

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA**

THAÍS MOREIRA FONTENELE

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DA MILTEFOSINA**

**GOIÂNIA - GO
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome completo da autora: Thaís Moreira Fontenele

Título do trabalho: Estudo do Mecanismo de Ação da Atividade Leishmanicida da Miltefosina

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM
[] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta à autora e ao orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 01/09/2023, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Moreira Fontenele, Discente**, em 01/09/2023, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4011765** e o código CRC **629E0407**.

THAÍS MOREIRA FONTENELE

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DA MILTEFOSINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Física Médica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Área de pesquisa: Biofísica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.

GOIÂNIA - GO
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

FONTENELE, THAIS MOREIRA
ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DA MILTEFOSINA [manuscrito] / THAIS MOREIRA
FONTENELE. - 2023.
46 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Física Médica, Goiânia, 2023.
Bibliografia.
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Leishmania. 2. Miltefosina. 3. Espectroscopia de Ressonância
Paramagnética Eletrônica. 4. Marcador de Spin, . 5. Fluidez de
Membrana. I. Alonso, Antonio , orient. II. Título.

CDU 577.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezessete dia(s) do mês de agosto do ano de 2023 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Estudo do Mecanismo de Ação da Atividade Leishmanicida da Miltefosina**”, de autoria de **Thaís Moreira Fontenele**, do curso de Física Médica, do Instituto de Física da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Antonio Alonso (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Cássia Alessandra Marquezin (IF/UFG) e Prof. Dr. Sebastião Antônio Mendanha Neto (IF/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição da estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **10,0** (dez), tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 17/08/2023, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Antônio Mendanha Neto, Professor do Magistério Superior**, em 17/08/2023, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cássia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 17/08/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3959327** e o código CRC **675612C5**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus por não me desamparar em vários momentos de fragilidade durante todos esses anos, e por me ensinar que a dedicação é tão importante quanto o talento.

Agradeço ao meu orientador Antônio Alonso pela paciência e pelo apoio durante o desenvolvimento do trabalho, aos meus companheiros de laboratório de pesquisa pelo companheirismo e pelos ensinamentos na vivência de um ambiente de pesquisa, em especial, Prof^o Cássia, Prof^o Sebastião, Laís Alonso e Ellyessa.

À minha família em especial meus pais Guilhermina e Ivanaldo *in memoriam*, meu irmão Thales que não tiveram os mesmos privilégios que eu, mas fizeram o possível e impossível pra que eu pudesse usufruir de uma educação melhor. Meu tio Romualdo, que esteve sempre ao meu lado sendo meu suporte.

Aos meus amigos de curso em especial o Gustavo Campos, Thamires Tavares, Tâmara e Diéricon pela jornada amigável e com um clima de cooperativismo que providenciaram um bom clima e uma boa vivência acadêmica.

Aos meus amigos e amigas da vida em especial à Fernanda e à Eduarda, pois sem elas não encontraria tamanha perseverança na graduação em Física Médica.

Uma vez que aceitamos os nossos limites, vamos além deles.
- ***Albert Einstein***

RESUMO

A miltefosina (MT) é um fármaco oral aprovado internacionalmente para tratamento da leishmaniose, no entanto, seus mecanismos de ação não estão esclarecidos ainda. Neste estudo, utilizamos a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) associada ao método de marcadores de spin para demonstrar que a MT causa rigidez de membrana em promastigotas de *L. amazonensis* após tratamentos de 24, 48 e 72 h. Os espectros de RPE foram consistentes com a ocorrência de intensa lipoperoxidação e oxidação de proteínas de membrana. Estes resultados estão em concordância com outros trabalhos reportados mostrando que a MT também causa alteração no potencial de membrana mitocondrial, assim como diversos compostos que também causam rigidez de membrana no parasita de *Leishmania*. Como estudos anteriores mostraram que a MT causa grande fluidez na membrana do parasita após duas horas de tratamento, os resultados deste trabalho sugerem que a ação primária da MT ocorre na membrana plasmática, com provável alteração no equilíbrio iônico, a exemplo da ivermectina que altera o potencial elétrico na membrana do parasita e também causa rigidez de membrana como tem sido reportado.

Palavras-chave: *Leishmania, Miltefosina, Espectroscopia de Ressonância Paramagnética, Marcador de Spin, Fluidez de Membrana.*

ABSTRACT

Miltefosine (MT) is an internationally approved oral drug for the treatment of leishmaniasis, however, its mechanisms of action are not clear yet. In this study, we used electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy associated with the spin label method to demonstrate that MT causes membrane rigidity in promastigotes of *L. amazonensis* after treatments of 24, 48 and 72 h. The EPR spectra were consistent with the occurrence of intense lipoperoxidation and oxidation of membrane proteins. These results agree with reported works showing that MT also causes changes in the mitochondrial membrane potential, as well as several compounds that also cause membrane rigidity in the Leishmania parasite. As previous studies have shown that MT causes great fluidity in the parasite's membrane after two hours of treatment, the results of this work suggest that the primary action of MT is on the plasmatic membrane, with probable alteration in the ionic balance, like ivermectin that alters the electrical potential on the parasite membrane and causes membrane rigidity as has been reported.

Keywords: *Leishmania, Miltefosine, Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Spin Marker, Membrane Fluidity.*

LISTA DE ABREVIATURAS

LC – Leishmaniose Cutânea

LV- Leishmaniose Visceral

LT – Leishmaniose Tegumentar

MT – Miltefosina

PBS - Tampão Fosfato-Salino, do inglês: *Phosphate Buffered Saline*

ROS - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

RPR - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

LISTA DE FIGURAS

- Figura [1]** - a) Forma cutânea: Lesão única, ulcerada em região maleolar externa. b) Lesões exulceradas, múltiplas, base eritematosa infiltrada, recobertas por crostas.....20
- Figura [2]** - Forma cutânea disseminada de LT. Apresentam múltiplas lesões pequenas, pápilotuberosas, exulceradas..... 21
- Figura [3]** - Forma cutânea difusa de LT. Em (a) o paciente estava com 6 anos de idade. A lesão se iniciou no primeiro ano de vida dele, apresentando lesão infiltrada em base de pirâmide nasal. Em (b), a mesma lesão após 17 anos de evolução, caracterizando a evolução crônica e a refratariedade a diversos esquemas terapêuticos.....21
- Figura [4]** - Forma mucosa de LT. As duas imagens apresentam a forma mucosa tardia, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial.....22
- Figura [5]** - Estrutura molecular da MT.....25
- Figura [6]** - Ligação e internalização da MT em parasitos leishmania. Etapas sequenciais na acumulação da MT: A - Ligação da MT no folheto externo da membrana plasmática. MT é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório do fármaco; B - a fração de MT que se liga à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade *flipflop*. Esse maquinário de translocação inclui, no mínimo, duas proteínas da membrana, LdMT e LdRos3.....27
- Figura [7]** - Foto do espectrômetro de RPE do laboratório de biofísica (Instituto de Física – UFG).....30
- Figura [8]** - Diagrama de bloco do espectrômetro de RPE.....30
- Figura [9]** - Imagem do tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno contendo 1×10^8 parasitas empacotados na parte inferior do capilar após sua centrifugação.....34
- Figura [10]** - Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática do parasita da leishmania *amazonensis* promastigotas após tratamentos de 24, 48 e 72 h com diferentes concentrações de miltefosina. O parâmetro de RPE

2A//, que é o desdobramento hiperfino externo, é medido diretamente no espectro conforme indicado. A varredura de campo magnético em cada espectro (eixo X) é de 100 G, e a intensidade do espectro (eixo Y) está em unidade arbitrária.....35

Figura [11] - Variação do parâmetro de RPE 2A// do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática do parasita da Leishmania para amostras tratadas com diferentes concentrações de MT e diferentes períodos de tratamento.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela [1] - Classificação Taxonômica dos complexos de leishmania em seus subgêneros.....	22 e 23
--	---------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Considerações Gerais.....	16
1.2 Leishmaniose.....	17
1.3 Manifestações Clínicas.....	19
1.4 Agente Etiológico.....	22
1.5 Tratamento.....	24
1.6 Miltefosina.....	24
1.7 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (RPE).....	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Produtos Químicos.....	33
3.2 Cultivo das Células Parasitas.....	33
3.3 Preparação e Marcação das Amostras Para o Experimento de RPE...33	
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	40
7. PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A leishmaniose afeta principalmente as populações pobres da África, Ásia e América Latina, estando associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e a indivíduos imunocomprometidos. Além das questões ambientais como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização (OMS, 2015).

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a leishmania constitui problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007).

A Miltefosina (MT) foi o primeiro fármaco oral aprovado para uso no tratamento de LV e LT, sendo liberada para uso humano na Índia, Alemanha e Colômbia (OLLIARO *et al*, 2005, p763-744) e mais recentemente nos Estados Unidos (MONGE -MAILLO e LÓPEZ-VELEZ, 2015 p. 1398-1404). Este fármaco mostrou altas taxas de cura no tratamento das leishmanioses, tanto em leishmaniose viral (LV) (BHATTACHARYA *et al*, 2007, p. 591-598) como leishmaniose tegumentar (LT) (SOTO *et al*, 2004 p. 1266-1272; SOTO *et al*, 2007 p. 350-1356)

A MT foi originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos (SUNDAR e OLLIARO, 2007 p. 733-740). Embora muitos estudos tivessem sido conduzidos para identificar os mecanismos de ação da MT contra células tumorais (BLITTERSWINJK e VERHEIJ, 2008 p. 2061-2074) e parasitos (DORLO *et al*, 2012 p.2576-2597), estes mecanismos ainda não são bem compreendidos. No entanto, devido à sua estrutura química, a MT possui uma alta afinidade por membranas, e por isso, tem-se pensado que os primeiros alvos

moleculares deste fármaco se encontram em nível da membrana plasmática (BLITTERSWINJK e VERHEIJ, 2008 p. 2061-2074; MOREIRA *et al*, 2011 pp. 201-211).

Foi comprovado que a MT provoca um significativo aumento na fluidez dos lipídios presentes nas membranas do estrato córneo, a camada mais externa da pele, quando avaliada diretamente no tecido. Contudo, esse efeito não é observado nas membranas modelo do estrato córneo, que consistem em vesículas preparadas com lipídios comerciais representando as três principais classes de lipídios desta membrana: ceramida de cérebro bovino, ácido beénico e colesterol, numa proporção molar de 2:1:1. Nesse sistema, a MT apenas desencadeia uma discreta alteração na fluidez dos lipídios (ALONSO *et al*, 2012 p. 391-398). Por outro lado, estudos demonstraram que a MT também promove um drástico aumento na fluidez tanto dos lipídios quanto das proteínas presentes nas membranas de *ghosts* (vesículas que contêm apenas a membrana plasmática) e nas membranas resistentes a detergentes, ambas derivadas de eritrócitos (MOREIRA, *et al*, 2013).

Neste estudo em questão, temos como propósito aprofundar o entendimento acerca do mecanismo de ação da MT, sendo apresentada a sua influência sobre as membranas de *L. (L.) amazonensis* utilizando a espectroscopia de RPE. Objetivamos ainda desenvolver as metodologias para investigar a interação de outros fármacos hidrofóbicos que possam afetar a membrana plasmática, buscando contribuir com a pesquisa na biodiversidade em busca de novos medicamentos que sejam mais eficazes e apresentam menor incidência de efeitos colaterais.

1.2 Leishmaniose

Pertencente à ordem das *Kinetoplastidas* e à família *Trypanosomatidae*, o gênero *Leishmania* compreende um conjunto de protozoários unicelulares e digenéticos, conforme descrito por (NEVES, 2016). Essa espécie manifesta-se nas formas de promastigota e amastigota, com seus flagelos podendo estar livres ou aderidos ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados. Na configuração

amastigota, o parasita reside intracelularmente, desprovido de flagelo, de acordo com (NEVES, 2016).

No decorrer de seu ciclo biológico, a *Leishmania* requer a intervenção de mais de um hospedeiro para completar sua trajetória. Os *flebotomíneos*, conhecidos como mosquitos-palha, desempenham o papel de hospedeiros invertebrados para esse parasita, sendo somente as fêmeas desses insetos as que se alimentam de sangue. Por outro lado, os mamíferos atuam como os principais hospedeiros vertebrados, incluindo os seres humanos, que podem ser infectados pela picada do inseto portador da infecção, como explicado por (NEVES, 2016).

A leishmaniose é uma infecção causada por infecção intracelular obrigatória protozoários parasitas *leishmania* transmitidos pela picada de certas espécies de flebotomíneos (MURRAY, 2000). Várias espécies de *leishmania* específicas para várias áreas geográficas são capazes de causar doenças em humanos podendo resultar em diversas manifestações clínicas.

Leishmaniose visceral (LV), a forma grave de leishmaniose, é tipicamente causada pelo complexo de espécies *Leishmania donovani*. Caracteriza-se por infecção visceral disseminada do sistema reticuloendotelial e é inevitavelmente fatal se não for tratada (CHAPPUIS *et al*, 2007).

O tratamento de LV e LT é complicado por diferenças intrínsecas específicas da espécie na suscetibilidade a fármacos, (CROFT, 2003) e também por diferenças na eficácia aparente desses fármacos entre regiões geográficas áreas (CHAPPUIS *et al*, 2007), o que implica que cada novo tratamento e combinação tem que ser reavaliado em cada localização geográfica distinta onde LV ou LT é endêmica.

Cerca de 20 espécies de leishmanias têm a capacidade de ocasionar enfermidades em seres humanos. No contexto do Brasil, existem atualmente sete dessas espécies em circulação, sendo que a predominante é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, reconhecida pela sua gravidade, de acordo com (NEVES, 2016). A cada ano, globalmente, cerca de 12 milhões de indivíduos são infectados, como relatado pela OMS em 2018.

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. Representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007). O parasita é transmitido pela picada do flebotomíneo aos hospedeiros mamíferos. A doença é endêmica em 88 países e afeta até 12 milhões de pessoas em todo o mundo com uma incidência de 0,5 milhão de casos da forma visceral da doença e 1,5 a 2,0 milhões de casos da forma cutânea da doença, causando extensa mortalidade e morbidade (JUNIOR, 2013).

No presente momento, a leishmaniose é submetida a tratamento por meio de antimoniais pentavalentes, anfotericina B, MT e paromomicina, conforme mencionado por S.M. CHRISTENSEN et al. (2019). Entretanto, várias desvantagens são associadas à administração desses medicamentos, tais como toxicidade, extensa duração do tratamento e o surgimento de resistência medicamentosa, como assinalado por (CHAKRAVARTY & SUNDA, 2019). Portanto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes é de suma importância.

A utilização da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em conjunto com a abordagem do rótulo de spin tem demonstrado ser a metodologia preferencial na análise da dinâmica molecular presente nas membranas biológicas. Tal técnica já foi empregada para a exploração das interações entre compostos de caráter antileishmania e a membrana plasmática do parasita. No entanto, os mecanismos subjacentes a essas interações ainda permanecem incompletamente esclarecidos, conforme apontado por (MOREIRA et al. 2014; ALONSO et al. 2019).

1.3 Manifestações Clínicas

Na LT, a infecção pode se manifestar de três formas comuns: a leishmaniose cutânea (localizada ou disseminada), leishmaniose muco cutânea e a leishmaniose cutânea difusa. Estas podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas diferentes (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007), as quais são determinadas

pelas características do hospedeiro, da espécie da leishmania envolvida e da resposta imune do indivíduo infectado.

A LC localizada pode ocorrer como lesão única ou múltipla Figura [1], na mesma região da picada do vetor ou nos pontos das picadas infectantes. A lesão é geralmente ulcerosa, com tendência à cura espontânea (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

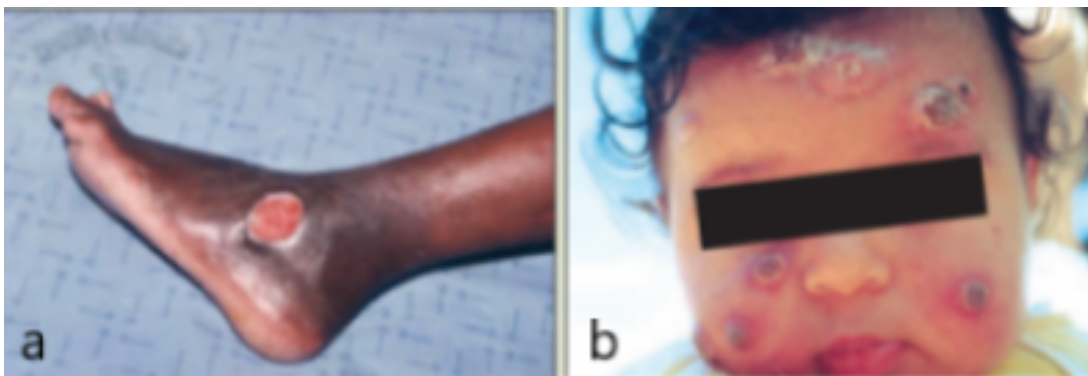


Figura [1] - Fonte: Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006 **a)** Forma cutânea: Lesão única, ulcerada em região maleolar externa. **b)** Lesões exulceradas, múltiplas, base eritematosa infiltrada, recobertas por crostas.

A forma cutânea disseminada ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito. As lesões Figura [1] são numerosas e distantes do local da picada, distribuindo-se por diversas áreas do corpo; em geral, são pequenas e ulceradas, podem ter diversos tamanhos (Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006).

Na Figura [2] mostra a forma cutânea disseminada de LT. A leishmaniose cutânea difusa constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de leishmania. Inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento Figura [3]; evolui de forma lenta, com formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões cutâneas (Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006)

A forma mucosa ou mucocutânea da LT Figura [4] é geralmente causada por disseminação hematogênica dos parasitos para as mucosas nasais, orofaringe,

palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior. É, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele (GONTIJO, 2003)

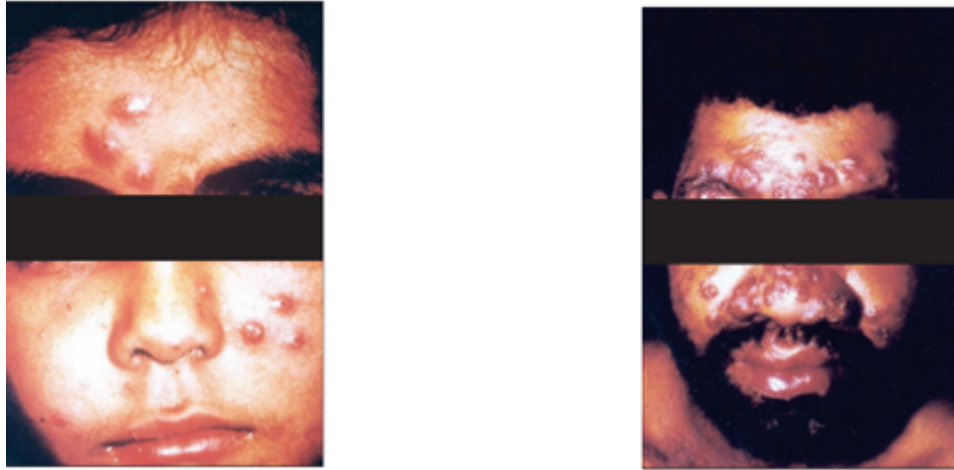


Figura [2]: Fonte: Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006.
Forma cutânea disseminada de LT. Apresentam múltiplas lesões pequenas, pápilotuberosas, exulceradas.

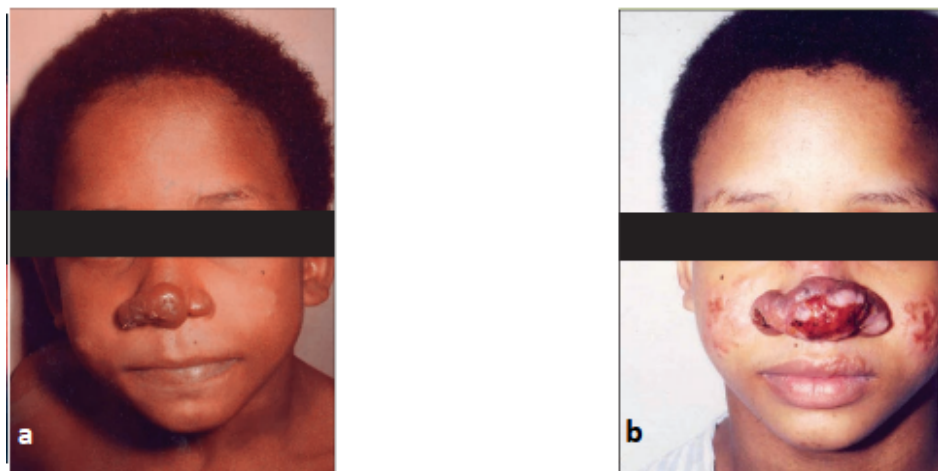


Figura [3]: Fonte: Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006.
Forma cutânea difusa de LT. Em (a) o paciente estava com 6 anos de idade. A lesão se iniciou no primeiro ano de vida dele, apresentando lesão infiltrada na base de pirâmide nasal. Em (b), a mesma lesão após 17 anos de evolução, caracterizando a evolução crônica e a refratariedade a diversos esquemas terapêuticos.

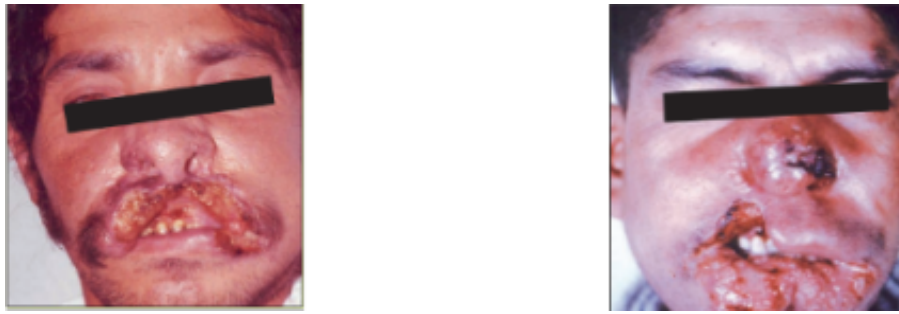


Figura [4]: Fonte: Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006. Forma mucosa de LT. As duas imagens apresentam a forma mucosa tardia, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial

1.4 Agente Etiológico

No Brasil, há diferentes espécies de leishmania que são responsáveis pela LT, as três mais importantes são as *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007). A *Leishmania (Viannia) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo esta última uma consequência de picadas simultâneas de vários flebótomos infectados ou metástases linfáticas secundárias (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). Esses subgêneros, foram organizados em 10 complexos, conforme mostra a Tabela [1].

Leishmania	Complexo <i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>
	Complexo <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
	Complexo <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
	Complexo <i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
	Complexo <i>L. major</i>	<i>L. major</i> <i>L. major</i> ou <i>L. major-like</i>
	Complexo <i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. enrietti</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i>
Viannia	Complexo <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. equatorensis</i> <i>L. peruviana</i>

Complexo <i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>
Complexo <i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i>
Complexo <i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>

Tabela [1] Fonte: NEVES, 2016. Classificação Taxonômica dos complexos de *Leishmania* em seus subgêneros.

Os parasitos se encontram no norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e, estendendo-se pelas Guianas, é encontrada principalmente em florestas de terra firme (GONTIJO, 2003). Foi a primeira espécie de leishmania descrita como agente etiológico da LT (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). Tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental.

A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas em indivíduos com deficiência imunológica inata (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). Os parasitos estão presentes nas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás), provavelmente associada a ciclos enzoóticos de matas residuais (GONTIJO, 2003).

A *Leishmania* pode assumir duas formas distintas, conhecidas como promastigota e amastigota (GRIMALDI JR. et al., 1991; CUPOLILLO et al., 2000). A variante promastigota exibe um corpo alongado e fusiforme, medindo cerca de 16 a 40 µm de comprimento por 1,5 a 3,0 µm de largura. Essa forma também carrega um flagelo, responsável por sua locomoção e ancoragem no epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (PESSOA; MARTINS, 1988). Por outro lado, a variante amastigota da *Leishmania* adota uma forma imóvel e intracelular nos hospedeiros vertebrados. Com dimensões aproximadas de 1,5 a 3,0 µm de largura por 3,0 a 6,5 µm de comprimento, a sua morfologia pode variar entre arredondada e oval (REY, 2001).

1.5 Tratamento

O primeiro agente farmacológico que demonstrou eficácia contra a *Leishmania* foi a Ureastibamina, um composto antimonial. A atividade leishmanicida da Ureastibamina em relação à *Leishmania donovani* foi inicialmente identificada em 1922 por Brahmchari, cientista da Índia. Através do aprimoramento e desenvolvimento dos compostos antimoniais pentavalentes, os efeitos colaterais foram reduzidos, e esses agentes continuam a ser amplamente empregados no tratamento de todas as manifestações da leishmaniose (SOTO *et al*, 2007; SOTO *et al*, 2001).

Contudo, tem sido observada uma resistência a este tipo de fármaco em determinadas regiões do mundo, sobretudo no nordeste da Índia, e tornando-os rapidamente obsoletos (OUELLETTE *et al*, 2004). Apesar de sua eficácia substancial, os antimoniais pentavalentes manifestam certas limitações no que concerne à sua aplicação via intravenosa, tendo em vista a elevada toxicidade, o prolongado período de cicatrização, a frequente ocorrência de efeitos colaterais e o custo elevado associado (BERMAN, 1997).

A pentamidina e a anfotericina B são consideradas opções secundárias de medicamentos. No entanto, o uso desses fármacos é limitado devido à sua toxicidade e custo elevado (OUELLETTE *et al*, 2004). A MT representou o primeiro fármaco oral que demonstrou sucesso no tratamento das formas mucosas e cutâneas da LT. A administração oral é altamente conveniente, uma vez que dispensa a necessidade de internação, resultando em redução dos custos associados e viabilizando a continuidade do tratamento no ambiente domiciliar (SOTO *et al*, 2007; SOTO *et al*, 2001).

1.6 Miltefosina

A simultânea, mas independente, descoberta das atividades antiprotozoário e antineoplásica da MT e de alquilfosfocolinas relacionadas ocorreu no início de 1980

[79]. Apesar da excelente atividade da MT contra os parasitos tripanossomatídeos, foi dada prioridade ao desenvolvimento do fármaco como um tratamento local de metástases cutâneas de câncer de mama levando-se, eventualmente, a aprovação de uma formulação tópica do medicamento (Miltex) (DORLO *et al*, 2012; SMORENBURG *et e.*, 2000)

O nome químico da MT é hexadecil 2-(trimetil azanium) fosfato de etila, também conhecido como hexadecilfosfocolina Figura [5]. Sua fórmula empírica é $C_{21}H_{46}NO_4P$ e o peso molecular igual a 407,57 g/mol. É um composto anfifílico e zwitteriônico devido ao grupo amino quartenário carregado positivamente (carregado permanentemente) e ao grupo fosforil carregado negativamente. O composto cristalino é um pó higroscópico e se dissolve facilmente em solventes aquosos e orgânicos (DORLO *et al*, 2012).

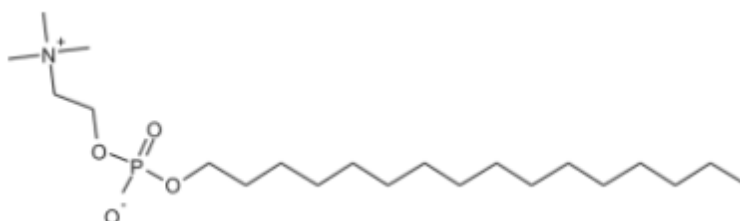


Figura [5] Fonte: Repositório DrugBank® (<https://go.drugbank.com/drugs/DB09031>).
Estrutura molecular da MT.

A dose recomendada de MT como tratamento único para as formas cutânea e visceral da Leishmaniose é de 2,5 mg/kg/dia, administrada ao longo de 28 dias (DORLO *et al*, 2012). Estudos tanto *in vitro* como *in vivo* têm demonstrado a atividade leishmanicida da MT contra as formas promastigotas e amastigotas de diversas espécies de *Leishmania* (SUNDAR *et al*, 2007; CROFT *et al*, 1987; KUHLENCORD *et al*, 1992). Apesar de várias hipóteses terem sido propostas nos últimos anos, o mecanismo exato pelo qual a MT atua contra a Leishmaniose ainda não foi definitivamente identificado.

Nos últimos anos, surgiram várias hipóteses sobre o mecanismo de ação leishmanicida da MT, porém, até o momento, nenhum mecanismo foi definitivamente identificado. A multiplicidade de propostas de possíveis mecanismos e estudos contraditórios pode sugerir que a MT possui mais de um sítio molecular de atuação (DORLO *et al*, 2012). Dentre as possíveis abordagens, foram mencionados danos à

membrana flagelar, inibição da síntese de fosfatidilcolina, interferência com o metabolismo alquilfosfolípido e biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, modulação da homeostase de cálcio, bem como a indução da apoptose (MISHRA e SAXENA, 2007; KEDZIERSKI *et al*, 2009). O acúmulo intracelular do fármaco na leishmania é essencial para todas as ações já mencionadas da MT e acontece em três etapas Figura [6].

i) A MT se liga à membrana plasmática das células. Em condições normais de cultura, ela se une à albumina, que atua como um reservatório para o fármaco. Devido à sua natureza anfifílica, a MT pode formar micelas na água e se ligar às camadas lipídicas das células, mantendo um equilíbrio entre a fração que fica com a albumina e a fração que se liga às membranas celulares. Esse equilíbrio é influenciado pela concentração do fármaco, a quantidade de albumina ou soro presente no meio de cultura e o número de células e membranas plasmáticas presentes.

ii) A internalização do fármaco MT na leishmania ocorre em duas etapas principais. Primeiro, as moléculas de MT presentes na membrana plasmática podem ser endocitadas em vesículas endocíticas, especialmente quando há uma grande quantidade de fármaco na membrana. Segundo, os monômeros de MT podem ser translocados através da membrana com a ajuda de proteínas específicas, chamadas de flipases, que formam um complexo de translocação na membrana plasmática. Esse processo de internalização depende de energia (ATP) e das proteínas transportadoras LdMT e LdRos3 (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, pp 2403-2404, 2003).

Estudos com microscopia eletrônica mostraram que a MT pode romper as membranas das organelas intracelulares, agindo como um detergente em baixas concentrações. O metabolismo da MT no interior das células da leishmania é muito lento ou quase negligenciável, enquanto a capacidade de entrada do fármaco é alta (CROFT e COOMBS *et al.*, 2003).

A MT pode ser eliminada das células dos parasitas por mecanismos como exocitose ou ação de proteínas transportadoras chamadas flipases, que podem

reduzir a concentração do fármaco dentro das células (PÉREZ-VICTORIA et al., pp 2397-2403, 2003) Em resumo, a MT age dentro das células da leishmania, mas ainda não sabemos exatamente onde ela se acumula. Estudos mostram que ela pode romper as membranas das organelas e seu metabolismo dentro da célula é lento. Por outro lado, ela pode ser eliminada das células, mecanismos de exocitose ou proteínas transportadoras. (PÉREZ-VICTORIA et al., pp 2468-2474, 2001)

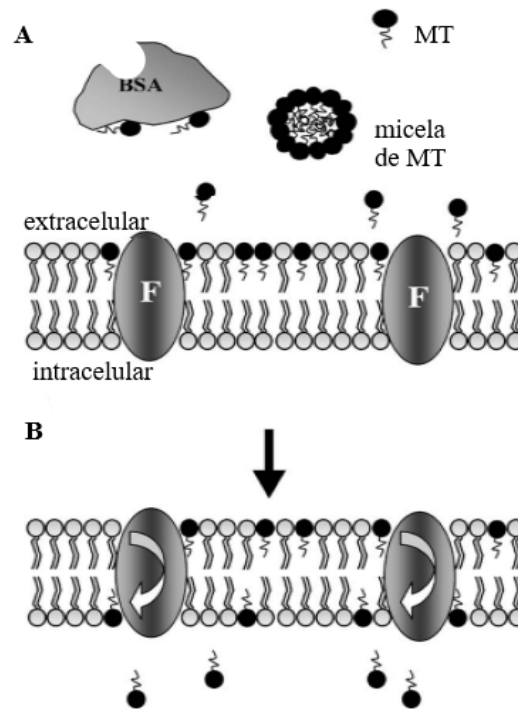


Figura [6]: Fonte: Adaptação de PÉREZ-VICTORIA *et al*, pp 26-39, 2006. Ligação e internalização da MT em parasitos leishmania. Etapas sequenciais na acumulação da MT: A - Ligação da MT no folheto externo da membrana plasmática. MT é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório do fármaco; B - a fração de MT que se liga à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade *flipflop*. Esse maquinário de translocação inclui, no mínimo, duas proteínas da membrana, LdMT e LdRos3.

A MT influencia as membranas celulares inicialmente, afetando sua composição lipídica, permeabilidade e fluidez, bem como o metabolismo de fosfolípidios e a transdução do sinal proliferativo (PALUMBO, pp 2-4, 2008). Devido à sua estrutura química, ela é facilmente incorporada nas membranas biológicas, resistindo à degradação catabólica. A distribuição das moléculas de MT nas bicamadas lipídicas depende da insaturação das cadeias alquil-fosfolipídicas e do teor de colesterol (JIMÉNEZ-LÓPEZ, *et al*, pp 1-10, 2010).

Esse composto interage com a membrana celular e alcança rapidamente outras membranas subcelulares, impactando vários níveis do metabolismo celular (WIEDER, *et al*, pp 249-259, 1999; BERKOVIC, pp 185-193, 2003), incluindo potencialmente o retículo endoplasmático devido à localização das enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (JIMÉNEZ-LÓPEZ, *et al*, pp 1-10, 2010).

As preocupações principais com o uso amplo da MT envolvem seu potencial teratogênico (SINDERMANN e ENGEL, pp 17-20, 2006) e sua longa meia-vida (150-200 h), que pode resultar na persistência de níveis sub-terapêuticos na corrente sanguínea por semanas após o tratamento, possivelmente favorecendo o surgimento de parasitas resistentes (BERMAN, pp. 1381-1388, 2005).

Nos estudos clínicos com MT para tratar leishmaniose, os efeitos colaterais geralmente são leves e suportáveis. Eles incluem desconfortos temporários no estômago, como vômitos e diarreia, além de um aumento temporário nos níveis de certas substâncias no fígado e nos rins (BHATTACHARYA, *et al*, pp 591-598, 2007; SUNDAR *et al*, pp 173-1746, 2002).

O conhecimento mais concreto de como a MT funciona, possibilita a criação de novas formas de tratamento mais eficazes para a leishmaniose.

1.7 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O equipamento de RPE do laboratório de Biofísica e seu diagrama de blocos estão respectivamente nas Figuras [7] e [8]. A espectroscopia de RPE mede a absorção de energia pela amostra, resultante da interação da radiação de micro-ondas com o momento magnético do elétron desemparelhado na presença de um campo magnético. As micro-ondas são geradas por desaceleração de elétron e uma guia de onda as conduz até a cavidade de ressonância onde formam ondas estacionárias. A cavidade tem geometria retangular de dimensões apropriadas para que o campo magnético da onda estacionária seja máximo no centro da cavidade,

onde fica localizada a amostra, enquanto o campo elétrico que é indesejável possui um mínimo no local da amostra.

Durante a medição de RPE, quando a amostra absorve a energia de micro-ondas, ocorre diminuição da intensidade de micro-onda que é refletida da cavidade e que vai para o diodo detector. A detecção se baseia em uma corrente que passa pelo diodo e que na presença da micro-onda é aumentada. O atenuador serve para diminuir a potência de micro-ondas que chega à cavidade. O circulador conduz a micro-onda incidente para a cavidade e a refletida para o detector. Após passarem pelo detector as micro-ondas que sobram são conduzidas pelo circulador a um absorvedor onde são eliminadas para não voltarem para o sistema.

Os sistemas biológicos em geral não possuem sinal de RPE. Os radicais livres em determinadas condições possuem um sinal de RPE. A espectroscopia de RPE aplicada à Biologia em geral faz uso do método de marcadores de *spin*. O marcador de *spin* é uma molécula que tem afinidade pelo sistema biológico de interesse e que foi modificada pela inserção de um fragmento paramagnético, geralmente o radical nitróxido. O nitróxido é um radical livre com boa estabilidade, tendo um tempo de vida suficiente para realizar a medição de RPE. O elétron desemparelhado do radical nitróxido sofre interação com o spin nuclear do nitrogênio vizinho gerando um espectro de RPE muito sensível às modificações no meio molecular, permitindo a obtenção de informações sobre a dinâmica molecular e a polaridade do meio. Um dos marcadores de *spin* mais adequados é o ácido esteárico que traz o nitróxido ligado ao quinto carbono da cadeia metilênica.

Ao ser inserido na membrana biológica é extremamente sensível à fluidez lipídica e à dinâmica de proteínas de membrana. A dinâmica da membrana afeta parâmetros de RPE como o desdobramento hiperfino externo, chamado de $2A//$. Este parâmetro diminui na medida em que a dinâmica molecular é aumentada. Há certos casos em que a distribuição do marcador de *spin* na amostra não é homogênea formando domínios de diferentes estados de mobilidade. Nesses casos é necessário o uso da simulação dos espectros de RPE para analisar as componentes espectrais sobrepostas (MOREIRA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2019).



Figura [7] Fonte: própria autoria. Foto do espectrômetro de RPE do laboratório de biofísica (Instituto de Física – UFG).

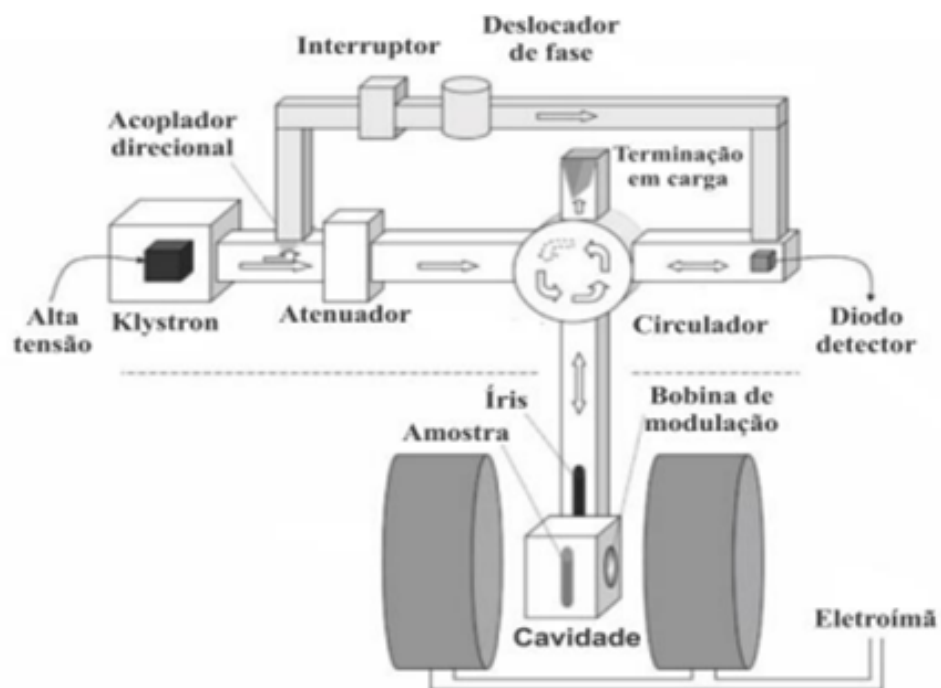


Figura [8] Fonte: HAGEN, W. Biomolecular EPR Spectroscopy (CRC, Boca Raton, FL), 2009. – Diagrama de bloco do espectrômetro de RPE.

A espectroscopia de RPE associada ao método de marcadores de *spin* tem se mostrado a técnica de escolha para o estudo da dinâmica molecular em membranas biológicas. Essa técnica já foi utilizada para investigar as interações de compostos antileishmania, cujos mecanismos de ação não foram elucidados, com a membrana plasmática do parasita.

O parâmetro $2A//$ na espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) desempenha um papel crucial ao fornecer informações detalhadas sobre o desdobramento hiperfino externo. Esse valor é diretamente obtido do espectro. Em termos precisos, o $2A//$ é definido como a diferença, expressa em unidades de campo magnético, entre o pico de ressonância inicial e o último pico invertido no espectro.

Vale ressaltar que tais valores podem indicar uma relação com a rigidez da membrana. Em outras palavras, à medida que a rigidez da membrana aumenta, também ocorre um aumento nos valores do parâmetro $2A//$. Isso ressalta a importância desse parâmetro como um indicador potencial da propriedade estrutural da membrana em questão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

No presente estudo, temos o objetivo de conhecer melhor o mecanismo de ação da atividade leishmanicida da MT. Usando a espectroscopia de RPE de marcador de *spin* demonstrar que após 24 h de tratamento com a MT a membrana plasmática da *Leishmania amazonensis*, apresenta rigidez, denotando que o composto causa estresse oxidativo celular consistente com o desequilíbrio iônico.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar por espectroscopia de RPE do marcador de *spin* os efeitos da MT na membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 24, 48 e 72 h de tratamento;
- Fazer uma análise dos mecanismos de ação da atividade leishmanicida da MT com base nos dados de RPE e comparação com trabalhos anteriores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produtos Químicos

No presente trabalho os reagentes utilizados foram: MT, marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA), L-glutamina, penicilina, estreptomicina e o meios de cultura Grace, todos comprados da SigmaAldrich (St. Louis, EUA). O soro fetal bovino inativado pelo calor foi comprado da Corning Life Sciences (Corning, NY, EUA). Os tampões e meios de cultura preparados com água ultra pura *mili-Q* (uma marca de equipamento que produz água ultra-pura).

3.2 Cultivo das Células Parasitas

Foi estudada a cepa de referência da OMS, L. (L.) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), na forma promastigota, a qual foi cultivada a 26°C em placas de 24 poços contendo 2 mL de meio Grace suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os parasitas foram obtidos do Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.3 Preparação e Marcação das Amostras Para Experimentos de (RPE)

De modo similar ao ensaio antiproliferativo, as promastigotas de L. *amazonensis* foram primeiramente diluídas em meio Grace suplementado com 10% de PBS (tampão fosfato-salino, do inglês: *phosphate buffered saline*) em placas de cultura de 24 poços para uma concentração final de parasita de 5×10^7 /mL e tratados com diferentes concentrações de MT. O volume final de cada amostra foi de 2 mL. Após incubação a 26°C por 24 h, as amostras foram transferidas para tubos *ependorfs* e centrifugadas a $25.000 \times g$ por 10 min para retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e os parasitas foram ressuspensos em PBS. Após nova centrifugação o sobrenadante foi retirado deixando junto com os parasitas precipitados um volume de aproximadamente 50 µL.

Cada amostra contendo 1×10^8 parasitas foi marcada aplicando uma alíquota de $0,25 \mu\text{L}$ de uma solução etanólica contendo o marcador de spin 5-DSA diluído a 2 mg/mL em cada amostra de $50 \mu\text{L}$. Para a medição de RPE, a amostra foi transferida para um tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno. O capilar de vidro foi selado de um dos lados, usando chama, e em seguida foi centrifugado a $25000 \times g$ por 5 min para concentração dos parasitas como mostrado na Figura [9]. A região do capilar contendo os parasitas foi posicionada bem no centro da cavidade de ressonância para realizar as medidas de RPE.

O espectrômetro EMX-Plus da Bruker (Rheinstetten, Alemanha) foi utilizado para registrar os espectros RPE, operando nas seguintes configurações instrumentais: potência de micro-ondas, 10 mW ; frequência de micro-ondas, $9,452 \text{ GHz}$; frequência de modulação, 100 kHz ; amplitude de modulação, $1,0 \text{ G}$; varredura de campo magnético, 100 G ; tempo de varredura, 168 s ; e temperatura da amostra, 25°C .

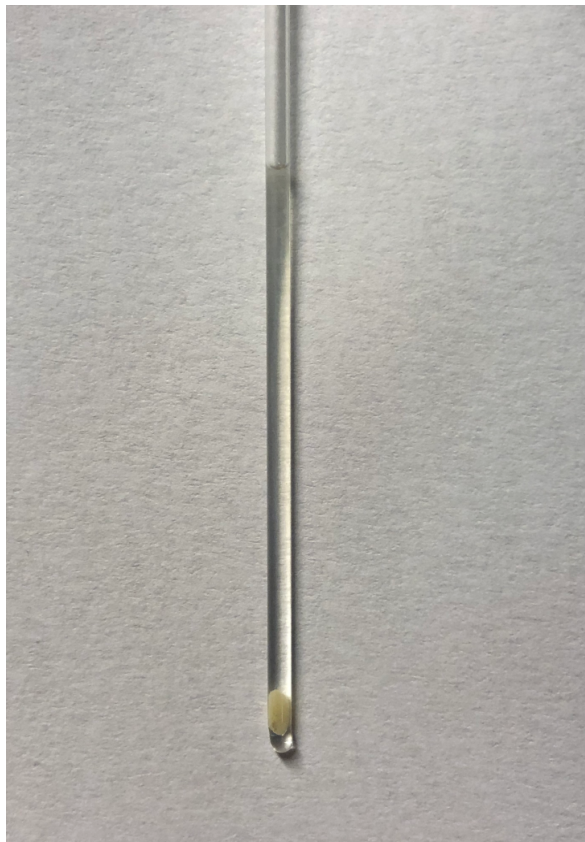


Figura [9]. Fonte: Própria autoria. Imagem do tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno contendo 1×10^8 parasitas empacotados na parte inferior do capilar após sua centrifugação.

4. RESULTADOS

A Figura [10] mostra os espectros de RPE do 5-DSA incorporado na membrana plasmática de *Leishmania amazonensis* promastigotas após tratamento em meio de cultura com a MT a 5, 10, 20 e 40 μM e para períodos de incubação de 24, 48 e 72h. A Figura [11] mostra as variações do $2A//$ para os diferentes tempos de incubação. A concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50}) tem sido reportada como sendo de aproximadamente 10 μM para a miltefosina (FERNANDES, *et al*, 2017; ALONSO, *et al*, 2019). Portanto, pode-se verificar que a técnica de RPE detectou uma alteração na membrana plasmática para tratamentos com 5 μM de miltefosina, ou seja, metade do valor de IC_{50} .

Os valores do parâmetro $2A//$ aumentaram dos valores de controle de 53 G para valores de até 60 G para tratamento de 48 em concentrações mais altas de 20 e 40 μM . Este aumento de 7 G no parâmetro indica um aumento drástico na rigidez de membrana, o que deve corresponder a uma intensa oxidação de proteínas de membrana e peroxidação lipídica. Na Figura [11] pode ser visualizado que para os tratamentos de 48 e 72h o processo oxidativo da membrana foi mais intenso do que para o tratamento de 24 h.

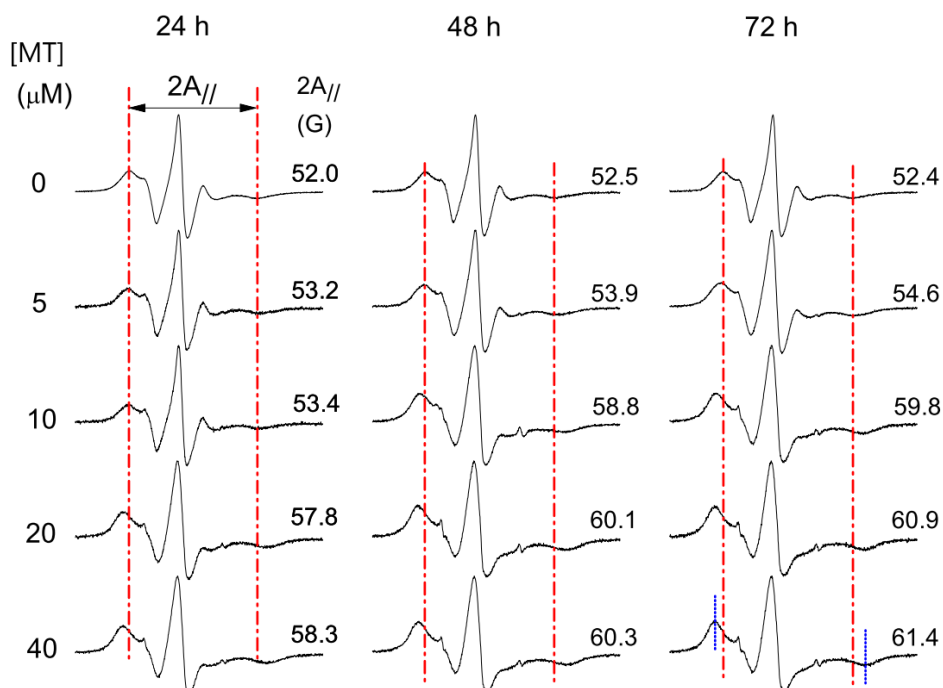


Figura [10]. Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática do parasita da *leishmania amazonensis* promastigotas após tratamentos de 24, 48 e 72 h com diferentes concentrações de miltefosina. A varredura de campo magnético em cada espectro (eixo X) é de 100 G, e a intensidade do espectro (eixo Y) está em unidade arbitrária.

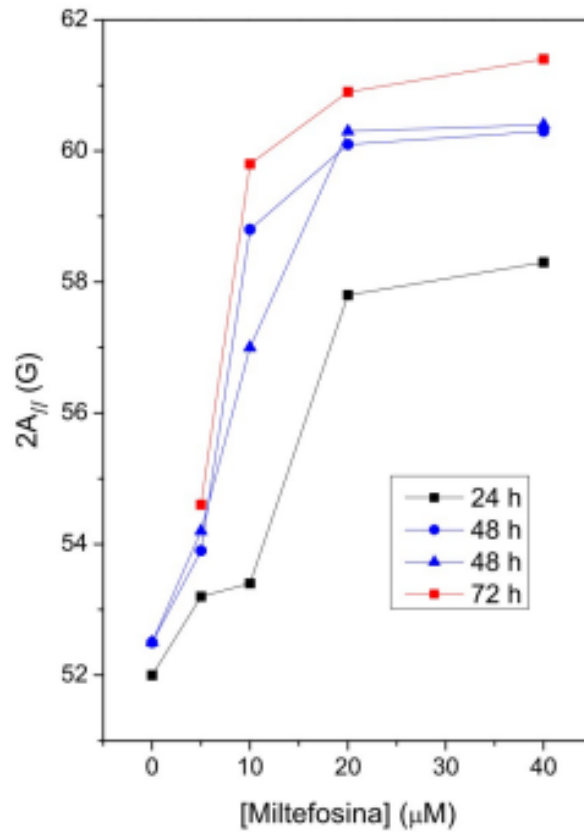


Figura [11]. Variação do parâmetro de RPE 2A// do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática do parasita da *Leishmania* para amostras tratadas com diferentes concentrações de MT e diferentes períodos de tratamento

5. DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que o fármaco antiparasitário ivermectina causa rigidez de membrana em *L. amazonensis* (ALONSO *et al*, 2022). Este resultado reforça o entendimento de que compostos que alteram o transporte iônico podem gerar um estresse oxidativo na célula que resulta na oxidação da membrana do parasita. É bem conhecido que a ivermectina ativa os canais de cloreto controlados por glutamato no parasita, dando origem a um influxo de íons cloreto e consequente hiperpolarização da membrana plasmática (KANE *et al.*,2000; PRIEL e SILBERBRG, 2004). Essa redução no potencial de repouso do parasita deve levar a uma alteração do potencial de membrana mitocondrial, que por sua vez pode desencadear diversos outros eventos, como a produção de ânion superóxido a partir do vazamento de elétrons da membrana mitocondrial.

É bem conhecido que o aumento na produção de ânion superóxido mitocondrial dá origem a outras espécies reativas do oxigênio molecular (ROS) e produtos de lipoperoxidação, resultantes da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados ω -6 (PUFAs) tais como ácido linoleico, γ -linolênico e araquidônico (FRUHWIRTH, LOIDL e HERMETTER, pp. 718 – 736, 2007; JOVANOVIC *et al*, pp 433-440, 2019). Vários aldeídos reativos são formados como produtos da peroxidação lipídica, sendo o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) um dos alquenos lipídicos mais bioativos e bem estudados (JOVANOVIC *et al*, pp 433-440, 2019; ZHONG, YIN pp. 9-193, 2015). O 4-HNE modifica covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE) para formar diferentes subprodutos 4-HNE-PE, sendo responsável por aumentar a permeabilidade dos íons sódio na membrana (JOVANOVIC *et al*, pp 433-440, 2019). O 4-HNE é um composto anfifílico, que tende a se concentrar em biomembranas, onde pode reagir não apenas com PE, mas também com proteínas de membrana, como transportadores, canais iônicos e receptores (POLI, *et al*, pp.569-631, 2008). Alterações conformacionais de proteínas mediadas por HNE são geralmente atribuídas à sua capacidade de modificar moléculas por ligação covalente a resíduos de proteína Cys, Lys e His (POLI, *et al*, pp.569-631, 2008; JOVANOVIC *et al*, pp 1067-1076, 2015). Recentemente, foi demonstrado que o 4-HNE puro tem a

capacidade de causar rigidez da membrana plasmática em promastigotas de *L. amazonensis*, produzindo aumentos no parâmetro de EPR 2A// muito semelhantes aos encontrados neste trabalho (ALONSO, *et al*, 2021).

Grupos de pesquisa da UFG estudaram a atividade citotóxica de um derivado sintético de chalcona, denotado por LQFM064 (3), contra uma linha celular de câncer de mama humano. A atividade antitumoral deste composto foi associada à produção excessiva de ROS e redução do potencial de membrana mitocondrial (CABRAL, *et al.*, 2017). Esse derivado de chalcona também causou rigidez de membrana em promastigotas de *L. amazonensis* e os espectros de EPR foram semelhantes aos encontrados neste trabalho (ALONSO, *et al*, 2020). Além disso, foi mostrado que a rigidez de membrana é também observada em *L. amazonensis* após tratamento com 500 µM de H₂O₂ por 24h em meio de cultura contendo azida de sódio, um inibidor da catalase (ALONSO, *et al*, 2020). Em trabalhos anteriores têm sido demonstrado que a incubação de eritrócitos com peróxido de hidrogênio por 3 h em um tampão fosfato contendo azida de sódio pode induzir a formação de ligações cruzadas de hemoglobina com proteínas do esqueleto do eritrócito, o que tem sido associado a uma mudança progressiva na forma da célula para a morfologia dos equinócitos, diminuição da deformabilidade da hemácia e aumento da rigidez da membrana (MENDANHA, *et al.*, 473-481, 2012 ; SNYDER *et al.*, pp 1971-1977, 1985).

A rigidez da membrana detectada pela espectroscopia EPR de marcador de spin tem sido associada à produção excessiva de ROS e redução no potencial de membrana mitocondrial em vários estudos. Por exemplo, compostos como os derivados de β-carbolina (ALONSO, *et al*, 2021) de isoxazol (ALONSO, *et al*, 2022), ivermectina e curcumina (ALONSO, *et al*, 2022) têm mostrado atividade contra *L. amazonensis*, enquanto o sesquiterpeno (-)-elatol mostrou atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (GUIMARÃES, *et al*, pp 455-465; 2007), sendo que todos esses compostos também causam aumento na produção de ROS, despolarização do potencial da membrana mitocondrial, aumento da produção de ânion superóxido mitocondrial e rigidez da membrana plasmática.

Em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a MT pode causar drásticas mudanças na membrana plasmática do parasita da *L. amazonensis*, aumentando não só a dinâmica dos lipídios, mas também das proteínas de membrana, e também causar a lise do parasita (MOREIRA, et al, 2014).

7. CONCLUSÃO

A espectroscopia de RPE de marcadores de *spin* demonstrou que a MT causa rigidez de membrana em promastigotas de *L. amazonensis* após tratamentos de 24, 48 e 72 h. Os espectros de RPE indicando rigidez de membrana do parasita foram similares aos de outros estudos onde a lipoperoxidação e oxidação de proteína na membrana foram bem caracterizadas.

Trabalhos anteriores mostram que a MT também causa alteração no potencial de membrana mitocondrial assim como diversos compostos que também causam rigidez de membrana do parasita de *Leishmania*. Como tem sido reportado que a MT tem forte ação na membrana do parasita logo após o tratamento (períodos de incubação menores de 2 h), os resultados do presente trabalho sugerem que a ação primária da MT ocorre na membrana plasmática, com provável alteração no equilíbrio iônico, a exemplo da ivermectina que conhecidamente hiperpolariza a membrana do parasita, e foi reportado que ela também causa rigidez de membrana.

O desequilíbrio iônico poderia ser causado pela MT por duas maneiras prováveis: a primeira hipótese se baseia no fato que a MT aumenta a dinâmica de proteína como foi reportado, sendo possível que ela mude a conformação de canais iônicos, afetando o potencial de membrana, e uma outra possibilidade se baseia no fato que a MT tem uma cabeça polar zwitteriônica com forte afinidade por proteína e uma cadeia graxa com afinidade pelo componente lipídico da membrana, assim, ela poderia se concentrar na interface lipídio-proteína da membrana, criando defeitos ou poros que poderiam causar o vazamento de íons.

8. PERSPECTIVAS

O presente estudo representou um marco significativo na busca por compreender melhor os aspectos intrincados da membrana em promastigotas de *L. amazonensis* interagindo com a MT. Os resultados obtidos até agora são promissores e representam o primeiro passo de um projeto mais amplo e ambicioso, empregando metodologias precisas e sensíveis para realizar medições *in vitro* nas células parasitárias, futuramente focando também na fase amastigota de *L. amazonensis*. Sabe-se que essa fase do ciclo de vida do parasita desencadeia diversas adaptações celulares que são cruciais para a sua sobrevivência e patogenicidade.

Os resultados alcançados até agora são animadores. Este trabalho é apenas o início de futuras pesquisas expandindo essa metodologia para investigações mais abrangentes, considerando fatores como estresse oxidativo, rigidez da membrana e interações moleculares.

REFERÊNCIAS

ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1323, n. 1, p. 75-84, 1997.

ALONSO, L. et al. Analysis of the Interactions of Amphotericin B with the Leishmania Plasma Membrane Using EPR Spectroscopy. **J. Phys. Chem. B.**, v. 124, n. 45, p. 10157-10165, 2020.

ALONSO, L. et al. Analysis of the interactions of amphotericin B with the Leishmania plasma membrane using EPR spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 45, p. 10157-10165, 2020.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of 3, 4, 5-trisubstituted isoxazoles by interaction with *Leishmania amazonensis*. **Jornal de Estrutura Molecular**, v. 131604, 2022.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 151, p. 105407, 2020.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 183, p. 110421, 2019.

ALONSO, L. et al. Comparative EPR spectroscopy analysis of amphotericin B and miltefosine interactions with *Leishmania*, erythrocyte and macrophage membranes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 163, p. 105859, 2021.

ALONSO, L. et al. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1861, p. 1049-1056, 2019.

ALONSO, L. et al. Interaction of Miltefosine with Intercellular Membranes of Stratum Corneum and Biomimetic Lipid Vesicles. **Int. J. Pharm.**, v. 434, n. 1-2, p. 391-398, 2012.

ALONSO, L. et al. Ivermectin and curcumin cause plasma membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* due to oxidative stress. **Biochim Biophys. Acta Biomembr.**, v. 1864, n. 9, p. 183977, 2022.

ALONSO, L. et al. Plasma membrane rigidity effects of 4-hydroxy-2-nonenal in Leishmania, erythrocyte and macrophage. **Toxicol. In Vitro**, v. 79, p. 105294, 2021.

ALONSO, Lais et al. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105407, 2020.

ALONSO, Lais et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, p. 110421, 2019.

ALONSO, Lais et al. Comparative EPR spectroscopy analysis of amphotericin B and miltefosine interactions with Leishmania, erythrocyte and macrophage membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 163, p. 105859, 2021.

ALONSO, Lais et al. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1861, n. 6, p. 1049-1056, 2019.

ALONSO, Lais et al. Membrane dynamics in Leishmania amazonensis and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1863, n. 1, 2021.

AZULAY, R. D. Dermatologia. 3. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.

BERKOVIC, D.; WERNICKE, J. H.; FLEER, E. a M. Effects of Etherlipid Analogs on Cell Membrane Functions. **J. Exp. Ther. Oncol.**, vol. 3, n. 4, p. 185-193, 2003.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clin. Infect. Dis.**, vol. 24, no. 4, pp. 684–703, 1997.

BERMAN, J. Miltefosine to Treat Leishmaniasis. Expert Opin. **Pharmacother.**, v. 6, n. 8, p. 1381-1388, 2005.

BERMAN, J. Miltefosine to Treat Leishmaniasis. Expert Opin. **Pharmacother.**, vol. 6, no. 8, pp. 1381–1388, 2005.

BHATTACHARYA, S. K.; SINHA, P. K.; SUNDAR, S. et al. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 591-598, 2007.

CABRAL, B. L. S. et al. A novel chalcone derivative, LQFM064, induces breast cancer cells death via p53, p21, KIT and PDGFRA. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 1-15, 2017.

CAMARGOS, H. S. et al. Terpenes increase the lipid dynamics in the Leishmania plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.

CAMARGOS, H. S. et al. Terpenes increase the lipid dynamics in the Leishmania plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS One**, v. 9, n. 8, e104429, 2014.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 157, n. 1, p. 1-11, 2009.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother.** pp. 1251-1265, 2019.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat Rev Microbiol.* **Nature reviews. Microbiology**, vol. 5, n. 11, pp. 82-873, 2007.

CHOWDHURY, S. et al. Disuccinyl betulin triggers metacaspase-dependent endonuclease G-mediated cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 58, p. 2186-2201, 2014.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 13, n. 3, e0007152, 2019.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

DESOTI, V. C. et al. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Frontiers in Microbiology.** Mar. Drugs, v. 10, n. 8, p. 1631-1646, 2012.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

FERNANDES, K. S. et al. The cytotoxic activity of miltefosine against Leishmania and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1859, n. 1, p. 1-9, 2017.

FIGARELLA, K. et al. Prostaglandin-induced programmed cell death in Trypanosoma brucei involves oxidative stress. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 1802-1814, 2006.

FRUHWIRTH, G. O.; LOIDL, A.; HERMETTER, A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1772, n. 7, p. 718-736, 2007.

FRUHWIRTH, G. O.; LOIDL, A.; HERMETTER, A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1772, n. 7, p. 718-736, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

JAEGER, T.; FLOHÉ, L. The thiol-based redox networks of pathogens: Unexploited targets in the search for new drugs. **Biofactors**, v. 27, p. 109-120, 2006.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. et al. Alterations in the Homeostasis of Phospholipids and Cholesterol by Antitumor Alkylphospholipids. **Lipids Health Dis.**, v. 9, n. 33, p. 1-10, 2010.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. et al. Alterations in the Homeostasis of Phospholipids and Cholesterol by Antitumor Alkylphospholipids. **Lipids Health Dis.**, vol. 9, no. 33, pp. 1-10, 2010.

JOVANOVIĆ, O. et al. Covalent modification of phosphatidylethanolamine by 4-hydroxy-2-nonenal increases sodium permeability across phospholipid bilayer membranes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 143, p. 433-440, 2019.

JOVANOVIĆ, O. et al. The molecular mechanism behind reactive aldehyde action on transmembrane translocations of proton and potassium ions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 89, p. 1067-1076, 2015.

JUNIOR, I. A. S. S. Avaliação da Metaciclologênese in Vitro de Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) amazonensis. Dissertação (Mestrado em Medicina

Tropical e Saúde Pública) - **Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública**, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

JUNIOR, I. A. S. S. Avaliação da Metaciclogênese in Vitro de Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) amazonensis. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - **Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública**, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

KANE, N. S. et al. Drug-resistant Drosophila indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 97, n. 25, p. 13949-13954, 2000.

KATHURIA, M. et al. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Leishmania donovani by orally active clerodane diterpene. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, p. 5916-5928, 2014.

MENDANHA, S. A. et al. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 6, p. 473-481, 2012.

MOREIRA, R. A. et al. Interaction of Miltefosine with the Lipid and Protein Components of the Erythrocyte Membrane. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, p. 1661-1669, 2013.

MOREIRA, R. A. et al. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in Leishmania amazonensis membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, p. 3021-3028, 2014.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Tolerance to Drug-induced Cell Death Favours the Acquisition of Multidrug Resistance in Leishmania. **Cell Death Dis.**, v. 2, n. 9, p. e201, 2011.

MURRAY, H. W. et al. Interleukin-12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 5, p. 1497–1502, 2000.

MURRAY, H. W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J. P. Interleukin12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 5, p. 1497-1502, 2000.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 13a edição. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 2016.

OLLIARO, P. L. et al. Treatment Options for Visceral Leishmaniasis: a Systematic Review of Clinical Studies Done in India, 1980-2004. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, n. 12, p. 763-774, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, **Resistance and New Developments. Drug Resist. Updat.**, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

PALUMBO, E. Oral Miltefosine Treatment in Children with Visceral Leishmaniasis: a Brief Review. **Braz. J. Infect. Dis.**, vol. 12, n. 1, p. 2-4, 2008.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of Experimental Resistance of Leishmania to Miltefosine: Implications for Clinical Use. **Drug Resist. Updat.**, vol. 9, n. 1-2, p. 26-39, 2006.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Leishmania donovani Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol. 47, n. 8, p. 2397-2403, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, J. M. et al. Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant Leishmania tropica and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 9, p. 2468-2474, 2001.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. Leishmanioses tegumentares. In: Parasitologia Médica. 11. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 78-87. 1988.

POLI, G. et al. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Med. Res. Rev.**, v. 28, p. 569-631, 2008.

PRIEL, A.; SILBERBERG, S. D. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 123, n. 3, p. 281-293, 2004.

REY, L. - Bases da Parasitologia Médica, 3ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, ROSS, Ronald. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British medical journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261, 1903. 2011.

RODRIGUES, J. C. F. et al. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against Leishmania amazonensis: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 4098-4114, 2008.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico Clínico e Diferencial. 1ª edição. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2007.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of Miltefosine as an Oral Treatment for Leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. Suppl. 1, p. S17-S20, 2006.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of Miltefosine as an Oral Treatment for Leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. Suppl. 1, p. S17–S20, 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SMORENBURG, C. H. et al. Phase II Study of Miltefosine 6 % Solution as Topical Treatment of Skin Metastases in Breast Cancer Patients. **Epub**, vol.11, no. 10, pp. 825–828, 2000.

SNYDER, L. M. et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 1971-1977, 1985.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1266-1272, 2004.

SOTO, J. et al. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 5, p. E57-E61, 2001.

SOTO, J. et al. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 350-356, 2007.

SUNDAR, S. et al. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, n. 4, p. 1104-1107, 2000.

SUNDAR, S. et al. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. **N Engl J Med**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the Treatment of Leishmaniasis: Clinical Evidence for Informed Clinical Risk Management. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

VAN BLITTERSWIJK, W. J.; VERHEIJ, M. Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 21, p. 2061-2074, 2008.

WIEDER, T. et al. Mechanisms of Action of Phospholipid Analogs as Anticancer Compounds. **Prog. Lipid Res.**, v. 38, n. 3, p. 249-259, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis fact sheet no. 375. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland. [Acesso: 09 de Agosto de 2023]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (HNE) in cancer: focusing on mitochondria. **Redox Biol.**, v. 4, 2015.

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (HNE) in cancer: focusing on mitochondria. **Redox Biol.**, v. 4, p. 193-199, 2015.