

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

ANÁLISE *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO CLORITO E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL ANTILEISHMANIA E ANTINEOPLÁSICA

MELQUISEDEQUE MATEUS MONTEIRO

CAMPO GRANDE – MS

2023

MELQUISEDEQUE MATEUS MONTEIRO

ANÁLISE *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO CLORITO E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL ANTILEISHMANIA E ANTINEOPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul como requisito
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo.

CAMPO GRANDE – MS

2023

MELQUISEDEQUE MATEUS MONTEIRO

ANÁLISE *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO CLORITO E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL ANTILEISHMANIA E ANTINEOPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul como requisito
para obtenção do título de Mestre.

Campo Grande, MS, 27 de março de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior
FioCruz-Pernambuco

Profa. Dra. Herintha Coeto Neitzke Abreu
Universidade Federal da Grande Dourados

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este sonho

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e a todos os professores credenciados a ele.

À CAPES/CNPq pelo fomento: bolsa de mestrado fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha esposa Laís que me manteve firme e confiante durante toda a minha trajetória, que me apoiou e suportou comigo todo o estresse e principalmente que me fez o homem mais feliz do mundo quando se casou comigo durante este mestrado, sou eternamente grato por sua vida

A minha mãe por todo apoio e incentivo que me fizeram ter forças para iniciar e ir até o fim com foco e determinação. Obrigado por ser uma mulher tão forte que me inspirou e me ensinou a lutar pelos meus sonhos.

A minha irmã, meu cunhado e meus sobrinhos por acreditarem em mim e serem uma rede de apoio tão forte nos momentos mais difíceis da minha trajetória

Aos meus sogros que sempre oraram por mim e demonstravam admiração e confiança, vocês fizeram a diferença em minha trajetória

A minha orientadora Renata Trentin Perdomo que me acolheu e me auxiliou em todo o processo desse mestrado, me inspirando a buscar cada vez mais e sendo para mim um objetivo como profissional que espero ser um dia

Ao Professor Manoel que me guiou para iniciar o mestrado e acreditou em mim e me forneceu a amostra para que este trabalho pudesse ser realizado

As gurias do laboratório Emylli e Isabela que foram minhas parceiras de trabalho, me auxiliaram e dividiram o fardo que carregamos nesses dois anos, com vocês o trabalho duro ficou mais leve.

A colega do lab Giovana que me ensinou tudo o que precisava e teve paciência comigo no meu aprendizado, sendo sempre disposta a ensinar e tirar dúvidas quando eu precisei

A professora Carla Arruda por ser sempre tão prestativa e presente assim como o pessoal do laboratório de parasito, Fernanda e Amarith, que me auxiliaram nas análises sempre de bom grado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, onde pude aprender técnicas e desenvolver meu trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este projeto se realizasse.

“Mas, buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas.”

Mateus 6:33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida das formas evolutivas de *Leishmania spp.* no hospedeiro invertebrado.

Figura 2- Ciclo biológico da *Leishmania spp.*

Figura 3- Fases do ciclo celular

Figura 4- Vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose

Figura 5- Efeito do clorito (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade celular. Resultados obtidos em ensaios triplicados de sulforrodamina B

Figura 6- Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem MDCK em análise fluorescente.

Figura 7- Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem 786-0 em análise fluorescente.

Figura 8- Efeito antiproliferativo das células frente ao tratamento com clorito nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 9- - Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem MDA-MB231 em análise fluorescente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Toxicidade (hepato e nefrotoxicidade) do clorito em linhagens celulares *in vitro*.

Tabela 2- Atividade antileishmania em formas promastigotas em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Tabela 3- Atividade antiproliferativa do clorito em linhagens neoplásicas e não neoplásicas

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

2ClO₂ - Clorito de sódio

786-0 - Linhagem celular de adenocarcinoma renal humano

CDK - Ciclina dependente de quinase

ClO₂ - Dióxido de cloro

ClO₂⁻ - Clorito

ClO₃ - Clorato

CO₂ - Dióxido de carbono

DEMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERO'S - Espécies reativas de oxigênio

GI₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento celular

GL₅₀ - Concentração que leva à morte de 50% das células

GLOBOCAN - Global Cancer Observatory

H₂O - Água

HepG2 – Linhagem celular de Hepatocarcinoma humano

LMC - Leishmaniose mucocutanea

LT - Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

**MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
(Michigan Cancer Foundation).**

**MDA-MB-231 – Linhagem de adenocarcinoma de mama triplo negativo
resistente múltiplas drogas**

MDCK – Linhagem celular de rim canino (Madin-Darby Canine Kidney)

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina

NaHCO - Bicarbonato de sodio

NHI/3T3 – Linhagem celular de Fibroblasto murino

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde

PBS - Solução salina fosfatada

PC-03 – Linhagem de Carcinoma prostático

RNA - Ácido ribonucleico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SFB - Soro fetal bovino

IS- Índice de seletividade

SRB - Sulforrodamina B

T0 - Tempo zero de tratamento

ATA - Ácido tricloroacético

TGI – (Concentração que inibe crescimento de 100% das células)

TNF - Fator de necrose tumoral

WHO - *World Health Organization*

Sumário

Resumo	12
1. Introdução	14
2. Revisão de literatura.	16
2.1. Leishmanioses	16
2.2. Leishmaniose tegumentar	17
2.3. Leishmaniose visceral	17
2.4. Leishmaniose mucocutânea	18
2.5. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	18
2.6. Tratamento para leishmaniose.	21
2.7. Câncer	23
2.8. Ciclo celular	24
2.9. Morte celular	26
2.10. Terapias antineoplásicas	28
2.11. Dióxido de cloro	29
3. Objetivos	31
3.1. Objetivos gerais	31
3.2. Objetivos específicos	31
3.2.1. Avaliação antileishmania	31
3.2.2. Avaliação anticâncer	31
4. Material e métodos	31
4.1. Obtenção da amostra	31
4.2. Preparo da amostra	32
4.3. Ensaio celulares <i>in vitro</i>	32
4.3.1. Linhagem celular e condições de cultura	32
4.3.2. Atividade antiproliferativa por Sulforrodamina B (SRB)	33
4.3.5. Atividade <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas	34
4.3.6. Ensaio de avaliação de apoptose em 2D	34
5. Resultados	35
5.1. Aividade antileishmania	35
5.1.1. Avaliação da toxicidade - atividade antiproliferativa por SRB	35
5.1.2. Atividade antileishmania em promastigotas	36
5.1.3. Avaliação da Integridade de Membrana e apoptose por coloração com Brometo de Etídio / Laranja de Acridina.	37
5.2. Resultado anticâncer	40

5.2.1.	Atividade antiproliferativa por SRB	40
5.2.2.	Avaliação da integridade de membrana e apoptose pela coloração por Brometo de Etídio (Be)/ Laranja de Acridina (LA)	41
6.	Discussão	42
7.	Conclusão	44
	REFERÊNCIAS	45

Resumo

O dióxido de cloro (ClO_2) possui um forte poder de oxidação podendo se oxidar em clorito e clorato. O efeito oxidativo do ClO_2 já foi considerado potencial para uso em tratamento contra doenças infecciosas, parasitárias e anticâncer. Muitas pesquisas por novos tratamentos contra a leishmaniose são realizadas em busca de encontrar alternativas de baixo custo e de reposicionamento de fármacos. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do dióxido de cloro em meio aquoso e a determinação do seu potencial antileishmania e anticâncer. Através do cultivo celular de linhagens neoplásicas e não neoplásicas, foi possível realizar análises de toxicidade e anticâncer *in vitro* por meio do ensaio de SRB e análises de potencial antileishmania *in vitro* com o uso de promastigotas no ensaio de coloração com MTT. O clorito não foi nefrotóxico e hepatotóxico até a concentração $10\mu\text{g/mL}$, até a concentração de TGI $94\mu\text{g/mL}$, apresentou inibição de proliferação celular que pode ser reversível ou irreversível. Quanto à atividade antileishmania, as concentrações efetivas foram 10x menores ($<1\mu\text{g/mL}$) que a GI50 das células não neoplásicas (NIH/3T3) mostrando seletividade. O efeito anticâncer foi moderado para as três linhagens testadas (MDA-MB231, MCF7 e PC-03). Os resultados preliminares indicam o clorito estimula injúria celular pela via da apoptose. O clorito apresentou efeito antileishmania e anticâncer com baixa toxicidade.

Palavras-chaves: dióxido de cloro; clorito; leishmania; câncer; toxicidade.

Abstract

Chlorine dioxide (ClO₂) has a strong oxidation power and can oxidize to chlorite and chlorate. The oxidative effect of ClO₂ has been found to have potential for use in treatment against infectious, parasitic, and anticancer diseases. Many researches for new treatments against leishmaniasis are carried out in order to find low cost alternatives and drug repositioning. The objective of this work was to evaluate the toxicity of chlorine dioxide in aqueous media and to determine its antileishmanial and anticancer potential. Through cell culture of neoplastic and non-neoplastic cell lines, it was possible to perform in vitro toxicity and anticancer analyses using the SRB assay and in vitro antileishmania potential analyses using promastigotes in the MTT staining assay. The chlorite was not nephrotoxic and hepatotoxic up to the concentration 10µg/mL, up to the concentration of TGI 94µg/mL, showed inhibition of cell proliferation that may be reversible or irreversible. As for the antileishmania activity, the effective concentrations were 10x lower(<1µg/mL) than the GI₅₀ of non-neoplastic cells (NIH/3T3) showing selectivity. The anticancer effect was moderate for the three tested strains (MDA-MB231, MCF7 and PC-03). Preliminary results indicate chlorite stimulates cell injury through the apoptosis pathway. Chlorite showed antileishmanial and anticancer effect with low toxicity.

Keywords: chlorine dioxide; chlorite; leishmania; cancer; toxicity.

1. Introdução

O dióxido de cloro (ClO_2) é um gás amarelo-esverdeado que pode também se apresentar na forma líquida quando diluído (GATES, 1998). Possui um forte poder de oxidação podendo se oxidar em clorito e clorato (BECKER, NICOSON E MARGERUM, 2003). Tem utilidade popular para o uso em tratamento de águas, mas sua utilidade inicial aplicava-se como agente de branqueamento de papel (HUBBARD, POPPENDIECK E CORSI 2009). O dióxido de cloro e suas outras formas também apresentaram atividade como antifúngicos, antivirais, antibacterianos e antiparasitários (SANEKATA et al., 2010; Li et al. 2004; MORINO et al. 2007 MORINO et al. 2011)

O efeito oxidativo do ClO_2 já foi descrito apontando para um potencial uso em tratamento contra doenças infecciosas e parasitárias, porém, até o momento não há trabalhos que comprovem (POWELL E CLARK, 2004). Com base em pesquisas em diferentes vertentes, esta amostra demonstra ser um forte candidato a um tratamento multialvo.

Muitas pesquisas por novos tratamentos contra a leishmaniose são realizadas em busca de encontrar alternativas de baixo custo e com baixa toxicidade ao organismo (BRASIL, 2017). O tratamento da leishmaniose humana se trata de quimioterapia baseada na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimoniatos, entre eles os mais usados são o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®). A Pentamidina e Anfotericina B são utilizados como tratamento de segunda linha, usados geralmente quando o paciente não responde ao tratamento. Todos são de administração injetável e precisam de supervisão clínica ou hospitalização devido elevada toxicidade (RAJASEKARAN & CHEN, 2015; MURRAY et al., 2005; SUNDAR et al., 2012)

Para os cães o tratamento com medicações humanas é ilegal, fazendo com que a miltefosina seja o medicamento liberado para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Este fármaco possui toxicidade comprovada, no entanto não apresenta nefrotoxicidade. (BRASIL, 2017).

O tratamento da leishmaniose em humanos apresenta baixa efetividade e alta toxicidade, além de desenvolver resistência às drogas já existentes e variação na sensibilidade de diferentes cepas às mesmas também dificultam o tratamento. (BRASIL, 2017).

Considerando o câncer como uma doença altamente incidente em todo o mundo, a quimioterapia é o principal e mais eficaz entre os tratamentos, porém o uso de radioterapia, cirurgias, hormonioterapias podem ser utilizadas como adjuvantes (SOUZA et al. 2007). Neste método o uso de politerapias ajuda a diminuir os efeitos adversos assim como a resistência medicamentosa e as doses aplicada dos medicamentos quimioterápicos, diminuindo toxicidade.

A busca de novos fármacos contra o câncer é constante no meio científico, voltados a tratamentos com baixo custo, menos tóxicos e com menores efeitos colaterais (MEDRADO et al. 2015)

Com isso o foco desta pesquisa foi avaliar *in vitro* a toxicidade do clorito e seu potencial antileishmania e anticâncer

2. Revisão de literatura.

2.1. Leishmanioses

As leishmanioses podem ser definidas como um complexo de doenças infecciosas que são causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e fazem parte do grupo de doenças caracterizadas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2022)

Apresenta-se principalmente em três formas clínicas: a visceral sendo considerada a forma mais grave, a cutânea como a forma mais frequente e a mucocutânea (WHO 2022). Está classificada entre as 6 doenças mais negligenciadas em todo o mundo e afeta principalmente países em desenvolvimento com foco em regiões mais pobres. (WHO 2022)

O gênero *Leishmania* possui 20 espécies que podem prejudicar a saúde do homem dentre as mais de 50 espécies já reconhecidas (Klatt et al. 2019). A transmissão desses parasitas se dá por insetos dípteros chamados de flebotomíneos, que pertencem ao gênero *Lutzomyia* no novo mundo. As principais formas evolutivas deste parasito são a promastigota que fica localizada no tubo digestivo do vetor e a amastigota encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. (BRASIL 2017)

Anualmente, são notificados mais de dois milhões de novos casos em todo o mundo, isso por que a leishmaniose é endêmica em 98 países o que leva a cerca de 350 milhões de pessoas a risco dessa infecção. De maneira global o Brasil é líder em número de notificações de casos de leishmaniose Visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (BRASIL, 2017)

As espécies de *Leishmania* se divergem em relação às suas manifestações clínicas, podendo uma apresentar feridas que se curam em poucos meses e outra levar o infectado a óbito. Os pontos que podem diferenciar cada espécie são o vetor, as características do parasito, do vetor e do hospedeiro (Colmenares 2002)

2.2. Leishmaniose tegumentar

A forma clínica mais comum é a leishmaniose tegumentar (LT), endêmica em mais de 70 países (OPAS 2019). Nas Américas está presente em 19 países, sendo o Brasil com a maior prevalência na América do Sul com 90% dos casos (Burza et al.,2018). A LT era identificada primordialmente em áreas rurais, porém o desmatamento decorrente da urbanização ocasionou na adaptação do ciclo do vetor para regiões próximas às moradias urbanas levando a um aumento do número de casos desta doença. (BRASIL, 2017)

Segundo Lainson e Shaw (2010) as espécies responsáveis por acometer a LT em território brasileiro estão divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* e as principais espécies são *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, e *L. (L.) amazonensis*.

É caracterizada por lesões profundas na pele podendo ser única ou múltiplas com capacidade de disseminação. Esta forma não é fatal e suas feridas podem se curar em 3 a 18 meses. Porém, pode afetar de maneira severa padrões estéticos e psicossociais dos infectados (Yanik 2004,; Burza et al.,2018)

2.3. Leishmaniose visceral

A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral (LV), sendo fatal em 95% dos casos se não for tratada. Cerca de 90% dos casos relatados pela OMS ocorreram em 10 países sendo eles: Brasil, China, Etiópia, Índia, Kenia, Somália, Sudão e Iêmen. (WHO, 2020).

Em território brasileiro a espécie causadora da LV é a *Leishmania infantum* e seu vetor são os flebotomíneos pertencentes às espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* conhecido popularmente como mosquito palha (RANGEL; LAINSON 2003; OLIVEIRA et al., 2017)

A doença apresenta um grave quadro febril, associada a um aumento do tamanho do baço seguido de anemia e perda de peso levando o paciente a óbito por hemorragia ou infecção por bactérias oportunistas (SINGH & SUNDAR, 2015)

Os cães são apontados como os principais reservatórios urbanos da *L. infantum* ocasionando a Leishmaniose visceral canina (LVC). Estudos apontam que casos humanos tendem a ser mais expressivos em locais que possuem alta porcentagem de casos de LVC, e por estes animais serem a principal fonte de infecção do vetor, a presença destes em regiões endêmicas são um fator de risco para os humanos. (ALVES E BEVILACQUA, 2004; WERNECK, 2014)

2.4. Leishmaniose mucocutânea

É uma forma endêmica na América Latina sendo a *L. (V.) braziliensis* seu principal causador (PALMEIRO et al, 2007). Quase 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (OPAS, 2021). Por ser uma forma grave e com riscos de recidivas da doença em pacientes com problemas de imunossupressão a preocupação dos países endêmicos é cada vez maior (LAWN, 2004; TUON et al, 2007).

As lesões ocasionadas por esta forma clínica são crônicas causando deformidades e sequelas no paciente. Afetam o trato respiratório e digestivo superior e aparecem normalmente após a cicatrização das lesões cutâneas podendo ambas ocorrer ao mesmo tempo. (MARSDEN, 1986; MUVDI-ARENAS, OVALLE-BRACHO, 2019). Com isso as lesões causadas por esta forma são consideradas destrutivas e úlcero vegetantes com sulcos profundos e grânulos grosseiros (PALMEIRO et al, 2007)

A LMC apresenta uma difícil detecção da carga parasitária, seu diagnóstico é feito a partir de testes sorológicos, moleculares e teste cutâneo de Montenegro. É de extrema importância clínica que o diagnóstico e tratamento sejam feitos e administrados o quanto antes para que se evite possíveis sequelas funcionais no paciente (MARSDEN, 1986; SKRABA, 2015)

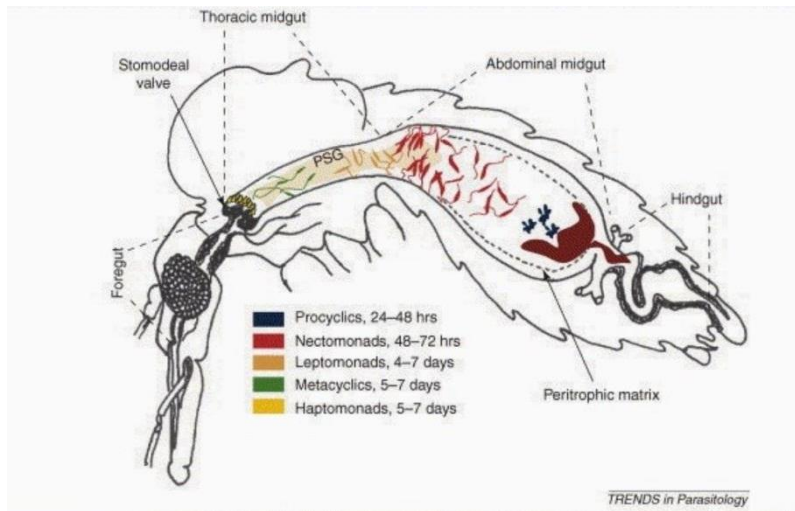
2.5. Ciclo biológico de *Leishmania spp.*

Leishmania spp são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear. São da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, apresentam durante seu ciclo de vida duas formas de desenvolvimento biológico: promastigota e amastigota (CARLSEN et al., 2013). As formas promastigota são proliferativas e possuem flagelo livre. São encontradas no trato intestinal do inseto vetor podendo estar no lúmen ou ligada pelo flagelo à cutícula intestinal.

A forma amastigota é ovalada não móveis, sem flagelo aparente, são exclusivas do hospedeiro vertebrados e geralmente encontrados no interior de células fagocíticas sendo os macrófagos os principais e possuem capacidade de se multiplicar mesmo estando sob ação de enzimas liso somais (PESSOA; MARTINS, 1988; READY, 2010; DE MORAIS et al., 2015).

As promastigotas possuem cinco subclasses diferentes: procíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclicas sendo esta última a forma infectante que é inoculada no hospedeiro vertebrado no momento que ocorre o repasto sanguíneo (ZULFIQAR et al., 2017). Quando o flebotomíneo ingere os macrófagos contendo amastigotas é quando se inicia o ciclo. No início do repasto a amastigotas se diferenciam em procíclicas são lentas e pequenas e com flagelos curtos, chegando no intestino do vetor se diferenciam para nectomonas, estruturas maiores que já conseguem se multiplicar e com objetivo de sair da matriz peritrófica, uma membrana que envolve o bolo sanguíneo, para se ligar às células epiteliais presentes no intestino médio e seguir para o intestino médio "torácico" anterior onde evoluem para leptomonas com uma morfologia mais curta. Por fim avançam para as próximas duas formas na válvula estomodeal, a haptomonas parasita foliar com flagelos curtos e não móveis e constituem um tampão parasita na válvula estomodeal. e a metacíclicas a fase infecciosa possuindo grandes flagelos estando aptos para a transmissão para o hospedeiro mamífero. O tempo médio para este ciclo é de 6 a 9 dias. (KAMHAWI, 2006; SMITH et al., 2014) A figura 1 demonstra os desenvolvimentos principais que ocorrem no interior do vetor das formas de promastigota de *Leishmania*.

Figura 1 - Ciclo de vida das formas evolutivas de *Leishmania spp.* no hospedeiro invertebrado.

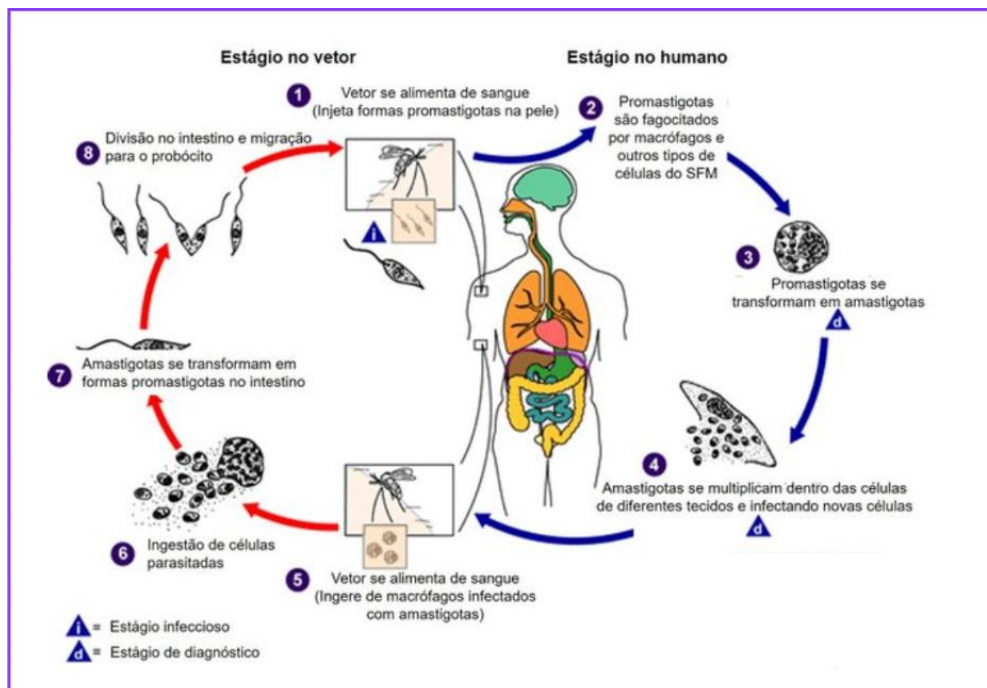


Fonte: KAMHAWI, 2006

Através da picada do flebótomo para se alimentar e neste momento ocorre o regurgitamento do sangue ingerido anteriormente. Quando contaminado este sangue regurgitado irá conter as promastigotas precíclicas, que no indivíduo será capturado primordialmente por macrófagos. Com isso, uma vez dentro deles as promastigotas se transformam em sua forma amastigota dentro das células.

As amastigotas se multiplicam levando a célula hospedeira à lise e infectando novas células, que serão ingeridas pelo flebótomo fazendo com que desta maneira o ciclo recomece. (figura 2)

Figura 2 Ciclo biológico da *Leishmania spp.*



Ciclo da *Leishmania* e seus estágios no homem e no vetor. Fonte: adaptado CDC 2017

2.6. Tratamento para leishmaniose.

A maneira de se prevenir a doença é através da administração do tratamento em indivíduos infectados além do controle de reservatórios e vetores. O tratamento contra a leishmaniose ocorre desde o século XX e mesmo assim existem poucas drogas disponíveis para este fim. Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2017) os fármacos disponíveis para este tratamento incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, paromomicina e pentoxifilina.

A atividade antileishmaniana do antimonial pentavalente se dá por uma ação mais ativa e com maior potencial tóxico de antimônio dada por uma redução a uma forma trivalente (RAJASEKARAN & CHEN, 2015), além de aumentar as espécies reativas de oxigênio (ERO's) e inibir a tripanotiona redutase e supostamente inibir a biossíntese macromolecular em amastigotas (SINGH et al., 2016). Em contrapartida este fármaco necessita que sua administração seja feita de modo parenteral por um longo período e apresenta graves efeitos tóxicos aos organismos principalmente nos sistemas renal, hepático e cardíaco. (MURRAY et al., 2005)

A anfotericina B é o medicamento utilizado como uma segunda opção, usado apenas quando não há possibilidade de uso do antimonial ou quando não houver resposta à sua aplicação. Este fármaco atua na membrana celular do parasita e também dentro e fora das células (BALASEGARAM et al., 2012). Por conta de seu alto potencial tóxico, formulações envolvendo lipídeos foram feitas visando a diminuição da toxicidade e facilitar a passagem do composto ativo por um maior período de tempo pelo organismo (GHORBANI; FARHOUDI, 2017). Sua aplicação é realizada por 10 dias via intravenosa e é recomendado que seja controlado as funções dos rins e fígado para a monitorização de efeitos adversos (BRASIL, 2017). O alto custo deste fármaco impossibilita uma maior adesão do sistema de saúde público em seus tratamentos (BRASIL, 2017).

O isetionato (Di-β-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina causa a morte do parasita atuando na síntese do DNA, RNA e proteínas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Diversos efeitos colaterais já foram descritos, como aumento da pressão arterial, taquicardia, insuficiência renal, efeitos tóxicos ao pâncreas (BRASIL, 2017)

Pesquisas em ensaios *in vitro* demonstram que existem espécies de leishmaniose como por exemplo a *L. amazonensis* que apresentaram resistência a pentamidina, tendo até 75 vezes menos captação do mesmo (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006)

A miltefosina é um fármaco que teve sua utilidade descoberta em 1980 para o tratamento do câncer e da leishmaniose, sua ação pode ser direta ao parasita, afetando seu metabolismo lipídico e causando sua morte (CROFT et al., 1987) Este fármaco possui efeitos colaterais mais amenos, porém sua teratogenicidade e custo são os principais problemas (SUNDAR et al., 2012)

A paromiomicina possui uma atividade contra diferentes microrganismos, sua ação na *Leishmania* não é devidamente descrita, mas de acordo com pesquisas feitas em bactéria a proposta é que seu alvo seja a síntese proteica (HWAN, 2016). Devido à baixa absorção quando administradas via oral, a opção é a aplicação via intramuscular para leishmaniose visceral, o que causa dor no local da aplicação, sendo esse seu principal efeito colateral, uma vez que o número

de pacientes que apresentaram nefrotoxicidade foi baixo (BEN SALAH et al., 2013; SUNDAR et al., 2007).

A Pentoxifilina possui uma ação hemorreológica, que auxilia na mobilidade dos eritrócitos pelos capilares através da flexibilização dos mesmos (BLAM et al., 1996). Ele atua inibindo as fosfodiesteras IV, leva ao aumento de AMP-cíclico que diminui a expressão de fatores de transcrição NF-kB e NF-AT o que culmina no bloqueio da síntese de TNF- α , e com a leishmaniose tendo um desbalanço de componentes pró-inflamatórios o uso deste fármaco com foco de TNF- α na imunomodulação se torna uma boa opção de tratamento (EIGLER ET AL., 1997; NEUNER ET AL., 1997; BRITO et al., 2014)

2.7. O Câncer

Considerando que os mecanismos de ação de morte dos parasitos podem se interpor com os mecanismos de ação de morte celular, foi interessante estudar o efeito do clorito como agente anticâncer *in vitro*.

O Câncer é um grupo de doenças que possuem como definição células anormais que se reproduzem rapidamente além de seus limites com poder de afetar qualquer órgão e se disseminar por todo o corpo. Tendo o título de ser uma das principais causas de morte do mundo em 2020 foi responsável por causar quase 10 milhões de mortes em todo o globo (WHO, 2022)

Segundo dados apresentados pelo *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) com ligação a Organização Mundial da Saúde, em 2020 os tipos de câncer com maior incidência excluindo os cânceres de pele não melanoma no mundo foram os cânceres de mama (2,26 milhões), pulmão (2,20 milhões), colorretal (1,93 milhões), próstata (1,41 milhões) e estômago (1,08 milhões) (GLOBOCAN, 2020)

Os diferentes tipos de cânceres recebem uma classificação histológica. Quando são do tecido epitelial são denominados carcinomas, que são o tipo mais comum de câncer, podendo ainda de dividirem em carcinomas de células basais ou carcinoma de células escamosas dependendo de onde são provenientes. Os tecidos epiteliais responsáveis pela produção de muco ou fluidos podem originar

os adenocarcinomas mas se as células forem do tecido conjuntivo são chamadas de sarcomas (STRAYER, 2015).

Quando as células do sangue são afetadas inicialmente nos linfócitos e por consequência os linfonodos a nomenclatura a ser utilizada é linfoma (SATO et al., 2019) e quando atingem a medula óssea e a série vermelha do sangue são denominadas leucemias que possuem diferentes subtipos (BAIN, 2017).

O processo de carcinogênese possui diferentes etapas de formação sendo elas a iniciação, promoção, proliferação e invasão, onde se dá o início através de diversas mutações acumuladas em um tipo celular na qual geralmente suas mutações são ligadas direta ou indiretamente a tumorigênese, responsáveis pela diferenciação e proliferação da célula, essas mutações podem ser uma resposta a fatores genéticos ou até mesmo ambientais (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004)

As células possuem mecanismos de verificação celular que promovem o reparo e execução de danos ao DNA entretanto por certas alterações, algumas células não são reparadas e as mutações são consequências dessa falha (PICININI, 2021) Algumas habilidades são adquiridas pelas células durante o seu processo de tumorigênese, como a perda de fatores de supressão de crescimento; manutenção da sinalização de proliferação; indução de angiogênese; capacidade de invasão e metástase; reprogramação do metabolismo energético entre outros (HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Ciclo celular

Sendo um processo altamente organizado, o ciclo celular tem como objetivo a duplicação e transmissão de informações genéticas de uma célula para outra. Este processo deve ocorrer de forma precisa fazendo com que as duas células filhas criadas recebam cópias idênticas de cromossomos (ISRAELS E ISRAELS, 2000). Durante a replicação o DNA possui um rigoroso sistema de monitoramento, porém as vias de identificação e reparo de danos das células cancerígenas sofrem mutações levando a uma falha nas checagens e as informações incorretas sejam passadas célula a célula na replicação. (ZABLUDOFF et al., 2008).

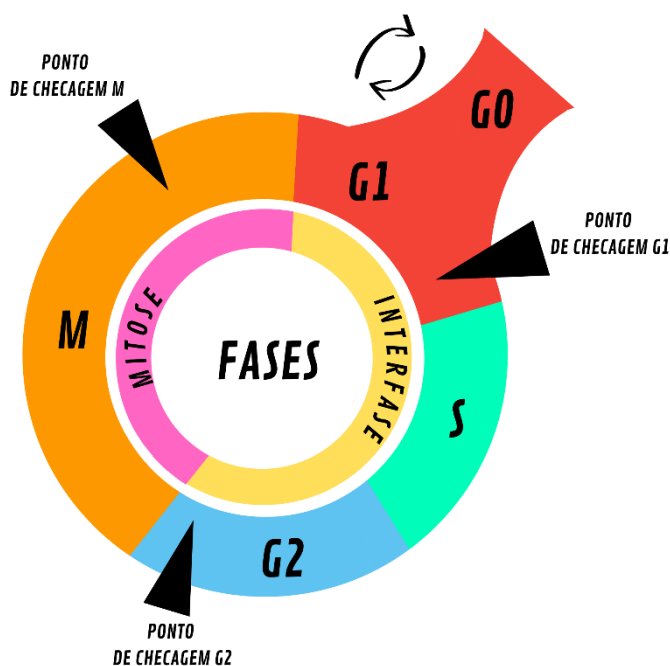
O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 (interfase) e M (mitose) (Figura 3). Normalmente as células permanecem fora do ciclo, na fase conhecida como G0 e através de estímulos entram na fase G1 na qual a célula recebe fatores de crescimento que a faz evoluir para a fase S, que ocorre a duplicação do material genético e após isso a célula evolui para a fase G2 sintetizando outros componentes celulares levando a célula para a fase M, a mitose que é a fase marcada pela condensação e formação do fuso mitótico e a divisão celular propriamente dita (ISRAELS E ISRAELS, 2000; ALBERTS et al., 2010).

Para a monitorização do ciclo celular são ativadas substâncias reguladoras como as ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK) em pontos específicos (NURSE E BISSETT, 1981). Para que a célula entre na fase G1 a ciclina D deve se ligar as CDKs 4 e 6 e para evoluir para a fase S a ciclina E deve se associar a CDK2. A ligação entre a ciclina A e a CDK2 deve ocorrer para que a célula entre na fase G2 e por último o complexo de ciclina A com CDK2 leva a fase M culminando na divisão celular (MOTOKURA et al., 1991).

As regulações garantem que todos os passos em cada fase sejam completos, com isso os pontos de checagem que monitoram o DNA estão devidamente alocados no final da fase G1, G2 e M (ISRAELS E ISRAELS, 2000; ALBERTS et al., 2010). Em G1 os danos dependentes de p53 estimulam o p21 que quando presente inibe a CDK levando a parada do ciclo para reparo, entrando novamente em G0. Em G2 quando não há a duplicação correta e completa do DNA a fusão entre ciclina e CDK não ocorre, acarretando estagnação do ciclo (SILICIANO et al., 1997) e em M onde a checagem ocorre antes do início da citocinese e divisão das cromátides irmãs (ALBERTS et al., 2010). Quando não há opções de reparo do dano a célula entra em morte (LEVINE, 1997).

Figura 3 – Fases do ciclo celular

CICLO CELULAR



Fonte: Adaptado de Márquez (2021).

2.8. Morte celular

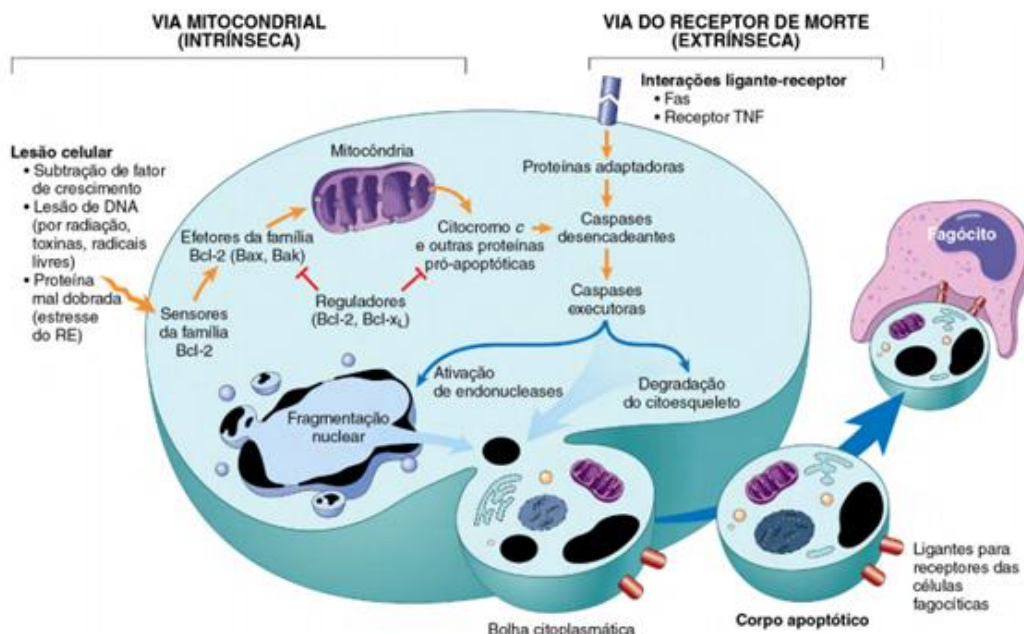
A morte celular é definida quando a célula não possui a capacidade de executar suas funções e quando perde a integridade de sua membrana plasmática sem a possibilidade de correção. Os tipos de morte são classificados de acordo com a morfologia da célula além de critérios bioquímicos, moleculares e funcionais, podendo ser de forma programada ou induzida (GALLUZZI, 2018).

Os tipos de morte mais comumente estudado são a apoptose, que se caracteriza como um tipo de morte programada com um papel importante na homeostasia dos tecidos eliminando células defeituosas ou que já completaram o seu ciclo biológico (FUCHS; STELLER, 2015) e a necrose, que através de um processo degenerativo leva a uma lesão celular que resulta na perda da integridade de membrana plasmática e conseqüentemente no extravasamento do conteúdo intracelular culminando em um processo inflamatório atingindo células adjacentes (GALLUZZI, 2018).

A apoptose possui duas principais vias de ativação: extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) (figura 4). Na extrínseca estímulos extracelulares ativam receptores de morte da família do TNF (fator de necrose tumoral) e esses receptores recrutam caspases iniciadoras (8 ou 10) e formam o complexo de sinalização de indutor de morte e a ativação das caspases executoras (3 ou 7) (ALBERTS et al., 2010; GALLUZZI, 2018). A intrínseca se desencadeia com sinais de dano ou estresse celular (quebra do DNA ou falta de nutrientes) que criam interação com fatores pró-apoptóticos como Bax/Bak (DASGUPTA et al. 2016; ICHIM; TAIT, 2016) levando a modificações na permeabilidade da membrana mitocondrial que ativam a caspase 9 e cliva a pró caspase 3 ativando as capazes 3, 6 e 7 chamadas de executoras levando a morte celular (ALBERTS et al., 2010; TOWER, 2015).

A regulação de ambas as vias de apoptose é feita de maneira criteriosa para que a morte celular ocorra apenas quando necessário. Em células neoplásicas a resistência de morte celular por apoptose se deve ao fato de possuírem alteração em pelo menos uma proteína envolvida nesta via e com isso a indução de apoptose é um dos principais alvos para o tratamento de diversos tipos de câncer (WONG, 2011).

Figura 4 - Vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose.



Fonte: KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016.

2.9. Terapias antineoplásicas

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de terapias antineoplásicas tem sido alvo de diversas pesquisas científicas pelo fato desta enfermidade causar óbitos em todo o mundo diariamente. As formas mais comumente utilizadas contra o câncer são a cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia ou a quimioterapia. (SOUZA et al. 2007)

A cirurgia se dá pela remoção do tumor quando possível, a radioterapia trabalha principalmente focando na ruptura do DNA levando a célula à morte, método indicado quando há chances de recidivas principalmente após cirurgias. A hormonioterapia é um tratamento utilizado quando as células neoplásicas estão localizadas em meio a células que crescem por estímulos de hormônios sexuais como mama e próstata. Neste método podem ser retirados os hormônios estimulantes ou adicionados ao organismo substâncias antagonistas a esses hormônios (SOUZA et al. 2007).

A quimioterapia utiliza substâncias químicas chamadas quimioterápicos que podem ser aplicados de maneira isolada ou associadas atuando a nível celular afetando o processo de crescimento e replicação causando danos ao DNA, fazendo com que suas chances de morte aumentem (SHEPHERD, 2003).

Os quimioterápicos visa destruir células que se reproduzem de forma desordenada evitando o crescimento acelerado de tumores, porém sem seletividade para células neoplásicas, uma vez que o organismo possui naturalmente células com alta reprodução como células do sistema imune e epitélio intestinal por exemplo e isso faz com que no geral os quimioterápicos sejam tóxicos trazendo efeitos colaterais ao organismo (ORIYAMA et al. 2017).

A terapia combinada também tem se mostrado uma ótima opção de tratamento contra o câncer, pois ambos os tratamentos podem atribuir um dano as células com o aumento da citotoxicidade nos mesmos alvos agindo em sinergismo ou separadamente, em contrapartida a ação toxica pode afetar as células saudáveis sem que haja dano as células cancerosas (WITTES; GOLDIN, 1986)

Levando em consideração que a patogenia do câncer é pouco explorada nos tratamentos a reposição farmacológica se destaca na eficiência clinica pois visa

um maior espectro de mecanismos de ação contra as células neoplásicas quando se utiliza de diferentes classes terapêuticas (BAVARESCO et al. 2005)

2.10. Dióxido de cloro

O dióxido de cloro (ClO_2) ou também denominado clorito de cloro é um estável radical livre e por ser um forte oxidante tem capacidade de oxidar espécies inorgânicas (BECKER, NICOSON E MARGERUM, 2003) e orgânicas (GANIEV et al, 1999). É um gás sintético com cor amarelo-esverdeado e odor semelhante ao gás de cloro, apresenta elevada solubilidade em água, porém sua produção deve acontecer no local do uso pois não pode ser comprimido por ser explosivo à baixa pressão e possui a seguinte estrutura química:



Existem diferentes maneiras de se obter o dióxido de cloro, seja na forma de gás ou diluído, de qualquer maneira é utilizado uma solução ainda forte de clorito ou clorato de sódio sendo para pequenas e médias ou grandes produções respectivamente (GATES, 1998).

Quando é adicionado na água a oxidação ClO_2 resulta rapidamente na formação do íon clorito que também é um excelente oxidante. Para que ocorra esta reação a presença de um agente redutor para o fornecimento de elétron é necessária.



Além disso, o clorito pode ser oxidado a clorato quando há presença de cloro livre (equação 3) e em altas condições alcalinas o ClO_2 se decompõe em clorito e clorato (equação 4)



O clorito é utilizado primordialmente para esterilização de ambientes e alimentos e tratamento de água devido ao seu alto poder de esterilização.(HUBBARD, POPPENDIECK E CORSI 2009; SMITH, ERNST E HERGES, 2015; CHOI et al. 2015).

Estudos indicam seu poder antiviral (SANEKATA et al., 2010). Li et al. (2004) testaram seu potencial contra os vírus da hepatite A. Este foi exposto por 10 minutos ao dióxido de cloro e sua inativação foi completa, além da perda da sua antigenicidade. Outras atividades foram relacionadas a esta substância, como ação antifúngica (MORINO et al. 2007) antibacteriana (MORINO et al. 2011) e apresentou efetividade contra o parasita *Neoparamoeba pemaquidensis* presente em salmão do atlântico (POWELL E CLARK, 2004).

Segundo estudos, sua ação desinfetante se dá através do contato com grupos sulfidrilas, que permeiam a membrana celular alterando o grupo –SH da glicose oxidase levando a interrupção da atividade enzimática e causando a morte da bactéria e o dano ao DNA e degradação da proteína viral, sendo este o mecanismo de ação utilizado contra os vírus. (ISON; ODEH; MARGERUM, 2006)

O efeito oxidativo é marcante sobre as estruturas dos eritrócitos, desde sua má formação como seu rompimento e diminuição (MOORE E CALABRESE, 1980). De acordo com Tan e colaboradores (1987) em um teste de reatividade com 21 aminoácidos o ClO₂ demonstrou reação com cisteína, tirosina, triptofano, histidina, hidroxiprolina e prolina na qual os três primeiros apresentaram uma rápida reação. Dentre os três com mais rápida reação a cisteína apresentou uma maior reatividade (ISON; ODEH; MARGERUM, 2006)

De acordo com Nishikiori et al. (2008) as células de fibroblastos gengivais humanos não apresentaram indução de apoptose nem necrose em nenhuma concentração testada após serem expostas a solução aquosa de dióxido de cloro. Em um ensaio de citotoxicidade utilizando queratinócitos da pele humana o dióxido de cloro obteve resultados bem menores em comparação ao hipoclorito de sódio (Stratilo; CRICHTON E SAWYER, 2015).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do dióxido de cloro em meio aquoso e determinar o seu potencial antileishmania e anticâncer.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliação antileishmania

- a) Analisar o potencial antiproliferativo da amostra em linhagens não neoplásicas de fibroblastos murinos (NHI/3T3);
- b) Analisar a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade *in vitro*, usando as linhagens celulares: rim de cão (MDCK); câncer renal humano (786-0) e hepatocarcinoma humano (HepG2)
- c) Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) braziliensis*
- d) Verificar padrão de morte celular nas linhagens em 2D por coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo

3.2.2. Avaliação anticâncer

- a) Analisar o potencial antiproliferativo da amostra em linhagens de câncer de mama triplo resistente (MDA MB 231); adenocarcinoma de mama (MCF-7); câncer de próstata (PC-03).
- b) Determinar o índice de seletividade da amostra para a linhagem neoplásica em relação a não neoplásica.
- c) Verificar alteração na integridade de membrana e indução de apoptose nas linhagens em 2D por coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo

4. Material e métodos

4.1. Obtenção da amostra

As amostras de clorito de sódio e ácido cítrico em forma de pó para a obtenção do dióxido de cloro em meio aquoso foram cedidas através de uma parceria com a FioCruz - Pernambuco sob supervisão do professor doutor Manoel Sebastião da Costa Lima Junior.

4.2. Preparo da amostra

Os sais de clorito de sódio e ácido cítrico já foram recebidos pesados em quantidade suficiente para 100ml estando clorito de sódio a 80% e ácido cítrico a 100%. Para a dissolução os sais foram colocados em vidros âmbar de 100ml separadamente e adicionado água destilada na quantidade estipulada. Como as amostras separadas só podem reagir no momento do uso, em cada momento de tratamento das células uma alíquota de 100 µl de cada uma das amostras diluídas foram misturadas e esperado um tempo de 5 minutos para que a reação fosse completa, observando a mudança de coloração de incolores quando separadas para amarelo quando misturadas ficando cada vez mais intensa com o passar do tempo.

4.3. Ensaios celulares *in vitro*

4.3.1. Linhagem celular e condições de cultura

Para avaliação da atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens de células neoplásicas humanas: MDA-MB-231 (ATCC-HTB26) adenocarcinoma triplonegativo), MCF-7 (ATCC-HTB22) adenocarcinoma de mama, PC-03 (ATCC-CRL 1435) adenocarcinoma prostático, para a avaliação da toxicidade as linhagens HepG2 (ATCC-HB8065) carcinoma hepatocelular, 786-0 (ATCC-CRL 1932) adenocarcinoma de rim e MDCK (ATCC- CCL 34) rim de cão e para a determinação do índice seletividade a linhagem não tumoral NIH/3T3 (ATCC-CRL1658) fibroblasto murino. As células neoplásicas e não neoplásicas foram obtidas pelo banco de células Americanos (ATCC) e pelo banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) mantidas em nitrogênio líquido. Para realização dos testes de citotoxicidade as linhagens foram descongeladas e cultivadas em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ (Freshney 2005)

As linhagens foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) ou *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dependendo da linhagem, pH 7,2, contendo 2 mM L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO₃, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e enriquecido com soro fetal bovino (SBF) (Gibco, Invitrogen) a 10%. Em uma atmosfera

relativa a 95%, a 37 ° C e 5% de CO₂, para uma densidade inicial de 1 milhão de células.

As células na fase de crescimento logarítmico foram mantidas até a densidade celular adequada para o ensaio (3×10^5 /ml), considerando a característica de crescimento de cada linhagem. O teste de exclusão com o corante azul de Trypan foi utilizado para contagem de células viáveis.

4.3.2. Atividade antiproliferativa por Sulforrodamina B (SRB)

O *screening* foi realizado para a obtenção da GI50 das linhagens e foi realizado pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB, Sigma Chemical Co.). Foram realizados testes com placa de tempo zero (T0), esta contém uma triplicata celular e meio de cultura usado como branco para posterior leitura, sua importância está em mostrar o crescimento celular sem tratamento até o início do tratamento. Após 24h foi realizada a leitura da placa T0 e a amostra foi colocada em triplicata na placa teste, nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina nas concentrações 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL. A placa com a suspensão celular em tratamento foi mantida a 37°C, 5% CO₂ e umidade por 48 horas. O início da metodologia ocorre com a aspiração do meio celular seguido da adição suave de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (4°C) a cada poço, seguido de incubação a 4°C durante 30 minutos. As placas foram lavadas com água cinco vezes e deixadas secar ao ar, em seguida, coradas pela adição de solução de SRB 50 p/l [0,4% de SRB (p/v) em ácido acético a 1% (v / v)] aos poços durante 30 min. Após a coloração, as placas foram rapidamente lavadas cinco vezes com ácido acético a 1% para remover o corante não ligado e deixado secar ao ar. O corante ligado foi solubilizado com 10 mmol de base Tris (pH 10,5, Sigma Chemical Co.) antes da leitura das placas em 540 nm.

4.3.3. Cálculo do índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela relação entre o GI50 da amostra determinado para linhagem celular não-tumoral (NIH/3T3) e a GI50 para células cancerígenas. A $IS > 2$ indica que a substância testada é mais seletiva

para células cancerígenas, sugerindo uma proteção às células normais e diminuição de efeitos colaterais (VAN LEEUWEN et al., 2012).

4.3.4. Atividade *in vitro* sobre formas promastigotas

As formas promastigotas foram adicionadas a placas de 96 poços (2x10⁵/mL) em fase log de crescimento em Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab®), 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®), foi incubado o dióxido de cloro nas concentrações de 0,04 a 50 µg/mL. O controle positivo utilizado foi a Pentamidina e a anfotericina nas concentrações entre 12,5 - 100 µg/mL (SigmaAldrich®). O controle negativo foi as formas em meio de cultura. As placas foram mantidas a 37°C em 5% CO₂ por 72 h. Para avaliar a viabilidade celular foi realizada a coloração por meio da adição de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difenil tetrasodium] (Sigma-Aldrich®; 5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 4 h e, em seguida, a absorbância estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 540 nm. A atividade das amostras foi expressa através da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀), calculada pelo Programa GraphPad Prism 5.0 por meio de curva de regressão não linear. O experimento foi realizado em septuplicatas

4.3.5. Ensaio de avaliação de apoptose em 2D

As células MDA MB-231, MCF-7, PC-03, HepG2, 786-0, MDCK e NHI/3T3 foram semeadas (3x10⁵ células/mL) em placa de 6 poços contendo lamínulas de vidro redondas de 18µm e incubadas por 24 horas, logo após foram tratadas com a substância teste nas concentrações de 10 e 20 µg/mL e incubadas por 48 horas. Após este tempo as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e as lamínulas retiradas e colocadas em lâminas de microscopia devidamente identificadas para adicionar solução de Laranja de acridina e de Brometo de etídio (EtBr) volume final de 20µL a 1µg/mL em PBS para corar as células. As células foram avaliadas em microscópio de fluorescência seguindo os padrões de celularidade e integridade de membrana: (I) células vivas com a membrana íntegra coram-se uniformemente de verde; (II) células em apoptose, onde a membrana está rompida e possui fragmentação do DNA mostram uma coloração

verde no núcleo, citoplasma e corpos apoptóticos; (III) células em processo de apoptose tardia mostram pontos corados de laranja e (IV) células necróticas, apresentam coloração laranja uniforme por toda extensão celular (MCGAHON et al., 1995).

5. Resultados

5.1. Atividade antileishmania

5.1.1. Avaliação da toxicidade - atividade antiproliferativa por SRB

As células testadas são padronizadas para avaliação de hepatotoxicidade (HepG2), nefrotoxicidade humana (786-0) e nefrotoxicidade canina (MDCK) (OECD, 2010). A linhagem NIH/3T3 é padronizada para avaliação de toxicidade aguda *in vitro*. Após o tratamento das células em quatro concentrações (0,1, 1, 10 e 100µg/ml), foi obtida a densidade óptica do produto da coloração com SRB que permitiu calcular a porcentagem de crescimento e a porcentagem de inibição celular da amostra em relação ao controle negativo (células não tratadas = 100% de crescimento) e à T0 (valor de absorbância no início do tratamento). Esses percentuais foram usados na obtenção dos valores de GI50 (concentração que inibe 50% da proliferação celular) e estão na tabela 1.

Tabela 1 - Toxicidade (hepato e nefrotoxicidade) do clorito em linhagens celulares *in vitro*.

	HepG2	786-0	MDCK	NHI/3T3
	GI50 (µg/mL)	GI50 (µg/mL)	GI50 (µg/mL)	GI50 (µg/mL)
CIO ₂ -	58,75 ± 15,70	17,65 ± 0,15	45,91 ± 11,27	27,28 ± 0,13
CP	0,22 ± 0,01	0,08 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,28 ± 0,01

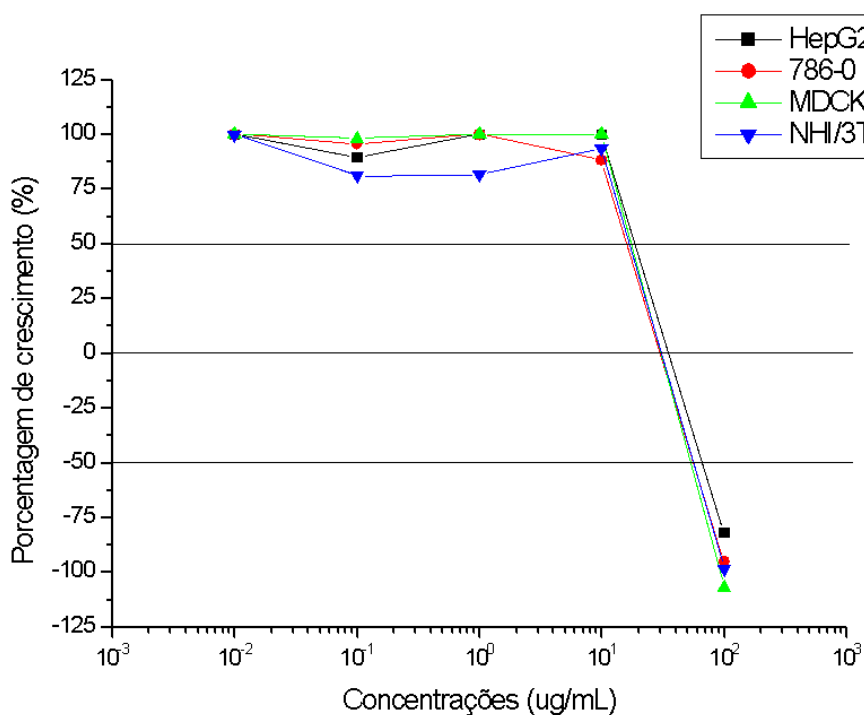
Os dados são apresentados como valores GI50, em µg/ml, obtidos por regressão não linear realizada em triplicado pelo ensaio SRB. CP= Controle positivo, na qual foi utilizada a doxorubicina.

A atividade contra essas células se apresentou moderada com base nos valores de GI50, tanto em hepatócitos quanto em células renais e fibroblastos. No entanto, até a concentração de 10 µg/mL não apresentaram toxicidade (Figura 5). Este perfil de toxicidade também foi identificado contra os fibroblastos

murinos (NIH/3T3) Porém sua atividade foi 100 vezes menor comparado à toxicidade causada pelo controle positivo (GI50=0,24µg/mL).

A partir da concentração de 10 µg/mL até a concentração de TGI 94µg/mL, houve efeito antiproliferativo citostático. Após esse valor são concentrações de efeito citocida, ou seja, que causam morte celular em todas as linhagens.

Figura 5- Efeito do clorito (0,1 a 100 µg/mL) na viabilidade celular. Resultados obtidos em ensaios triplicados de sulforrodamina B



5.1.2. Atividade antileishmania em promastigotas

Foram testadas duas diferentes espécies de promastigota a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em septuplicatas em diferentes concentrações de clorito, após as análises obtivemos os valores de IC50 da amostra frente às cepas, determinadas na tabela 2.

Tabela 2 Atividade antileishmania em formas promastigotas em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Amostras	IC50± DP (µg/mL) <i>L. amazonensis</i>	IC50± DP (µg/mL) <i>L. braziliensis</i>	GL50 (µg/mL) NIH/3T3	IS com NIH/3T3 <i>L. amazonensis</i>	IS com NIH/3T3 <i>L. braziliensis</i>
CIO ₂ ⁻	0,68 ± 0,03	1,268 ± 0.03	98.82	145.32	77.93
Anfotericina	0,093 ± 0,04	0,076 ± 0.06	N/A	N/A	N/A
B					
Pentamidina	0,27 ± 0,07	0,064 ± 0.04	N/A	N/A	N/A

IC50= concentração capaz de inibir 50% do crescimento das cepas de *leishmanias*; GL50= concentração com capacidade de morte de 50% das células; IS= índice de seletividade calculado através da razão dos resultados de IC50 das cepas de *leishmania* / GL50 da linhagem NHI/3T3; N/A= não avaliado.

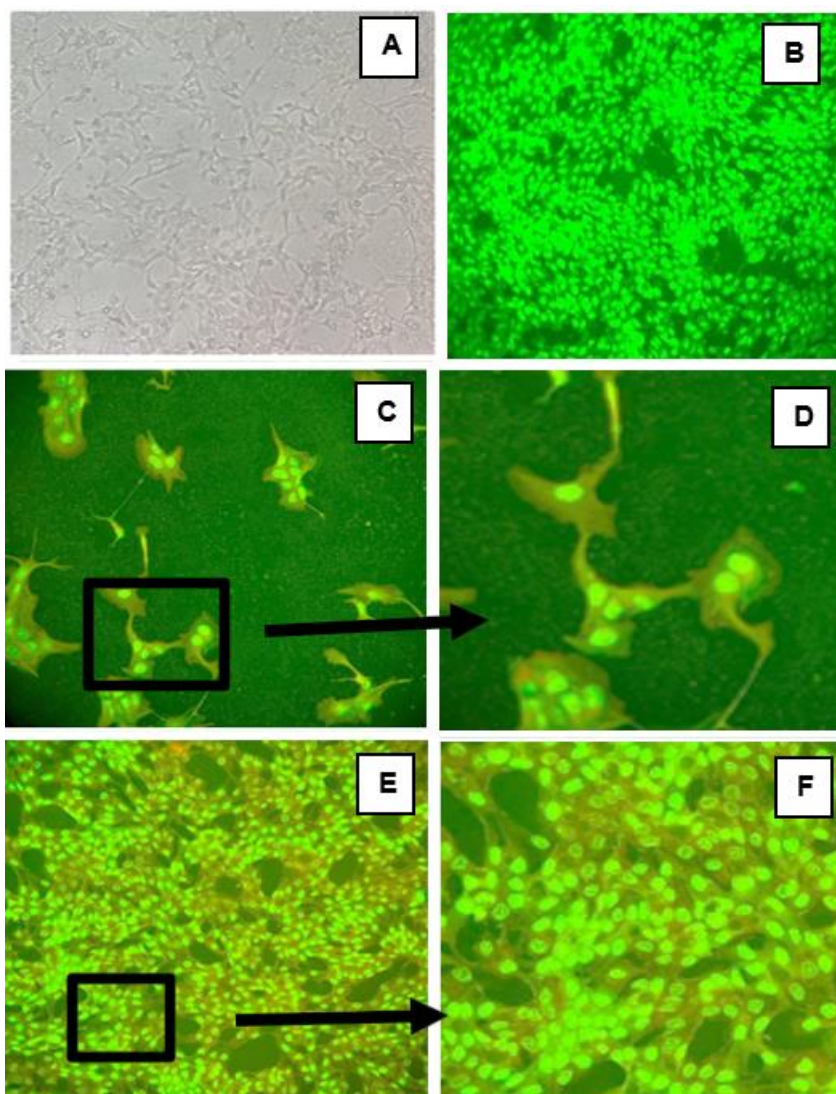
Os resultados apresentados pelo clorito em ambas as espécies de *leishmania* demonstraram que é necessária uma baixa concentração para afetar significativamente o parasita, assim como acontece com os fármacos comumente usados, em contrapartida a concentração que causa a morte de 50% das células de fibroblasto murino é potencialmente mais alta. A relação entre as células e o parasito calculado através deste ensaio *in vitro* demonstra uma alta especificidade da amostra contra o parasito.

5.1.3. Avaliação da Integridade de Membrana e apoptose por coloração com Brometo de Etídio / Laranja de Acridina.

Esta metodologia permite que se diferencie as células viáveis das células em processo de morte através da fluorescência. As células íntegras apresentam núcleo com cor verde pois o laranja de acridina atravessa a membrana íntegra e intercalando-se ao DNA, porém as células danificadas indicando apoptose apresentam apenas manchas verde brilhante e alterações em sua membrana por conta da formação de corpos apoptóticos. Em processo de apoptose tardia os núcleos são corados de vermelho por conta da ação do brometo de etídeo que se intercala ao DNA uma vez que a membrana esteja fragmentada, em caso de necrose, a célula ficará toda corada em vermelho (KUMMAR et al. 2004). Assim observamos que no tratamento das células MDCK com clorito na concentração de 10 µg/mL há persistência da coloração alaranjada no

citoplasma e núcleo fragmentado em algumas células corado em verde, configurando alteração de integridade de membrana e início de apoptose a confirmar com testes específicos (figura 6)

Figura 6 - Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem MDCK em análise fluorescente.



A imagem apresenta o controle negativo, apenas as células sem tratamento em objetiva 40x, B= controle negativo em fluorescência; C= células tratadas com controle positivo (doxorubicina) em objetiva 100x; D= Ampliação de um foco da imagem C; E= células tratadas com clorito na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em objetiva 40x; F= ampliação de um foco da imagem E demonstrando o efeito nas células.

Na avaliação das células 786-0 com clorito a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7) observa-se que a maioria das células, citoplasma e núcleo são coradas de alaranjado, com fragmentação nuclear, sugestivo de apoptose tardia.

Figura 7 - Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem 786-0 em análise fluorescente.

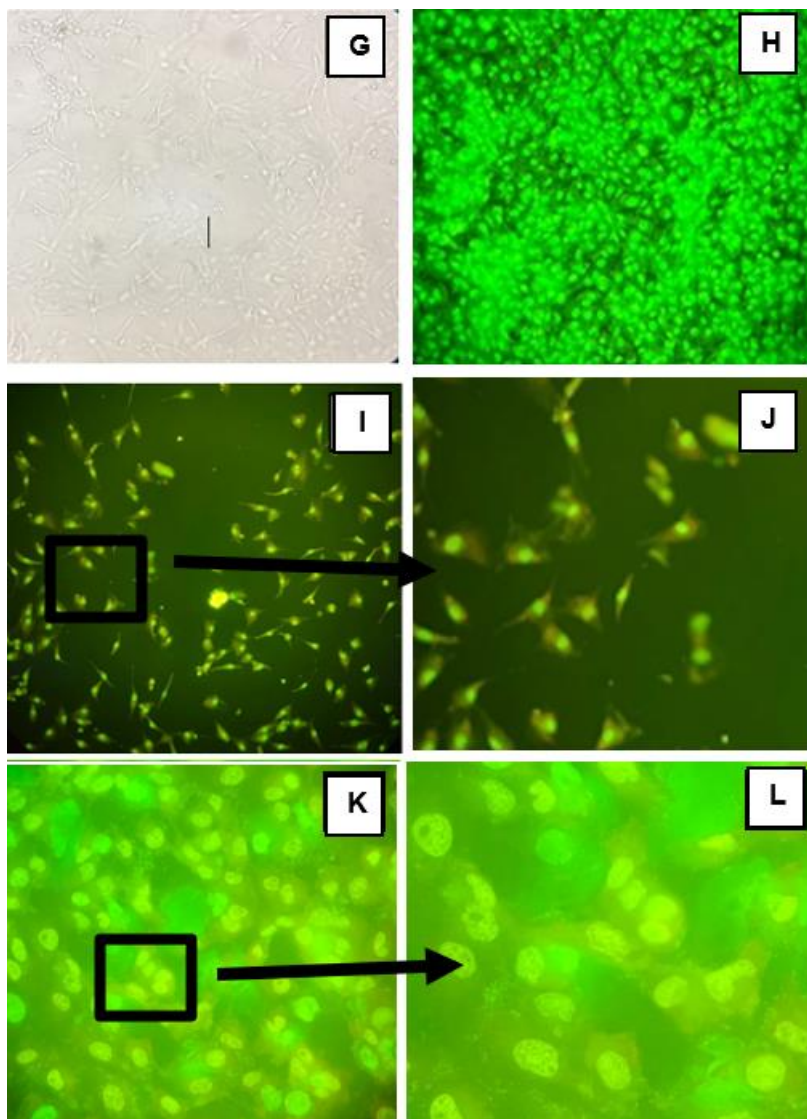


imagem G apresenta o controle negativo, apenas as células sem tratamento em objetiva 40x, H= controle negativo em fluorescência; I= células tratadas com controle positivo (doxorubicina) em objetiva 40x; J= Ampliação de um foco da imagem I; K= células tratadas com clorito na concentração de 10 µg/ml em objetiva 40x; L= ampliação de um foco da imagem K demonstrando o efeito nas células.

Para a linhagem de rim de cão (MDCK) (figura 6) foi apresentado células com colorações vermelhas no citoplasma e outras com citoplasma e núcleo verdes brilhantes mostrando que o clorito danifica a membrana de maioria das células, mas sem degradação total do núcleo, indicando possível apoptose, mesmo com isso nota-se a diferença da quantidade de células presentes no controle positivo em relação ao tratamento. Na linhagem 786-0 (figura 7) as células presentes apresentaram coloração verde brilhante e características de corpos apoptóticos,

assim como na linhagem MDCK a quantidade de células presentes no tratamento é superior ao número de células no controle positivo.

5.2. Resultado anticâncer

5.2.1. Atividade antiproliferativa por SRB

As concentrações testadas para este ensaio foram 01, 1, 10 e 100 µg/ml, determinando o valor de inibição de 50% da viabilidade celular de células neoplásicas.

Os resultados demonstraram uma moderada atividade antiproliferativa da amostra frente às linhagens neoplásicas (Tabela 3). As células de câncer de próstata (PC-03), são mais sensíveis ao tratamento desde a concentração mais baixa, comparado às demais linhagens celulares (Figura 8). Outro fato importante é o efeito do clorito sobre as células MDA-MB231, que são de linhagem triplo negativas e resistentes a múltiplos fármacos e foi mais sensível do que as células não neoplásicas (Tabela 3). Todas apresentaram efeito concentração dependente com efeito citocida a partir da concentração de 50µg/mL.

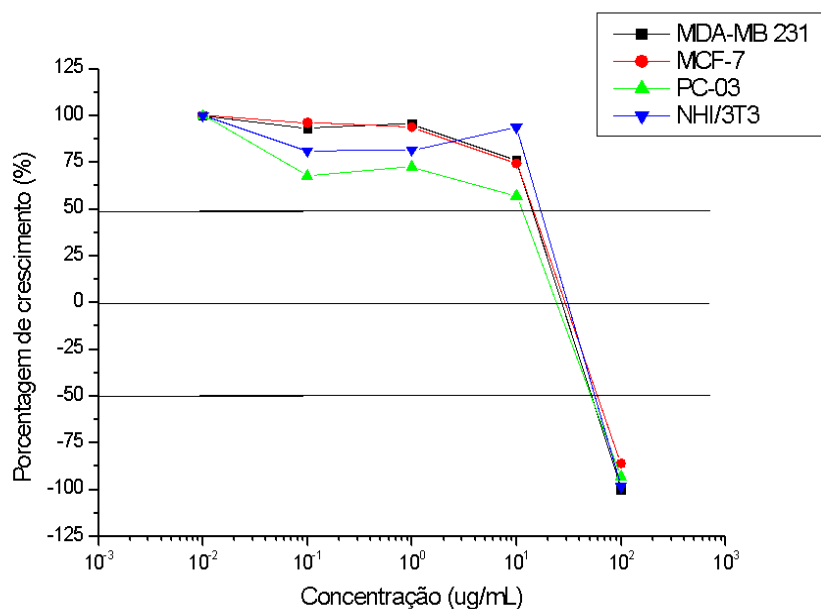
Tabela 3 - Atividade antiproliferativa do clorito em linhagens neoplásicas e não neoplásicas

	MDA-MB 231 GI50 (µg/mL)	MCF-7 GI50 (µg/mL)	PC-03 GI50 (µg/mL)	NIH/3T3 GI50 (µg/mL)
CIO2	16,30 ± 0,29	15,65 ± 0,24	12,17 ± 0,13	27,28 ± 0,13
CP	1,21 ± 0,01	0,08 ± 0,001	0,36 ± 0,02	0,28 ± 0,01
IS	1,62	1,77	2,26	N/A

Os dados são apresentados como valores GI50, em µg/ml, obtidos por regressão não linear realizada em triplicado pelo ensaio SRB. CP= Controle positivo, na qual foi utilizada a doxorrubicina; IS= Índice de seletividade; N/A= Não se aplica.

O índice de seletividade realizado para as células de câncer de mama neste estudo mostrou valores <2,0 indicando que a clorito não tem seletividade para estas linhagens, assim como a doxorrubicina. Porém para a linhagem PC-03 a seletividade foi positiva.

Figura 8 – Efeito antiproliferativo das células frente ao tratamento com clorito nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µg/ml.



5.2.2. Avaliação da integridade de membrana e apoptose pela coloração por Brometo de Etídio (Be)/ Laranja de Acridina (LA)

. Na figura 9 observamos a ação do clorito em células de câncer de mama triplo negativo resistentes a múltiplos fármacos. No tratamento com clorito na concentração de 10 µg/ml houve alteração de integridade de membrana (citoplasma alaranjado) com manutenção da integridade nuclear, o que não ocorre no tratamento com o controle positivo que apresenta células dismórficas e núcleos comprometidos indicando morte por necrose.

Figura 9 - Avaliação da integridade de membrana e apoptose em linhagem MDA-MB231 em análise fluorescente.

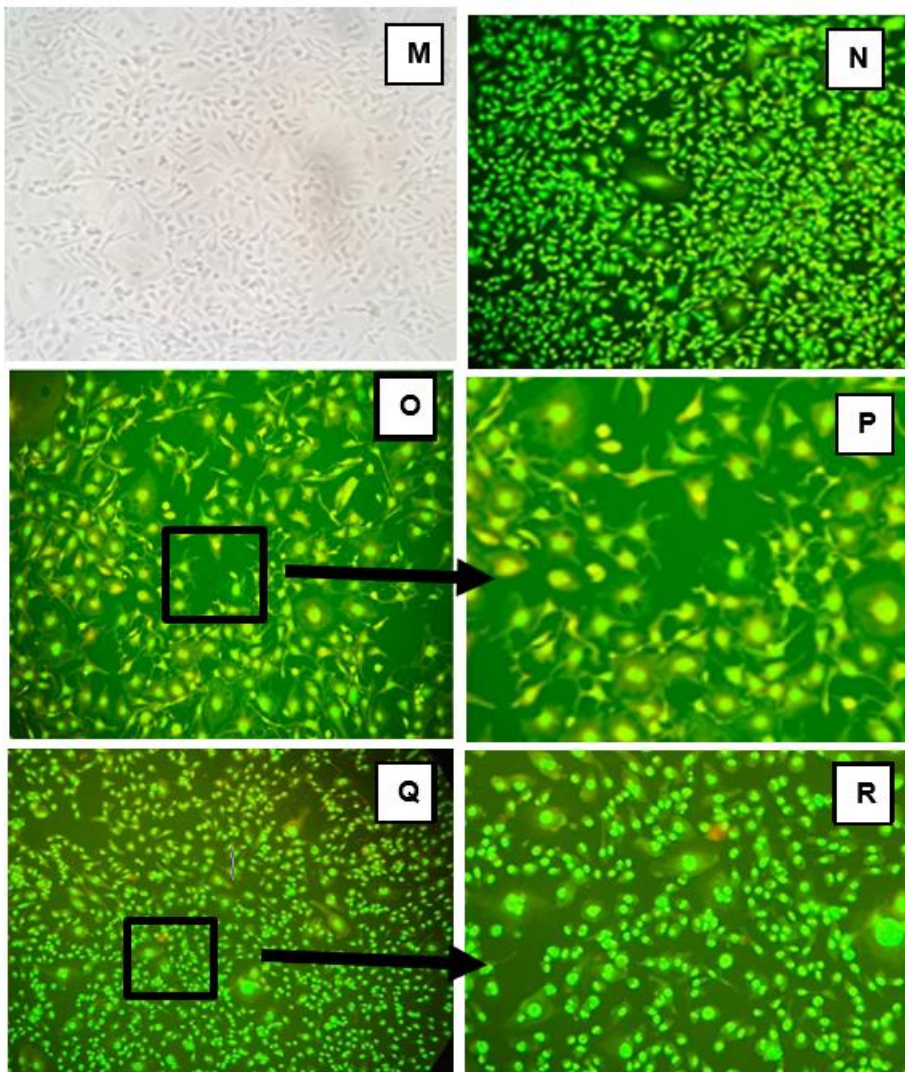


imagem M apresenta o controle negativo, apenas as células sem tratamento em objetiva 40x, N= controle negativo em fluorescência; O= células tratadas com controle positivo (doxorrubicina) em objetiva 40x; P= Ampliação de um foco da imagem O; Q= células tratadas com clorito na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em objetiva 40x; R= ampliação de um foco da imagem Q demonstrando o efeito nas células.

6. Discussão

O dióxido de cloro é capaz de oxidar agentes orgânicos e inorgânicos e por essa atividade foi relacionado às atividades antimicrobiana, antiparasitária e reparadora tecidual. A toxicidade para uso tópico foi identificada e a partir da concentração de 0,25% teria toxicidade sobre queratinócitos, *in vitro* e *in vivo* e que na concentração de 0,025% não teria toxicidade (HEGGERS et al., 1991). A partir destas informações foi avaliado a citotoxicidade *in vitro* por cultura de células de órgãos como o fígado e rim, selecionados devido suas ações

metabolizadoras e depuradoras, respectivamente e por serem órgãos altamente vascularizados e por isso respondem rapidamente a xenobióticos. As linhagens HepG2, 786-0 e MDCK tiveram alta viabilidade celular, em torno de 90% até a concentração de 10 µg/ml (0,01%), corroborando com a ausência de toxicidade na concentração de 0,25% no estudo de HEGGERS et al., (1991). No entanto, na concentração de 10 µg/ml, foi evidenciado alterações celulares que indicam quebra de integridade de membrana e apoptose. Considerando que a concentração de tratamento é enquadrada no efeito citostático, estas injúrias celulares podem ser revertidas ou seguir para processo de morte celular.

Quanto à atividade antileishmania, o ensaio contra a promastigota de *leishmania* é um teste inicial de verificação da ação da amostra. Os resultados antileishmania foram positivos pois a concentração necessária para inibir 50% do parasita é inferior à concentração que afeta as células saudáveis do organismo.

As análises com marcadores fluorescentes realizadas neste trabalho nas linhagens MDCK e 786-0 indicam que possivelmente a apoptose é a via utilizada, demonstrando uma morte controlada, porém diferentes ensaios devem ser feitos para comprovar.

Com os resultados preliminares antileishmania utilizando as células neoplásicas para determinar sua citotoxicidade demonstrando pontos positivos e a possível associação do estresse oxidativo neste processo, despertou o interesse de análise desta amostra contra o câncer onde os testes realizados buscando sua citotoxicidade demonstrou bons resultados.

Quanto à atividade anticâncer, foi observado que a até a concentração 10 µg/ml (0,01%) a viabilidade nas linhagens tumorais (MCF-7, MDA-MB231, PC-03) foi mais baixa (60 a 75%) em relação à viabilidade celular dos fibroblastos (NIH/3T3) que foi próxima de 100%, ou seja, a amostra é em torno de 35% mais eficiente nas linhagens tumorais do que nas células não tumorais, demonstrando seletividade tumoral. Nesta concentração foi evidenciado dano celular pelo teste com marcadores fluorescentes na linhagem MDA-MB-231. Mesmo que tóxica possui uma seletividade, essa toxicidade não implica no seu possível avanço farmacológico pois seu uso pode ser utilizado em sinergismo com

quimioterápicos existente ou até mesmo como uma forma de sensibilizar as células para outras terapias atuarem de maneira mais fácil

Estas alterações observadas na concentração 10 µg/ml já fazem esta substância importante para ser usada com agente sensibilizador celular, que deixa a célula vulnerável para acentuar o efeito do quimioterápico, agindo em combinação, como na politerapia.

7. Conclusão

O clorito possui um potencial ação antileishmania maior do que o efeito tóxico em linhagens NIH/3T3. Também apresentou ação anticâncer maior do que a toxicidade em linhagens NIH/3T3.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas
- BAIN, BARBARA J. *Leukaemia diagnosis*. John Wiley & Sons, 2017.
- BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. v. 17, n. 4, p. 493-510, nov 2012.
- BECKER RH, NICOSON JS, MARGERUM DW. Assistência nucleófila de reações de transferência de elétrons entre dióxido de nitrogênio e dióxido de cloro concomitante com a desproporção de dióxido de nitrogênio. *Química Inorgânica*. 1º de dezembro de 2003;42(24):7938-44.
- BEN SALAH, A. et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*. v. 368, ed. 6, p. 524–32, fev 2013. Disponível em:
- BLAM ME, STEIN RB, LICHTENSTEIN GR. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol*, 2001 Jul; 96(7):1977-97.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 189, 2017.
- BRITO, GRAÇA et al. Evolução clínica e imunológica em pacientes com leishmaniose tegumentar tratados com pentoxifilina. **The American Journal of Tropical Medicine and Higiene** , v. 90, n. 4, pág. 617, 2014.
- BURZA S, CROFT SL, BOELAERT M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30126638.
- CARLSEN, E.D. et al. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infection and Immunity*. v. 81, n. 11, p. 3966-74, nov 2013.
- CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural product with leishmanial
- CHOI S., PARK S., KIM Y., KIM BS, BEUCHAT LR, HOIKYUNG K., RYU JH Redução de *Salmonella enterica* na superfície de cascas de ovos por tratamento sequencial com dióxido de cloro aquoso e secagem. *Int. J.*

Microbiol Alimentar. 2015; 210 :84-87. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.009.

COLMENARES, MARIA et al. Mecanismos de patogênese: diferenças entre espécies de Leishmania. *Transações da Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. S3-S7, 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*. V. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CROFT, SL et al. A atividade de alquilfosforilcolinas e derivados relacionados contra *Leishmania donovani*. **Farmacologia bioquímica**, v. 36, n. 16, pág. 2633-2636, 1987.

DASGUPTA, A. et al. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 23, 2016.

DE MORAIS, C.G.V. et al. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection, *BioMed Research International*. v. 2015, id: 324915, set 2015.

DE OLIVEIRA EF, OSHIRO ET, FERNANDES WS, FERREIRA AM, DE OLIVEIRA AG, GALATI EA. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):178-181. doi:10.4269/ajtmh.16-0191

EIGLER A, SINHA B, HARTMANN G, ENDRES S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today*. 1997 Oct; 18 (10):487-92

FRANKEN, NICOLAAS AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 16, n. 6, p. 329, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, p. 1, 2018.

GANIEV IM, TIMERGHAZIN QK, KHALIZOV AF, ANDRIYASHINA NM, SHERESHOVETS VV, VOLODARSKY LB, TOLSTIKOV GA. Complexos de dióxido de cloro com radicais nitroxilo. *Letras tetraedros*. 18 de junho de 1999;40(25):4737-40.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug design, development and therapy*. V. 12, p. 25–40, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEGGERS JP, SAZY JA, STENBERG BD, STROCK LL, MCCAULEY RL, HERNDON DN, ROBSON MC. Bactericidal and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions: the 1991 Lindberg Award. *J Burn Care Rehabil.* 1991 Sep-Oct;12(5):420-4. doi: 10.1097/00004630-199109000-00005. PMID: 1752875.

HUBBARD H., POPPENDIECK D., CORSI RL Reações de dióxido de cloro com materiais internos durante a desinfecção de edifícios: absorção de superfície. *Ambiente. Sci. Tecnol.* 2009; 43 :1329-1335. doi: 10.1021/es801930c.

ICHIM, G.; TAIT, S.W.G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, p. 539-548, 2016.

ISON, A.; ODEH, I. N.; MARGERUM, D. W. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorganic Chemistry*, v. 45, n. 21, p. 8768-8775, 2006

ISRAELS, E. D.; ISRAELS, L. G. The cell cycle. **The oncologist**, v. 5, n. 6, p. 510-513, 2000.

KAMHAWI, Shaden. Flebotomíneos e parasitas Leishmania: amigos ou inimigos?. **Tendências em parasitologia** , v. 22, n. 9, pág. 439-445, 2006.

KLATT, S.; SIMPSON, L.; MASLOV, D. A.; KONTHUR, Z. Leishmania tarentolae: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS neglected tropical diseases*. V. 13, n. 7, 2019.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004.

LAINSON, R. AND SHAW, J.J. (2010). New World leishmaniasis. In: Collier, L., Balows, A., and Sussman, M. (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. New York: John Wiley and Sons, pp. 313–349.

LAWN, SD et al. Leishmaniose cutânea e mucosa do novo mundo: um problema de saúde emergente entre os viajantes britânicos. **Qjm** , v. 97, n. 12, pág. 781-788, 2004.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LI, JUN WEN et al. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. **Water Research**, v. 38, n. 6, p. 1514-1519, 2004.

LIANG, CHUN-CHI; PARK, ANN Y.; GUAN, JUN-LIN. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, v. 2, n. 2, p. 329, 2007.

MARSDEN, PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911), *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 80, Issue 6, 1986, Pages 859–876, [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90243-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90243-9)

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R.; The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods cell biol.* v. 46, p.153 – 185, 1995).

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians.* V. 107, n. 1, p. 7-14, 2014

MEDRADO, H.; DAVIDA, J. M.; DAVIDB J. P.; BRANDÃO, H. N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. *Quim Nova*, v. 28, n. 2, p. 243-258, 2015.

MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Dynamics of cancer 111 progression. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 3, p. 197–205, mar. 2004.

MOORE AND CALABRESE, 1980 - Moore, G.S. and Calabrese, E.J. (1980). The effects of chlorine dioxide and sodium chlorite on erythrocytes of A-J and C-57LJ mice. *J. Environ. Path. Toxicol* 4(2-3):513-524

MORINO, H., FUKUDA, T., MIURA, T., & SHIBATA, T. (2011). Effect of low-concentration chlorine dioxide gas against bacteria and viruses on a glass surface in wet environments. *Letters in applied microbiology*, 53(6),628-634.

MORINO, H., MATSUBARA, A., FUKUDA, T., & SHIBATA, T. (2007). Inibição do crescimento de hifas do fungo *Alternaria alternata* pelo gás dióxido de cloro em concentrações muito baixas. *Yakugaku Zasshi: Jornal da Sociedade Farmacêutica do Japão* , 127 (4), 773-777.

MOTOKURA, T. et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*, v. 350, n. 6318, p. 512-515, 1991.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. *The Lancet.* v. 366, v. 9496, p. 1561–77, nov 2005.

MUVDI-ARENAS, Sandra; OVALLE-BRACHO, Clemência. Leishmaniose mucosa: uma doença esquecida, descrição e identificação de espécies em 50 casos colombianos. **Biomédica** , v. 39, p. 58-65, 2019.

NEUNER P, KLOSNER G, POURMOJIB M, KNOBLER R, SCHWARZ T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology*, Mar 1997;90(3):435-9.

NISHIKIORI, R. et al. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *Journal of Dentistry*, v. 36, n. 12, p. 993-998, 2008.

NURSE, P.; BISSETT, Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, v. 292, n. 5823, p. 558-560, 1981.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas Nº 8 – dezembro de 2019. Disponível em <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y

OPAS, Organização Mundial da Saúde, Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses Nº 10 - Março, 2021

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Leishmanioses. Informe Epidemiológico nas Américas. Organização Pan Americana da Saúde, Organização Mundial de Saúde, Informe Leishmaniose, 3; 2015.

PALMEIRO MR, ROSALINO CMV, QUINTELLA LP, MORGADO FN, MARTINS ACC, MOREIRA J, SCHUBACH AO, CONCEIÇÃO-SILVA F. GINGIVAL leishmaniasis in an HIV-negative patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007; 104:e12-e16.

PESSOA, S.; MARTINS, A. V. Gênero Leishmania: *Leishmania donovani*/leishmaniose visceral ou calazar. In: REY, L. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 67-77.

PINTO, BRONSON I. et al. In vitro scratch assay to demonstrate effects of arsenic on skin cell migration. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n.144, p. e58838, 2019.

POWELL, MD; CLARK, GA Eficácia e toxicidade de desinfetantes oxidativos para a remoção de amebas branquiais das brânquias da doença branquial amebiana afetada pelo salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) em água doce. *Aquaculture Research*, v.35, p.112-123, 2004

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y.P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today*. v. 20, ed. 8, p. 858-68, ago 2015.

RANGEL EF, LAINSON R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. p.13-14

RASBAND, WAYNE S. et al. *ImageJ*. 1997. Disponível em <<http://www.worldlibrary.in/articles/eng/ImageJ> >

READY, P.D. Leishmaniasis emergence in europe, *Euro Surveillance*. v. 15, n. 10, p. 1-11, mar 2010.

RODRIGUEZ, LUIS G.; WU, XIAOYANG; GUAN, JUN-LIN. Wound-healing assay. In: *Cell Migration*. Humana Press, 2005. p. 23-29.

SANEKATA T. , FUKUDA T. , MIURA T. , MORINO H. , LEE C. , MAEDA K. , ARAKI K. , OTAKE T. , KAWAHATA T. , SHIBATA T. 2010 ; Avaliação da atividade antiviral do dióxido de cloro e hipoclorito de sódio contra calicivírus felino, vírus influenza humano, vírus do sarampo, vírus da cinomose, herpesvírus humano, adenovírus humano, adenovírus canino e parvovírus canino. *Biocontrol Sci* 15: 45-49

SATOU, AKIRA; BENNANI, N. NORA; FELDMAN, ANDREW L. Update on the classification of T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert review of hematology*, v. 12, n. 10, p. 833-843, 2019.

SHEPHERD, G. M. Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 24, p. 253-262, 2003.

SILICIANO, J. D. et al. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & development*, v. 11, n. 24, p. 3471-3481, 1997.

SINGH, O.P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty*. v. 5, p. 19, 2016.

SINGH, O.P.; SUNDAR, S. “Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era,” *Journal of Parasitology Research*, v. 2015, out 2015.

SKRABA, C.M.; MELLO, T.F.; PEDROSO, R.B.; FERREIRA, E.C.; DERMARCHI, I.G.; ARISTIDES, S.M. et al, Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.48, p.4377-444, 2015.

SMITH DJ, ERNST W., HERGES GR Resíduos de cloroxânion em melão e tomate após saneamento com gás dióxido de cloro. *J. Agric. Química Alimentar*. 2015; 63 :9640-9649. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04153.

SMITH, RYAN C.; VEGA-RODRÍGUEZ, JOEL; JACOBS-LORENA, MARCELO. O gargalo do Plasmodium: perdas de parasitas da malária no mosquito vetor. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v. 109, p. 644-661, 2014.

SOUZA, MARCUS VINÍCIUS NORA DE et al. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 02, p. 25-42, 2007.

STRATILO, C. W.; CRICHTON, M. K. F.; SAWYER, T. W. Decontamination efficacy and skin toxicity of two decontaminants against bacillus anthracis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1– 12, 2015.

STRAYER, DAVID S. RUBINS pathology: clinicopathologic foundations of medicine. 2015.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral Leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical Infectious Diseases*. v. 55, n. 4, p. 543-50, ago 2012.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*. v. 356, n. 25, p. 2571–81, jun 2007.

TAN, HK, WHEELER, WB, & WEI, CI (1987). Reação do dióxido de cloro com aminoácidos e peptídeos: estudos de cinética e mutagenicidade. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 188 (4), 259- 266.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews*, v. 23, p. 90-100, 2015.

TUON, FELIPE FRANCISCO et al. Reativação da leishmaniose cutânea 2 anos após o tratamento causado por corticosteróides sistêmicos – primeiro relato. **Revista Internacional de Dermatologia**, v. 46, n. 6, pág. 628-630, 2007.

VAN LEEUWEN, I. M. M. et al. An evaluation of small-molecule p53 activators as chemoprotectants ameliorating adverse effects of anticancer drugs in normal cells. *Cell Cycle*. v.11, n.9, p. 1851–1861, 2012.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, p. 851-855, 2014. DOI: 10.1590/S0034- 8910.2014048005615.

WERNECK, GUILHERME L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 32, p. eED010616, 2016.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact Sheets: Cancer, Fev 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact Sheets: Leishmaniasis, Jan 2022.

YANIK, M., GUREL, M. S., SIMSEK, Z., & KATI, M. (2004). The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, 29(5), 464–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01605.x>

ZABLUDOFF, S. D. et al. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Molecular cancer therapeutics*, v. 7, n. 9, p. 2955-2966, 2008.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*. v. 22, n. 10, p. 1516-31, out 2017. Disponível em: