto distinto é a capacidade de adaptação do parasito aos fagolisossomos, porque enquanto outras espécies retardam a formação de enzimas lisossômicas e causam a acidificação do meio para facilitar a infecção, os parasitos de *L. amazonensis*

não possuem essa capacidade, infectando e sobrevivendo em fagolisossomos maduros (Carneiro e Peters, 2021). Deste modo, a investigação desses mecanismos imunológicos específicos se torna extremamente importante para a investigação de novos tratamentos.

1.2.4 Fatores de virulência de *L. (L.) amazonensis*

A *Leishmania amazonensis* é uma das principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea nas Américas. Esta espécie se destaca entre as mais desafiadoras de se tratar, devido à elevada incidência de recidivas. Possui potencial metastático, sendo capaz de invadir os vasos sanguíneos e linfáticos, o que resulta na disseminação da doença e na manifestação das formas clínicas atípicas como a disseminada e difusa (PAHO, 2019).

L. (L.) amazonensis pertence ao subgênero *Leishmania*, assim como *L. (L.) infantum*, espécie responsável pela forma visceral da leishmaniose no Novo e no Velho Mundo. Estudos investigam e destacam a composição de algumas proteínas comuns entre as espécies. No qual, essas características semelhantes além da resposta imune do hospedeiro resultam nos casos descritos de leishmaniose visceral, causado pela espécie *L. amazonensis*. Como o caso reportado por Porto e colaboradores (2022), onde um paciente foi diagnosticado simultaneamente com LV e linfoma de Hodgkin. E após isolamento e cultivo do parasito foi descoberto que se tratava *L. amazonensis*.

A arginase é uma enzima que desenvolve um papel essencial na replicação e sobrevivência do parasito, uma vez que converte L-arginina em ureia e L-ornitina. Por outro lado, a L-arginina é substrato para a produção de óxido nítrico (NO) pelo macrófago. A produção de NO é considerada a principal resposta do macrófago contra o parasito, induzindo à apoptose celular e desencadeando a resposta imune contra a leishmaniose. Portanto a abundância de arginase no parasito torna a competição por L-arginina decisiva para a manutenção da infecção e sobrevivência do parasito, interferindo diretamente no óxido nítrico sintase (Acuña et al., 2017; Aoki et al., 2019; Lima et al., 2020).

A glicoproteína de superfície GP63 é considerada um dos principais fatores de virulência da infecção por *Leishmania* sp. Predominante na forma

promastigota, essa glicoproteína tem a capacidade de inibir a produção de NO, retardar a maturação dos fagolisossomo, induzir a proteína quinase que aumenta o crescimento do parasito, além de potencializar a adesão e a infecção dos macrófagos. Também influencia na resistência do parasito, favorecendo a sobrevivência e a replicação intracelular (de Rezende et al., 2017).

A proteína Linj.303360 (XP-001467184.1) foi detectada em abundância semelhante em ambas as espécies, *L. amazonensis* e *L. infantum*, podendo estar associada a características comuns entre elas. Embora a função específica dessa proteína no parasito ainda não tenha sido descrita, ela se torna um alvo de interesse para a investigação de fármacos e vacinas (Souza et al., 2021).

Na procura de genes também envolvidos no potencial de virulência da *L. amazonensis* foram identificados genes relacionados ao metabolismo da heme e do ferro, presentes em espécies causadoras de leishmaniose visceral. Esses genes, que estão envolvidos na produção de proteínas A2, foram encontrados no genoma de *L. amazonensis*, apresentando semelhanças com aqueles encontrados em espécies causadoras de LV, o que pode constituir a base genética da virulência dessa espécie (Goes et al., 2023).

Outros genes analisados, sMeta 1 e Meta 2, encontrados em formas promastigotas metacíclicas, produzem aminoácidos chamados de LaLRR17, que interagem com os macrófagos GRP78 e aumentam a fagocitose das promastigotas pelas células. Essa interação foi citada anteriormente em casos de infecção fúngica e viral (Peña et al., 2023).

Assim, a investigação desses fatores fornece informações valiosas sobre as diferenças entre as cepas, contribuindo para a pesquisa de novos fármacos, além de favorecer a compreensão da eficácia dos medicamentos utilizados em casos de resistências, para o manejo adequado das infecções por *Leishmania*.

1.3 Epidemiologia das Leishmanioses

A epidemiologia das leishmanioses está diretamente ligada aos fatores sociais e ambientais, atingindo principalmente populações com maior vulnerabilidade. Sendo infecções com participação vetorial, as condições climáticas e ecológicas contribuem para sua disseminação, tendo maior

ocorrência em países tropicais, como o Brasil. Mundialmente, as leishmanioses são endêmicas em 98 países (PAHO, 2024) e encontradas em quatro regiões: África do Sul, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático; mas principalmente nas Américas (OPAS, 2022).

Nas Américas, no período de 2001-2021, foram registrados 69.665 casos novos de LV e 1.105.50 casos entre LC e LM (OPAS, 2022). Já em 2022, foram registrados 37.890 casos da forma cutânea, enquanto para LV foram 1.834 novos casos, sendo registrados no Brasil 92% desses casos (OPAS, 2024).

Houve uma redução na notificação dos casos de LV entre 2019 e 2020, entretanto a taxa de letalidade foi a mais alta desde 2012, 9,45% (OPAS/OMS, 2022), podendo ser consequência da pandemia da COVID-19, que interferiu diretamente nos serviços de saúde e vigilância vetorial (OPAS, 2024). No Brasil, isto se refletiu na maior letalidade (9,7%) e na maior taxa de transmissão, sendo considerada intensa e presente em todas as regiões territoriais (OPAS, 2022).

Em relação à LC e LMC, em 2021, nas Américas, foram registrados 37.786 casos novos, o menor valor no período de 20 anos. No Brasil, foram identificados 15.023 casos em 2021 e 12.878 casos em 2022, sendo a maior incidência das Américas em ambos os anos. A coinfeção *Leishmania*/HIV também é uma realidade no país, representando 17% dos casos de LV em 2022 e 161 casos em 2021 com LC/HIV, tornando ainda mais problemático o diagnóstico e o tratamento (OPAS, 2022; OPAS, 2024).

Em 2022, 10,5% das notificações realizadas pelo Centro de Vigilância de Zoonoses do Brasil, foram de leishmaniose não especificada, com 1684 casos durante este ano, sendo que 105 casos foram notificados na região Centro-Oeste no país (MS, 2023). No estado de Mato Grosso do Sul, segundo a Secretaria de Saúde, foram notificados 152 casos de LV em humanos, com 12,5% de letalidade, representando 50% quando comparados ao ano de 2021. Sendo a maioria (60%) dos casos em indivíduos do sexo masculino e 28% associados com a infecção do vírus HIV (MS, 2022). Estima-se que para cada humano infectado tenha-se 200 cães com a doença (OPAS, 2022). Esse cenário se torna sinal importante para a urgência de saúde pública em medidas eficazes contra essa doença negligenciada.

1.4 Tratamentos

Em 2021, a OMS, com o apoio do OPAS, lançou um novo plano com o objetivo de eliminar as DTNs até 2030. Em relação às leishmanioses, os principais objetivos foram: eliminar a LV como problema de saúde pública, com menos de 1% de letalidade, e controlar os índices de LC com 85% de todos os casos diagnosticados e com 95% tratados (WHO, 2020). Como há uma concentração de casos nas Américas com características clínicas específicas, a OPAS, em parceria com a OMS (2022), lançou uma publicação com as diretrizes para o tratamento das leishmanioses na região.

A tomada de decisão entre os tratamentos disponíveis depende não só da patogenia existente, mas também dos fatores associados aos medicamentos, para possibilitar a adesão do paciente e reduzir efeitos adversos e tóxicos que influenciam no prognóstico da doença. A forma medicamentosa, o esquema terapêutico, a toxicidade e o custo ao paciente ou sistema de saúde tornam o tratamento das leishmanioses complexo, necessitando ainda de acompanhamento clínico durante e depois do manejo medicamentoso (OPAS, 2022).

Os medicamentos disponíveis são os antimoniais pentavalentes (Sb^V), Anfotericina B desoxicolato (AnfoB-D), Anfotericina B lipossomal (L-AnfoB), Anfotericina B em formulações lipídicas (AnfoB-FL), pentamidina, paromomicina e miltefosina (OPAS, 2022). O Sb^V está disponível desde 1940 para o tratamento das leishmanioses, sendo o antimoniato de *N*-metil glucamina o único permitido no Brasil (Carvalho et al., 2019). Já a miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi recomendada para o tratamento da LC em 2018, pela Comissão de Incorporação de Tecnologias no SUS -CONITEC (CONITEC, 2018), e apenas em 2020 foi incorporada à relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) como primeira linha de tratamento (Brasil, 2020).

A miltefosina é disponibilizada na apresentação de 10 e 50 mg em forma de cápsula como tratamento estratégico para combater os casos de LC em regiões de difícil acesso, uma vez que é o único medicamento com administração oral (CONITEC, 2018; Carvalho et al., 2019). Com base nas diretrizes estabelecidas pela OMS para o tratamento de LC, LM e LV na região das Américas (OPAS, 2022), a Tabela 1 traz as principais recomendações de condutas no tratamento.

A estratégia terapêutica deve ser comunicada de forma clara ao paciente, sendo essencial sua colaboração na manutenção da assepsia da(s) lesão(ões) em LC e no controle das manifestações clínicas associadas à LV. A identificação da espécie do parasito não é obrigatória para se iniciar o esquema terapêutico, porém a análise posterior garante o tratamento correto e reduz as recidivas (OPAS, 2022).

Tabela 1- Principais recomendações da OMS para o tratamento das leishmanioses nas Américas baseado nas diretrizes publicadas em 2022 (OPAS, 2022).

LC	Espécies		Tratamento
	Adulto	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i>	Sb ^v (Intralesional)
		<i>L. panamensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> e <i>L. braziliensis</i> .	Miltefosina (oral)
		<i>L. guyanensis</i>	Pentamidina (IM/IV)
		<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> e <i>L. mexicana</i>	Termoterapia (local)
		<i>L. panamensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. mexicana</i>	Paromomicina (tópico)
		<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. peruviana</i> e <i>L. mexicana</i>	Sb ^v (IM/IV)
	Pediátrico	<i>L. panamensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , e <i>L. braziliensis</i>	Miltefosina (oral)
		<i>L. panamensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. mexicana</i>	Paromomicina (tópico)
		LC quando nenhuma outra alternativa estiver disponível	Sb ^v (IM/IV)
	Tratamento		Contraindicações/OBS
	Gestantes	Termoterapia L-AnfoB/ AnfoB-D	Sb ^v e miltefosina são contraindicados
	Lactantes	Sb ^v intralesional/ termoterapia/ AnfoB-D	Contracepção necessária
	Alterações cardíacas	Termoterapia/ miltefosina/ L-AnfoB	Sb ^v e Pentamidina Contraindicado
	Cardíacos/ renais crônicos/hepatopatas	Tratamentos locais e L-AnfoB	Sb ^v intralesional monitorado
	HIV/ imunocomprometidos	L-AnfoB/ AnfoB-D	Em ambiente ambulatorial
	Disseminada	Anfo B lipossomal/ miltefosina/ Sb ^v	No centro de referência
	Difusa	Sb ^v /pentamidina/miltefosina	No centro de referência
	>50anos	--	Evitar Sb ^v
LM/LM C	Tratamento		Contraindicações/OBS
	Adultos/Pediátricos		Com/sem associação de pentoxifilina oral

	Gestantes	L-AnfoB/ AnfoB-D	Sb ^v , miltefosina e pentamidina são contraindicados
	Lactantes	L-AnfoB/ Sb ^v	Contracepção necessária
	Alterações cardíacas	Miltefosina/ L-AnfoB	Sb ^v e Pentamidina são contraindicados
	Cardíacos/ renais crônicos/hepatopatas	L-AnfoB	--
	HIV/ imunocomprometidos	L-AnfoB/ AnfoB-FL/ AnfoB-D	--
	>50anos	--	Evitar Sb ^v
LV		Tratamento	Contraindicações/OBS
	Adultos/Pediátricos	L-AnfoB como 1º escolha Sb ^v / AnfoB-D 2º escolha	Miltefosina não é recomendado
	HIV/ imunocomprometidos	L-AnfoB 1º escolha AnfoB-FL/ AnfoB-D 2º escolha	Sb ^v não recomendado

Antimoniais pentavalentes – Sb^v; Anfotericina B desoxicolato- AnfoB-D; Anfotericina B lipossomal- L-AnfoB; Anfotericina B em formulações lipídicas - AnfoB-FL; (--) sem recomendações; pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana- HIV; Observações- OBS.

Em pacientes imunocomprometidos, a LV requer medidas de suporte específicas, devido à sua rápida evolução clínica. Além do tratamento ser em ambiente ambulatorial, recomenda-se o acompanhamento das funções renais quando utilizadas todas as formulações de AnfoB. A profilaxia é recomendada com ressalvas, mas é uma maneira de evitar recidivas (OPAS, 2022).

Em casos de falha terapêutica, é recomendado administrar fármacos diferentes e associar tratamentos, principalmente em LC e LM, a fim de evitar possíveis resistências e garantir a eficácia terapêutica (Chakravarty e Sundar, 2019; OPAS, 2022). Em pacientes idosos, o único medicamento contraindicado é o Sb^v, devido aos efeitos colaterais cardíacos, que são identificados mais comumente em idosos. A associação da pentoxifilina em casos de LM/LMC é recomendada por haver evidências, mesmo que pequenas, de que o efeito sinérgico com o Sb^v reduz os efeitos adversos (OPAS, 2022).

1.4.1 Antimoniato de N-metil glucamina

Os antimoniais pentavalentes foram os primeiros fármacos descritos para o tratamento da Leishmaniose, em duas marcas comerciais: o Pentostan® e o Glucantime®. No Brasil, o único permitido pelo ministério da saúde é o Glucantime® produzido pelo laboratório Sanofi, disponibilizado na forma intramuscular (IM) e intravenosa (IV). Sua apresentação em ampolas de 5 mL, contendo 300 mg/mL do fármaco, disponibiliza ao organismo 81 mg/mL do antimônio pentavalente (Sb^{V}). São administrados cerca de 10-20 mg/kg de Sb^{V} durante 20-30 dias em aplicações sistêmicas e, em alguns casos clínicos, podendo ser também utilizado em aplicações intralesionais (Carvalho et al., 2019).

A toxicidade relacionada aos Sb^{V} mais conhecida é a cardíaca, trazendo transtornos como arritmias, batimentos irregulares, taquicardia e/ou fibrilação ventricular, mas outras reações colaterais são observadas, como dor, prurido e eritema no local da aplicação (Chakravarty e Sundar, 2029).

Os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos, possuindo duas moléculas com valências diferentes e, por isso, mecanismos de ação complementares: forma pentavalente (Sb^{V}) e trivalente (Sb^{III}), após metabolização. Sua função Sb^{V} é responsável por formar grupos ribossomais que inibem a topoisomerase, alterando a homeostase topológica do DNA, interrompendo o ciclo celular do parasito. Após sua oxidação, se torna Sb^{III} dentro do parasito, inibindo a tripanotiona redutase. A inibição dessa enzima, encontrada nos tripanossomatídeos, torna a sobrevivência do parasito inviável devido ao transtorno oxidativo, desencadeando mecanismos de apoptose (Moreira et al., 2017; Carvalho et al., 2019).

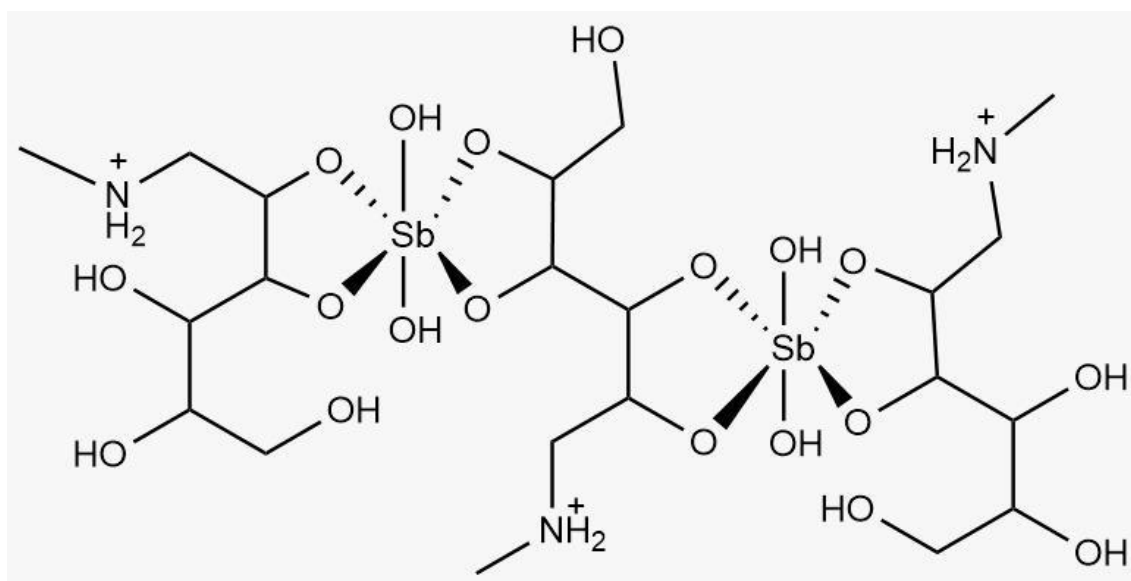
O antimônio, na sua forma trivalente, interage com outras biomoléculas como a glutatona e a cisteína, presente em nosso organismo, provocando os efeitos adversos já citados e tornando-o contraindicado durante a gestação, lactação, em casos de cardiopatia e insuficiência renal crônica (Carvalho et al., 2019).

Na farmacocinética do Sb^{V} destacamos dois pontos importantes: a absorção e a eliminação. Na absorção, sua administração parenteral potencializa a perfusão do fármaco nos tecidos, com maior dificuldade em regiões periféricas justamente onde a infecção se encontra na LC, sendo necessárias várias aplicações. Já na eliminação do fármaco na fase lenta, tem

como meia vida 24-76 horas em adultos, podendo estar associada à conversão entre as valências possibilitando a maior deposição desse fármaco principalmente no fígado, tireóide e coração (Carvalho et al., 2019).

Os antimonialis pentavalentes são considerados como fármacos de primeira escolha para LC e LM e a segunda escolha para a LV, sendo utilizado em todas as regiões endêmicas, com exceção da Índia, onde foi comprovada a resistência do parasito (Van Griensven e Viro, 2019; OPAS, 2022).

Figura 2- Estrutura química do Antimoniato de *N*-metil glucamina.



Fonte: Própria autoria.

1.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B (AnfoB) é um antifúngico utilizado no tratamento das leishmanioses, sendo considerado o fármaco mais eficaz disponível contra essa doença. Descoberto a partir da secreção produzida pela bactéria *Streptomyces nodosus*, a AnfoB tem como principal mecanismo de ação a interação com ergosterol presente na parede celular dos fungos ou do parasito. Sua molécula é composta por uma porção hidrofílica (poli hidroxila) e uma parte hidrofóbica (polieno-hidrocarboneto), sendo esta a responsável pela interação com 8 moléculas de ergosterol. Essa ligação forma poros na membrana celular do

parasito, resultando na perda de prótons e cátions monovalentes e, consequentemente, iniciando o mecanismo de apoptose (Hamill, 2013; Kip et al., 2018).

A interação da Anfotericina B desoxicolato (AnfoB-D) com o ergosterol tem uma força de ligação 10 vezes maior do que com o colesterol encontrado nas células do hospedeiro, porém há dose dependência nessa interação. Essa falta de seletividade da AnfoB-D é responsável pelos efeitos colaterais e reações adversas apresentadas como a febre, diminuição da função renal e até mesmo parada cardíaca ou cardiorrespiratória, podendo ser fatal (Brüggemann; Jensen; Lass-Flörl, 2022). Dessa forma, as aplicações são preferencialmente realizadas em pacientes hospitalizados e obrigatoriamente em casos com outras morbidades associadas, para melhor acompanhamento dos sintomas e melhor prognóstico terapêutico (OPAS, 2022).

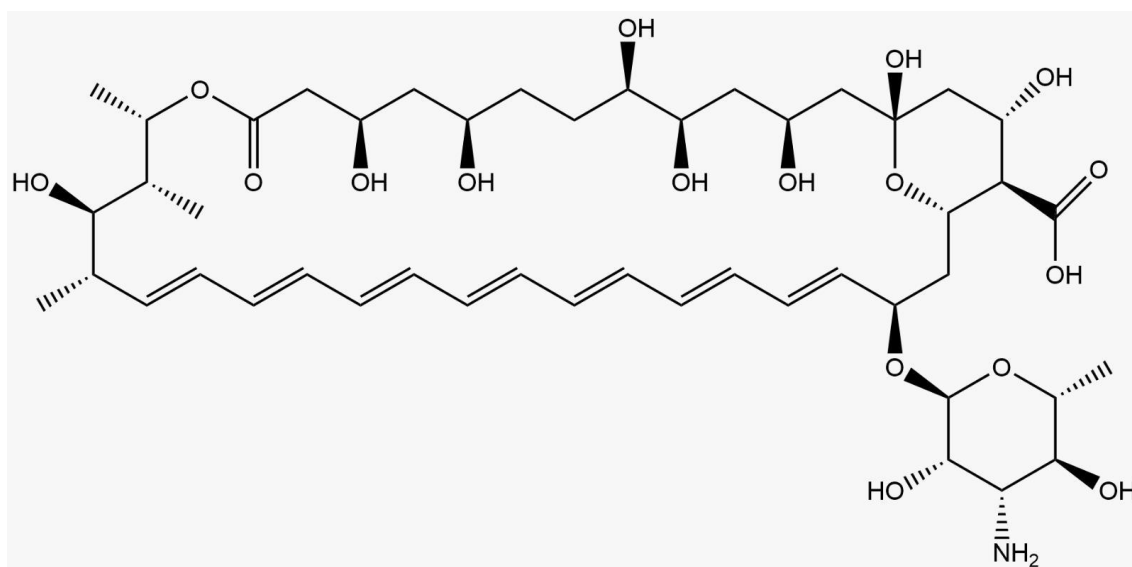
A anfotericina B lipossomal (L-AnfoB) é uma tecnologia que utiliza lipossomas unilamelares, com a presença de colesterol, para proporcionar estabilidade à AnfoB - que fica dentro dessa bicamada lipossomal, sendo liberada apenas dentro da célula-alvo infectada, aumentando consideravelmente a seletividade do fármaco. Após o surgimento da L-AnfoB, outras formulações lipídicas foram realizadas, como os complexos lipídicos e as dispersões coloidais. Ambas essas formulações com a anfotericina B possuem maior afinidade pelo HDL (lipoproteína de alta densidade), promovendo a captação pelo sistema reticuloendotelial e reduzindo a concentração renal, assim reduzindo os efeitos nefrotóxicos (Stone et al., 2016; Kip et al., 2018).

Com o emprego de formulações lipossomais (AnfoB-FL), como a anfotericina B envolvida por bicamada fosfolipídica (AmBisome®) aumentando a seletividade do fármaco, os efeitos tóxicos e colaterais como cefaleia, náuseas, hipotensão e febre reduziram drasticamente, tornando a utilização mais segura em populações que não podem utilizar os antimônios como a de gestantes e cardiopatas (Kip et al., 2018).

A anfotericina B desoxicolato e lipossomal é disponibilizada em pó liofilizado em frasco ampola de 50 mg cada. A dose varia 0,7-1 mg/kg/dia, dependendo do porte físico do paciente e do caso clínico. Já a forma lipossomal varia em torno de 2-5mg/kg/dia, também dependendo do paciente e da resposta clínica (Kip et al., 2018; OPAS, 2022).

Sendo a AnfoB o principal tratamento para LV e para alguns casos de LC e LM, deve-se sempre considerar a toxicidade e o risco de morte associado à doença. Recomenda-se a administração de L-AnfoB como primeira escolha e, quando houver impossibilidade, utilizar outras formulações lipídicas, com monitoramento renal. E apenas em situações específicas utilizar a AnfoB-D, com acompanhamento clínico rigoroso e administração em ambiente hospitalar (OPAS, 2022).

Figura 3- Estrutura química da Anfotericina B.



Fonte: Própria autoria.

1.4.3 Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo adjuvante no tratamento das leishmanioses, sendo utilizada a via parenteral para LV e tópica para a LC (Daga; Rohatgi; Mishra, 2021). Sua ação parasitológica foi descoberta aleatoriamente, quando foi utilizada contra infecções secundárias em pacientes com leishmaniose, observando-se a melhora clínica no quadro da leishmaniose (Chakravarty e Sundar, 2019). A ação leishmanicida acontece pela inibição da síntese proteica ribossomal, causada pela interação do fármaco com a subunidade ribossômica 30S-50S, formando complexos peptídicos (Kip et al., 2018).

As reações adversas apresentadas em pacientes com LV são alterações hepáticas e renais, além da ototoxicidade. A associação da paromomicina IM com os antimoniais é realizada na África Ocidental, com aplicações intramusculares de 15 mg/kg de paromomicina. Alguns estudos já relatam casos de resistência dos parasitos com tratamentos isolados com paromomicina, que pode estar relacionada à redução da captação dos medicamentos. Sua ação é exclusivamente intracelular, portanto, é recomendado a associação terapêutica com outros fármacos (Kip et al., 2018).

Já nas Américas, a paromomicina é preferencialmente utilizada para o tratamento de LC, em formulações tópicas contendo 15% do fármaco. Para aumentar sua absorção e eficácia, é recomendada a utilização associada com tratamentos térmicos, como a crioterapia e a termoterapia (Kip et al., 2018; OPAS, 2022).

1.4.4 Pentamidina

A pentamidina inicialmente foi utilizada na Índia como tratamento alternativo ao Sb^v em pacientes refratários ou com alguma contraindicação para o uso dos antimoniais. Sendo uma diamidina aromática com ação antibacteriana, sua indicação leishmanicida é recomendada para pacientes com LC, com uma dose de 2-4 mg/kg administrados por via IM em dias alternados. Sua eficácia pode variar entre 35 a 90% na redução parasitária dos hospedeiros (Kip et al., 2018; Daga; Rohatgi; Mishra, 2021).

O mecanismo de ação associado à pentamidina é a inibição da produção de ATP (adenosina trifosfato) pela mitocôndria do parasito, assim reduzindo as atividades metabólicas, interferindo diretamente na sua multiplicação. Seu uso é restringido pelos efeitos adversos e colaterais associados, como diabetes mellitus, miocardite e toxicidade renal, além de ser contraindicada para gestantes e cardíacos (Chakravarty e Sundar, 2019; Daga; Rohatgi; Mishra, 2021).

1.4.5 Miltefosina

A miltefosina, diferentemente dos outros fármacos, possui origem farmacológica antiproliferativa contra metástases cutâneas. É um derivado fosfolipídico da classe das alquilfosfocolinas, e até hoje é o único fármaco oral disponível para o tratamento das leishmanioses (Carvalho et al., 2019). Utilizada no Brasil para tratar LC ou LM, o fármaco apresenta formulações de 10 e 50 mg, sendo encontrado do SUS, após recomendação da CONITEC, para auxiliar no tratamento principalmente em regiões em que o serviço de saúde ambulatorial é escasso (CONITEC, 2018; OPAS, 2022).

A utilização em casos de LV, no Brasil, logo foi contraindicada devido à presença de casos de resistência em outros países e por não haver ter eficácia comprovada sobre *L. infantum*, com 40% de recidivas em estudos clínicos (Chakravarty e Sundar, 2019). Na LC por *L. braziliensis*, a miltefosina apresentou 88% de eficácia contra 94% do Sb^v em estudo realizado na Bolívia. Já no Brasil, foi registrado 75% de eficácia da miltefosina contra 53% do Sb^v (CONITEC, 2018).

O esquema terapêutico aconselhado é de 2,5 mg/kg/dia (adultos) e 1,5-2,5 mg/kg/dia (pediátrico), com dose máxima de 150 mg/dia, divididas em 2 ou 3 doses durante 28 dias. Os efeitos adversos são brandos, como incômodos gastrointestinais que podem ser reduzidos com a ingestão do medicamento junto com alimentos, assim não impedindo a continuação do tratamento (CONITEC, 2018; OPAS, 2022).

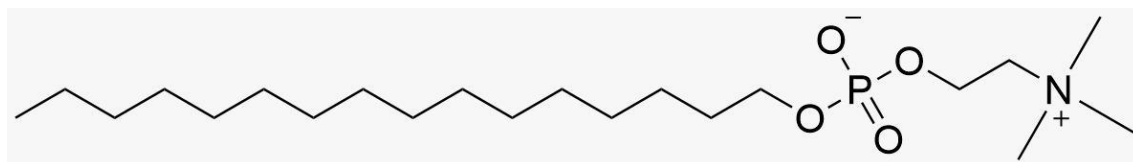
As contraindicações mais severas são em mulheres gestantes, por ser teratogênico, cardíacos e renais crônicos, porém em pacientes apenas com alterações cardíacas a miltefosina pode ser utilizada com cautela e monitoramento (CONITEC, 2018; OPAS, 2022).

Entre as hipóteses do mecanismo de ação da miltefosina, foram descritos a indução à apoptose, inibição de vias de sinalização e efeitos imunomoduladores (Kip et al., 2018; Roatt et al., 2020). Com a utilização de cepas deficientes em metacaspases de *L. major*, foi possível comprovar em testes “in vitro”, em que a miltefosina induziu a produção dessa protease, responsável pela morte celular programada (apoptose) (Basmaciyan; Azas; Casanova, 2018).

Muitas vantagens são atribuídas à utilização da miltefosina no tratamento das leishmanioses, como a adesão do paciente e a acessibilidade ao tratamento.

Por ser administrado por via oral, a distribuição em regiões de difícil acesso é um grande avanço no tratamento e no controle da infecção (CONITEC, 2028). Em comparação com os demais tratamentos, o custo de hospitalizações é reduzido, contribuindo para sua utilização.

Figura 4- Estrutura química da miltefosina.



Fonte: Própria autoria.

2.0 Ácido úsnico

Os líquens são constituídos de uma relação simbiótica entre um fotobionte, podendo ser uma alga ou uma cianobactéria, e um micobionte, que são filamentos de fungos. São abundantes e de grande importância para os ecossistemas, resistindo a condições climáticas e geográficas extremas. Estes organismos sintetizam compostos primários e aproximadamente 630 compostos secundários, como as antraquinonas, atranorinas, liquexantona e derivados do ácido pulvínico e ácido úsnico (Honda e Vilegas, 1999; Schmeda-Hirschmann et al., 2008).

Entre esses componentes, o ácido úsnico (2,6-diacetílico-7,9-dihidroxi-8,9-dimetil-1,3(2H,9bH) se destaca, pelas múltiplas atividades atribuídas a ele, como antiprotzoário, antibiótico, antiviral, antiproliferativo entre outras. Desde seu isolamento, há mais de duas décadas, sua primeira utilização em grande escala foi como conservante em formulações cosméticas, como cremes e desodorantes, devido à sua ação antimicrobiana (Ingolfssdottir et al., 2002).

O ácido úsnico (figura-3) é um composto fenólico amarelo, hidrofóbico e com duas fórmulas enantioméricas, encontrado em vários gêneros liquênicos com extenso potencial farmacêutico. Na cosmética, além de conservante, foi identificada ação fotoprotetora, com absorção de luz ultravioleta (UV) na mesma faixa do octocrileno (substância comum utilizada em filtros solares), tornando possível a formulação de fotoprotetores com maior estabilidade e eficácia (Galanty et al., 2021).

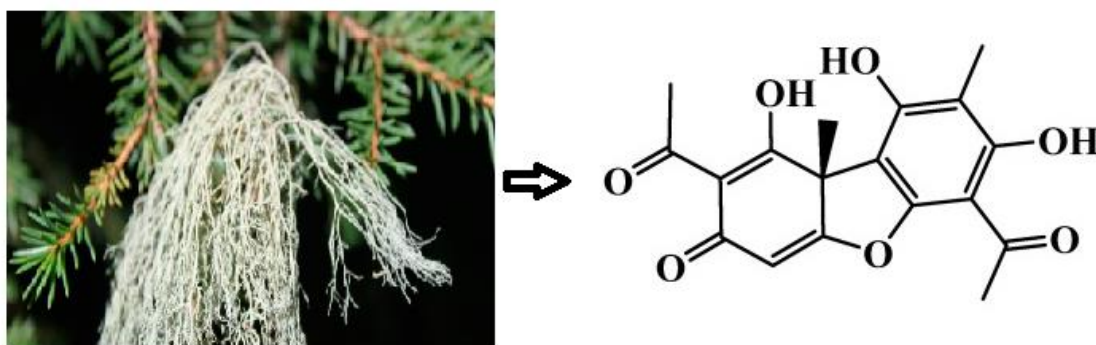
A ação antiproliferativa do ácido úsnico foi pesquisada em diferentes células tumorais. Uma das ações identificadas foi o aumento da transcrição proteica Nrf2 (fator nuclear eritróide) através do aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Qi et al., 2020; Krajka-Kuzniak et al., 2021).

A ação antibacteriana do ácido úsnico foi potencializada após encapsulamento em lipossomas, tendo resultados promissores em cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, em uma associação com a rifampicina e a isoniazida (Ferraz-Carvalho et al., 2016). A ação antiviral previamente mencionada contra o vírus influenza (H1N1) foi recentemente corroborada em testes utilizando o vírus SARS-CoV-2. O ácido úsnico demonstrou eficácia contra três cepas virais, a Wuhan, Delta e a Omicron, tendo um valor de $CI_{50}=3,7 \mu M$ contra a cepa Omicron, onde foi observada a maior eficácia (Sokolov, 2012; Filimonov, 2022).

Já a ação antiprotozoária do ácido úsnico foi identificada contra *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e espécies diferentes de *Leishmania*. (De Carvalho et al., 2005; Si et al., 2016; Derici; Cansaran-Duman; Taylan-Ozkan, 2018). O composto mostrou atividade, com CI_{50} de $18,30 \mu g/mL$ em testes “in vitro” sobre *L. infantum* (Da Luz et al., 2015). Posteriormente, foi observada atividade contra as espécies *L. major* ($CI_{50}=10.76 \mu g/mL$), *L. tropica* ($CI_{50}=21.06 \mu g/mL$) e novamente em *L. infantum* ($CI_{50}=13.34 \mu g/mL$), onde foi discutido o mecanismo apoptótico sobre o parasito (Deric; Cansaran-Duman; Taylan-Ozkan, 2018).

Suas ações terapêuticas são promissoras em diversas áreas médicas, precisando apenas de estudos mais eficazes em relação sua toxicidade. Alguns estudos citam a hepatotoxicidade e alergias associadas ao uso do ácido úsnico (Si et al., 2016), porém são análises limitadas. Por outro lado, outros estudos de toxicidade identificaram toxicidade hepática apenas nas maiores concentrações, podendo ser um efeito dose-dependente (Wang et al., 2022).

Figura 5- Líquens de *Usnea longissima* e ácido úsnico.



Fonte: Wang et al. (2022).

3.0 Lantanídeos

Os lantanídeos são metais pertencentes ao sexto período da tabela periódica (lantânio ao lutécio), possuindo características únicas em relação a seu potencial eletrônico e magnético. Sua proximidade atômica com as demais substâncias tornou seu isolamento raro e, por serem encontrados na forma de óxido, foram originalmente denominados como elementos de terras raras (Galvão e Menezes, 2016). Porém, sua abundância no ambiente logo foi observada e os estudos de suas aplicações eletrônicas e biológicas prosseguiram.

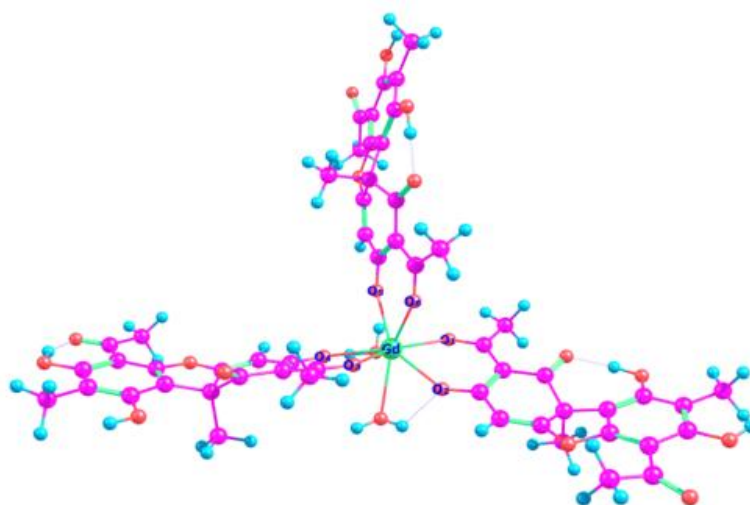
Primeiramente, sua utilização foi em equipamentos eletrônicos, como marcadores ópticos, LEDs, monitores, lâmpadas e agentes de contraste para ressonância magnética (Pallares e Abergel, 2020; Vuojola e Soukka, 2014). Sua conformação eletrônica com sete elétrons 4f desemparelhados, proporcionando característica paramagnética com propriedades luminescentes, impulsionou as aplicações em terapias por imagens, para o diagnóstico e futuro tratamento para o câncer (Teo; Termini; Gray, 2016).

Os lantanídeos são íons que em sua maioria prevalecem na forma trivalente, sendo de difícil estabilidade na forma isolada, tendo a necessidade de complexação ou encapsulamento em outras moléculas. Utilizando os lantanídeos complexados com estruturas análogas às purinas, foram obtidos resultados promissores contra os agentes das leishmanioses e da doença de Chagas, onde o composto com lantânio foi o mais ativo contra *L. braziliensis* e *L. infantum*, em ambas as formas evolutivas (promastigotas e amastigotas),

apresentando atividade seis vezes maior que o Glucantime® (Caballero et al., 2014).

Em trabalho semelhante, os íons lantanídeos agora complexados a moléculas de usnato de sódio (figura-5), sal sintetizado a partir do ácido úsnico para aumentar sua solubilidade, também apresentou bons resultados em células tumorais. Estes compostos foram consideravelmente seletivos sobre células tumorais MCF-7, causadoras do câncer de mama, com menor ação em células não tumorais (MCF-10A) (Nunes et al., 2020).

Figura 6- Íons lantanídeos complexados com o usnato de sódio.



Fonte: Nunes et al. (2020).

4.0- Técnicas para detecção da morte celular

A análise para identificação do mecanismo de morte celular nos protozoários é fundamental para se estabelecer os alvos farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos e para a elaboração de esquemas terapêuticos apropriados para eliminar cepas suscetíveis e resistentes dos parasitos (Payel; Saradindi; Somdeb, 2021).

De modo geral a morte celular pode se dar de forma programada ou não programada. Na morte programada, os mecanismos biológicos intrínsecos desempenham um papel central, com a ativação de vias de sinalização específicas que desencadeiam funções bioquímicas ordenadas a fim de destruir

células defeituosas, processo necessário à manutenção da homeostase e da integridade do organismo. Por outro lado, na morte celular não programada ou acidental, os fatores externos desempenham papel significativo, ocorrendo a morte de forma descoordenada devido a alterações físico-químicas como variação de temperatura, pH desfavorável e pressão osmótica, exemplos de fatores que podem ser modulados por ações farmacológicas (Galluzzi et al., 2018).

A apoptose é considerada uma forma programada de morte celular, onde perturbações intrínsecas ou extrínsecas, como estresse do retículo endoplasmático (ER), aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos ao DNA levam à morte celular. As células apoptóticas mantêm a membrana plasmática e atividade metabólica até fases avançadas do processo, nos quais ocorre a fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos, logo essas células são removidas pelo sistema fagocítico sem induzir resposta inflamatória. Já em estágios avançados da célula apoptótica, há perda da integridade celular, com destruição da membrana plasmática e formação de uma morfologia necrótica (Galluzzi et al., 2018).

Já a apoptose em protozoários está associada à ativação das metacaspases, que são enzimas responsáveis pelo processo, semelhantes às caspases em células humanas. Em *Leishmania* sp. as metacaspases foram identificadas nas duas formas evolutivas do parasito, nas promastigotas (em fase logarítmica e estacionária de crescimento) e na amastigota intracelular (Basmacıyan e Casanova, 2019).

As características morfológicas iniciais de apoptose nas formas de *Leishmania* sp são o arredondamento e o encolhimento celular, além de apresentarem internamente alterações mitocondriais, condensação de cromatina e fragmentação do DNA nuclear (Galluzzi et al., 2018).

Podemos observar essas alterações apoptóticas por meio de citometria de fluxo, utilizando substâncias específicas como a Anexina-V, calceína, iodeto de propídio ou 7-AAD. A Anexina-V é uma proteína que possui afinidade pela fosfatidilserina gerando um sinal de fluorescência detectável pelo citômetro. A fosfatidilserina (PS) é encontrada na camada interna da membrana plasmática de células saudáveis. Sua principal função é contribuir para a estrutura celular além de estar envolvida em processos de sinalização. Quando uma célula morre

por apoptose, a PS deixa de estar restrita ao lado interno da membrana e passa a estar exposta na superfície da célula. Portanto, uma vez que se detecta a presença de fosfatidilserina significa que há um dano estrutural celular, associado ao início do apoptose (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Basmaciyan e Casanova, 2019).

A combinação da calceína com o iodeto de propídio permite identificar células saudáveis, apoptóticas precoces e tardias. A permeabilidade do iodeto de propídio através da membrana celular ocorre somente quando há degradação ou perda total da estrutura. Por outro lado, a calceína se liga a estruturas citoplasmáticas ricas em cálcio, ou seja, a permeabilidade dela e não a do iodeto de propídio é capaz de detectar modificações na membrana, mas mantendo sua integridade estrutural (característica do apoptose precoce). Na apoptose tardia, há sinalização de ambas as substâncias, indicando a degradação avançada da membrana (Basmaciyan; Azas; Casanova, 2017).

O 7-AAD (7-amino-actinomicina D) também é um corante de vitalidade celular que se liga a fragmentos de DNA. No entanto, o 7-AAD é impermeável em membranas intactas, tornando-se possível a utilização do 7-AAD em associação com a Anexina-V para obter sinais de todos os estágios da apoptose. Na apoptose precoce: a membrana permanece presente, impedindo a entrada do 7-AAD, enquanto a fosfatidilserina é identificada pela Anexina-V (Anexina-V positiva e 7-AAD negativa), já na apoptose tardia ou necrose: há permeabilidade ao 7-AAD devido a perda estrutural da membrana (Gadelha et al., 2020).

A alteração do potencial de membrana mitocondrial da célula também é um marcador significativo de apoptose celular, pois as alterações mitocondriais desencadeiam a liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. O TMRE (esterpercolato de tetrametilrodamina) é um corante lipofílico que se deposita nas mitocôndrias metabolicamente ativas e viáveis, sendo que a redução da intensidade do sinal de fluorescência indica uma possível interferência no potencial de membrana, associado à apoptose (Gadelha et al., 2020).

A pesquisa de novos protótipos a fármacos antileishmania requer análises detalhadas para compreender a forma de atuação sobre o parasito e identificar possíveis mecanismos de ação. A condução de estudos robustos utilizando as drogas de referência também é necessária para a compreensão dos

mecanismos de ação leishmanicida espécie-específicos. Dessa forma, torna-se possível observar alterações na eficácia da atividade dos fármacos, permitindo a identificação precoce de possível resistência medicamentosa.

5.Objetivos

5.1 Objetivo geral

- Investigar a ação antileishmania *in vitro* de complexos de usnato de sódio com íons lantanídeos, bem como avaliar a atividade antileishmania de fármacos de referência utilizadas na prática clínica sobre cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isoladas de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea e visceral.

5.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antileishmania *in vitro* dos complexos de usnato de sódio com íons lantanídeos samário - Sm(III), gadolínio - Gd(III), európio - Eu(III), neodímio - Nd(III), lantânio - La(III) e térbio - Tb(III);
- Investigar possíveis mecanismos de ação leishmanicida, verificando alterações na permeabilidade celular e no potencial de membrana mitocondrial ocasionada pelo tratamento *in vitro* com os fármacos de referência e dos complexos com íons lantanídeos, por meio de citometria de fluxo.
- Avaliar a atividade antileishmania de fármacos de referência para leishmaniose sobre três cepas de *L. amazonensis* (formas promastigotas e amastigotas intracelulares), sendo duas cepas isoladas de pacientes e uma cepa já padronizada isolada de flebotomíneo.

6. Referências:

- AOKI JI, LARANJEIRA-SILVA MF, MUXEL SM, FLOETER-WINTER LM. The impact of arginase activity on virulence factors of *Leishmania amazonensis*. *Curr Opin Microbiol*. 2019 Dec;52: 110-115. doi: 10.1016/j.mib.2019.06.003. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31306995.
- ARRUDA, C.C.P. et al. A triazole hybrid of neolignans as potential antileishmanial agent by triggering mitochondrial dysfunction. *Molecules*. v.25, n.1, p.37, 2020. Disponível em: 10.3390/molecules25010037. Acesso em: 10 fev. 2024.
- Acuña SM, Aoki JI, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Fernandes JCR, Muxel SM, et al. (2017) A expressão da arginase modula a produção de óxido nítrico em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS UM* 12(11): e0187186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187186>
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGU, L. Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v.52, n.6, p.1359–1375, 2022. Disponível em: 10.1016/j.cvsm.2022.06.012. Acesso em: 10 mar. 2024.
- BASMACIYAN L.; AZAS, N.; CASANOVA, M. Calcein+/PI- as an early apoptotic feature in *Leishmania*. *PLoS One*. v.12, n.11, 2017. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0187756. Acesso em: 12 abr. 2024
- BASMACIYAN, L., AZAS, N. & CASANOVA, M. Different apoptosis pathways in *Leishmania* parasites. *Cell Death Discovery*. v.4, n.90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0092-z>. Acesso em: 15 de abr. de 2024.
- BASMACIYAN, L.; CASANOVA M. Cell death in *Leishmania*. *Parasite*. v. 26, n.7, 2019. Disponível em: 10.1051/parasite/2019071. Acesso em: 10 fev. 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Renome 2020. [recurso eletrônico] – ISBN 978-85-334-2748-8. Brasília, 2020.
- BRÜGGEMANN, R.J.; JENSEN, G.M.; LASS-FLÖRL, C. Liposomal Amphotericin B—the Past. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.77, p.ii3–ii10, 2022. Disponível em: 10.1093/jac/dkac351. Acesso em: 10 mar. 2024.
- BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *Lancet*, v.392, p.951–970, 2018. Disponível em:10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Acesso em: 10 fev. 2024.
- CABALLERO, A.B. et al. Lanthanide Complexes Containing 5-Methyl-1,2,4-Triazolo[1,5-a] Pyrimidin-7(4H)-One and Their Therapeutic Potential to Fight Leishmaniasis and Chagas Disease. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v.138, p.39–46, 2014. Disponível em: 10.1016/j.jinorgbio.2014.04.016. Acesso em: 10 fev. 2024.
- CARNEIRO, P.P. et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania Braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE*. v,11, n.2, e0148084, 2016. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0148084. Acesso em: 10 fev. 2024.
- CARVALHO, S.H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. *Tropical Medicine & International Health*. v.24, n.4, p.380-391, 2019. Disponível em: 10.1111/tmi.13210. Acesso em: 10 mar. 2024.

- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. v.20, p.1251–1265, 2019. Disponível em: 10.1080/14656566.2019.1609940. Acesso em: 10 mar. 2024.
- CONITEC- Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias No Sistema Único de Saúde. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Relatório de recomendação, 2018. No 365. Disponível em: <http://antigo-conitec.saude.gov.br/recomendacoes-sobre-as-tecnologias-avaliadas-2018>. Acesso em: 03 mar. 2024.
- COSTA, A.T. et al. Ecology of Phlebotomine Sand Flies in an Area of Leishmaniasis Occurrence in the Xakriabá Indigenous Reserve, Minas Gerais, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.52, e20180474, 2019. Disponível em: 10.1590/0037-8682-0474-2018. Acesso em: 10 mar. 2024.
- DA LUZ, J.S.B. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania Infantum* Chagasi Promastigotes Forms Treated in Vitro with Usnic Acid. *Scientific World Journal*, 617401, 2015. Disponível em: 10.1155/2015/617401. Acesso em: 12 jan. 2024.
- DAGA, M.K.; ROHATGI, I.; MISHRA, R. Leishmaniasis. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. v.25, Suppl 2, p.S166-S170, 2021. Disponível em: 10.5005/jp-journals-10071-23844. Acesso em: 10 mar. 2024.
- DE CARVALHO, E.A.B. et al. Effect of Usnic Acid from the Lichen *Cladonia Substellata* on *Trypanosoma Cruzi* in Vitro: An Ultrastructural Study. *Micron*. v.36, p. 155–161, 2005. Disponível em: 10.1016/j.micron.2004.09.003. Acesso em: 12 jan. 2024.
- DE REZENDE E., et al. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Nov 27;11(11):e0006090. doi: 10.1371/journal.pntd.0006090. PMID: 29176891; PMCID: PMC5720813.
- DE SOUZA FERNANDES, W. et al. Phlebotomine Sandfly (Diptera: Psychodidae) Fauna and The Association Between Climatic Variables and The Abundance of *Lutzomyia Longipalpis* Sensu Lato in an Intense Transmission Area for Visceral Leishmaniasis in Central Western Brazil. *Journal of Medical Entomology*. v.59, n.3, p.997–1007, 2022. Disponível em: 10.1093/jme/tjac006. Acesso em: 10 mar. 2024.
- DERICI, M.K.; CANSARAN-DUMAN, D.; TAYLAN-ÖZKAN, A. Usnic Acid Causes Apoptotic-like Death in *Leishmania Major*, *L. Infantum* and *L. Tropica*. *3Biotech*. v.8, n.384, 2018. Disponível em: 10.1007/s13205-018-1409-6. Acesso em: 20 mar 2024.
- FERRAZ-CARVALHO, R.S. et al. Effects of the Encapsulation of Usnic Acid into Liposomes and Interactions with Antituberculous Agents against Multidrug-Resistant Tuberculosis Clinical Isolates. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.111, n.5, p.330–334, 2016. Disponível em: 10.1590/0074-02760150454. Acesso em: 15 mar. 2024.
- FILIMONOV, A.S. et al. (+)-Usnic Acid and Its Derivatives as Inhibitors of a Wide Spectrum of SARS-CoV-2 Viruses. *Viruses*. v.14, n.10, p.2154, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14102154>. Acesso em: 20 mar 2024.
- GADELHA, A.P.R. et al. Insights about the structure of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) and the activity of bisphosphonates on the proliferation and ultrastructure of *Leishmania* and *Giardia*. *Parasit Vectors*. v.13, n.1, p.168, 2020. Disponível em: 10.1186/s13071-020-04019-z. Acesso em: 12 abr. 2024.

- GALANTY, A. et al. (+)-Usnic Acid as a Promising Candidate for a Safe and Stable Topical Photoprotective Agent. *Molecules* 2021, v.26, n.17, p.5224, 2021. Disponível em: 10.3390/molecules26175224. Acesso em: 10 mar. 2024.
- GALLUZZI, L. et al. Mecanismos moleculares de morte celular: recomendações do Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular 2018. *Cell Death Differ*, v. 25, p. 486–541, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>. Acesso em: 02 jan. 2024.
- GALVÃO, R.; MENEZES, J.F.S. Breve Discussão Histórica sobre a “Desoberta” dos Lantanídeos e sua Relação com as Teorias de Luz e Cores de Maxwell e Einstein. *Química Nova na Escola*. v.38, n.1, p.25-32, 2016. Disponível em: 10.5935/0104-8899.20160005. Acesso em: 20 mar 2024.
- Goes WM., et al. Complete assembly, annotation of virulence genes and CRISPR editing of the genome of *Leishmania amazonensis* PH8 strain. *Genomics*. 2023 Sep;115(5):110661. doi: 10.1016/j.ygeno.2023.110661. Epub 2023 May 30. PMID: 37263313.
- GYORKOS, T. et al. Eliminating morbidity caused by neglected tropical diseases by 2030. Special report. *Pan American journal of Public Health*. v.47, n.16, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.16>. Acesso em: 02 jan. 2024.
- HAMILL, R.J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*. v.73, p.919-934, 2013. Disponível em: 10.1007/s40265-013-0069-4. PMID: 23729001. Acesso em 09 de abr. 2024.
- HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. *Química Nova*.v.22, p.110–125, 1999. Disponível em: 10.1590/S0100-40421999000100018. Acesso em: 10 mar. 2024.
- INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic Acid. *Phytochemistry*. v.61, p.729–736, 2002. Disponível em: 10.1016/s0031-9422(02)00383-7. Acesso em: 10 mar. 2024.
- JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors*. v.3, n.104, 2010. Disponível em: 10.1186/1756-3305-3-104. Acesso em: 09 abr. 2024.
- JOSEPH, A.; COTRUVO, JR. The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Central Science*. v. 5, n.9, p.1496-1506, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00642>. Acesso em: 10 fev. 2024.
- KIP, A.E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet*. v.57, n.2, p.151–176, 2018. Disponível em: 10.1007/s40262-017-0570-0. Acesso em: 10 mar. 2024.
- KRAJKA-KUŹNIAK, V. et al. (+)-Usnic Acid Modulates the Nrf2-ARE Pathway in FaDu Hypopharyngeal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v.476, p.2539–2549, 2021. Disponível em: 10.1007/s11010-021-04092-7. Acesso em: 10 mar. 2024.
- KUMAR, A.; PANDEY S.C.; SAMANT, M. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunology*. v.42, n.10, p.e12727, 2020. Disponível em: 10.1111/pim.12727. Acesso em: 10 mar. 2024.
- LIMA BSS., et al. Study of the differentially abundant proteins among *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum*. *PLoS One*. 2020 Oct 15;15(10):e0240612. doi: 10.1371/journal.pone.0240612. PMID: 33057350; PMCID: PMC7561129.

- LINDOSO, J.A.L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. v.15, n.10, p.193-201, 2018. Disponível em: 10.2147/HIV.S143929. Acesso em: 10 mar. 2024.
- MAIA, C. et al. *Leishmania* Exposure in Dogs from Two Endemic Countries from New and Old Worlds (Brazil and Portugal): Evaluation of Three Serological Tests Using Bayesian Latent Class Models. *Parasites & Vectors*. v.15, n.202, 2022. Disponível em: 10.1186/s13071-022-05328-1. Acesso em: 10 mar. 2024.
- miologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-04/view. Acesso em: 03 mar. 2024.
- MOREIRA, V.R. et al. Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) Infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.61, 2017. Disponível em: 10.1128/aac.02360-16. Acesso em: 10 mar. 2024.
- MS- Ministério da Saúde. Secretária de vigilância em Saúde e Ambiente. Estrutura e atividade das Unidades de Vigilância de Zoonoses no Brasil, 2022. Boletim Epidemiológico - Volume 54 – N. 04, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epide>
- MS- Secretaria do estado de saúde. Boletim epidemiológico 2022 Leishmaniose Visceral Humana 2022. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/boletim-epidemiologico-2022-leishmaniose-visceral/>. Acesso em: 09 mar. 2024.
- Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*. 2016 Sep;110(6):247-260. doi: 10.1080/20477724.2016.1232042. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27660895; PMCID: PMC5070640.
- NUNES, D.M. et al. New Complexes of Usnate with Lanthanides Ions: La(III), Nd(III), Tb(III), Gd(III), Synthesis, Characterization, and Investigation of Cytotoxic Properties in MCF-7 Cells. *Inorganica Chimica Acta*. v.506, 119546, 2020. Disponível em: 10.1016/j.ica.2020.119546. Acesso em: 10 fev. 2024.
- OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. 2º edição, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275725030>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. No 11 (Dezembro de 2022) - OPAS/OMS. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>. Acesso em: 20 mar. 2024.
- OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. N.12 (dezembro de 2023), 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- PAHO- Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Region of the Americas. 2ª edição, 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- PALLARES, R.M.; ABERGEL, R.J. Transforming Lanthanide and Actinid e Chemistry with Nanoparticles. *Nanoscale*. v.12, p.1339–1348, 2020. Disponível em: 10.1039/c9nr09175k. Acesso em: 20 mar 2024.
- PAYEL, D.; SARADINDU, S.; SOMDEB, B. The ultimate fate determinants of drug induced cell-death mechanisms in Trypanosomatids, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.15, p.81-91, 2021., Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021>. Acesso em: 12 abr. 2024.

- PEÑA MS., et al. *Leishmania (L.) amazonensis* LaLRR17 increases parasite entry in macrophage by a mechanism dependent on GRP78. *Parasitology*. 2023 Sep;150(10):922-933. doi: 10.1017/S0031182023000720. Epub 2023 Aug 9. PMID: 37553284; PMCID: PMC10577668.
- Porto V.B.G. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022 Sep 5;64:e51. doi: 10.1590/S1678-9946202264051. PMID: 36074446; PMCID: PMC9448255.
- QI, W. et al. (+)-Usnic Acid Induces ROS-Dependent Apoptosis via Inhibition of Mitochondria Respiratory Chain Complexes and Nrf2 Expression in Lung Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. v.21, n.3, p.876, 2020. Disponível em: 10.3390/ijms21030876. Acesso em: 10 mar. 2024.
- ROATT, B.M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. v.104, n.21, p.8965-8977, 2020. Disponível em: 10.1007/s00253-020-10856-w. Acesso em: 10 mar. 2024.
- ROCHA, M.I.F. et al. Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Brasil no século XXI: análise de tendências espaciais e temporais e fatores associados. *Revista Panamericana de Salud Pública*. v.47, n.1, 2023. Disponível em: 10.26633/RPSP.2023.146. Acesso em: 02 jan. 2024.
- SANTIAGO, A.S.; PITA, S.S. R.; GUIMARÃES, E.T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*. 2021. Disponível em: 10.33448/rsd-v10i7.16543. Acesso em: 12 jan. 2024.
- SAPATERA, N. de S. et al. Leishmaniose visceral em canídeos silvestres – revisão de literatura. *Research, Society and Development*., v.11, n.4, p. e30211427303, 2022. Disponível em: 10.33448/rsd-v11i4.27303. Acesso em: 10 mar. 2024.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. A New Antifungal and Antiprotozoal Depside from the Andean Lichen *Protosnea Poeppigii*. *Phytotherapy Research*. v.22, n.3, p.349–355, 2008. Disponível em: 10.1002/ptr.2321. Acesso em: 10 mar. 2024.
- SI, K. et al. Efeitos Do Ácido (+)-Úsnico e Do Ácido (+)-Úsnico-Lipossoma Sobre *Toxoplasma Gondii*. *Experimental Parasitology*. v.166, p.68–74, 2016. Disponível em: 10.1016/j.exppara.2016.03.021. Acesso em: 20 mar 2024
- SOKOLOV, D.N. et al. Anti-Viral Activity of (-)- and (+)-Usnic Acids and Their Derivatives against Influenza Virus A(H1N1)2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v.22, n.23, p.7060–7064, 2012. Disponível em: 10.1016/j.bmcl.2012.09.084. Acesso em: 15 mar. 2024.
- SOUZA, A.G.M. et al. Characterization of a protein with unknown function (LinJ.30.3360) in *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol*. 2021 Feb;221:108048. doi: 10.1016/j.exppara.2020.108048. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33307096.
- STONE, N.R. et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, *Clinical Experience and Future Directions*. *Drugs*. v.76, n.4, p.485-500, 2016. Disponível em: 10.1007/s40265-016-0538-7. Acesso em: 10 mar. 2024.
- TEO, R.D.; TERMINI, J.; GRAY, H.B. Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.59, p.6012–6024,

2016. Disponível em: 10.1021/acs.jmedchem.5b01975. Acesso em: 20 mar 2024.

VAN GRIENSVEN J; DIRO E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*. v.33, n.1, p.79-99, 2019. Disponível em: 10.1016/j.idc.2018.10.005. Acesso em: 10 mar. 2024.

VUOJOLA, J.; SOUKKA, T. Luminescent Lanthanide Reporters: New Concepts for Use in Bioanalytical Applications. *Methods and Applications in Fluorescence*. v.2, n.1, 2014. Disponível em: 10.1088/2050-6120/2/1/012001. Acesso em: 20 mar 2024.

WANG, H. et al. Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules*. v. 27, n. 21, p. 7469, 2022. Disponível em: 10.3390/molecules27217469. Acesso em: 12 jan. 2024.

WHO- World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/ending-ntds-together-towards-2030>. Acesso em: 10 fev 2024.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis Drug Discovery: Recent Progress and Challenges in Assay Development. *Drug Discovery Today*. v.22, p.1516–1531, 2017. Disponível em: 10.1016/j.drudis.2017.06.004. Acesso em: 10 fev. 2024.

Capítulo II:

Artigo1- Publicado na revista International Journal of Molecular Sciences-MDPI. Classificada como A2 na área de farmácia no quadriênio (2017-2020).

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/1/413>.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Antileishmanial Activity, Toxicity and Mechanism of Action of Complexes of Sodium Usnate with Lanthanide Ions: Eu(III), Sm(III), Gd(III), Nd(III), La(III) and Tb(III)

Fernanda da Silva ¹, Yasmin Silva Rizk ¹, Amarith Rodrigues das Neves ¹, Estela Mariana Guimarães Lourenço ², Alda Maria Teixeira Ferreira ³, Melquisedeque Mateus Monteiro ⁴, Dênis Pires de Lima ², Renata Trentin Perdomo ⁴, Iluska Senna Bonfá ⁵, Mônica Cristina Toffoli-Kadri ⁵, Adriana Pereira Duarte ⁶, Daniel Mendes Nunes ⁷, Marco Antonio Utrera Martines ⁶, Eliane Mattos Piranda ¹ and Carla Cardozo Pinto de Arruda ^{1,*}



Citation: da Silva, F.; Rizk, Y.S.; das Neves, A.R.; Lourenço, E.M.G.; Ferreira, A.M.T.; Monteiro, M.M.; de Lima, D.P.; Perdomo, R.T.; Bonfá, I.S.; Toffoli-Kadri, M.C.; et al.

Antileishmanial Activity, Toxicity and Mechanism of Action of Complexes of Sodium Usnate with Lanthanide Ions: Eu(III), Sm(III), Gd(III), Nd(III), La(III) and Tb(III). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 413. <https://doi.org/10.3390/ijms25010413>

Academic Editor: Thiago Almeida Pereira

Received: 9 August 2023
Revised: 9 September 2023
Accepted: 12 September 2023
Published: 28 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; s.fernanda@ufms.br (F.d.S.); yasminrizk@gmail.com (Y.S.R.); amardasneves@gmail.com (A.R.d.N.); eliane.piranda@ufms.br (E.M.P.)
- ² Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas-SINTMOL, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79074-460, Brazil; estela.mariana@hotmail.com (E.M.G.L.); denis.lima@ufms.br (D.P.d.L.)
- ³ Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; alda.ferreira@ufms.br
- ⁴ Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; melquisedeque.mateus@gmail.com (M.M.M.); renata.trentin@ufms.br (R.T.P.)
- ⁵ Laboratório de Farmacologia e Inflamação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79074-460, Brazil; iluska.senna@ufms.br (I.S.B.); monica.kadri@ufms.br (M.C.T.-K.)
- ⁶ Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79074-460, Brazil; adriana.duarte@ufms.br (A.P.D.); marco.martines@ufms.br (M.A.U.M.)
- ⁷ Faculdade de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Campo Grande 79804-970, Brazil; danim@uems.br

* Correspondence: carla.arruda@ufms.br; Tel.: +55-67-33457390

Abstract: Leishmaniasis are neglected diseases with limited therapeutic options. Diffuse cutaneous leishmaniasis can occur in Brazil due to *Leishmania amazonensis*. This study details the antileishmanial activity and cytotoxicity of complexes of sodium usnate (SAU) with lanthanide ions ([LnL₃(H₂O)₆] (Ln = La(III), Nd(III), Gd(III), Tb(III), Eu(III) and Sm(III); L = SAU). All lanthanide complexes were highly active and more potent than SAU against *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes (Pro: IC₅₀ < 1.50 µM; Ama: IC₅₀ < 7.52 µM). EuL₃·3H₂O and NdL₃·3H₂O were the most selective and effective on intracellular amastigotes, with a selectivity index of approximately 7.0. In silico predictions showed no evidence of mutagenicity, tumorigenicity or irritation for all complexes. Treatment with EuL₃·3H₂O triggered NO release even at the lowest concentration, indicating NO production as a mechanism of action against the parasite. Incubating promastigotes with the lanthanide complexes, particularly with SmL₃·4H₂O and GdL₃·3H₂O, led to a change in the mitochondrial membrane potential, indicating the ability of these complexes to target this essential organelle. The same complexes caused cell death through cell membrane disruption, but their relationship with early or late apoptotic processes remains unclear. Thus, the inclusion of lanthanide ions in SAU improves selectivity with a promising mechanism of action targeting the mitochondria.

Keywords: lanthanide complexes; biological activity; *Leishmania amazonensis*; cytotoxicity; selectivity; mechanism of action

Antileishmanial activity, toxicity and mechanism of action of complexes of sodium usnate with lanthanide ions: Eu(III), Sm(III), Gd(III), Nd(III), La(III) and Tb(III)

Fernanda da Silva¹, Yasmin Silva Rizk¹, Amarith Rodrigues das Neves¹, Estela Mariana Guimarães Lourenço², Alda Maria Teixeira Ferreira³, Melquisedeque Matheus Monteiro⁴, Dênis Pires de Lima², Renata Trentin Perdomo⁴, Iluska Senna Bonfá⁵, Mônica C. Toffoli-Kadri⁵, Adriana Pereira Duarte⁶, Daniel Mendes Nunes⁷, Marco Antonio Utrera Martines⁴, Eliane Mattos Piranda¹, and Carla Cardozo Pinto de Arruda^{1*}

¹Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), 79070-900, Brazil

²Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas - SINTMOL, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), 79074-460, Brazil

³Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil

⁴Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil

⁵Laboratório de Farmacologia e Inflamação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, 15 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79074-460, MS, Brazil

⁶Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brazil

⁷Faculdade de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Caixa postal 351, 79804-970, Brazil

* Correspondence: CCPA carla.arruda@ufms.br; 556733457390.

Abstract: Leishmaniasis are neglected diseases with limited therapeutic options. Diffuse cutaneous leishmaniasis can occur in Brazil due to *Leishmania amazonensis*. This study details the antileishmanial activity and cytotoxicity of complexes of sodium usnate (SAU) with lanthanide ions ($[LnL_3(H_2O)_x]$ ($Ln=La(III), Nd(III), Gd(III), Tb(III), Eu(III)$ and $Sm(III)$; $L=SAU$). All lanthanide complexes were found highly active and more potent than SAU against *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes (Pro: $IC_{50} < 1.50 \mu M$; Ama: $IC_{50} < 7.52 \mu M$). $EuL_3.3H_2O$ and $NdL_3.3H_2O$ were the most selective and effective on intracellular amastigotes, with selectivity index of approximately 7.0. *In silico* predictions showed no evidence of mutagenicity, tumorigenicity or irritation for all complexes. Treatment with $EuL_3.3H_2O$ triggered NO release even at the lowest concentration, indicating NO production as a mechanism of action against the parasite. Incubating promastigotes with the lanthanide complexes, particularly with $SmL_3.4H_2O$ and $GdL_3.3H_2O$, led to a change in the mitochondrial membrane potential, indicating the ability of these complexes to target this essential organelle. The same complexes caused cell death through cell membrane disruption, but their relationship with early or late apoptotic processes remains unclear. Thus, the inclusion of lanthanide ions in SAU improves selectivity with a promising mechanism of action targeting the mitochondria.

Keywords: lanthanide complexes; biological activity; *Leishmania amazonensis*; cytotoxicity; selectivity; mechanism of action.

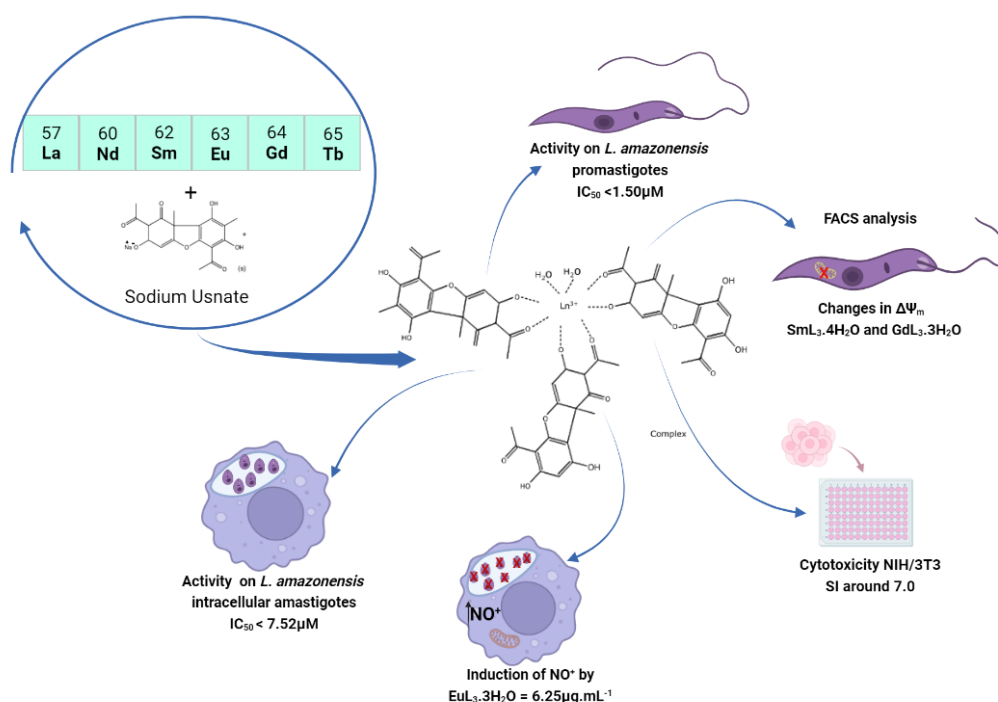
Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Revised: date
Accepted: date
Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Graphical Abstract

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) defines neglected tropical diseases (NTDs) as a group of diseases that are prevalent in the poorest regions of the world, where access to healthcare, sanitation, and safe drinking water is inadequate [1]. During the Covid-19 pandemic, there has been a rise in mortality rates from NTDs due to insufficient support for affected individuals, who are often among the most vulnerable populations [2]. This reinforces what the Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi) has confirmed: there are no neglected diseases, only *neglected patients* [3].

Leishmaniasis are among the top ten of NTDs. These are a group of vector-borne infectious diseases that affect more than 12 million people worldwide, with 0.9-1.6 million new cases each year [4]. The potentially fatal visceral manifestation or even the potentially disfiguring and stigmatizing cutaneous and/or mucocutaneous forms are caused by *Leishmania* protozoan parasites. This broad spectrum of clinical manifestations is related to the variety of parasite species: more than 20 species can cause the disease, and these are transmitted by a diversity of phlebotomine species in various epidemiological cycles [5].

Cutaneous leishmaniasis (CL) produces skin lesions with a tendency to ulceration and can evolve into destructive lesions on the mucous membranes (mucosal or mucocutaneous leishmaniasis, ML). 95% of cases occur in the Americas, the Mediterranean basin, the Middle East and Central Asia [4]. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 is one of the pathogens responsible for cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil. It causes either localized lesions or the diffuse form of the disease, in which the parasite spreads due to an impaired cell-mediated immune response [6]. Consequently, lesions tend to be more resistant to treatment and do not heal spontaneously [7].

The antileishmanial drugs currently used include pentavalent antimonials (N-methyl glucamine antimonate and sodium stibogluconate), amphotericin B (deoxycholate and the less toxic liposomal formulation), the antibiotic pentamidine and miltefosine, an oral anticancer drug currently used to treat cutaneous and visceral leishmaniasis [8]. In addition, controlled released drug systems carried out by nanoparticles became an important tool to improve the antileishmanial chemotherapy [9-11]. Therapeutic options for leishmaniasis are limited, toxic, and costly, in addition to being poorly accessible to patients due to the repetitive parenteral route of administration [8]. Thus, the development of safer and shorter treatments is highly desirable. Mitochondria are considered potential targets for the development of antileishmanial drug candidates, as they are important organelles with unique properties and proteins that differ from those of the mammalian host [12]. As an example, paromomycin (paromomycin sulfate, $C_{23}H_{47}O_{18}S$) is an intramuscularly administered aminoglycoside antibiotic for the treatment of leishmaniasis whose mechanism of action involves mitochondria [13].

Lichens are organisms formed by the interspecific association of a photobiont (algae or cyanobacteria) and a mycobiont (fungus). This harmonious relationship results in more than 630 secondary metabolites: aliphatic acids, meta- and paradeptides, depsidones, benzyl esters, dibenzofurans, xanthenes, anthraquinones, terpenes and derivatives of pulvinic acid [14]. However, the lichenic compound most studied is usnic acid (2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzofurandione (Figure 1), a dibenzofuran derivative with several biological activities, including antileishmanial [15–17].

The biological activities of usnic acid have been widely described; among which we can highlight the antibacterial, antiprotozoal, antiviral, anti-inflammatory, antipyretic and antitumor activities [16,18]. To enhance these activities, several changes have been made in the structure of the molecule, as its different functional groups make it a good target for structural modification [19]. Derivatization was also performed to overcome the low solubility of usnic acid and optimize the production of the compounds, as the acquisition of natural lichen biomass to supply secondary metabolites on a large scale is neither practical nor environmentally friendly [20].

Derici et al. [18] have shown that usnic acid has an apoptotic effect on several species of *Leishmania*. In order to increase the solubility of this compound in water, sodium usnate (SAU) **1** with the general formula $NaL_2 \cdot 5H_2O$ (Figure 1) was synthesized and complexed with metals to improve the activity [21]. The coordination compounds containing lanthanide ions that we present in this study have been obtained from the molecular modification of SAU **1**. Because of their high chemical reactivity, lanthanides never occur as pure elements in nature, but only as sparsely distributed compounds that form rare minerals. Lanthanide compounds often have magnetic, catalytic, and optical properties, and therefore they are currently widely used in industry and medicine, as chemical markers, and optical sensors [22].

In this work, the lanthanides samarium - Sm(III), gadolinium - Gd(III), europium - Eu(III), neodymium - Nd(III), lanthanum - La(III) and terbium - Tb(III) were complexed with SAU **1** [21], resulting in complexes that were tested for antileishmanial activity and selectivity. In addition to elucidating their mechanisms of leishmanicidal action, these promising results may contribute to more viable and effective therapeutic options against cutaneous leishmaniasis.

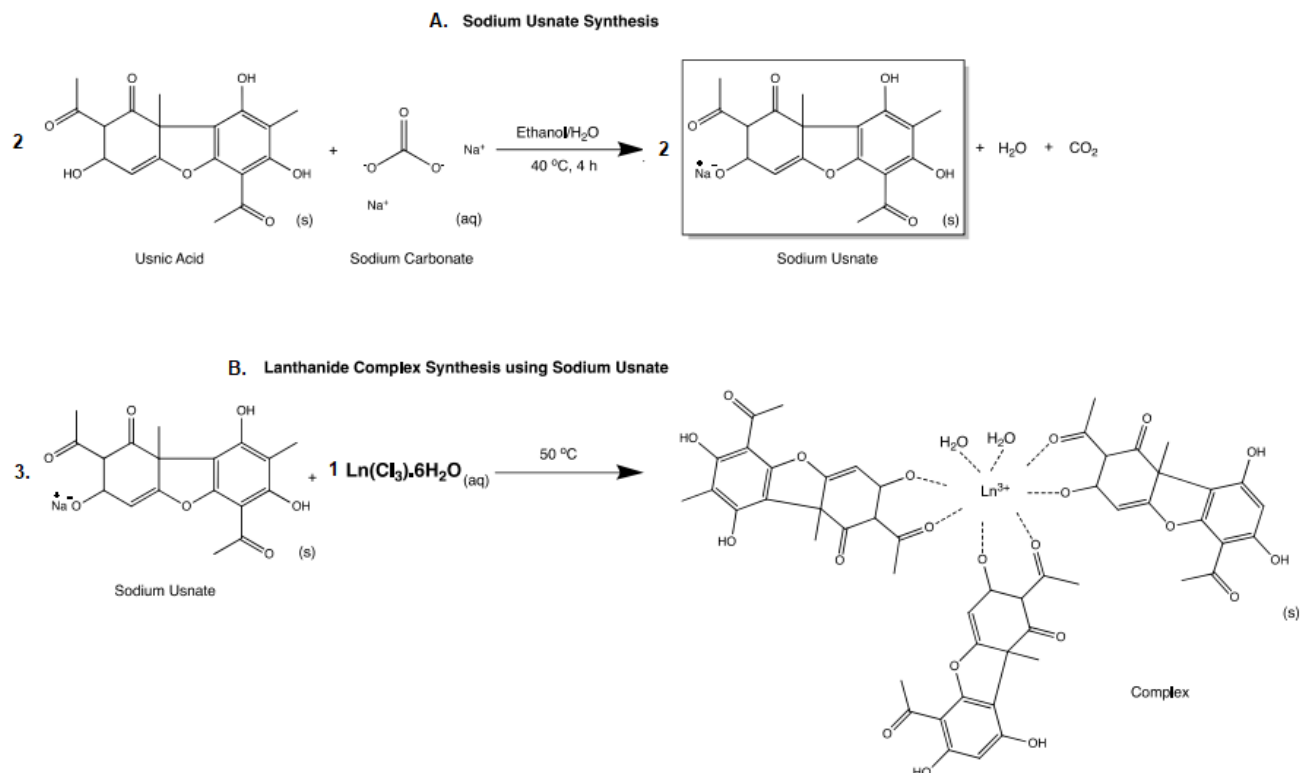


Figure 1 – A. Structural formula of usnic acid ($R = OH$) and sodium usnate **1** (SAU, $R = ONa$) [12]. B. Complexes $[Ln L_3 (H_2O)_x]$ ($Ln = Sm(III)$ **2**, $Gd(III)$ **3**, $Eu(III)$ **4**, $Nd(III)$ **5**, $Tb(III)$ **6**, $La(III)$ **7**, and $L =$ sodium usnate) [21].

2. Results and Discussion

2.1 Antileishmanial activity

Sodium usnate (SAU **1**) was synthesized to increase the solubility of usnic acid in water (Figure 1), looking for better suitability for biological in vitro and in vivo assays.

Biological applications of lanthanides have recently increased because they are abundant in the environment and exhibit chemistry similar or superior to other biologically useful metals because of their higher Lewis acidity. They have sufficient coordination chemistry to allow selective uptake, transport, and incorporation into enzymes. Their biological coordination chemistry is analogous to that of other metals, most notably Ca^{II} and Fe^{III} , but includes cooperative metal bonding to amplify the effects of small differences in ionic radius and allow selectivity [23–28].

In this work, SAU 1 and the lanthanide complexes 2-7 were tested against *L. (L.) amazonensis* promastigote forms, and cell viability was assessed by MTT metabolization, using the principle of tetrazolium–formazan conversion by living cell mitochondrial enzymes. All complexes were found to be highly active against promastigote forms (Table 1), more potent than the original compound SAU 1 ($IC_{50}=2.09 \mu M$) and even more effective than the reference drug, pentamidine ($IC_{50}=1.50 \mu M$). EuL₃.3H₂O 4 was found more potent than the reference drug amphotericin B ($IC_{50}=0.20$ versus $0.145 \mu M$). The complex with Tb(III) 6 showed impressive activity ($IC_{50}=0.0023 \mu M$), 63 times higher than amphotericin B and almost a thousand times higher than SAU 1 (Table 1). The optimization of the cytotoxic effect of the same lanthanide complexes over SAU was observed by Nunes et al. on MCF-7 tumor cells [21].

Derici et al. [18] observed a potent activity of usnic acid on promastigotes of *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor, 1914, *L. (L.) infantum* Nicolle, 1908, and *L. tropica* Wright, 1903, with IC_{50} values/48h of $10.76 \mu g.mL^{-1}$, $13.34 \mu g.mL^{-1}$, and $21.06 \mu g.mL^{-1}$, respectively. Similarly, Luz et al. [16] have found an $IC_{50}/72h = 18.30 \mu g.mL^{-1}$ for *L. (L.) infantum* promastigotes treated with usnic acid. In our work, sodium usnate SAU 1 was found to be highly active against *L. (L.) amazonensis* promastigotes, with an $IC_{50}/72h = 2.09 \mu M (=0.77 \mu g.mL^{-1})$, showing that improved solubility in aqueous medium may have resulted in optimized antileishmanial activity.

Table 1. *In vitro* antileishmanial activity, cytotoxic effect on mammalian cells, and selectivity index of SAU 1 and lanthanide complexes 2-7.

Lanthanide complex	<i>L. amazonensis</i> promastigotes (Pro.) $IC_{50}^1 (\mu M)$	<i>L. amazonensis</i> intracellular amastigotes (Ama.) $IC_{50}^2 (\mu M)$	Fibroblasts NIH/3T3 (Fib.) $IC_{50}^3 (\mu M)$	SI ⁴ (Ama.)
SAU (sodium usnate) 1	2.09	19.97	68.20	3.41
SmL ₃ .4H ₂ O 2	1.26	5.23	19.98	3.82
GdL ₃ .3H ₂ O 3	1.50	5.52	26.54	4.81
EuL ₃ .3H ₂ O 4	0.20	2.98	20.07	6.73
NdL ₃ .3H ₂ O 5	0.91	2.83	19.73	6.97
TbL ₃ .2H ₂ O 6	0.0023	7.52	17.49	2.32
LaL ₃ .3H ₂ O 7	1.49	4.58	10.89	2.38
Pentamidine	1.49	0.92	NT	NC
Amphotericin B	0.145	0.198	NT	NC

¹ IC_{50} : half-maximal inhibitory concentration on promastigotes; ² IC_{50} : half-maximal inhibitory concentration on intracellular amastigotes; ³ IC_{50} : half-maximal inhibitory concentration on NIH/3T3 fibroblasts; ⁴SI (selectivity index): IC_{50} in NIH/3T3 fibroblasts/ IC_{50} on intracellular amastigotes; ⁵SI

(selectivity index): IC₅₀ on NIH/3T3 fibroblasts/IC₅₀ on promastigotes; positive control: pentamidine and amphotericin B; NC: not calculated; NT: not tested. Data are representative of three independent experiments.

All compounds were found to be more active against promastigotes than against amastigote forms. To understand this pharmacological behavior, it is important to emphasize that amastigotes are the intracellular stage of *Leishmania* parasites. Therefore, a drug candidate must be able to cross the macrophage cell membrane to reach these forms. In this context, biopharmaceutical aspects are crucial for predicting the biological tendencies of a molecule. The Topological Polar Surface Area (TPSA) is an important biopharmaceutical parameter considering molecular complexes and is directly related to the number of polar groups exposed to solvents. Complexes and peptoids with low TPSA values are already known to have a higher permeability ratio [29]. All complexes tested showed moderate TPSA values (Table 2). Considering that the in vitro activity on intracellular amastigotes was demonstrated in RPMI 1640 medium, the intermolecular interaction between the polar groups of the complexes and the aqueous medium may have reduced their permeability across the membrane, which explain the inferior results.

Table 2. In silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity (ADMET) predictions of lanthanide complexes. No mutagenic, tumorigenic, or irritating effects were observed for any of the complexes.

Lanthanide Complex	logP	logS	TPSA	Drug likeness	Drug-score
SAU (sodium usnate) 1	- 1.31	- 3.52	123.9	-0.34	0.36
SmL₃.4H₂O 2	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
GdL₃.3H₂O 3	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
EuL₃.3H₂O 4	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
NdL₃.3H₂O 5	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
TbL₃.2H₂O 6	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
LaL₃.3H₂O 7	0.76	- 3.52	121.1	-0.09	0.37
Pentamidine	1.75	- 2.23	118.2	-5.35	0.45
Amphotericin B	0.32	- 5.08	319.6	-0.14	0.27

LogP = partition coefficient; LogS = water solubility; TPSA = topological polar surface area; Druglikeness = similarity of the properties between compounds and existing drugs; Drug-score = compilation of ADMET parameters to judge the compound's overall potential to qualify for a drug.

In addition, biopharmaceutical parameters are useful to indicate whether a compound may have oral viability. This route of administration is desirable for the treatment of most diseases such as leishmaniasis. Advantages include ease of administration, cost-effective manufacturing, easy storage conditions, high patient compliance, and more accurate self-administered dose [33]. In particular, the logP value has been widely discussed in the postulation of the rule of five and is still considered an important parameter of a prototype. This parameter can be used to predict whether a compound will penetrate the cell membrane or be easily soluble in an aqueous medium such as blood [31]. According to Lipinski et al [32], a $\log P \leq 5$ is considered necessary for an ideal prototype. Meanwhile, logS values are directly related to the water solubility of a compound and values close to -4 have been defined as the standard for a drug candidate [33]. All tested compounds exhibited logS values close to -4 and $\log P \leq 5$, following the postulated characteristics and indicating that the complexes can be administered orally (Table 2).

Intracellular amastigote activity was evaluated according to the following arbitrary scale: compounds were considered active when $IC_{50} < 20 \mu M$; moderately active when $20 < IC_{50} < 50 \mu M$; and potentially inactive when $IC_{50} > 50 \mu M$ [34]. Therefore, all lanthanide complexes were active against *L. (L.) amazonensis* amastigotes (Table 1), with a greater effect than SAU 1. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Turkey test has confirmed NdL₃.3H₂O 5 was statistically different from SAU 1 ($p \leq 0.0001$) at all concentrations tested. EuL₃.3H₂O 4 was more potent than SAU at the lowest concentrations ($p \leq 0.0001$); and TbL₃.2H₂O 6 only at the higher concentration (50 $\mu g/mL$; $p \leq 0.0001$); all the other complexes were more potent than SAU 1 at all the concentrations tested excepting 6.25 $\mu g/mL$ ($p \leq 0.0001$).

These results lead to the conclusion that the insertion of the lanthanide ion led to optimization of the antileishmanial activity. Because of their high chemical reactivity, it is not possible to analyze the activity of isolated lanthanides. This is the case with other drugs in medicine, such as the use of cyclodextrin to promote the stability of gold nanoparticles and the programmed release of antitumor drugs [35,36]. For example, the stability of trivalent antimonials (SbIII) is possible when linked to meglumine and gluconate, as in the antileishmanial drugs Glucantime® and Pentostam® [37].

Among the complexes tested, those with Eu(III) 4 and Nd(III) 5 were the most active in intracellular amastigotes ($IC_{50}=2.98$ and $2.83 \mu M$, respectively; Figure 2), while the compound with Tb(III) was the least active ($IC_{50}=7.52 \mu M$). Studies with other lanthanide complexes on other parasite species have shown similar results. Caballero et al. [38] observed that the complexes with Eu(III) and Nd(III) had the same effect as the reference drug Glucantime®; on the other hand, the complex with La(III) was the most active on *L. (L.) infantum* and on *L. (L.) braziliensis* amastigotes. In the present study, LaL₃.3H₂O 7 was active on *L. (L.) amazonensis* ($IC_{50}=4.58 \mu M$), opening a promising perspective for application against several species of *Leishmania*.

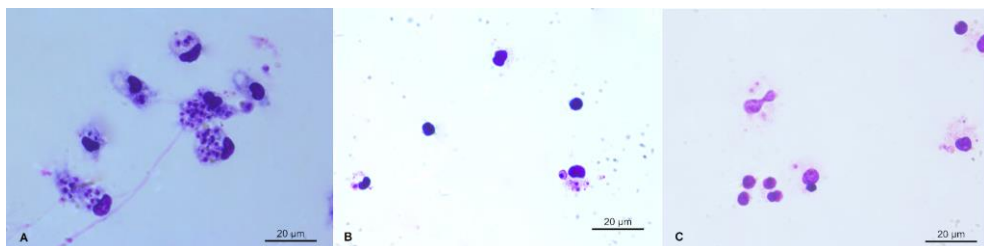


Figure 2 - *In vitro* antileishmanial activity on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* intracellular amastigotes. A. Nontreated infected peritoneal cells. B. Cells treated with NdL₃.3H₂O at a concentration of 6.5 µg.mL⁻¹; C. Cells treated with EuL₃.3H₂O at 12.5 µg.mL⁻¹.

2.2 Cytotoxicity and selectivity index in mammalian cells

In silico predictions were used to estimate the risk of mutagenicity, tumorigenicity, and irritation, and the complexes showed no evidence of these side effects (Table 2). To demonstrate host cell safety, SAU **1** and lanthanide complexes **2-7** were tested on NIH/3T3 fibroblasts to assess their cytotoxicity and estimate their selectivity, as recommended by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) [39].

A compound is considered to have low cytotoxicity when SI ≥ 10 [40]. The most active complexes on intracellular amastigotes were EuL₃.3H₂O **4** (IC₅₀=2.98 µM; SI=6.73) and NdL₃.3H₂O **5** (IC₅₀=2.83 µM; SI=6.97). Although they did not meet the SI ≥ 10 criteria, both showed a potent effect on *L. (L.) amazonensis* amastigotes. Suárez et al obtained similar results [41] working with synthetic analogs of quinolones and alkaloids (1,2,3,4-tetra-hidro(benzo)-3-quinolin-ol and 2-amino-8-hidroxi-quinoline), with SI ~ 5.0. Indeed, the application of the SI criterion is controversial for *in vitro* tests used in drug research for infectious diseases [40], once in *in vivo* tests these compounds induced a total reduction of lesions and no cytotoxicity related clinical effects [41].

2.3 Nitric Oxide (NO) production

The induction of a strong oxidative response by lanthanides on human cells has already been described, with the release of reactive oxygen species (ROS) that interfere with the signaling that regulates the immune response to an infection [42]. Macrophages are the host cells of *Leishmania* sp. and also play a role in the action against the parasite. The beneficial function of the ROS oxidative burst and NO is associated with the eradication of the parasite, in addition to the clinical improvement of the patient [43].

Intracellular parasites rely on the ability to undergo replication cycles within host cells. Once the cellular environment of macrophages becomes inviable, the parasite cannot replicate. NO production is one of the main mechanisms for the intracellular killing of the parasite. In addition to more immediate effects, such as reduced parasite metabolism and proliferation, it is associated with immune regulation of infection [44,45]. Paradoxically, NO alone may not be sufficient to control the infection and may contribute to the tissue damage observed in human CL [46].

Treatment with lanthanide complexes at some concentrations induced an increase in NO release from infected macrophages (Figure 3). EuL₃.3H₂O **4** had the strongest effect at the very lowest concentration (6.25 µg.mL⁻¹). This concentration is close to the half-maximal inhibitory concentration on the intracellular amastigotes (IC₅₀ = 2.98 µM or 3.687 µg.mL⁻¹), suggesting NO production as a mechanism of action of this complex against *L. (L.) amazonensis*.

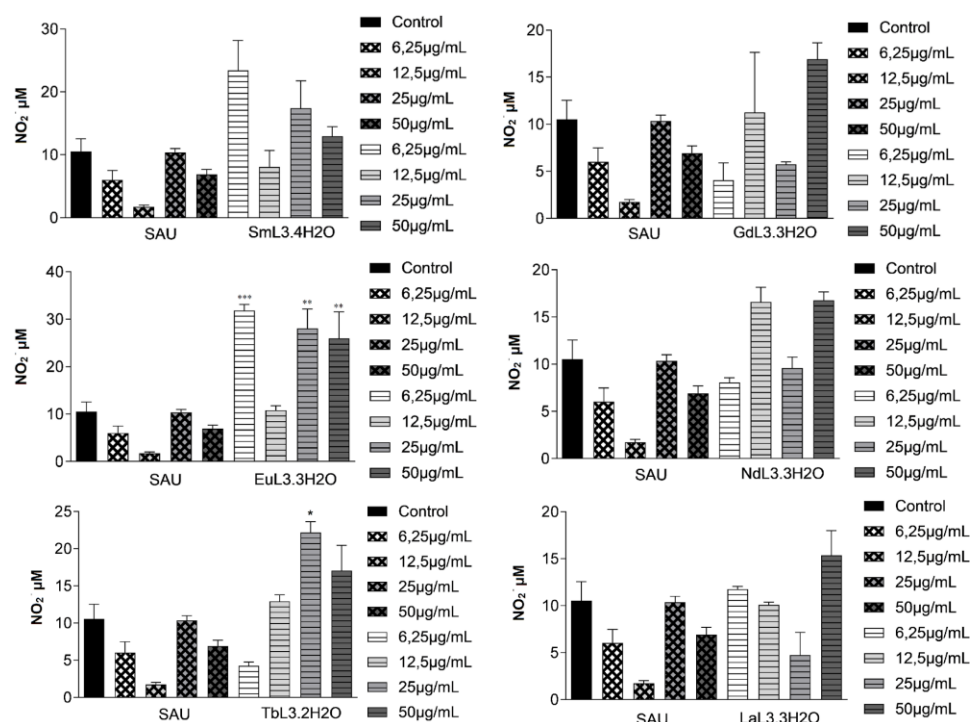


Figure 3 - Release of nitric oxide by *L. (L.) amazonensis* infected macrophages 24 h after treatment with sodium usnate (SAU **1**) and lanthanide complexes **2-7**. Bars represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three replicates. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.0001$, for the different concentrations compared to untreated cells (control); ANOVA, followed by the Bonferroni test.

2.4 Flow cytometric analysis for detection of changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Promastigotes treated with SAU **1** and lanthanide complexes **2-7** were stained with TMRE to evaluate changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Figure 4 and Table 3 show the histograms (%) of TMRE-labeled promastigotes after incubation with **1-7** at the calculated IC₅₀ (Table 1). The complex with Sm(III) showed a marked effect on the mitochondrial membrane potential, as we observed a reduction in labeling of 40.7% and 41.7% after 48 and 72 h of treatment, respectively. Similarly, the complex with Gd(III) was able to reduce the $\Delta\Psi_m$ in 36.2% and 24.5% after 48 and 72 h treatment, respectively. Complexes with La(III) and Nd(III) affected the $\Delta\Psi_m$ in 22.3% and 11.35%, respectively, after 72 h of treatment. Thus, we can assume that the complexes with these lanthanides cause mitochondrial dysfunction, an important and recognized target of antileishmanial drugs.

SAU **1** had a mild effect on $\Delta\Psi_m$ 72h after treatment, with a 12% reduction in labeling at the concentration tested (IC₅₀ = 2.09

μM). There are few reports on the effect of usnic acid on trypanosomatid mitochondria. Carvalho et al. [47] showed damage to mitochondria of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with 30–50 μg.mL⁻¹ usnic acid, with marked swelling and branching, as well as loss of organization of the mitochondrial cristae observed in ultrastructural analysis. Similarly, Luz et al. [16] observed changes in the mitochondrial morphology of *L. (L.) infantum* promastigotes treated with 25 μg.mL⁻¹ usnic acid, with marked swelling.

Table 3. Flow cytometry of *L. (L.) amazonensis* to evaluate the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and apoptosis after treatment with SAU **1** and lanthanide complexes **2-7**. Promastigotes captured in the gated region and representative histograms (% labeled cells) of promastigotes incubated with TMRE, and PE Annexin V and 7-AAD.

Treatment	Time after Treatment TMRE		Time after treatment PE Annexin V and 7-AAD											
			24 h				48 h				72 h			
	48h	72h	Unst.	An.	7-AAD	An./7-AAD	Unst.	An.	7-AAD	An./7-AAD	Unst.	An.	7-AAD	An./7-AAD
Nontreated parasites	73.3	78.4	98.1	1.0	0.3	0.6	95.4	1.0	2.5	1.1	80.3	1.9	6.4	11.4
Heat-killed parasites	0.4	0.2	1.4	1.4	11.5	85.3	6.4	2.0	29.0	62.5	13.3	3.4	38.8	44.5
SAU 1	69.3	69.0	98.5	0.6	0.4	0.5	96.0	1.4	0.8	1.9	85.7	2.3	3.8	8.2
SmL ₃ .4H ₂ O 2	43.5	45.7	81.2	3.1	10.2	5.5	92.1	1.7	2.8	3.4	85.8	2.5	4.0	7.6
GdL ₃ .3H ₂ O 3	46.8	59.2	98.4	0.7	0.4	0.6	78.8	2.4	12.7	6.0	86.8	2.6	3.2	7.4
EuL ₃ .3H ₂ O 4	79.9	80.6	98.2	0.6	0.5	0.7	95.4	1.3	1.0	2.3	84.0	1.9	6.0	8.1
NdL ₃ .3H ₂ O 5	70.1	60.9	98.4	0.7	0.3	0.5	93.8	1.4	1.6	3.3	79.8	2.5	7.7	10.0
TbL ₃ .2H ₂ O 6	70.2	69.5	98.3	0.8	0.2	0.6	94.5	1.3	1.2	3.0	80.9	2.6	6.4	10.1
LaL ₃ .3H ₂ O 7	76.0	82.0	98.3	0.7	0.4	0.5	93.3	1.8	1.6	3.3	82.0	2.4	5.6	10.0

Unst. = unstained parasites; An. = PE Annexin V stained parasites; 7-AAD = 7-AAD stained parasites; An./7-AAD = double stained parasites.

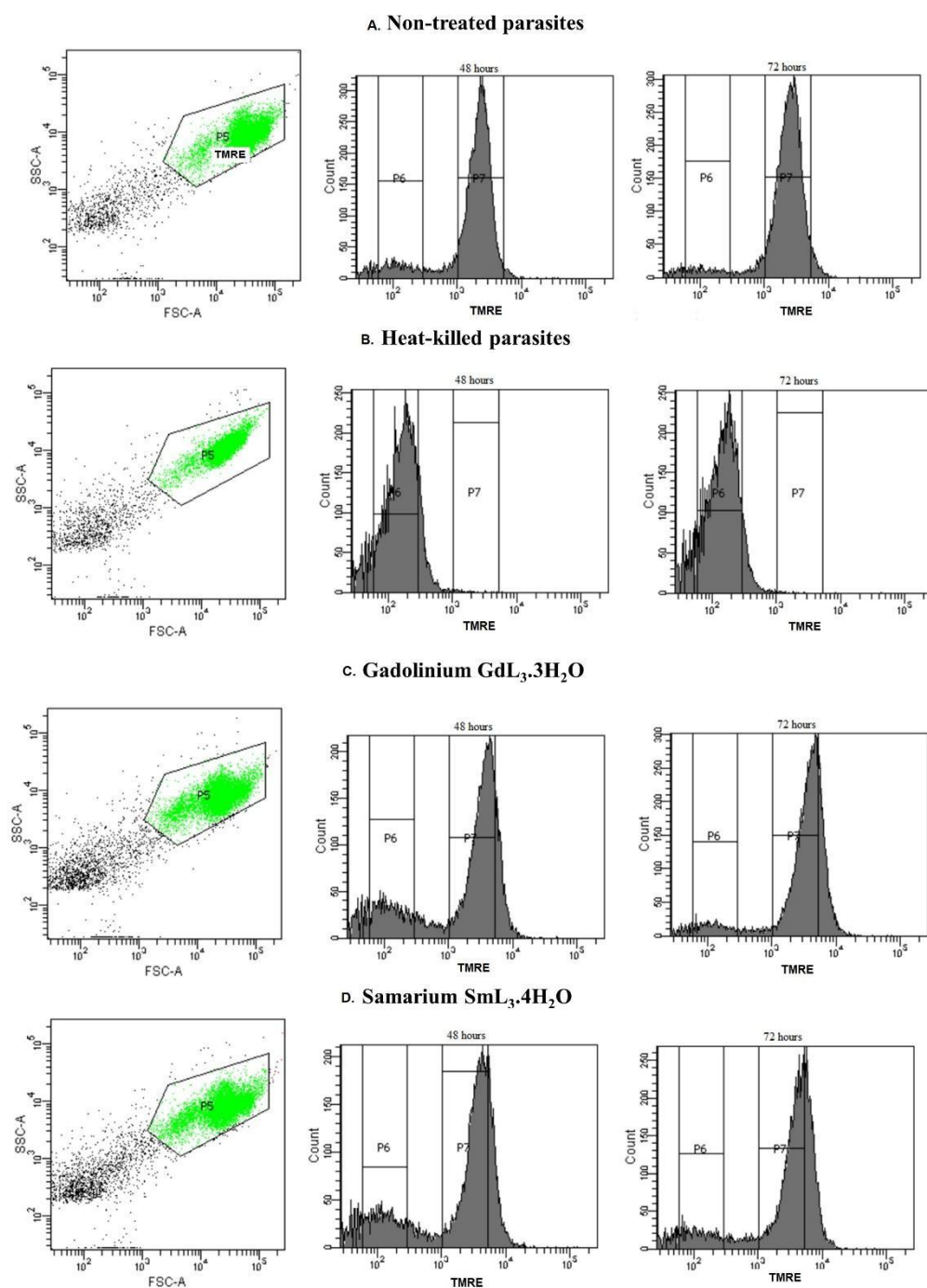


Figure 4 - Flow cytometry of *L. (L.) amazonensis* to evaluate the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) after 48 and 72 h of treatment with lanthanide complexes $[Ln L_3 (H_2O)_x]$ ($Ln = Gd(III)$ and $Sm(III)$ and $L =$ sodium usnate). Promastigotes captured in the gated region (dotplots) and representative histograms (% labeled cells) of promastigotes incubated with TMRE. **(A)** Non-treated parasites. **(B)** Heat-killed parasites. **(C)** Promastigotes treated with $GdL_3.3H_2O$ **3** ($1.50 \mu M$). **(D)** Promastigotes treated with $SmL_3.4H_2O$ **2** ($1.26 \mu M$).

2.5 Flow cytometric analysis for detection of apoptosis and membrane permeability

L. (L.) amazonensis promastigote forms were treated with SAU **1** and the lanthanide complexes **2-7** at the calculated IC_{50} (Table 1) for 24, 48 and 72 hours, and then stained with PE Annexin V and 7-AAD for FACS analysis. This measurement can track cells over time from PE Annexin V and 7-AAD negative (viable, or without measurable apoptosis), to PE Annexin V and 7-AAD positive (early apoptosis, membrane integrity present), and finally to PE Annexin V and 7-AAD positive (terminal apoptosis and death). The movement of parasites through these three stages is indicative of apoptosis. On the other hand, cells that are both PE Annexin V and 7-AAD positive may have undergone apoptotic death or died by a necrotic pathway.

Figure 5 and Table 3 show the percentage of cell labeling after incubation with PE annexin and 7-AAD. Again, the effect of the complexes with the lanthanides Sm(III) and Gd(III) on the parasites can be highlighted. $SmL_3.4H_2O$ **2** caused an earlier cell death effect, since 24 h after treatment there was a 17.2% reduction in viability, with 10.2% 7-AAD staining and 5.5% double labeling. On the other hand, $GdL_3.3H_2O$ **3** had its greatest effect 48 h after treatment, also reducing cell viability by 17.4%, with 12.7% 7-AAD staining and 6% double labeling. Despite the disruption of cell membrane integrity in both cases, it was not possible to establish a relationship with either early or late apoptotic processes, as PE Annexin V labeling was low at all times studied.

2.6. Study limitations

The complexity of understanding the mechanisms of leishmanicidal action, namely the induction of apoptosis, may be related to the use of IC_{50} as the inhibitory concentration for promastigote forms. The use of IC_{90} or IC_{99} , or higher concentrations, would improve these analyses by promoting complete parasitic inhibition. Likewise, investigating the mechanisms of action of the complexes on the intracellular amastigote forms could greatly enhance our understanding, despite the current methodology's challenging nature.

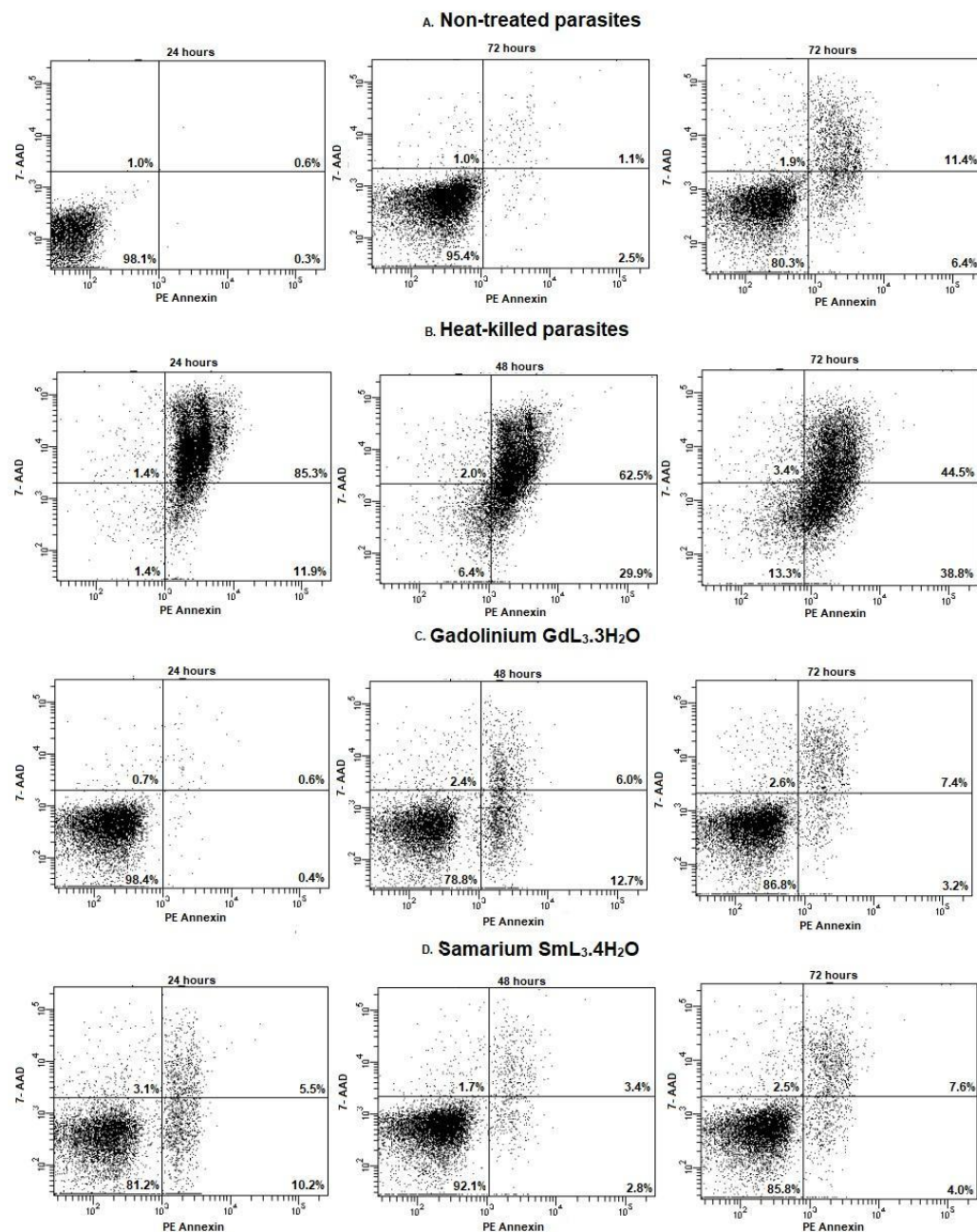


Figure 5 - Flow cytometry of *L. (L.) amazonensis* to detect apoptosis or plasma membrane permeability after 24, 48 and 72 h of treatment with lanthanide complexes [Ln L₃ (H₂O)_x] (Ln= Gd(III) and Sm(III) and L= sodium usnate). Promastigotes captured in the gated region and representative histograms of promastigotes incubated with PE Annexin V and 7-AAD. (A) Non-treated promastigotes. (B) Heat-killed parasites. (C) Promastigotes treated with GdL₃.3H₂O **3** (1.50 μM). (D) Promastigotes treated with SmL₃.4H₂O **2** (1.26 μM).

3. Materials and Methods

3.1 Lanthanide complexes

Compounds **1-7** (Figure 1) were synthesized in the Institute of Chemistry of the Federal University of Mato Grosso do Sul [19]. Sodium usnate (SAU) **1** was prepared as described in the literature [46], from the reaction of the ethanolic suspension of usnic acid (**3**

mmol) with a sodium carbonate solution (1.5 mmol) with stirring at 40 ° C for 4 h, followed by filtration and evaporation of the solvent to obtain a yellow solid. Lanthanide complexes were then synthesized and characterized [19]. Briefly, sodium usnate (0.3 mmol) was dissolved in water and ethanol (3:1); 0.1 mmol of lanthanide ions: Sm(III), Gd(III), Eu(III), Nd(III), Tb(III) and La(III) were added to this solution and kept under stirring for 8 h at 50°C. The resulting yellow precipitate was washed with ice water and dried in a vacuum desiccator (Figure 1). The general coordination formula was used: $[LnL_3(H_2O)_x]$, where $L = C_{18}H_{15}O_7$, $Ln = Tb(III)$, $x = 2$; $Ln = Gd(III)$, $Eu(III)$, $Nd(III)$, $La(III)$, $x=3$ and $Ln = Sm(III)$, $x=4$.

3.2 Parasites

A standard strain of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) was used for *in vitro* antileishmanial activity assays. Promastigote forms were grown in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil), 10,000 U.mL⁻¹ penicillin and 10 mg.mL⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil). Parasites were routinely isolated from skin lesions previously induced in BALB/c mice and maintained in axenic culture until passage 20 [34].

3.3 Animals

Four-week-old female BALB/c mice were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). The animals were housed in mini-isolators connected to a ventilated rack, fed a balanced diet (Nuvital®, Nuvilab®), and given ad libitum access to filtered water. This study received approval from the local Animal Experimentation Ethical Committee (CEUA/UFMS) under protocol 1,172/2021.

3.4 *In vitro* antileishmanial activity on *L. (L.) amazonensis* promastigote forms

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in the logarithmic growth phase (10^6 parasites/mL) were added to 96-well plates, and incubated with SAU **1** and the lanthanide complexes **2-7** (0.78-50.0 µg.mL⁻¹) in six replicates. The microplates were incubated at 26°C for 72 hours. Cell viability was assessed by adding 1 mg.mL⁻¹/well of MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich® SP/Brazil) [49]. Results were expressed as the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) calculated from a nonlinear dose-response regression curve using the GraphPad PRISM 5.0 statistical program. Pentamidine (Sigma-Aldrich® SP/Brazil; 0.19-12.5 µg.mL⁻¹) and AMB (Amphotericin B, Sigma-Aldrich® SP/Brazil; 0.15-1 µg.mL⁻¹) were used as positive controls and pure Schneider® culture medium as negative control.

3.5 *In vitro* antileishmanial activity on *L. (L.) amazonensis* intracellular amastigotes

Peritoneal macrophages were obtained from BALB/c mice in RPMI 1640 culture medium (Sigma-Aldrich® SP/Brazil). After exclusion of inviable cells with trypan blue staining (Sigma-Aldrich® SP/Brazil), cells were transferred to 24-well plates with 13-mm round glass coverslips (10^6 cells/well) and kept at 37°C/5% CO₂. After adhesion for one hour, cells were infected with promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in the stationary phase (4×10^6 cells/well). After 4 h of incubation, samples (complexes **1-7**) were added in six replicates (6.25-50.0 µg.mL⁻¹). Non-treated infected cells were used as the negative control and AMB (0.125-1.0 µg.mL⁻¹) and Pentamidine (6.25-50.0 µg.mL⁻¹) were used as the positive controls. Coverslips were removed after 24 hours, subjected to a dehydration battery with increasing concentrations of acetone: xylol

and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich® SP/Brazil) diluted 1:10 in distilled water [34]. After mounting on slides, 200 cells per coverslip were analyzed by light microscopy and the average number of amastigotes/cells was calculated. IC₅₀ was determined using a non-linear dose-response regression curve as described above. The concentrations of complexes were compared by Two-way ANOVA followed by the Turkey test.

3.6. *In silico* ADMET predictions

All compounds were subjected to the OSIRIS Property Explorer program to estimate the risk of side effects such as mutagenicity, tumorigenicity, and irritation. Furthermore, drug-related properties were measured, including clogP, logS, MW, drug similarity, and overall drug score [33].

3.7 Cytotoxicity in mammalian cells

The cytotoxic effect of compounds **1-7** was evaluated on NIH/3T3 fibroblasts [50] obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil). Fibroblasts were seeded at 5×10^5 cells/well in 96-well plates. After 24 h of fixation, cells were incubated for 48 hours with **1-7** at 2.5-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, in three replicates. Cell growth was evaluated using the sulforhodamine B colorimetric method [50], with absorbances read on the PT-READER microplate instrument (Thermoplate®) at 540 nm. DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich® SP/Brazil) was used as a negative control at a concentration necessary to solubilize the highest concentration of the test sample and did not interfere with cell viability. The growth inhibition percentage - GI (%) of each test sample was calculated in Microsoft Office Excel 2007 software [51]. IC₅₀ was determined graphically in the Microcal Origin Version 6.00 program [52]. The selectivity index (SI) was calculated as the ratio between the cytotoxicity on cells (IC₅₀) and the activity on the parasite forms (IC₅₀).

3.8 NO production by infected cells

Nitric oxide (NO) production by infected and treated peritoneal macrophages was estimated in the supernatants from the intracellular amastigotes assay by the Griess reaction [53]. Aliquots of the supernatants (50 mL) were incubated with Griess reagent (1:1) for 10 minutes at room temperature. Absorbance was read on a microplate reader (SpectraMax®) at 550nm. Conversion of nitrite (NO⁻²) to micromolar (μM) was performed by comparing the samples to a standard curve obtained with known concentrations (1-10 μM) of sodium nitrite diluted in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich® SP/Brazil). The average and standard error of the mean (SEM) were calculated from three replicates. The data were analyzed using ANOVA and subsequently subjected to the Bonferroni test.

3.9 Flow cytometric analysis to detect changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$)

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) can change in cells undergoing apoptosis, oxidative stress, necrosis, and other cellular processes. Cationic and lipophilic $\Delta\Psi\text{m}$ -sensitive dyes accumulate within the mitochondria of healthy cells, but not in mitochondria that have lost $\Delta\Psi\text{m}$. In this work, *L. (L.) amazonensis* promastigote forms ($1 \times 10^6.\text{mL}^{-1}$) were treated for 48 and 72h with SAU **1** and the lanthanide complexes **2-7** at the calculated IC₅₀ (Table 1), in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich®) supplemented with 20% FCS (Cultilab®), 10,000 U.mL⁻¹ penicillin, and 10 mg.mL⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich®). Heat-killed parasites (60°C bath/10 min.) were used as positive control and non-treated parasites were used as negative control [54].

Promastigotes were stained with 50 nM tetramethylrhodamine, ethylester (TMRE) (MitoStatus TMRE, BD Pharmingen™) for 15 min at room temperature, and subjected to flow cytometric analysis (BD FACSCanto™ II). 10,000 events were acquired in the region previously determined to correspond to the parasites. Fluorescence was quantified, and histograms were generated.

3.10 Flow cytometry analysis for detection of apoptosis

PE Annexin V staining precedes the loss of membrane integrity observed in the final stages of cell death, resulting from either apoptotic or necrotic processes. PE Annexin V is used in conjunction with the vital dye 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) to identify early apoptotic cells (7-AAD negative, PE Annexin V positive). Viable cells with intact membranes exclude 7-AAD, but the membranes of dead and damaged cells are permeable to 7-AAD. Cells that are in late apoptosis or already dead are both PE Annexin V and 7-AAD positive. In this work, *L. (L.) amazonensis* promastigote forms ($1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) were treated for 24, 48, and 72h with **1-7** at the calculated IC_{50} (Table 1), in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich®) supplemented with 20% FCS (Cultilab®), 10,000 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin, and 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin (Sigma-Aldrich®). Heat-killed parasites (60°C bath/10 min.) were used as positive control and untreated parasites were used as negative control [54]. Promastigotes were stained with 5 μL of PE Annexin V and 5 μL 7-AAD (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences™) and immediately subjected to flow cytometric analysis (BD FACSCanto™ II). 10,000 events were captured in the region previously determined to correspond to the parasites. Fluorescence was quantified, and histograms were generated.

4. Conclusions

All lanthanide complexes **2-7** were found highly active and more potent than SAU **1** against both parasite forms (Pro: $\text{IC}_{50} < 1.50 \mu\text{M}$; Ama: $\text{IC}_{50} < 7.52 \mu\text{M}$). The most effective complexes on promastigotes were $\text{TbL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ **6** and $\text{EuL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ **4**. $\text{EuL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ **4** and $\text{NdL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ **5** were the most selective and effective on intracellular amastigotes, with SI of approximately 7.0. Treatment with $\text{EuL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ **4** triggered NO release even at the lowest concentration ($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), indicating NO production as a mechanism of action against *L. (L.) amazonensis*. Incubation of promastigotes with the lanthanide complexes at the calculated IC_{50} , especially with $\text{SmL}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ **2** and $\text{GdL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ **3**, was found to modulate the mitochondrial membrane potential, suggesting that these complexes are able to target this crucial organelle. The aforementioned complexes caused cell death through cell membrane disruption, but their relationship with early or late apoptotic processes remains unclear. Further research is being conducted to understand the mechanisms of leishmanicidal action at different concentrations.

Authors Contributions: Conceptualization, C.C.P.A. and A.P.D.; methodology, F.S.; A.R.N.; Y.S.R.; E.M.G.L.; M.M.; R.T.P.; D.M.N.; A.M.T.F.; D.P.L.; E.M.G.L.; E.M.P.; C.C.P.A.; I.S.M.; formal analysis, F.S.; A.R.N.; E.M.G.L.; C.C.P.A.; R.T.P.; Y.S.R.; A.M.T.F.; D.P.L.; E.M.G.L.; M.C.T.K.; investigation, C.C.P.A.; E.M.P.; A.P.D.; resources, C.C.P.A., D.P.L.; A.M.T.F. and A.P.D.; data curation, C.C.P.A. and A.P.D.; writing—original draft preparation, F.S.; C.C.P.A.; writing—review and editing, C.C.P.A. and A.P.D.; project administration, C.C.P.A., A.P.D. and M.A.U.M.; funding acquisition, C.C.P.A., D.P.L., A.M.T.F. and A.P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, and by the Federal University of Mato Grosso do Sul.

Institutional Review Board Statement: The animal study was reviewed and approved by Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFMS - Brazil), under Protocol Number 1.172 /2021.

Acknowledgments: The authors would like to pay tribute to Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa, who passed away on June 10, 2023, for his important contributions to the study of trypanosomatids. The authors thank Dr. Inês Tozetti for providing the flow cytometry platform for FACS analysis, and Natália Oliveira Alves and Jennifer Naed for administrative and technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Neglected tropical diseases -- GLOBAL Available online: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases> (accessed on 15 July 2023).
2. Dias, N.L.C.; Faccini-Martínez, Á.A.; Oliveira, S. Análise das internações e da mortalidade por doenças febris, infecciosas e parasitárias durante a pandemia da COVID-19 no Brasil. *InterAmerican Journal of Medicine and Health* **2021**, *4*, doi:10.31005/iajmh.v4i.173.
3. DNDi – Best science for the most neglected Available online: <https://dndi.org/> (accessed on 15 July 2023).
4. Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas, December 2020 Available online: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090?locale-attribute=en> (accessed on 15 July 2023).
5. Bilgic-Temel, A.; Murrell, D.F.; Uzun, S. Cutaneous Leishmaniasis: A Neglected Disfiguring Disease for Women. *International Journal of Women's Dermatology* **2019**, *5*, 158–165, doi:10.1016/j.ijwd.2019.01.002.
6. Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M.R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. Leishmaniasis: a Review. *F1000Research*, **2017**, *26*, 750, doi: 10.12688/f1000research.11120.1
7. Reithinger, R.; Dujardin, J.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* **2007**, *7*, 581–596, doi:10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
8. Brindha, J.; Balamurali, M.; Chanda, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Frontiers in Chemistry* **2021**, *9*, 622286, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>.
9. Lqbal, K.; Khalid, S.; McElroy, C.A.; Adnan, M.; Khan, G.M.; Dar, M.J. Triple-combination therapy for cutaneous leishmaniasis using detergent-free, hyaluronate-coated elastic nanovesicles. *Future Medicine* **2022**, *17*, doi:10.2217/nnm-2022-0077.

10. Khalid, S.; Salman, A.; Lqbal, K.; Rehman, F.; Ullah, I.; Satoskar, A.R.; Khan, G.M.; Dar, M.J. Surfactant free synthesis of cationic nano-vesicles: A safe triple drug loaded vehicle for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2022**, *40*, 102490, doi:10.1016/j.nano.2021.102490.
11. Dar, M.J.; McElroy, C.A.; Khan, M.I.; Satoskar, A.R.; Khan, G.M. Development and evaluation of novel miltefosine-polyphenol co-loaded second generation nano-transfersomes for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2020**, *17*, 1, 97–110, doi:10.1080/17425247.2020.1700227.
12. Tasbihi, M.; Shekari, F.; Hajjaran, H.; Masoori, L.; Hadighi, R. Mitochondrial Proteome Profiling of *Leishmania tropica*. *Microbial Pathogenesis* **2019**, *133*, 103542, doi:10.1016/j.micpath.2019.103542.
13. Maarouf, M.; de Kouchkovsky, Y.; Brown, S.; Petit, P.X.; Robert-Gero, M. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research* **1997**, *232*, 339–348, doi:10.1006/excr.1997.3500.
14. Honda, N.K.; Vilegas, W. A química dos líquens. *Quím. Nova* **1999**, *22*, 110–125, doi:10.1590/S0100-40421999000100018.
15. Schmeda-Hirschmann, G.; Tapia, A.; Lima, B.; Pertino, M.; Sortino, M.; Zacchino, S.; Arias, A.R. de; Feresin, G.E. A New Antifungal and Antiprotozoal Depside from the Andean Lichen *Protosnea Poepigii*. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 349–355, doi:10.1002/ptr.2321.
16. da Luz, J.S.B.; de Oliveira, E.B.; Martins, M.C.B.; da Silva, N.H.; Alves, L.C.; dos Santos, F.A.B.; da Silva, L.L.S.; Silva, E.C.; de Medeiros, P.L. Ultrastructural Analysis of *Leishmania Infantum* Chagasi Promastigotes Forms Treated in Vitro with Usnic Acid. *ScientificWorldJournal* **2015**, *2015*, 617401, doi:10.1155/2015/617401.
17. Fournet, A.; Ferreira, M.-E.; de Arias, A.R.; de Ortiz, S.T.; Inchausti, A.; Yalaff, G.; Quilhot, W.; Fernandez, E.; Hidalgo, M.E. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1997**, *116*, 51–54, doi:10.1016/S0742-8413(96)00127-2.
18. Derici, M.K.; Cansaran-Duman, D.; Taylan-Özkan, A. Usnic Acid Causes Apoptotic-like Death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. *3 Biotech* **2018**, *8*, 384, doi:10.1007/s13205-018-1409-6.
19. Koçer, S.; Uruş, S.; Çakır, A.; Güllüce, M.; Diğrak, M.; Alan, Y.; Aslan, A.; Tümer, M.; Karadayı, M.; Kazaz, C.; et al. The Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Antimutagenic Activities of Hydroxyphenylimino Ligands and Their Metal Complexes of Usnic Acid Isolated from *Usnea longissima*. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 6148–6164, doi:10.1039/C3DT53624F.
20. Natić, M.; Te[sbreve]jić, [Zbreve]ivoslav; An[dbar]elković, K.; Br[cbreve]jeski, I.; Radulović, S.; Manić, S.; Sladić, D. Synthesis and Biological Activity of Pd(II) and Cu(II) Complexes with Acylhydrazones of Usnic Acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry* **2004**, *34*, 101–113, doi:10.1081/SIM-120027320.
21. Nunes, D.M.; Pessatto, L.R.; Mungo, D.; Oliveira, R.J.; Pinto, L.M. de C.; da Costa Iemma, M.R.; Altei, W.F.; Martines, M.A.U.; Pereira Duarte, A. New Complexes of Usnate with Lanthanides Ions: La(III), Nd(III), Tb(III), Gd(III), Synthesis, Characterization, and Investigation of Cytotoxic Properties in MCF-7 Cells. *Inorganica Chimica Acta* **2020**, *506*, 119546, doi:10.1016/j.ica.2020.119546.
22. Ingólfssdóttir, K. Usnic Acid. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 729–736, doi:10.1016/s0031-9422(02)00383-7.
23. Cotruvo, J.A.Jr. The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Central Science* **2019**, *5*, 1496–1506, doi:10.1021/acscentsci.9b00642.
24. Pałasz, A.; Segovia, Y.; Skowronek, R.; Worthington, J.J. Molecular Neurochemistry of the Lanthanides. *Synapse* **2019**, *73*, e22119, doi:10.1002/syn.22119.
25. Cotton, S. *Lanthanide and Actinide Chemistry*; John Wiley & Sons, 2013; ISBN 978-1-118-68136-7.
26. Kostova, I. Lanthanides as Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents* **2005**, *5*, 591–602, doi:10.2174/156801105774574694.
27. Kaczmarek, M.T.; Zabiszak, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R. Lanthanides: Schiff Base Complexes, Applications in Cancer Diagnosis, Therapy, and Antibacterial Activity. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *370*, 42–54, doi:10.1016/j.ccr.2018.05.012.
28. Teo, R.D.; Termini, J.; Gray, H.B. Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 6012–6024, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01975.

29. Tan, N.C.; Yu, P.; Kwon, Y.-U.; Kodadek, T. High-Throughput Evaluation of Relative Cell Permeability between Peptoids and Peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 5853–5861, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.074.
30. Monteiro, L.M.; Löbenberg, R.; Barbosa, E.J.; de Araujo, G.L.B.; Sato, P.K.; Kanashiro, E.; de Araujo Eliodoro, R.H.; Rocha, M.; de Freitas, V.L.T.; Fotaki, N.; et al. Oral Administration of Buparvaquone Nanostructured Lipid Carrier Enables in Vivo Activity against *Leishmania Infantum*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, *169*, 106097, doi:10.1016/j.ejps.2021.106097.
31. Bhal, S. LogP—Making Sense of the Value. Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, ON, Canada. Available online: https://www.acdlabs.com/wp-content/uploads/download/app/physchem/making_sense.pdf (accessed on 8 September 2023).
32. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3–26, doi:10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
33. Sander, T. (2001). Previsão de Propriedades Moleculares - Osiris Property Explorer Available online: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peol/> (accessed on 16 July 2023).
34. Neves, A.R.; Trefzger, O.S.; Barbosa, N.V.; Honorato, A.M.; Carvalho, D.B.; Moslaves, I.S.; Kadri, M.C.T.; Yoshida, N.C.; Kato, M.J.; Arruda, C.C.P.; et al. Effect of Isoxazole Derivatives of Tetrahydrofuran Neolignans on Intracellular Amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: A Structure–Activity Relationship Comparative Study with Triazole-neolignan-based Compounds. *Chemical Biology & Drug Design* **2019**, *94*, 2004–2012, doi:10.1111/cbdd.13609.
35. Asela, I.; Noyong, M.; Simon, U.; Andrades-Lagos, J.; Campanini-Salinas, J.; Vásquez-Velásquez, D.; Kogan, M.; Yutronic, N.; Sierpe, R. Gold Nanoparticles Stabilized with Bcyclodextrin-2-Amino-4-(4-Chlorophenyl)Thiazole Complex: A Novel System for Drug Transport. *PLoS One* **2017**, *12*, e0185652, doi:10.1371/journal.pone.0185652.
36. Cheng, J.-G.; Yu, H.-J.; Chen, Y.; Liu, Y. Selective Binding and Controlled Release of Anticancer Drugs by Polyanionic Cyclodextrins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 2287–2290, doi:10.1016/j.bmc.2018.03.013.
37. Santiago, A.S.; Pita, S.S. da R.; Guimarães, E.T. Leishmaniasis Treatment, Current Therapy Limitations and New Alternative Requirements: A Narrative Review. *RSD* **2021**, *10*, e29510716543, doi:10.33448/rsd-v10i7.16543.
38. Caballero, A.B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Salas, J.M.; Sánchez-Moreno, M.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Santamaría-Díaz, N.; Gutiérrez-Sánchez, R. Lanthanide Complexes Containing 5-Methyl-1,2,4-Triazolo[1,5-a] Pyrimidin-7(4H)-One and Their Therapeutic Potential to Fight Leishmaniasis and Chagas Disease. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *138*, 39–46, doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.04.016.
39. OECD Toxicity Guide TG-129: Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests Available online: <https://chemymunion.com/servicos/oecd-toxicity-guide-tg-129-guidance-document-on-using-cytotoxicity-tests-to-estimate-starting-doses-for-acute-oral-systemic-toxicity-tests-1> (accessed on 16 July 2023).
40. Katsuno, K.; Burrows, J.N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R.H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C.E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B.T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14*, 751–758, doi:10.1038/nrd4683.
41. Torres Suarez, E.; Granados-Falla, D.S.; Robledo, S.M.; Murillo, J.; Upegui, Y.; Delgado, G. Antileishmanial Activity of Synthetic Analogs of the Naturally Occurring Quinolone Alkaloid N-Methyl-8-Methoxyflindersin. *PLoS One* **2020**, *15*, e0243392, doi:10.1371/journal.pone.0243392.
42. Palasz, A.; Segovia, Y.; Skowronek, R.; Worthington, J.J. Molecular Neurochemistry of the Lanthanides. *Synapse* **2019**, *73*, e22119, doi:10.1002/syn.22119.
43. Carneiro, P.P.; Conceição, J.; Macedo, M.; Magalhães, V.; Carvalho, E.M.; Bacellar, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania Braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One* **2016**, *11*, e0148084, doi:10.1371/journal.pone.0148084.
44. Formaglio, P.; Alabdullah, M.; Siokis, A.; Handschuh, J.; Sauerland, I.; Fu, Y.; Krone, A.; Gintschel, P.; Stettin, J.; Heyde, S.; et al. Nitric Oxide Controls Proliferation of *Leishmania Major* by Inhibiting the Recruitment of Permissive Host Cells. *Immunity* **2021**, *54*, 2724–2739.e10, doi:10.1016/j.immuni.2021.09.021.
45. Heyde, S.; Philipsen, L.; Formaglio, P.; Fu, Y.; Baars, I.; Höbbel, G.; Kleinholz, C.L.; Seif, E.A.; Stettin, J.; Gintschel, P.; et al. CD11c-Expressing Ly6C+CCR2+ Monocytes Constitute a Reservoir for Efficient

- Leishmania* Proliferation and Cell-to-Cell Transmission. *PLOS Pathogens* **2018**, *14*, e1007374, doi:10.1371/journal.ppat.1007374.
46. Carneiro, P.P.; Conceição, J.; Macedo, M.; Magalhães, V.; Carvalho, E.M.; Bacellar, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One* **2016**, *11*, 2, doi:10.1371/journal.pone.0148084.
 47. De Carvalho, E. a. B.; Andrade, P.P.; Silva, N.H.; Pereira, E.C.; Figueiredo, R.C.B.Q. Effect of Usnic Acid from the Lichen *Cladonia Substellata* on *Trypanosoma cruzi* in Vitro: An Ultrastructural Study. *Micron* **2005**, *36*, 155–161, doi:10.1016/j.micron.2004.09.003.
 48. Ribár, B.; Kapor, A.; Argay, Gy.; Engel, P.; Djarmati, Z.; Jankov, R.M. Crystal Structure of Usnic Acid Sodium Salt 2 1/2 Hydrate. *Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research* **1993**, *23*, 107–111, doi:10.1007/BF01195444.
 49. Trefzger, O.S.; Das Neves, A.R.; Barbosa, N.V.; Carvalho, D.B.; Pereira, I.C.; Perdomo, R.T.; Matos, M.F.C.; Yoshida, N.C.; Kato, M.J.; De Albuquerque, S.; et al. Design, Synthesis and Antitrypanosomatid Activities of 3,5-Diaryl-Isoxazole Analogues Based on Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. *Chemical Biology & Drug Design* **2019**, *93*, 313–324, doi:10.1111/cbdd.13417.
 50. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Pau, K.; Vistica, D.. Feasibility of a high- flux anticancer drug screen using a di-verse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the Natural Cancer Institute* **1991**, *83*, 757–766.
 51. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the Natural Cancer Institute* **1990**, *82*, 1107–1112, doi:10.1093/jnci/82.13.1107.
 52. Monk, P.B. A Mixed Method for Approximating Maxwell's Equations. *SIAM Journal on Numerical Analysis* **1991**, *28*, 1610–1634.
 53. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. *Analytical Biochemistry* **1982**, *126*, 131–138, doi:10.1016/0003-2697(82)90118-x.
 54. Arruda, C.C.P.; Hardoim, D.J.; Rizk, Y.S.; Souza, C.S.F.; Zaverucha do Valle, T.; Carvalho, D.B.; Taniwaki, N.N.; Baroni, A.C.M.; Calabrese, K.S. A triazole hybrid of neolignans as potential antileishmanial agent by triggering mitochondrial dysfunction. *Molecules*, **2020**, *25*, 37, doi: 10.3390/molecules25010037.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Exploring Drug Resistance: A Comparative Analysis of Drug Action Between a Reference Strain and Clinical Isolates of *Leishmania (L.) amazonensis*

Fernanda da Silva¹, Natália Oliveira Alves², Jennifer Naed³, Alda Maria Teixeira Ferreira³, Eliane Mattos Piranda¹, and Carla Cardozo Pinto de Arruda^{1,*}

¹ Human Parasitology Laboratory, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Brazil.

² Multiuser Center for Research on Bioinputs and Health Technologies of the Institute of Tropical Pathology and Public Health of the Federal University of Goiás.

³ Laboratory of Immunology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil.

Corresponding Author: CCPA carla.arruda@ufms.br; 556733457314.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Visceral leishmaniasis and reference drugs.

ABSTRACT

Leishmaniasis persists as an endemic public health concern in numerous countries, including Brazil, where cutaneous leishmaniasis (CL) predominates among the various forms of the disease in the Americas. One species that contributes to the prevalence of CL is *Leishmania amazonensis*, a protozoan that can manifest in various clinical forms, including cutaneous, disseminated cutaneous, and diffuse cutaneous. In addition to the cutaneous form, cases involving visceral involvement have been documented. The objective of this study was to evaluate the in vitro biological behavior of three strains of *L. amazonensis* in antileishmania tests using reference drugs, on both promastigote and amastigote forms. The first strain was isolated from a patient with simple cutaneous leishmaniasis, the second from a patient presenting clinical signs of visceral leishmaniasis, and the third is a strain already standardized for antileishmania testing, isolated from a sand fly vector. In the antipromastigote analysis with the reference drugs on the strains, it was possible to identify significant differences between the IC₅₀ found. AmB continues to demonstrate high efficacy in all strains tested. Pent showed an increase in activity on the MHOM/BR/2022/LT013_22 strain, being 10 times more effective than the reference strain. In the intracellular form, amastigote, it was possible to observe the high activity in AmB and Penta on all strains, agreeing with other studies that point to pentamidine as a potential drug for research into new technologies the drug delivery. AmB continues to be the drug with the greatest activity, but due to its high toxicity, research into new antileishmanial drugs continues to be a priority.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a vector-borne parasitic group of diseases classified into three main clinical forms: cutaneous, mucocutaneous, and visceral. The differentiation of these forms is primarily based on clinical manifestations developed by the host and related to species and virulence factors of the parasite (1, 2). Cutaneous leishmaniasis (CL) has the highest epidemiological prevalence in the Americas. In 2022, the number of documented cases in the Americas amounted to approximately 37,890, with 92% of these cases occurring in Brazil (1,3).

Leishmania (Leishmania) amazonensis is a species that has been associated with severe cutaneous leishmaniasis cases in the Americas. This species has the capacity to metastasize and disseminate, inducing an inadequate immune response, thereby enabling the occurrence of forms of cutaneous leishmaniasis that are disseminated, diffuse, and atypical (1).

Visceral leishmaniasis (VL) is a clinical manifestation that is primarily associated with *Leishmania (L.) infantum* in the Americas (1). However, there have been reports of cases of VL caused by *L. (L.) amazonensis*, mainly in immunocompromised individuals (4). In addition to the immunological status of the host, the genetic composition of the host is a factor associated with the development of the visceral form in this species (5).

The investigation of such infections is imperative for the development of more efficacious treatments. Cases of resistant leishmaniasis have been linked to parasitological etiology. However, the identification of the parasite species is not a standard procedure prior to the initiation of treatment. In a separate study conducted by the group, strains of *Leishmania* spp. were isolated from samples of patients diagnosed with cutaneous and visceral leishmaniasis at the Maria Aparecida Pedrossian University Hospital (HUMAP) (6, 7). Two strains were selected for this analysis. They were both identified as *L. (L.) amazonensis* through standardized MLEE methods by the Collection of Leishmania from Oswaldo Cruz Institute (CLIOC/IOC/FIOCRUZ). One strain was isolated from a patient with the typical clinical manifestation of CL, while the other was obtained from a patient with VL.

In this context, the present study aims to analyze the “in vitro” behavior of these strains of *L. amazonensis* isolated from patients and compare it to the standard *L. (L.) amazonensis* strain, normally used for clinical and preclinical tests in the investigation of new antileishmania drugs.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

The strains were isolated from patient samples diagnosed with CL and VL at the Maria Aparecida Petrosian University Hospital (HUMAP) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Following identification and cataloging by CLIOC/IOC/FIOCRUZ, both strains were designated as *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, MHOM/BR/2022/LT013_22 and MHOM/BR/2022/LV045_22, respectively (6, 7).

The MHOM/BR/2022/LT013_22 strain was isolated from a biopsy of an ulcerated lesion with plaques from a female patient residing in the urban area of Campo Grande, MS. Notably, the patient did not have concomitant HIV infection, and the therapeutic regimen consisted of pentavalent antimoniate (6).

The MHOM/BR/2022/LV045_22 strain was obtained from a bone marrow aspirate of a male patient residing in Campo Grande, MS. The patient exhibited clinical symptoms characteristic of VL, including severe anemia, hepatosplenomegaly, weakness, and others. The patient was found to be HIV-positive but was in remission, having discontinued antiretroviral treatment three months prior (7).

A third strain of *L. (L.) amazonensis* (8) was incorporated into the study. This strain is the standard strain of (IFLA/BR/1967/PH8), which was originally isolated from sand flies and has been traditionally utilized for antileishmania assays. All strains were cultivated in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil) with the following supplements: 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil), 10,000 U/mL penicillin, and 10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil).

Animals

Four-week-old female BALB/c mice were acquired from the central animal facility of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). The animals were housed in mini-isolators connected to a ventilated rack, provided with balanced food (Nuvital®, Nuvilab®), and hydrated with filtered water ad libitum. The Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFMS) approved the procedures under Protocol Number 1.172/2021.

Reference drugs

The reference pharmaceuticals utilized in this study were Amphotericin B deoxycholate (AmB, Cristália®), Pentamidine (PENT, Sigma-Aldrich® SP/Brazil), Meglumine antimoniate (GLU, Sanofi®, Medley®), and Miltefosine (MILT, Sigma-Aldrich® SP/Brazil).

In vitro antileishmanial activity on *L. (L.) amazonensis* promastigote forms

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in log growth phase (10^6 parasites/mL) were added to 96-well plates and incubated in six replicates with the reference drugs. The drugs tested included AmB ($0.15\text{--}1\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), PENT ($0.19\text{--}12.5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), GLU ($0.78\text{--}50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), and MILT ($0.78\text{--}50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). A negative control comprised pure Schneider culture medium. The microplates were then incubated at 26°C for 72 hours. The assessment of cell viability was performed by adding 5 mg.mL^{-1} MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich® SP/Brazil). The results were expressed as the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculated by nonlinear dose-response regression curve using the statistical program GraphPad PRISM 5.0. Subsequently, a two-way analysis of variance (ANOVA) was employed, followed by the Tukey test, to compare the IC_{50} values.

In vitro antileishmanial activity on *L. (L.) amazonensis* intracellular amastigotes

Peritoneal macrophages were obtained from BALB/c mice in RPMI 1640 culture medium (Sigma-Aldrich® SP/Brazil). In order to eliminate any potentially defective cells, an exclusion step was performed using Trypan blue staining (Sigma-Aldrich® SP/Brazil). Subsequently, the cells were transferred to 24-well plates that contained 13 mm-round glass coverslips (10^6 cells/well), and maintained at $37^\circ\text{C}/5\%\text{ CO}_2$. Following a one-hour adhesion period, the cells were infected with promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in stationary phase (4×10^6 cells/well). Following a 4-hour incubation period, the cells were subjected to treatments with the reference drugs: AmB ($0.125\text{--}1\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), PENT ($1.56\text{--}12.5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), GLU ($6.25\text{--}50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), and MILT ($6.25\text{--}50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). The cells were then exposed to these treatments for 24 hours, after which the medium was replaced with pure Schneider culture medium, serving as a negative control. Coverslips were then removed and submitted to a dehydration battery with increasing

concentrations of acetone:xylol. The slides were subsequently stained with Giemsa (Sigma-Aldrich® SP/Brazil), diluted 1:10 in distilled water (9). Following mounting on slides, 200 cells per coverslip were meticulously analyzed under a light microscope, and the average number of amastigotes per cell was calculated. IC₅₀ was determined using a nonlinear dose-response regression curve as previously described. IC₅₀ values were then subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for post-hoc analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The host's metabolic processes and genetic composition exert substantial influence on the progression of cutaneous lesions to visceralization of *Leishmania* parasites. A substantial body of research has documented a correlation between this progression and other diseases that compromise the host's immune system, including cancer and AIDS (5,10).

The occurrence of VL caused by *L. (L.) amazonensis* has been documented in several studies (5). A clinical case reported by Porto (2022) underscores the association between this disease and lymphoma. The clinical manifestations associated with this parasite are attributed to its virulence factors, including cysteine peptidase B and the surface glycoprotein GP63 (10). These factors enhance the parasite's ability to bind to macrophages and facilitate intracellular replication (11).

The in vitro infectivity of macrophages is a critical step in conducting antileishmanial research aimed at identifying new effective treatments for the disease. While most studies utilize the standard *L. (L.) amazonensis* PH8 strain, significant differences in infectivity have been observed when analyzing other strains under the same macrophage infectivity protocols.

In the present study, the strain derived from a patient with VL (MHOM/BR/2022/LV045_22) exhibited the highest macrophage infectivity, with an average of 7.31 amastigotes per macrophage, as shown in Table 1. On the other hand, the strain obtained from a patient with CL (MHOM/BR/2022/LT013_22) exhibited the lowest infectivity rate, averaging 4.58 amastigotes per macrophage. This disparity serves to validate the heightened infectivity of the strain derived from the classical VL case, a finding that aligns with the augmented binding of promastigotes to macrophages, as previously postulated by Rezende (11).

Table 1. Average of amastigotes identified per macrophage analyzed in the controls of "in vitro" antileishmania activity.

<i>L. amazonensis</i> strains	Average infectivity in macrophage
IFLA/BR/1967/PH8¹	6.98
MHOM/BR/2022/LV045_22²	7.31**
MHOM/BR/2022/LT013_22³	4.54***

1- *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 2- *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2022/LT013_22) and 3- *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2022/LV045_22. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.0001$, for the different results compared to reference strain (IFLA/BR/1967/PH8); ordinary one-way ANOVA, followed by the Tukey's multiple comparisons test.

The present study examined the response of *Leishmania* strains to drugs commonly utilized in clinical practice. Initially, the promastigote form of the selected strains was analyzed, and AmB was found to exhibit varying levels of effectiveness across the different strains (see Table 2). The analysis revealed that AmB demonstrated approximately eightfold greater efficacy against the MHOM/BR/2022/LT013_22 strain ($IC_{50}=0.0150\mu M$) compared to the standard strain (IFLA/BR/1967/PH8) ($IC_{50}=0.1244\mu M$), and exhibited 21-fold greater activity against the MHOM/BR/2022/LV045_22 strain ($IC_{50}=0.0064\mu M$) than against the standard strain (IFLA/BR/1967/PH8). These findings underscore the remarkable efficacy of AmB, particularly in cases of VL.

The primary mechanism of action of AmB entails its interaction with ergosterol, a constituent of the parasite's cell membrane. This binding results in the formation of pores within the cell membrane, leading to the loss of protons and monovalent cations. Ultimately, this triggers the process of apoptosis (12,13). The direct effect of AmB on the parasite is associated with its broad efficacy against the different strains and clinical forms of leishmaniasis.

The antileishmanial activity was evaluated using the arbitrary scale previously mentioned in other works. The following classification was used: active when $IC_{50} < 20 \mu M$; moderately active when $20 < IC_{50} < 50 \mu M$; and potentially inactive when $IC_{50} > 50 \mu M$ (14, 15).

PENT demonstrated heightened activity against the MHOM/BR/2022/LT013_22 strain ($IC_{50}=0.0079\mu M$), exhibiting approximately tenfold enhanced efficacy compared to the standard strain ($IC_{50}=0.0773\mu M$). Conversely, on the MHOM/BR/2022/LV045_22 strain, pentamidine demonstrated approximately fourfold reduced efficacy

($IC_{50}=0.2949\mu M$) compared to its activity against the IFLA/BR/1967/PH8 strain (Table 1). As an aromatic diamidine, its mechanism of action involves the inhibition of ATP (adenosine triphosphate) production by the parasite's mitochondria, thereby reducing metabolic activities and directly interfering with its multiplication (16,17). However, its use is restricted to cases of CL due to its adverse effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity and cardiotoxicity (16).

The pentavalent antimonial GLU was demonstrated to be active exclusively on the promastigote forms of the reference strain ($IC_{50}=0.3175\mu M$). The reduced efficacy on these forms can be attributed to the mechanism of action of pentavalent antimonials, which necessitate metabolic conversion to their toxic trivalent form for optimal activity. However, the pentavalent form can also function by forming ribosomal groups that inhibit topoisomerase, disrupting the topological homeostasis of DNA, and interrupting the parasite's cell cycle. Considering solely this pathway requires higher doses to achieve the parasite. Consequently, doses above $50\mu g.mL^{-1}$ are necessary for antileishmania assays next as observed in other works (18).

Miltefosine, a distinctive oral treatment option for CL, demonstrated activity against MHOM/BR/2022/LT013_22 ($IC_{50}= 6.8762\mu M$) and IFLA/BR/1967/PH8 ($IC_{50}=1.3471\mu M$) strains, exhibiting moderate activity against MHOM/BR/2022/LV045_22 ($IC_{50}= 8.5636\mu M$) (Table 2). Its activity on MHOM/BR/2022/LT013_22 was five times less potent than on the reference strain. However, when analyzing the mechanism of action of MILT, it is important to note that its induction of apoptosis is primarily due to the inhibition of signaling pathways and immunomodulatory effects (12, 19). Consequently, its direct action on the parasite tends to be less pronounced.

Table 2. In vitro antileishmanial activity of the reference drugs on *L. (L.) amazonensis* strains.

		IFLA/BR/1967/PH8 ²	MHOM/BR/2022/LT013_22 ³	MHOM/BR/2022/LV045_22 ⁴
Promastigote forms IC₅₀¹ (μM)	AmB	0.1244	0.0150*	0.0059*
	PENT	0.0773	0.0079*	0.2949*
	GLU	0.3175	>50	>50
	MILT	1.3471	6.8762*	8.5636*
Amastigote forms IC₅₀¹ (μM)	AmB	0.01687 ± 0.01	0.1172 ± 0.08*	0.0330 ± 0.03*
	PENT	0.1890 ± 0.2	0.3897 ± 0.05*	0.0429 ± 0.1*

1- half-maximal inhibitory concentration on promastigotes. 2- *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 3- *L. amazonensis* (MHOM/BR/2022/LT013_22) and 4- *L. amazonensis* (MHOM/BR/2022/LV045_22). * $p \leq 0.0001$, for the different results the IC₅₀ compared to reference strain (MHOM/BR/2022/LV045_22); ordinary one-way ANOVA, followed by the Tukey's multiple comparisons test.

With respect to the intracellular amastigote forms, it is evident that AmB demonstrates a high degree of activity across all strains examined. AmB exhibited the highest activity (IC₅₀= 0.0168μM) on the reference strain, IFLA/BR/1967/PH8, and it was seven times more active than on MHOM/BR/2022/LT013_22 strain (IC₅₀=0.1172μM). Conversely, on MHOM/BR/2022/LV045_22 (IC₅₀=0.033μM), AmB demonstrated a twofold reduction in activity compared to the reference strain.

In a similar vein, pentamidine demonstrated notable efficacy against MHOM/BR/2022/LT013_22 (IC₅₀=0.3897μM), exhibiting ninefold activity against LV45 (IC₅₀= 0.0429μM) and twofold activity against PH8 (IC₅₀=0.1890μM). In accordance with the findings reported by Khan (2022), analogous results were observed for *Leishmania tropica*, with IC₅₀ values of 0.1375 μg.mL⁻¹ and 0.1910 μg.mL⁻¹, respectively, for promastigotes and amastigotes (20). The activity of pentamidine against various *Leishmania* species, including the one isolated from the human LV case and identified as MHOM/BR/2022/LV045_22 strain, underscores the potential of pentamidine for further investigation into technologies to reduce adverse effects and the expectation of more effective treatments (21).

In summary, AmB continues to be regarded as one of the most effective pharmaceuticals for the treatment of *Leishmania* spp. Nevertheless, its deleterious effects and dosage limitations due to toxicity underscore the necessity for alternative molecules with reduced toxicity profiles.

Data availability statement

The datasets must be made publicly available before the submission will be considered for publication. Proteomics datasets should be deposited in a public repository such as the [PRIDE archive](#), [Dryad](#), or [MASSIVE](#). Datasets should be made public at submission. A helpful list of proteomics resources and repositories is available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908408/table/T1/>.

Acknowledgments

Statements regarding sources of direct financial support (e.g., grants, fellowships, scholarships, etc.), personal assistance, or contributor roles should appear in the Acknowledgments.

REFERENCES

1. PAHO- Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Region of the Americas. 2^oedition, 2024. Available in: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>.
2. Podinovskaia M, Descoteaux A. 2015. *Leishmania* and the Macrophage: A Multifaceted Interaction. *Future Microbiology*, 10(1), 111–129. Doi: 10.2217/fmb.14.103.
3. OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. N.12 (dezembro de 2023), 2024. Available in: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>.
4. Porto VBG, Carvalho LB, Buzo BF, Litvoc MN, Santos ACS, Rocci RA, Soares SRC, Zampieri RA, Duarte MIS, Lindoso JAL. 2022. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. *Rev Inst Med trop S Paulo [Internet]* 64:e51. Doi: 10.1590/S1678-9946202264051.
5. Souza CSF, Calabrese KS, Silva ALA, Carvalho LOP, Cardoso FO, Dorval MEMC, Oshiro ET, Quaresma PF, Gontijo CMF, Pacheco RS, Rossi MID, Costa SCG, Valle TZ. 2018. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. *Histology and Histopathology*, v. 33, n. 7, p. 705-716. Doi: 10.14670/HH-11-965.
6. Silva YC., et al. Clinical-Epidemiological Profile of Patients with Suspected Cutaneous or Mucocutaneous Leishmaniasis Attended at a Referral Hospital in Mato Grosso do Sul State, Brazil. 2025.[paper unpublished], Federal University of Mato Grosso do Sul.
7. Alves NO., et al. Genomic analysis of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infection in patients diagnosed with visceral leishmaniasis. 2025. [paper unpublished], Federal University of Mato Grosso do Sul.
8. Lainson R, Shaw JJ. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull.* 1972 Jan;28(1):44-8. Doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070892. PMID: 4562681.
9. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. 1997. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1997 Jan;116(1):51-4. Doi: 10.1016/s0742-8413(96)00127-2. PMID: 9080673.
10. Porto VBG, Carvalho LB, Buzo BF, Litvoc MN, Santos ACS, Rocci RA, Soares SRC, Zampieri RA, Duarte MIS, Lindoso JAL. 2022. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. *Rev Inst*

- Med Trop Sao Paulo. Sep 5;64:e51. Doi:10.1590/S1678-9946202264051. PMID: 36074446; PMCID: PMC9448255.
11. De Rezende E, Kawahara R, Peña MS, Palmisano G, Stolf BS. 2017. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. PLoS Negl Trop Dis 11(11): e0006090. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006090>.
 12. Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, Dorlo TPC. 2018. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. Clin Pharmacokinet. v.57, n.2, p.151–176, 2018. Doi: 10.1007/s40262-017-0570-0.
 13. Hamill, R.J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*. v.73, p.919-934, 2013. Doi: 10.1007/s40265-013-0069-4. PMID: 23729001.
 14. Upegui Y, Gil JF, Quiñones W, Torres F, Escobar G, Robledo SM, Echeverri F. 2014. Preparation of Rotenone Derivatives and *in Vitro* Analysis of Their Antimalarial, Antileishmanial and Selective Cytotoxic Activities. *Molecules*. 19(11):18911-18922. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules191118911>.
 15. das Neves AR, Trefzger OS, Barbosa NV, Honorato AM, Carvalho DB, Moslaves IS, Kadri MCT, Yoshida NC, Kato MJ, Arruda CCP, Baroni ACM. 2019. Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: A structure–activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds. *Chem Biol Drug Des*. 2019;00:1–9. Doi: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13609>.
 16. Daga MK, Rohatgi I, Mishra R. 2021. Leishmaniasis. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. v.25, Suppl 2, p.S166-S170, 2021. Doi: 10.5005/jp-journals-10071-23844.
 17. Chakravarty J, Sundar S. 2019. Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. v.20, p.1251–1265, 2019. Doi: 10.1080/14656566.2019.1609940.
 18. Doroodgar M, Delavari M, Doroodgar M, Abbasi A, Taherian AA, Doroodgar A. 2016. Tamoxifen Induces Apoptosis of *Leishmania major* Promastigotes in Vitro. *Korean J Parasitol*. Feb;54(1):9-14. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26951973; PMCID: PMC4792327. Doi: 10.3347/kjp.2016.54.1.9.
 19. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. 2020. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. v.104, n.21, p.8965-8977, 2020. Doi: 10.1007/s00253-020-10856-w.
 20. Khan RU, Khan M, Sohail A, Ullah R, Iqbal A, Ahmad B, Khan IU, Tariq A, Ahmad M, Said A, Ullah S, Ali A, Rahman MU, Zaman A, Bilal H. 2022. Efficacy of pentamidine-loaded chitosan nanoparticles as a novel drug delivery system for *Leishmania tropica*. *Trop Biomed*. 2022 Dec 1;39(4):511-517. doi: 10.47665/tb.39.4.003. PMID: 36602209.
 21. Piccica M, Lagi F, Bartoloni A, Zammarchi L. 2021. Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review, *Journal of Travel Medicine*, Volume 28, Issue 6. Doi: <https://doi.org/10.1093/jtm/taab065>.

Perspectivas finais.

- Investigar os possíveis mecanismos de ação leishmanicida através de alterações na permeabilidade celular e no potencial de membrana mitocondrial, ocasionados pelo tratamento *in vitro*, com os fármacos de referência sobre três cepas de *L. amazonensis*. Os resultados serão incluídos do artigo 2 para a publicação.