

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO PARASITÁRIAS

Stephane França Ribeiro

**Estudo da atividade antileishmanial e do modo de ação de um derivado de
quinolina-aminotiazol em *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral
americana.**

JUIZ DE FORA, MG

2026

Stephane França Ribeiro

Estudo da atividade antileishmanial e do modo de ação de um derivado de quinolina-aminotiazol em *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral americana.

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Dra. Elaine Soares Coimbra

Co-Orientadora: Dra. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

JUIZ DE FORA, MG

2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

França Ribeiro, Stephane.

Estudo da atividade antileishmanial e do modo de ação de um derivado de quinolina-aminotiazol em *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral americana. / Stephane França Ribeiro. -- 2026.

126 p.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elaine Soares Coimbra

Coorientadora: Dr^a Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Quinolinas. 4. Aminotiofenol. I. Soares Coimbra, Prof^a Dr^a Elaine, orient. II. Maria Ribeiro Antinarelli, Dr^a Luciana, coorient. III. Título.

Stephane França Ribeiro

Estudo da atividade antileishmanial e do modo de ação de um derivado de quinolina-aminotiofenol em *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral americana

Dissertação apresentada ao Programa da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Imunologia & DIP

Aprovada em 06 de maio de 2026

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Adolfo Firmino da Silva Neto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a. Camila Simões de Freitas

Universidade Federal de Minas Gerais

Juiz de Fora, 13/07/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Soares Coimbra, Professor(a)**, em 14/07/2026, às 09:18, 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 **Luciana Antinarelli, Servidor(a)**, em 14/07/2026, às 10:43, 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 **Camila Simões de Freitas, Usuário Externo**, em 14/07/2026, às 12:40, 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 **Adolfo Firmino da Silva Neto, Professor(a)**, em 15/07/2026, às 12:12, 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 Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3082791** e o código CRC **1B2279B9**.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade amiga, por ter me amparado nos momentos difíceis e pela força durante essa caminhada de crescimento pessoal e profissional.

À minha mãe Sylvia, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas com palavras de ânimo e com muito amor.

À toda minha família e meu amor Saulo que sempre me incentivaram e proporcionaram momentos de afeto durante esse percurso.

À minha orientadora Dra. Elaine Soares Coimbra, que me acolheu no laboratório de parasitologia NUPEP/UFJF, compartilhando ensinamentos, vivência acadêmica e profissional, sendo fundamental para que eu chegasse até aqui.

À minha co-orientadora Dra. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, por todo conhecimento compartilhado e auxílio nos experimentos, além da amizade que tornaram os dias de muito trabalho mais leves, me faltam palavras que possam transmitir minha gratidão.

Ao Professor Dr. Adolfo Firmino da Silva Neto, pelos conhecimentos compartilhados na área de bioterismo, que ampliou minha vivência como médica veterinária na área da pesquisa.

À todos os colegas, alunos, professores e servidores que atuaram no NUPEP durante esse período, por transformarem minha experiência em um laboratório de pesquisa, compartilhando conhecimentos, histórias e muitas alegrias, tornando esse percurso mais humano e acolhedor.

Registro meu respeito aos camundongos utilizados de forma ética neste trabalho, cuja contribuição foi fundamental e indispensável nesta pesquisa.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, minha segunda casa durante a graduação em medicina veterinária e como pós-graduanda.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCBIO/UFJF).

Às Instituições de apoio à pesquisa, FAPEMIG, CAPES, CNPq.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, sendo a *L. infantum* amplamente distribuída globalmente e responsável pela transmissão zoonótica nas Américas, tendo o cão doméstico como principal reservatório no ambiente urbano. Além de ser incluída dentro das denominadas “Doenças Tropicais Negligenciadas” pela Organização Mundial de Saúde, a LV se torna uma questão de saúde única, por interligar a saúde humana, animal e ambiental. As terapias atuais para LV permanecem limitadas por regimes de tratamento prolongado, administração parenteral e efeitos tóxicos significativos, além de falha terapêutica, resistência medicamentosa e recidivas, o que ressalta a necessidade de pesquisas sobre novas alternativas terapêuticas para humanos e cães. Assim, este trabalho visou investigar a atividade e seletividade de um novo análogo de quinolina contendo 2-aminotiofenol, denominado **TQCL**, em *L. infantum*, bem como fornecer informações sobre seu modo de ação. Após tratamento com **TQCL** por 72 horas, a atividade em promastigotas e análise de toxicidade em células de mamíferos foram analisadas pela técnica do MTT, enquanto que em amastigotas intracelulares foi avaliada a carga parasitária dos macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* após coloração por Giemsa. Para estudos de modo de ação em promastigotas tratados foram utilizadas sondas fluorescentes específicas e abordagem utilizando microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Os resultados mostraram que **TQCL** apresenta potente atividade antileishmanial em promastigotas e amastigotas intracelulares, com valores de CI_{50} abaixo de 10 μ M e índice de seletividade superior a 10 μ M. Nos promastigotas, **TQCL** induziu alterações morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas pronunciadas, tendo a disfunção mitocondrial como evento central e alterações subsequentes compatíveis de morte por apoptose, paraptose e necrose. O tratamento dos macrófagos infectados induziu aumento na produção de NO, sugerindo potencial estímulo da atividade microbicida dos macrófagos. Em conjunto, os resultados indicam que o **TQCL** inibe o crescimento de *L. infantum* por meio de múltiplos mecanismos, revelando uma estratégia crucial de desregulação coordenada de processos celulares vitais no modelo *in vitro*, abrindo perspectivas para a avaliação na LV experimental.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, quinolinas, aminotiofenol.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the *Leishmania donovani* complex, with *L. infantum* being widely distributed worldwide and responsible for zoonotic transmission in the Americas, where the domestic dog acts as the main reservoir in urban environments. Additionally, it is classified among the so-called “Neglected Tropical Diseases” by the World Health Organization. VL represents a One Health issue, as it interconnects human, animal, and environmental health. Current therapies for VL remain limited due to prolonged treatment regimens, parenteral administration, and significant toxic effects, as well as therapeutic failure, drug resistance, and relapses, highlighting the need for research into new therapeutic alternatives for both humans and dogs. Thus, this study aimed to investigate the activity and selectivity of a novel quinoline analog containing 2-aminothiophenol, named **TQCL**, against *L. infantum*, as well as to provide insights into its mechanism of action. After 72 hours of treatment with **TQCL**, activity in promastigotes and toxicity in mammalian cells were assessed using the MTT assay, while intracellular amastigotes were evaluated by counting the parasite load in *L. infantum* infected peritoneal macrophages following Giemsa staining. For mechanistic studies in treated promastigotes, specific fluorescent probes and transmission and scanning electron microscopy approaches were employed. **TQCL** exhibited potent antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes, with CI_{50} values below 10 μ M and a selectivity index greater than 10 in promastigotes, **TQCL** induced pronounced morphological, ultrastructural, and biochemical alterations, with mitochondrial dysfunction as a central event, followed by changes consistent with apoptosis, paraptosis, and necrosis-like cell death. Treatment of infected macrophages induced an increase in NO production, suggesting a potential stimulation of the microbicidal activity of macrophages. Taken together, the results indicate that **TQCL** inhibits the growth of *L. infantum* through multiple mechanisms, revealing a crucial strategy of coordinated dysregulation of vital cellular processes in the *in vitro* model, and opening perspectives for its evaluation in experimental visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, quinolines, aminothiophenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Apresentação clínica das leishmanioses. (a) Forma visceral (b) cutânea (c) difusa (d) mucocutânea (e) disseminada. Fonte: Ministério da Saúde, 2017; SANTOS 2013; SILVEIRA, 2016; SOARES, 2024b. (Adaptado)..... 16

Figura 2: Paciente com leishmaniose dérmica pós-calazar. (a) Indivíduo apresentando lesões nodulares na testa, nariz, bochechas e queixo, causando desfiguração facial e múltiplas máculas hipopigmentadas no tronco e membro superior (b). Fonte: PATHANIA, 2021..... 17

Figura 3: (A) Formas promastigotas. (B) Formas amastigotas de *L. infantum*. Setas = Formas amastigotas dentro do macrófago. Aumento de 1000x. Fonte: Núcleo de Pesquisas em Parasitologia-NUPEP/UFJF..... 19

Figura 4: Indivíduo com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia e atrofia muscular. Fonte: Crump, A. TDR, WHO/Science Photo Library. Manual MSD, acesso em 23 jan. 2026..... 22

Figura 5: Principais tipos de lesões dérmicas e alteração ungueal observadas na leishmaniose canina. Dermatite ulcerativa (a), dermatite esfoliativa (b), dermatite papular (c) e onicogribose (d). Fonte: SARIDOMICHELAKIS, 2025. Adaptado..... 24

Figura 6 - Estrutura química do TQCL..... 27

Figura 7: Desenho experimental. As etapas iniciais do trabalho incluem avaliação da atividade do composto TQCL em promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, além da avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos e cálculo do índice de seletividade (IS). Em seguida, realizou-se os seguintes estudos de modo de ação em promastigotas de *L. infantum* tratados com o composto: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), formação de radicais superóxido e corpúsculos lipídicos, integridade da membrana plasmática, externalização de fosfatidilserina, avaliação do ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos. Também foi avaliado o efeito do TQCL na produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados. Para fornecer uma visão integrada da ação do composto, foram realizadas análises em gráfico no modelo “Spider plot” e gráfico de calor. Também foram realizadas análises ultraestruturais de promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura (MEV e MET). Fonte: O próprio autor..... 29

Figura 8: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*. Foi realizada a infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por 24 horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa para posterior leitura em microscópio óptico. A avaliação da atividade antileishmanial foi realizada através de três experimentos em duplicata, pela contagem de amastigotas de macrófagos infectados e não infectados, respeitando um total de 200 macrófagos para cada lamínula. O resultado foi expresso em % de inibição da carga global em relação ao controle

não-tratado (Controle). As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***). 44

Figura 9: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*. A infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* foi realizada na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por 24 horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa para posterior leitura em microscópio óptico. A avaliação da atividade antileishmanial foi realizada em três experimentos em duplicata, pela contagem do número de amastigotas, de macrófagos infectados e não infectados, respeitando um total de 200 macrófagos para cada lamínula. O resultado foi expresso em (%) de células infectadas em relação ao controle não-tratado (Controle). As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***). 45

Figura 10: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*. Foi realizada a infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por quatro horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa com leitura em microscópio óptico. As concentrações utilizadas foram de 50 μM (A), 25 μM (B), 12,5 μM (C), 6,25 μM (D) e 3,12 μM (E), além do controle sem tratamento (F). As setas indicam formas amastigotas de *L. infantum* no interior de macrófagos. Imagens analisadas e fotografadas através da técnica de Microscopia Óptica observadas em objetiva de 100x. Fonte: O próprio autor. 46

Figura 11: Alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) em promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL. Os parasitos não tratados (controle negativo) ou tratados com composto TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) foram marcados com corante fluorescente JC-1 após 24h de tratamento. FCCP foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos pela razão da fluorescência vermelha/verde. (***) indicam diferença estatística significativa em comparação ao grupo controle ($P < 0,001$). 48

Figura 12: Produção de ROS em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas não tratados (controle negativo) ou tratados com o composto TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) foram marcados com H2DCFDA após 24 h de tratamento. Miltefosina 6,47 μM foi utilizado como controle positivo. A intensidade da fluorescência foi medida por fluorimetria e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (u.a.) dos resultados de três experimentos independentes. (***) indica diferença estatística significativa em comparação ao grupo controle ($P < 0,0001$, respectivamente). 49

Figura 13: Produção de radicais superóxido em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas não tratados (controle negativo) ou tratados com o composto TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) foram marcados com MitoSOX após 24 h de tratamento. A miltefosina foi utilizada como controle positivo. Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com TQCL (6,29 μM e 12,58 μM) por 24 horas a 25 °C. Os parasitos foram então marcados com MitoSOX e a intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro a 540/600 nm de excitação/emissão. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,01$ (*) e $P < 0,0001$ (***). 50

Figura 14: Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas de *Leishmania infantum* foram incubados com o composto TQCL por 24 h e após foram marcados com o corante fluorescente Nile Red, e a intensidade da fluorescência foi avaliada usando um fluorímetro de microplacas. Miltefosina foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 usando análise de variância (One way ANOVA) e as diferenças estatísticas analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**). 51

Figura 15: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Após o tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com 6,29 ou 12,56 μM do composto TQCL por 24h, os parasitos foram marcados com iodeto de propídio (PI) e a intensidade de fluorescência foi avaliada usando um fluorímetro de microplacas. Como controle positivo foi realizado o aquecimento dos promastigotas por 10 minutos a 65°C . $P < 0,0001$ (***), diferença estatisticamente significativa em comparação com parasitos não tratados. 52

Figura 16: Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com TQCL. A formação de vacúolos de autofagia em promastigotas tratados com TQCL foi avaliada por fluorimetria após 24 h de incubação com o composto a 6,29 e 12,58 μM . Promastigotas incubadas com PBS por 24 horas foram utilizados como controle positivo. Os dados foram expressos como as médias de três experimentos independentes, que foram realizados em triplicata. (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo ($P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente). 53

Figura 17: TQCL induz a exposição de fosfatidilserina na membrana celular de promastigotas de *L. infantum*. Os parasitos foram tratados com CI_{50} e $2 \times \text{CI}_{50}$ de TQCL por 24h. A exposição de fosfatidilserina foi avaliada por dupla coloração com as sondas fluorescentes anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). As células foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo BD FACSCanto II, com gráficos de dispersão representativos de três experimentos independentes. (**) e (***) indicam diferenças significativas em comparação com o grupo controle não tratado ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). 54

Figura 18: Análise das alterações do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL. Histograma mostrando a análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo após tratamento com TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) por 24 h. Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*), (**) e (***) representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado ($P < 0,1$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). 55

Figura 19: Avaliação dos níveis de NO produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum*. Macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. infantum* foram incubados em diferentes concentrações do composto (3,12 μM - 50 μM) durante 48h. Os níveis de nitrito foram quantificados utilizando sobrenadante da cultura de macrófagos infectados pela metodologia de Griess. Macrófagos infectados e estimulados com LPS foram utilizados como controle positivo. (*), (**) e (***) representam diferenças estatisticamente significativas em

relação ao controle não tratado ($P < 0,1$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente).....56

Figura 20: Análise morfológica do efeito do TQCL em promastigotas de *Leishmania infantum*. (a-f) São apresentadas as micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (a) Controle demonstrando diferentes parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Parasitos apresentando morfologia preservada após incubação com o solvente orgânico DMSO. (c-d) TQCL a 6,29 μM : Células com morfologia arredondada (seta) e com leve rugosidade na membrana. Alguns parasitos apresentam debris próximo ao flagelo (asterisco). (e-f) TQCL a 12,58 μM : Parasitos com a morfologia arredondada (seta), encurtamento do flagelo (cabeça de seta) e debris celular (asterisco)..... 58

Figura 21: Análise ultraestrutural dos efeitos do TQCL em promastigotas de *Leishmania infantum*. (a-b) Controle apresentando algumas estruturas citoplasmáticas do parasito bem preservadas, além do corpo celular alongado e citoplasma íntegro. (c) Parasitos tratados com o DMSO não apresentam alteração ultraestrutural. (d-e) Parasitos tratados com TQCL a 6,29 μM . (d) Note um inchaço mitocondrial (asterisco) e a presença de gotas lipídicas (LD). (e) É possível observar inchaço mitocondrial (inset, asterisco). Foi observado vacúolo com membranas eletrondensas ao lado da bolsa flagelar (cabeça de seta). (f, g) Parasitos tratados com TQCL a 12,58 μM : Presença de gotas lipídicas (LD), inchaço mitocondrial sem a presença de cristas (seta). Note presença de grandes vacúolos (v) e células com conteúdo citoplasmático extraído (estrela). Núcleo (N), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), retículo endoplasmático (R), flagelo (F)..... 60

Figura 22: Mapa de calor dos efeitos celulares integrados do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum* após 24h de tratamento nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM . As relações entre os processos celulares induzidas pelo composto foi realizada através da “Matriz de correlação entre marcadores biológicos.”As relações foram representadas em escala de cores variando de intensidade na cor azul e vermelha, sendo mais próximo da cor vermelha (+1) indicativo de forte correlação linear, enquanto valores mais próximos da cor azul (-1), indicam relação negativa. Valores próximos de zero representam ausência de correlação linear. As análises computacionais, normalização de dados e representação gráfica foram realizadas utilizando software Python (3.10), biblioteca Pandas (v1.5), NumPy (v1.23), Matplotlib (v3.6) e Seaborn (v0.12)..... 62

Figura 23: Gráfico em modelo “Spider plot” dos efeitos celulares integrados do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum* após 24h de tratamento nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM . Cada eixo do gráfico representa um parâmetro experimental normalizado em uma escala de 0 (nenhum efeito detectável) a 1 (efeito máximo observado em relação aos controles não tratados). A normalização foi fundamentada na variação percentual ou na razão de mudança obtida a partir do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), estresse oxidativo (ROS e superóxido), acúmulo de gotículas lipídicas, permeabilização da membrana (captação de iodeto de propídio), exposição de fosfatidilserina (Anexina V), distribuição do ciclo celular e ensaios de autofagia. O gráfico “Spider plot” reflete a magnitude do efeito e não implica relevância biológica hierárquica entre as vias. As análises computacionais, normalização de dados e representação gráfica foram realizadas utilizando software Python (3.10), biblioteca Pandas (v1.5), NumPy (v1.23), Matplotlib (v3.6) e Seaborn (v0.12).....64

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Valores de CI_{50} em promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i> , CC_{50} em macrófagos e o índice de seletividade do TQCL.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BOD	“Biochemical Oxygen Demand” ou Demanda Bioquímica de oxigênio
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CC50	Concentração citotóxica de mata 50% das células
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CI50	Concentração do composto que inibe 50% do crescimento parasitário
CO₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FCCP	Carbocianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IS	Índice de Seletividade
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina
HCL	Ácido Clorídrico
H₂DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LC	Leishmaniose Cutânea
LDPK	Leishmaniose Dérmica Pós-Kala-azar
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MDC	Monodansilcadaverina
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólio

NUPEP	Núcleo de Pesquisa em Parasitologia
NUPEQ	Núcleo de Pesquisas Químicas
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline”- Salina Tampão Fosfato
PI	Iodeto de Propídio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	“Reactive oxygen species” Espécies reativas de oxigênio
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (Instituto Memorial Roswell Park)
SBF	Soro Bovino Fetal
SUS	Sistema Único de Saúde
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
WHO	World Health Organization
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Leishmanioses e leishmaniose visceral.....	16
1.2	O parasito <i>Leishmania</i> spp e ciclo de vida.....	19
1.3	A doença.....	20
1.4	Terapia da leishmaniose visceral.....	25
1.5	Quinolinas.....	26
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Desenho experimental.....	29
3.2	Obtenção do composto.....	30
3.3	Modelo animal e procedimentos de manejo.....	30
3.4	Cultivo de <i>L. infantum</i>	32
3.5	Manutenção da infectividade de <i>L. infantum</i>	32
3.6	Avaliação da citotoxicidade do TQCL em macrófagos peritoneais em camundongos BALB/c.....	33
3.7	Atividade antipromastigota em <i>L. infantum</i>	34
3.8	Atividade antiamastigota em <i>L. infantum</i>	34
3.9	Cálculo do índice de seletividade.....	35
3.10	Testes do modo de ação do composto TQCL em promastigotas de <i>L. infantum</i>	35
3.10.1	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	36
3.10.2	Avaliação da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs).....	36
3.10.3	Avaliação da formação de radicais superóxido.....	37
3.10.4	Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos.....	37
3.10.5	Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	37
3.10.6	Avaliação da formação de vacúolos autofágicos.....	38
3.10.7	Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com o composto TQCL.....	38
3.10.8	Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com o composto TQCL.....	39
3.10.9	Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico produzidos por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i>	39
3.11	Análise ultraestrutural em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com o composto TQCL.....	39
3.11.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
3.11.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
3.12	Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL através de análise gráfica “Spider plot” e gráfico de calor.....	40
3.13	Análise estatística.....	42

4	RESULTADOS.....	43
4.1	Avaliação in vitro da atividade antileishmanial e citotoxicidade em células de mamíferos do composto TQCL em <i>L. infantum</i>	43
4.2	Modo de ação do composto TQCL em promastigotas de <i>L. infantum</i>	47
4.2.1	Avaliação do composto TQCL na manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	47
4.2.2	Efeito do composto TQCL na produção de EROs em promastigotas de <i>L. infantum</i>	48
4.4.3	Avaliação dos níveis de superóxido mitocondrial em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com TQCL.....	50
4.4.4	Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com TQCL.....	51
4.4.5	Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com o composto TQCL.....	52
4.4.6	Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de <i>L. infantum</i> com TQCL.....	53
4.4.7	Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com o composto TQCL.....	54
4.4.8	Avaliação das alterações do ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com TQCL.....	55
4.4.9	Avaliação dos níveis de NO produzidos por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> ..	56
4.5	Avaliação das alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com TQCL.....	57
4.5.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	57
4.5.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	59
4.6	Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL utilizando gráfico no modelo “Mapa de calor” e “Spider plot”.....	61
4.6.1	Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL em gráfico no modelo “Mapa de calor”.....	61
4.6.2	Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL em gráfico no modelo “Spider plot”.....	63
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO.....	74
7	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICE A - “Quinoline-Aminothiazole Derivate Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in <i>Leishmania infantum</i> ” (Artigo submetido).....	85
	ANEXO A - Certificado 018/2023 - CEUA/UFJF.....	122
	ANEXO B - Certificado 019/2023 - CEUA/UFJF.....	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses e leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp., de transmissão vetorial e com grande impacto sócio econômico mundial. Em razão de atingir principalmente áreas tropicais e subtropicais, afetando populações pobres e em situação de vulnerabilidade, e por não despertar o devido investimento por parte de gestores responsáveis por políticas de saúde pública, bem como das grandes indústrias farmacêuticas, está classificada como uma das “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs) de acordo com o Ministério da Saúde, 2004.

As leishmanioses apresentam um espectro clínico polimórfico, com três apresentações clínicas principais: a forma visceral (LV), manifestação mais grave da doença, sendo fatal em mais de 90% dos casos sem tratamento; a cutânea (LC), mais comum e com a característica da formação de uma ou múltiplas lesões na pele do tipo úlcera e a forma mucocutânea (LM), secundária a lesão cutânea, que afeta principalmente a boca, nariz e garganta. Além dessas três principais formas, apesar de raro, alguns pacientes podem desenvolver as formas cutâneas difusa, disseminada e até apresentar lesões atípicas (Figura 1). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram 700.000 a 1 milhão de novos casos anualmente das leishmanioses (OMS, 2025).



Figura 1: Apresentação clínica das leishmanioses. (a) Forma visceral (b) cutânea (c) difusa (d) mucocutânea (e) disseminada. Fonte: Ministério da Saúde, 2017; Santos, 2013; Silveira, 2020; Soares, 2024b (Adaptado).

A LV está principalmente associada a espécies oriundas da Europa pertencentes ao complexo *L. donovani*, nomeadamente *L. donovani* de caráter antroponótico e *L. infantum*, zoonótico (OMS, 2025). *Leishmania infantum*, foco deste trabalho, tem ampla distribuição global, ocorrendo em aproximadamente 60 países, incluindo a bacia do Mediterrâneo, Norte da África, Oriente Médio e América Latina (WHO, 2024).

No continente americano, a LV, também conhecida como calazar, é uma zoonose transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* spp., sendo o cão (*Canis familiaris*) considerado como o principal hospedeiro reservatório no ambiente doméstico, mas outros mamíferos podem albergar o parasito, tais como roedores e marsupiais (Maxfield, 2025; Schwabl, 2021). Acredita-se que a *L. infantum*, descrita por Charles Nicolle em 1908, foi introduzida no continente americano há 500 anos, pelo processo de colonização a partir da Europa, oriunda de pacientes assintomáticos e cães e outros reservatórios mamíferos (Boité, 2019).

Além da apresentação clínica mucocutânea, cutânea e visceral, a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK) tem sido descrita principalmente na África e Ásia, afetando pacientes infectados previamente com *L. donovani* que desenvolveram LV e posteriormente a complicação para o quadro da LDPK. As manifestações clínicas incluem erupções cutâneas no rosto que podem disseminar ou não para outras áreas do corpo (Figura 2), sendo os principais fatores de risco o tratamento inadequado durante o quadro da LV, má nutrição e co-infecção com o vírus HIV. Em relação a *L. infantum*, a evolução para LDPK são consideradas atípicas e raras. Embora a condição de saúde geral do paciente com LDPK não seja considerada tão grave quanto ao quadro da LV, a LDPK constitui um estigma social importante, pois a lesão pode evoluir para fibrose, deixando cicatrizes na pele e/ou no corpo dos indivíduos afetados (WHO, 2012 e Pathania, 2021).



Figura 2: Paciente com leishmaniose dérmica pós-calazar. (a) Indivíduo apresentando lesões nodulares na testa, nariz, bochechas e queixo, causando desfiguração facial e múltiplas máculas hipopigmentadas no tronco e membro superior (b). Fonte: Pathania, 2021.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024), são estimados de 50.000 a 90.000 novos casos todos os anos de LV, sendo reportados em 75 países, dos quais 90% se concentram no Brasil, Índia e África Oriental (Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Quênia e Somália). Nas Américas, 96% dos casos de LV são notificados no Brasil, em 2023 foram registrados 1.461 novos casos confirmados com taxa de letalidade atingindo 8,60% dos casos, equivalente a 148 óbitos. Ainda, há uma fração dos casos positivos com dificuldade de se chegar ao diagnóstico e a notificação correta, sendo portanto, considerada uma doença subnotificada. Estima-se que somente cerca de 25 a 45% dos casos são notificados à OMS (WHO, 2025).

Em razão da complexidade de manifestações clínicas, distribuição geográfica ampla e interação entre homem, ambiente e reservatórios mamíferos, incluindo o cão doméstico, a LV nas Américas se torna uma questão de saúde pública, que requer uma ação conjunta entre políticas governamentais, ação direta da sociedade civil e organizações para busca da melhoria do controle da doença (OPAS, 2020). O conceito de Saúde Única (*One Health*) insere-se diretamente na dinâmica da leishmaniose visceral, ao considerar a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental na manutenção e disseminação da doença. Além do aumento da população global, a população animal doméstica cresceu em paralelo e todos os fatores de risco para o homem e animais são aumentados com as mudanças ambientais que excedem a capacidade de adaptação de toda população (Evans, 2014). Embora dados recentes demonstrem uma tendência de redução nos casos de LV e LC nos últimos anos, é possível observar uma expansão em novos territórios, aumento da letalidade para LV e aumento proporcional de casos de co-infecção em pacientes com LV e vírus da imunodeficiência humana HIV (OPS, 2024).

O plano de ação para fortalecer a vigilância e o controle das leishmanioses nas Américas 2023-2030 (OPS, 2024) aborda causas base que ilustram a complexidade para realização da vigilância, prevenção e controle das leishmanioses, que resulta em alta morbidade e mortalidade para as diversas manifestações clínicas. Entre os fatores apontados, podemos destacar: diagnóstico laboratorial, tratamento e reabilitação dos pacientes não são suficientemente acessíveis; controle vetorial não realizado de forma sustentada e padronizada; informações epidemiológicas não disponíveis em tempo hábil para tomada de decisão; técnicas de diagnóstico e laboratórios não padronizados; profissionais de saúde não capacitados em quantidade suficiente para diagnosticar, tratar e acompanhar casos positivos; falha no monitoramento dos efeitos colaterais dos pacientes na maioria dos países; insumos, equipamentos e vigilância no manejo de cães indisponível ou insuficiente.

1.2 O parasito *Leishmania* spp e ciclo de vida

Leishmania spp. é classificada taxonomicamente no supergrupo Excavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea.. O ciclo de vida é heteroxeno, o qual envolve inseto vetor e o hospedeiro mamífero, geralmente canídeos ou roedores. A transmissão entre os hospedeiros ocorre pela picada do flebotomíneo fêmea. A forma biológica presente no inseto vetor é denominada promastigota, com formato alongado e diâmetro variando entre 10-40 x 1,5 a 3 μm , com um único flagelo que permite sua mobilidade eficiente (Figura 3A). Já as amastigotas, formas presentes no hospedeiro mamífero, são intracelulares obrigatórias, com corpo oval ou esférico e com diâmetro de 1,5 a 3 x 3 a 6,5 μm , conforme Figura 3B (Ferreira, 2020). O parasito, assim como demais cinetoplastídeos, apresenta uma estrutura denominada cinetoplasto, região especializada da única mitocôndria presente, responsável por conter grande quantidade de DNA extranuclear. Este fato abre perspectivas para o desenvolvimento de fármacos com ação nesta organela do parasito (Menna-Barreto, 2014).

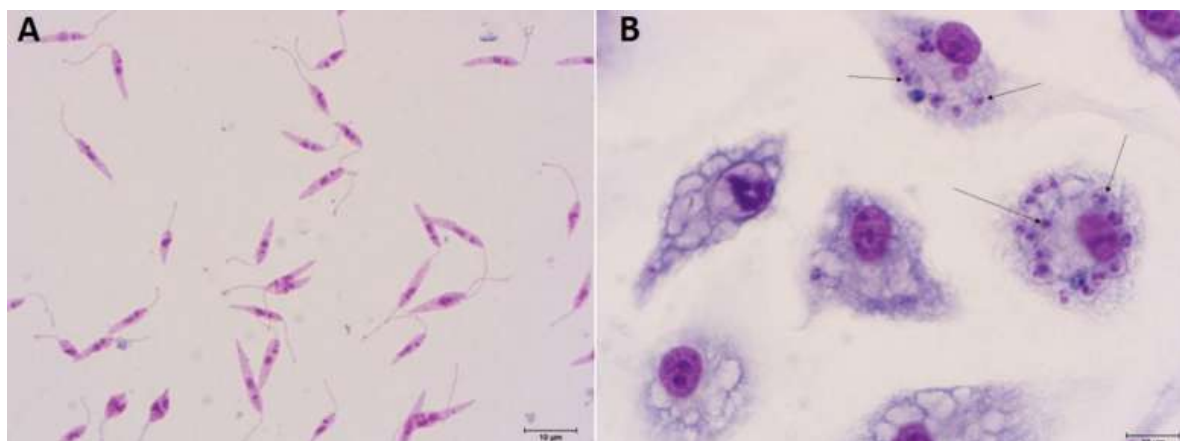


Figura 3: (A) Formas promastigotas. (B) Formas amastigotas de *L. infantum*. Setas = Formas amastigotas dentro do macrófago. Aumento de 1000x.

Fonte: Núcleo de Pesquisas em Parasitologia-NUPEP/UFJF

A infecção no inseto vetor se dá a partir da ingestão de sangue contaminado com amastigotas de um hospedeiro mamífero. Os parasitos ingeridos se diferenciam em promastigotas procíclicas, com capacidade de multiplicar por divisão binária e obter sua nutrição a partir dos nutrientes presentes no intestino do inseto. A partir da escassez desses nutrientes e interação com a microbiota do inseto, há a diferenciação para promastigotas metacíclicas, apresentando flagelo longo e ausência de multiplicação celular. Os promastigotas metacíclicos tem capacidade de resistência ao sistema complemento do

mamífero, fator importante para sua sobrevivência, essa forma migra para a porção do esôfago do vetor, que junto com a saliva e uma porção de fosfolípidos produzidos pelo flebotômio, são injetados no mamífero pela picada do inseto. Uma vez dentro do organismo do hospedeiro mamífero, as promastigotas são fagocitadas por células do sistema imunológico, principalmente por macrófagos, e são diferenciadas em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo, forma intracelular adaptada ao organismo do hospedeiro (Ferreira, 2020).

Para *L. infantum*, as formas amastigotas presentes no hospedeiro mamífero se multiplicam dentro do vacúolo parasitóforo localizado dentro dos macrófagos, células estas que podem atuar indiretamente na disseminação do parasito para os órgãos alvos principais, como fígado, baço e medula óssea, que irão gerar consequentemente uma ampla sintomatologia mais grave em comparação aos outros tipos de leishmanioses, devido ao seu acometimento visceral, caracterizando uma infecção sistêmica (Luz, 2023).

1.3 A doença

No Brasil a LV é uma doença endêmica, com 38.634 casos registrados entre 2010 e 2020, sendo notificadas em todas as regiões do país, mas com acentuado número de casos na região Nordeste, que neste período representou 54,5% dos casos, em comparação com a região Sudeste que apresentou 19%, Norte 18%, Centro-Oeste 8,2% e Sul com 0,3%. Outro perfil sociodemográfico relevante, é a incidência da maioria dos casos voltados para o sexo masculino nas regiões afetadas, que pode estar relacionada com maior exposição ao vetor e fatores fisiológicos ou ocupacionais. Não somente, a área endêmica para LV no Brasil é a região urbana, fator associado a processos de urbanização sem planejamento adequado (Silva, 2025).

Os fatores de risco para LV são amplos, abrangendo mudanças ambientais e climáticas, incluindo processos de urbanização, além disso, fatores socioeconômicos, sendo a pobreza um fator agravante e relacionado a outros processos de risco, como condições precárias de saneamento básico e de habitação, ineficiência na gestão de resíduos, como lixo e efluentes sanitários expostos, que favorecem a reprodução e aproximação dos vetores. A desnutrição é um outro elemento importante, pois a carência de nutrientes como níveis de ferro, proteína, vitaminas e minerais como o zinco, favorecem a evolução da doença para formas mais graves. A mobilidade também é um aspecto de transmissão para várias doenças, incluindo a LV, sendo o deslocamento para áreas endêmicas um fator de risco (WHO, 2023).

Dentre os infectados, os casos assintomáticos da LV são a maioria, geralmente relacionados com a presença de um paciente sintomático da mesma família, apontando para os mesmos fatores de risco do paciente afetado pela enfermidade (Oliveira, 2008). Para os casos com sintomatologia, a LV gera uma alteração clínica relevante, com acometimento principalmente do fígado, baço, medula óssea e linfonodos. A doença se instala a partir do momento que o parasito consegue ultrapassar os mecanismos protetores do sistema imunológico do hospedeiro, além de induzir alterações moleculares, tais como inibição da resposta imune Th1 e secreção de citocinas como IL-10, IL-4 e TGF- β , levando ao quadro de anergia das células T e desenvolvimento da doença. Em indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) HIV, a LV é considerada como uma doença oportunista importante, sendo a imunossupressão adquirida previamente considerada um fator relevante para evolução da infecção (Costa, 2023).

Após a instalação da infecção, os sintomas geralmente cursam com febre baixa prolongada, hepatomegalia e esplenomegalia, perda de peso, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal (IgG e IgM). A função hepática pode-se apresentar normal ou alterada, com alguns casos com apresentação de hipoalbuminemia e edema. Com progressão do quadro, a LV leva à caquexia grave e hemorragias devido a trombocitopenia acentuada, que em níveis elevados de sangramento em mucosas, colabora com evolução para sepse. Não somente, com a leucopenia, os indivíduos acometidos com a LV, desenvolvem um quadro imunossupressor, prejudicando a defesa contra outros microrganismos e favorecendo o desenvolvimento de outras infecções, como as bacterianas, fator importante na progressão desfavorável da doença e evolução para óbito (Kumar, 2012). A hepatoesplenomegalia e atrofia muscular característica de um paciente com LV pode ser observada na Figura 4.



Figura 4: Indivíduo com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia e atrofia muscular. Fonte: Crump, A. TDR, WHO/Science Photo Library. Manual MSD, acesso em 23 jan. 2026.

A suspeita da LV ocorre nos casos em que o paciente reside principalmente em áreas endêmicas e apresente os principais sintomas da doença, principalmente febre baixa de longa duração, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, astenia e anemia (Santos, 2023). Apesar de sua relevância em saúde pública, ainda há um número limitado de profissionais capacitados para reconhecer adequadamente a sintomatologia da doença, postergando o diagnóstico e a conduta terapêutica adequada (OPS, 2024). Com a falta de identificação clínica e ausência do tratamento adequado, a LV pode evoluir para o óbito dos pacientes em mais de 90% dos casos (OPAS, 2022).

Algumas enfermidades possuem sintomatologia semelhante ou provocam alterações laboratoriais comuns às apresentações dos pacientes com LV e são consideradas como diagnóstico diferencial, tais como infecções bacterianas como brucelose, tuberculose e endocardite; doenças parasitárias como malária e esquistossomose; afecções fúngicas como histoplasmoses e outras doenças fúngicas disseminadas; neoplasias como leucemia e linfoma; outras causas consideradas não infecciosas como lúpus eritematoso sistêmico, anemia

falciforme e anemia aplásica. Para os pacientes com LV aguda, ainda são considerados como diagnóstico diferencial uma série de doenças como doença de Chagas, febre tifóide, hepatite viral, mononucleose, doenças arbovirais, hepatite viral e abscesso hepático causado por amebíase (Pareyn, 2025).

Além da dificuldade pelos profissionais de saúde de reconhecer os sintomas da LV, a sobreposição das alterações clínicas comuns a outras doenças dificulta a confirmação da enfermidade, gerando atraso no diagnóstico correto, ocasionando consequentemente a piora do prognóstico da doença. Esse atraso torna-se ainda mais crítico para os casos de LV em crianças, pois o não estabelecimento do tratamento nas primeiras semanas é um importante fator de risco para mortalidade pela doença nesta faixa etária (Soares, 2024a).

Devido a sintomatologia inespecífica, é necessária a confirmação da LV através de métodos diagnósticos específicos como exames parasitológicos e imunológicos. Os exames parasitológicos buscam identificar formas amastigotas do protozoário e o diagnóstico imunológico se dá a partir da identificação de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo os mais utilizados os testes rápidos imunocromatográficos, a reação de imunofluorescência indireta RIFI e o ensaio imunoenzimático ELISA (Pessoa, 2024).

Dentre os testes imunológicos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), são considerados positivos as amostras reagentes a partir da diluição 1:80, e nos casos com sintomatologia característica de LV com diluição igual a 1:40, um novo exame deve ser realizado em 30 dias. Já para o teste rápido imunocromatográfico, a confirmação se dá a partir da visualização de uma linha indicada no campo C ou G na fita ou plataforma teste, além da linha controle, que garante validade do ensaio. Para diagnóstico parasitológico, o material preferencial de análise é obtido através da punção de medula óssea, mas também pode ser coletado amostras oriundas do linfonodo ou baço, exigindo esses últimos, coleta em ambiente hospitalar (Ministério da Saúde, 2025).

No cão doméstico (*Canis familiaris*), a leishmaniose canina (LVC) pode se comportar de maneira assintomática e o animal permanecer infectante por anos, principalmente em regiões endêmicas. No animal, além da multiplicação das formas amastigotas de *L. infantum* em macrófagos e posteriormente na chegada aos órgãos alvos como baço, fígado e medula óssea através da corrente sanguínea, a doença tem um perfil dermatrópico evidente, sendo a pele um dos principais tecidos alvo. A disseminação do parasito na pele constitui um fator importante para o desenvolvimento das lesões dérmicas e é um aspecto relevante para a transmissibilidade ao vetor (Saridomichelakis, 2025).

A sintomatologia e anormalidades clinicopatológicas da LVC é bastante diversa, a depender da imunidade e condição clínica do animal, variando de uma infecção autolimitante a quadros crônicos e fatais. Os principais achados clínicos são perda de peso, anormalidades oculares, letargia, linfadenomegalia, esplenomegalia, atrofia muscular, rinite, anemia, linfopenia e trombocitopenia. Em condições menos comuns, alguns animais podem apresentar alterações no sistema urinário, digestório e cardíaco. As manifestações cutâneas são observadas de 56 a 90% dos casos, podendo ocorrer de forma isolada ou associada a outros sintomas, caracterizada por dermatites ulcerativas ou esfoliativas, dermatite papular e onicogribose, alteração essa última caracterizada pela hipertrofia e crescimento anormal da unha, conforme Figura 5 (Saridomichelakis, 2025).

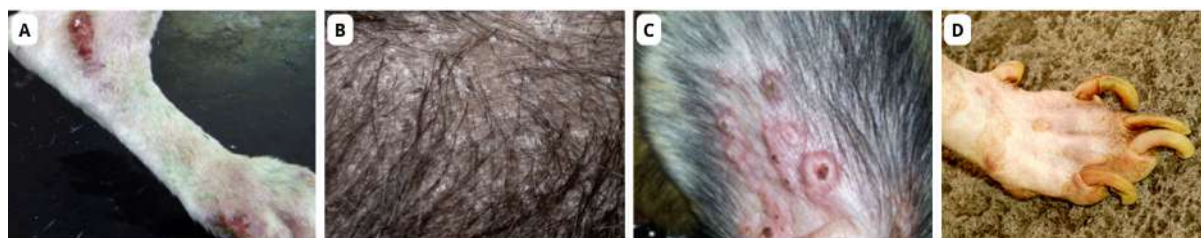


Figura 5: Principais tipos de lesões dérmicas e alteração ungueal observadas na leishmaniose canina. Dermatite ulcerativa (a), dermatite esfoliativa (b), dermatite papular (c) e onicogribose (d). Fonte: Saridomichelakis, 2025. Adaptado.

Embora o medicamento Milteforan™ (Miltefosina), seja o único produto farmacêutico aprovado para tratamento em cães com LVC no Brasil, de acordo com a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS (Brasil, 2016), ainda não há comprovação que o medicamento promova cura parasitária dos animais afetados. Além disso, tem sido observada a ocorrência de falha terapêutica, bem como a ausência de melhora do quadro clínico em animais utilizando esse fármaco (Gonçalves, 2024).

Além da possível falha no tratamento, os custos financeiros do tratamento de cães com LVC recaem integralmente ao tutor, conforme estabelecido pela Portaria Interministerial nº 1.426/2008, que proíbe o uso de medicamentos de uso humano ou não registrados no MAPA para esse fim, em consonância com os princípios da Lei nº 8.080/1990, que restringe a atuação do SUS à saúde humana. O tratamento da LVC é considerado de alto custo e necessita de exames e avaliações médico veterinárias periódicas (Abbiati, 2019), tal fato pode colaborar para o abandono do tratamento devido a falta de recursos financeiros, tornando o cão infectado um importante reservatório no ambiente urbano.

1.4 Terapia da leishmaniose visceral

Diante da ausência de uma vacina para a doença e de métodos eficazes para o controle dos flebotomíneos, o tratamento medicamentoso permanece como a principal estratégia de manejo e controle da LV. De acordo com as recomendações da diretriz mais recente para o tratamento da LV na região das Américas, atualmente estão disponíveis três opções terapêuticas: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B. Além disso, orienta-se que o tratamento desses pacientes seja conduzido em ambiente hospitalar, considerando a complexidade da evolução clínica e a necessidade de monitoramento contínuo (OPAS, 2022).

A escolha do medicamento para o tratamento da leishmaniose visceral LV leva em consideração fatores como idade e condição clínica do paciente. Devido à sua maior disponibilidade, os antimoniais pentavalentes são considerados como primeira opção de tratamento para pacientes sem comorbidades e imunocompetentes. Contudo, na presença de fatores de risco ou condições clínicas específicas, como insuficiência renal, hepática, extremos de idade, alterações cardiológicas, hipersensibilidade medicamentosa, gestação, lactação ou falha terapêutica prévia, a anfotericina B lipossomal é recomendada como tratamento de eleição. Na indisponibilidade da anfotericina B recomenda-se a administração do desoxicolato de anfotericina B ou de outras formulações lipídicas de anfotericina B (OPAS, 2022).

Os principais desafios encontrados no tratamento com os fármacos já disponibilizados para o tratamento da LV são a alta taxa de efeitos colaterais graves, elevada toxicidade, resistência medicamentosa, além do uso com cautela ou restrição em pacientes gestantes, em lactação, co-infectados com HIV ou imunocomprometidos (Sampaio, 2023). Os principais efeitos colaterais associados à anfotericina B lipossomal e do medicamento desoxicolato de anfotericina B relatados são a hipocalcemia, nefrotoxicidade e tremores. Já os antimoniais pentavalentes os principais efeitos observados são hepatotoxicidade e toxicidade cardíaca (Burza, 2018).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como fármaco antineoplásico, teve reconhecimento da sua atividade antileishmanial na década de 1980 e embora não utilizada para tratamento da LV humana no Brasil, é utilizada no regime terapêutico para pacientes com LV em outros países como na Índia, Nepal e Bangladesh, tendo como principal vantagem clínica a sua alta eficácia, chegando a taxas de cura de aproximadamente 94% em ensaios clínicos de fase 3 e a característica de ser o único medicamento disponibilizado com

administração por via oral (Singh, 2024; Ghorbani, 2017; Roatt, 2020). No Brasil, a miltefosina é autorizada para tratamento da LVC e leishmaniose cutânea humana. Apesar da disponibilidade por via oral, seu uso também é acompanhado de efeitos colaterais, incluindo vômito, diarreia, dor abdominal e náusea, além de efeito teratogênico (Pijpers, 2019).

1.5 Quinolinas

Pelo exposto acima, não há dúvidas acerca da necessidade na busca por novas alternativas para o tratamento da LV. Neste contexto, nosso grupo tem se dedicado há anos à pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com ação em *Leishmania* spp, com especial interesse nas quinolinas (Antinarelli, 2015; 2016; 2023; Coimbra, 2016; Glanzmann, 2021). As quinolinas constituem um grupo farmacóforo aromático heterocíclico de fórmula química C_9H_7N com dois anéis, em que um carbono na posição 1 é substituído pelo nitrogênio. Apresentam ampla diversidade de atividade biológica em especial como drogas antimaláricas tais como a cloroquina, tafenoquina e amodiaquina (Sureshkumar, 2020).

Além da atividade das quinolinas como terapia antibacteriana, oncológica, atividade no vírus do HIV e ação em protozoário como *Trypanosoma* spp., essa classe terapêutica também tem sido demonstrada em outros estudos na terapia das leishmanioses, incluindo ação antileishmanial em *L. donovani*. As quinolinas têm demonstrado estrutura química favorável para estudos antileishmaniais por possuir versatilidade estrutural ampla, podendo acomodar grupos farmacóforos direcionados para sua ação biológica e potência antileishmanial (Hartman, 2024; Upadhyay, 2018).

Adicionalmente, há evidência da ação das quinolinas direcionadas para a forma amastigota do parasito *Leishmania* spp., fator relevante na terapia das leishmanioses devido ao fato da forma intracelular ser responsável pelas manifestações clínicas no paciente (Romero, 2025a). Devido a esses aspectos, nosso grupo de pesquisa tem realizado ensaios antileishmaniais utilizando compostos derivados de quinolinas, em parceria com o Núcleo de Pesquisas Químicas - (NUPEQ) do Prof. Dr. Adilson David da Silva, do Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF.

Assim, a partir de um conjunto de resultados obtidos da quimioteca de compostos sintéticos derivados de quinolina do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia-NUPEP/UFJF, foi selecionado um composto, denominado **TQCL**, uma quinolina conjugada com 2-aminotiofenol (Figura 6). Este composto em estudos prévios realizados em nosso laboratório apresentou boa ação antileishmanial em *L. amazonensis*, com CI_{50} de 6,41 μ M e 4,32 μ M para os estágios de promastigota e amastigotas intracelulares, respectivamente (dados não publicados). Tais resultados motivaram ampliar os estudos de modo de ação desse composto e verificar sua atividade antileishmanial em *L. infantum*.

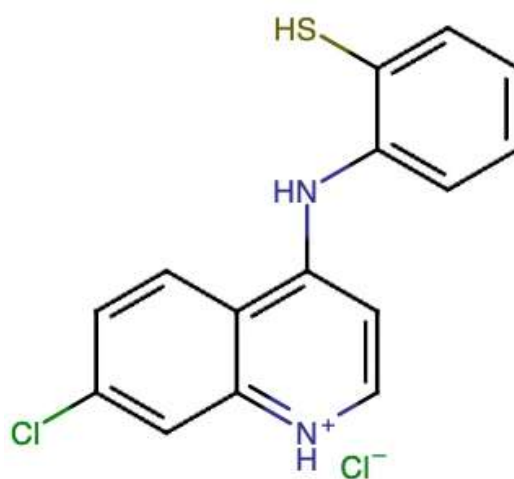


Figura 6 - Estrutura química do TQCL.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do composto **TQCL** em *L. infantum*, espécie responsável pela LV, bem como explorar a toxicidade em macrófagos de espécie murina da linhagem BALB/c. Além disso, verificar as alterações ultraestruturais, bioquímicas e celulares indicativas de processos de morte celular em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar o efeito do **TQCL**, em concentrações variadas, em promastigotas de *L. infantum*.
- 2- Avaliar o efeito do **TQCL**, em concentrações variadas, em amastigotas intracelulares de *L. infantum*.
- 3- Avaliar potencial citotóxico, em concentrações variadas, do composto **TQCL** em macrófagos.
- 4- Determinar o índice de seletividade do composto.
- 5- Analisar modificações bioquímicas e celulares indicativas de processos de morte celular em promastigotas de *L. infantum* tratados com **TQCL**, tais como:
 - Alterações no potencial da membrana mitocondrial;
 - Produção de espécies reativas do oxigênio (EROS);
 - Integridade e exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática;
 - Acúmulo de corpúsculos lipídicos;
 - Alterações no Ciclo celular;
 - Formação de vacúolos autofágicos;
 - Alterações ultraestruturais utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV).
- 6- Verificar o efeito do **TQCL**, na produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. infantum*.
- 7- Determinar, via spider plot e heatmap (gráfico de calor), o mapeamento temporal e causal do processo de morte do parasito.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Para facilitar o entendimento dos procedimentos realizados neste trabalho foi inserido neste documento o desenho experimental (Figura 7).



Figura 7: Desenho experimental. As etapas iniciais do trabalho incluem avaliação da atividade do composto TQCL em promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, além da avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos e cálculo do índice de seletividade (IS).

Em seguida, realizou-se os seguintes estudos de modo de ação em promastigotas de *L. infantum* tratados com o composto: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), formação de radicais superóxido e corpúsculos lipídicos, integridade da membrana plasmática, externalização de fosfatidilserina, avaliação do ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos. Também foram realizadas análises ultraestruturais de promastigotas de *L. infantum* tratadas com **TQCL** utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura (MEV e MET). Também foi avaliado o efeito do **TQCL** na produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados. Para fornecer uma visão integrada da ação do composto, foram realizadas análises em gráfico no modelo “Spider plot” e gráfico de calor. Fonte: O próprio autor.

3.2 Obtenção do composto

O composto **TQCL** proveniente da quimioteca do NUPEP/UFJF foi obtido após síntese química realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adilson David da Silva do SINTBIOLMOL/ICE/UFJF.

3.3 Modelo animal e procedimentos de manejo

Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6-8 semanas provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos por equipe previamente treinada, sob supervisão do médico veterinário responsável e após capacitação específica, incluindo cursos obrigatórios na área de ciência em animais de laboratório. Os aspectos envolvidos na capacitação incluem noções de bioterismo, contenção animal, bem-estar na espécie murina, monitoramento dos animais, coleta de sangue, além de treinamento específico e direcionado para cada profissional e procedimento.

O transporte dos animais do CBR ao biotério do NUPEP/ICB/UFJF foi realizado por dois membros da equipe mediante agendamento prévio junto ao CBR. Os animais foram transportados em gaiolas cobertas internamente por maravalha e externamente com saco vermelho a fim de reduzir o estresse de transporte, visto que camundongos não enxergam a cor vermelha.

Após a chegada no biotério do NUPEP, as gaiolas com os animais foram colocados na ante-sala, aguardando 30 minutos para a climatização no novo ambiente. Após esse período realizou-se o exame individual de cada animal pelo médico veterinário da equipe, verificando peso, temperatura, abertura dos olhos, tamanho dos dentes, sexo, presença de secreção em mucosas e condição geral de saúde. Os dados da avaliação clínica foram registrados em uma planilha do Excel e em seguida registrou-se a ficha de entrada dos animais.

Ao término do exame geral dos animais, estes foram acondicionados em no máximo 05 animais oriundos da mesma ninhada de origem, selecionados aleatoriamente em gaiola com as dimensões de 30 X 20 X 13 cm e forrada com maravalha, ração autoclavada (Nuvilab, Brasil) e bebedouro contendo água fresca e filtrada foram fornecidos *ad libitum*. Como estratégia de enriquecimento ambiental, foram confeccionados abrigos simulando tocas, utilizando segmentos de tubos de PVC (Policloreto de Vinila) com aproximadamente 5 cm de diâmetro e 8 cm de comprimento, previamente cortados e esterilizados em autoclave. As gaiolas foram devidamente identificadas com etiqueta vermelha contendo informações como a data de nascimento dos animais, data de entrada no biotério, sexo, quantidade de animais por gaiola.. Em seguida, as gaiolas foram transferidas para a estante ventilada com sistema de exaustão de ar (Alesco, São Paulo, Brasil) com controle de luminosidade com ciclo 12/12h, com permanência de luz das 6h da manhã até 18h da noite e temperatura mantida entre 19-22 °C. A sala de biotério dispõe de sistema de controle de luminosidade e ar-condicionado que mantém a temperatura do ambiente em torno de 22 °C.

Diariamente realizou-se o monitoramento dos animais, verificando disponibilidade de água, ração, temperaturas da sala e da estante ventilada, condição geral do ambiente, bem como presença de algum animal apático ou com outra condição de saúde adversa. Os animais que diferiram do grupo por condições de saúde foram reservados em gaiola separada e monitorados pelo médico veterinário.

Semanalmente realizou-se a limpeza de gaiolas por um membro da equipe, a fim de trocar a maravalha utilizada e reposição da água e ração. Todos os procedimentos realizados foram registrados no caderno de entrada do biotério, além do caderno de procedimento, incluindo a data, intervenção realizada e responsável.

Os animais utilizados neste estudo foram destinados à obtenção de macrófagos peritoneais, sendo previamente submetidos à anestesia, sob supervisão do médico veterinário responsável, por meio da administração de dose letal de xilazina (20 mg/kg) e quetamina

(100 mg/kg), para posterior realização dos procedimentos experimentais. Adicionalmente, o deslocamento cervical foi empregado como método complementar de eutanásia e como critério de ponto final humanitário.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados previamente pela Comissão de Ética do Uso de Animais da UFJF (CEUA nº 018/2023 e 019/2023).

3.4 Cultivo de *L. infantum*

A cepa de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foi isolada de um paciente com LV no Marrocos e cultivada em meio Warren completo [meio com infusão de cérebro e coração bovino (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia)], suplementado com ácido fólico e hemina (Sigma- Aldrich. St. Louis, Missouri, EUA), 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, SP, Brasil), além da adição de 0,1% de penicilina 100 UI/mL e 0,1% de estreptomicina 0,1 mg/mL (Cultilab, SP, Brasil), conforme descrito por Das Chagas Almeida (2022).

A manutenção *in vitro* dos promastigotas de *L. infantum* foi realizada a partir de repiques realizados duas vezes por semana, em garrafas para cultivo celular e mantidas em estufa BOD (“Biochemical Oxygen Demand” ou Demanda Bioquímica de oxigênio) a 25°C.

3.5 Manutenção da infectividade de *L. infantum*

A manutenção da infectividade da cepa de *L. infantum* foi realizada através da infecção *in vivo* em camundongos BALB/c. A infecção ocorreu por via intraperitoneal, onde foi inoculada através de uma seringa hipodérmica estéril de 1mL com agulha de 0,45x13mm, uma solução com PBS (“Phosphate Buffer Solution” ou Solução Salina Tamponada com Fosfato) contendo 10×10^7 de promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento. A eutanásia foi realizada após 20 dias da infecção, no qual foi realizada a coleta do baço e fígado para isolar as formas amastigotas do parasito. A suspensão de células contendo as amastigotas foram mantidas no meio de cultura como acima descrito, sendo mantidas em BOD à 25°C para transformação destas em promastigotas (Das Chagas Almeida, 2022). A utilização dos animais na presente etapa foi aprovada pela Comissão de Ética do Uso de Animais da UFJF (CEUA nº 018/2023 e 019/2023).

3.6 Avaliação da citotoxicidade do TQCL em macrófagos peritoneais em camundongos BALB/c

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram estimulados através da inoculação de 2 mL de tioglicolato de sódio 3% (Merck, Darmstadt, Alemanha), por via intraperitoneal em cada animal, utilizando uma seringa de 5mL e agulha 25x0,80mm. Após 72 horas, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com uma solução de PBS, xilazina 20 mg/kg e quetamina 100 mg/kg. Após atingir o plano anestésico adequado para o procedimento, a partir da avaliação médico veterinária, foi realizado o lavado peritoneal, a fim de obtenção dos macrófagos murinos. O lavado foi realizado utilizando 5 mL de solução de Hank's estéril (Sigma-Aldrich. St. Louis, Missouri, EUA), inoculado por via peritoneal e todo líquido foi aspirado e o mesmo procedimento foi repetido mais uma vez.

O conteúdo obtido no lavado foi centrifugado a 1200 rpm (Thermo Fisher Scientific D37520) durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi realizado o descarte do sobrenadante e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com enriquecimento de 10% de SFB e 0,5% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Foi coletada uma alíquota de 10µl com 990µl de solução de contagem, no qual foi utilizado 10µl dessa solução para contagem de macrófagos em uma câmara de Neubauer para ajuste da concentração em 2×10^6 células/mL.

O plaqueamento foi realizado utilizando uma placa de 96 poços (COSTAR - Corning incorporated, NY, USA, 14831) adicionando 100µl em cada poço para incubação durante 24h em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, o conteúdo da placa foi descartado e foi realizada a lavagem com PBS, para retirar células não aderidas. Após a lavagem, foi descartado todo o PBS e foi realizado o tratamento em diferentes concentrações do composto, a partir de 150 µM até 9,37 µM. Após tratamento, as placas foram acondicionadas novamente em estufa a 37°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂), durante 72h. Após esse período, foi adicionado 10µl de MTT a 5 mg/mL [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-tetrazólico - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)] em cada poço.

Após duas horas, foi acrescentado o isopropanol/HCl (solução a 0,7%) a fim de interromper a reação. Foi realizada leitura com espectrofotômetro (Multiskan EX - Thermo Electron Corporation, Vanta, Finlândia) a 570nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de inibição da viabilidade dos macrófagos em relação ao controle e calculado o valor do CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) pelo

programa GraFit 5. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da UFJF (CEUA nº 018/2023 e 019/2023), os dados completos podem ser consultados nos anexos A e B deste trabalho.

3.7 Atividade antipromastigota em *L. infantum*

A atividade antipromastigota foi avaliada através do teste colorimétrico MTT. Para isso, a *Leishmania* foi contada através de uma câmara de Neubauer e ajustada a contagem para 2×10^6 células/ml. Após o ajuste, os parasitos foram colocados em uma placa de 96 poços (COSTAR - Corning incorporated, NY, USA, 14831) e incubadas a 25°C em estufa BOD, em seguida os compostos foram adicionados em concentrações seriadas no intervalo de 100 µM a 3,12 µM e a placa foi incubada por 72h em estufa BOD a 25°C. Após esse período foi adicionado o MTT 5 mg/mL, sendo incubado por quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de 100µl de isopropanol/HCl (0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX - Thermo Electron Corporation, Vanta, Finlândia) a 570nm.

A avaliação dos resultados foi realizada em comparação com o controle sem a presença do composto em porcentagem de inibição de células viáveis. Para cálculo da concentração inibitória (CI_{50}), concentração que inibe 50% o crescimento dos parasitos, foi utilizado o programa GraFit 5 (das Chagas Almeida, 2022). A droga de referência utilizada foi a miltefosina, devido a sua atividade em *Leishmania* spp. serem reconhecidos (Agrawal, 2006).

3.8 Atividade antiamebíotica em *L. infantum*

A metodologia de obtenção de macrófagos peritoneais, juntamente com a cepa de *Leishmania* utilizada nos experimentos, foram as mesmas já descritas anteriormente. Resumidamente: Após o lavado peritoneal utilizando aplicação de solução de Hank's em camundongos BALB/c, que foram estimulados previamente com tioglicolato a 3%. A solução obtida foi centrifugada e ressuspensa em meio RPMI e uma alíquota de 10µl foi contada em uma câmara de Neubauer. Foi adicionado uma lamínula de vidro em cada poço da placa de 24 poços (COSTAR - Corning incorporated - 3524, Kennebunk, ME, USA) e após adição das lamínulas, a solução contendo macrófagos, meio RPMI, SBF a 10% e 0,5% de antibiótico foi adicionado na placa, totalizando 300µl por poço.

As placas foram encubadas em estufa por 24 horas à 37°C com 5% de CO₂ e macrófagos foram colocados para interagir com promastigotas de *Leishmania* na proporção de 1/10 (macrófago/parasito), durante 24 horas, em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram lavadas por três vezes com PBS para retirar as promastigotas que não internalizaram nos macrófagos, adicionou-se meio RPMI suplementado com soro de cavalo 3% e o composto foi adicionado em concentrações variadas (50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,12 µM), totalizando 72 horas de tratamento.

Para coloração, as células foram fixadas com etanol absoluto, coradas com Giemsa e desidratadas com proporções de acetona/xilol na sequência a seguir: acetona (100%); acetona/xilol (90/10%); acetona/xilol (50/50%); acetona/xilol (10/90%); xilol (100%). O efeito inibitório do composto foi avaliado através de contagem manual do número de amastigotas presentes nos macrófagos nas diferentes concentrações, com o auxílio do microscópio óptico, com a contagem de 200 macrófagos por lamínula, totalizando 400 macrófagos para cada concentração/lâmina testada. Foram realizados dois experimentos independentes, com cada lamínula em duplicata.

O controle negativo foi a infecção sem o tratamento e a droga de referência para título de comparação foram tratadas com miltefosina. Os resultados foram expostos como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle sem tratamento. O CI₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos, foi determinado utilizando o programa GraFit 5 (Das Chagas Almeida, 2022).

3.9 Cálculo do índice de seletividade

O Índice de Seletividade (IS) do composto foi calculado pela razão entre a toxicidade *in vitro* para macrófagos murinos (CC₅₀) e a atividade em promastigota ou amastigota intracelular (CI₅₀). Valores acima de 10 indicam que o composto foi mais tóxico para o parasito do que para a célula hospedeira (macrófagos). Valores inferiores a 10 indicam maior toxicidade para a célula hospedeira (Inacio, 2013).

3.10 Testes do modo de ação do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum*

Com o objetivo de evidenciar o modo de ação do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum* foram realizados ensaios experimentais utilizando o composto TQCL nas

concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM , correspondendo ao valor de 1x e 2x a concentração inibitória que inibe o crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}). A metodologia empregada em cada avaliação está detalhada nas seções subsequentes.

3.10.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

Promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento foram tratadas em garrafas de cultura com o composto **TQCL** na concentração 6,29 μM e 12,58 μM , referente ao valor de 1x e 2x o CI_{50} . Após 24 horas de tratamento, células foram lavadas em PBS, contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 5×10^6 células em 1 mL de solução de Hank's e incubadas no escuro com 10 $\mu\text{g/mL}$ do JC-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) durante 30 minutos. Após 30 minutos as células foram lavadas 3x com PBS e novamente ressuspensas em 1mL de solução de Hank's. Posteriormente, foi realizada a transferência das células para uma placa escura, compatível para realização da leitura em fluorímetro (FLx800) com os comprimentos de onda de excitação/emissão 485/528nm (fluorescência verde) e 485/600nm (fluorescência vermelha). Foi utilizado para o controle positivo o tratamento das promastigotas com 5 μM de FCCP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por 10 min a 25°C (Antinarelli, 2015). Em relação ao controle negativo, foram utilizados poços com ausência do composto.

3.10.2 Avaliação da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com o composto **TQCL** a 6,29 μM e 12,58 μM , por 24 h a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas 1x com PBS e ajustadas à concentração de 5×10^6 promastigotas/mL. Para determinar a produção de EROs total foi utilizada a sonda H_2DCFDA (D399 - Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). O H_2DCFDA é um marcador não fluorescente, que quando em presença de esterases intracelulares e EROs exibe um produto fluorescente (de acordo com indicações do fabricante). A incubação foi realizada à 20 μM por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob proteção da luz. O H_2O_2 a 4 μM foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi feito sem a adição do composto. A leitura ocorreu em fluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528nm (Antinarelli, 2015).

3.10.3 Avaliação da formação de radicais superóxido

Promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento foram ajustadas para $10 \times 10^6/\text{mL}$. Em seguida, foram tratadas com o composto em estudo utilizando as concentrações de 1 e 2x o valor do Cl_{50} e incubadas em estufa BOD a 25°C durante 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS, ajustando a concentração para $5 \times 10^6/\text{mL}$ em 200 μL da suspensão em placa escura. Foi adicionado o Mitosox (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) na concentração final de 5 μM e a placa foi incubada em temperatura ambiente durante 20 minutos na ausência de luz. Como controle positivo foi utilizado Miltefosina na concentração de 6,47 μM , que foi incubada por 15 minutos. No controle negativo foram utilizados parasitos não tratados. Para leitura foi utilizado o fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) empregando um comprimento de emissão de 600 nm e comprimento de excitação de 540 nm (Das Chagas Almeida, 2022).

3.10.4 Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos

O corante lipofílico Nile Red foi utilizado para avaliação de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto **TQCL** na concentração 6,29 μM e 12,58 μM . Para esse objetivo, promastigotas foram ajustadas na concentração de 5×10^6 promastigotas/mL e incubadas com corante Nile Red (19123 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, na ausência de luz. Como controle positivo foi utilizado a miltefosina na concentração de 7,81 μM . Para controle negativo foram utilizados poços sem adição do composto e a leitura foi efetuada em fluorímetro (FLx800) em comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528nm (Das Chagas Almeida, 2022).

3.10.5 Avaliação da integridade da membrana plasmática

Promastigotas de *L. infantum* (1×10^7 células/mL) em fase logarítmica de crescimento foram tratadas com o composto **TQCL** na concentração 6,29 μM e 12,58 μM durante 24 horas a 24°C e incubadas com iodeto de propídeo (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,

EUA) a 1 µg/mL por 15 minutos na ausência de luz. No controle positivo foi realizado o aquecimento dos parasitos a 65°C durante 10 minutos e no controle negativo utilizou-se poços contendo parasitos não tratados. Foi utilizado o fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com fluorescência de 540 nm de emissão e 600 nm de excitação (Antinarelli, 2015).

3.10.6 Avaliação da formação de vacúolos autofágicos

Promastigotas de *L. infantum* (1×10^7 células/mL) em fase logarítmica de crescimento foram tratadas com o composto **TQCL** na concentração 6,29 µM e 12,58 µM e incubadas durante 24 horas a 24 °C. Promastigotas em fase estacionária foram utilizadas como controle negativo e para controle positivo os parasitos foram incubados em PBS por 24 horas. Os parasitos foram centrifugados e lavados com PBS e marcados com 100 µM de monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por 1 hora a 37 °C e analisadas no fluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com 335 nm de excitação e 460 nm de emissão (Stroppa, 2017).

3.10.7 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL

Promastigotas de *L. infantum* (10^7 células/mL) foram incubadas com o composto **TQCL** (6,29 e 12,58 µM) por 24 h. Uma suspensão de 5×10^6 promastigotas foi lavada uma vez com PBS e incubada com 1 µL de anexina V-FITC (Invitrogen, Molecular Probes) por 20 minutos no escuro. Em seguida, iodeto de propídio (PI) foi adicionado a uma concentração de 1 µg/mL e as células foram incubadas no escuro por 15 minutos. Miltefosina na concentração de 6,47 µM foi usada como controle positivo. Parasitos sem tratamento foram utilizados como controle negativo. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software DIVA (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA), conforme descrito por Souza (2025).

3.10.8 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum* tratados com o composto TQCL

Promastigotas de *Leishmania infantum* (10^7 células/mL) foram tratadas com **TQCL** (6,29 e 12,58 μ M) por 24 horas a 24 °C, lavadas com PBS, permeabilizadas com 1 mL de etanol a 70% e incubadas a -20 °C por 1 hora. Em seguida, foram incubadas com 1 μ g/mL de Ribonuclease A (Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram incubadas com iodeto de propídio (PI), (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 1,0 μ g/mL por 20 minutos à temperatura ambiente. Para controle negativo utilizou-se parasitos não tratados. Miltefosina 6,47 μ M foi utilizada como controle positivo. Os dados foram adquiridos usando o citômetro FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software DIVA (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA), conforme descrito por Souza (2025).

3.10.9 Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum*

Para avaliar o conteúdo de NO, o sobrenadante da cultura de macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com **TQCL** foi coletado. A produção de NO foi medida indiretamente pela quantificação dos níveis de oxidação de nitrito utilizando o método colorimétrico de Griess. A absorbância foi medida a 540 nm utilizando um espectrofotômetro (Multiskan MS). Macrófagos não estimulados e infectados, cultivados apenas em meio RPMI, foram utilizados como controle negativo. Para a estimulação positiva, as células foram cultivadas com 5 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) - (Sigma-Aldrich, EUA), conforme descrito por Antinarelli (2019).

3.11 Análise ultraestrutural em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL

A avaliação ultraestrutural utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), foram realizadas em

parceria com o Prof. Dr. Victor do Valle Midlej, Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

As amostras foram primeiramente processadas no laboratório de parasitologia NUPEP/UFJF da seguinte maneira: promastigotas de *L. infantum* foram tratados com o composto **TQCL** nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM durante 24 horas. Após esse período foi realizada a lavagem das promastigotas com PBS e fixação com solução de glutaraldeído a 2,5 %, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora. Essas etapas descritas foram igualmente empregadas tanto para processamento do material para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e para microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme descrito por Souza (2025).

3.11.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após fixação do material, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e posteriormente secas com CO_2 , revestidas com uma espessa camada de ouro e analisadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390, Tóquio, Japão), conforme descrito por Souza (2025).

3.11.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após a fixação em cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora, as células foram pós fixadas em em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8%. Em seguida, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, incluídas em resina Epon, seccionadas em fatias ultrafinas (60-70 nm) e coradas com acetato de uranila (5%) e citrato de chumbo 0,2%. As seções foram analisadas com um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Tóquio, Japão). Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, cada um em triplicata (Souza, 2025).

3.12 Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL através de análise gráfica “Spider plot” e gráfico de calor

Para visualização e compreensão do modo de ação envolvendo o composto **TQCL** na atividade antileishmanial, foram realizadas análises quantitativas em formato de gráfico em

forma de “Spider plot”, no português também denominado como “gráfico de radar.” Além disso, foi aplicada análise quantitativa gráfica em formato de gráfico de calor.

Os dados experimentais foram processados utilizando software através dos valores médios obtidos dos experimentos em triplicata independente do parâmetro analisado. As análises computacionais, normalização de dados e representação gráfica foram realizadas utilizando Python (3.10), biblioteca Pandas (v1.5) e NumPy (v1.23). Matplotlib (v3.6) e Seaborn (v0.12) foram utilizados para visualização dos dados em alta resolução.

O “Spider plot” foi construído com o objetivo de evidenciar a ação biológica do composto **TQCL** através dos resultados do tratamento nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM comparadas ao fármaco de referência miltefosina e ao controle *n*. Os dados foram normalizados em uma escala adimensional variando de 0 a 1, levando em consideração a diversidade de medidas biológicas (porcentagem e média de fluorescência, por exemplo). O centro do gráfico (0) representa o controle e a periferia (1) representa o maior impacto biológico máximo observado por cada marcador. Nos parâmetros caracterizados por um aumento, tais como: ROS, superóxido, exposição de fosfatidilserina, permeabilidade da membrana, análise do ciclo celular e aumento de lipídios, a normalização mínimo-máxima foi aplicada pela seguinte fórmula:

$$X_{norm} = \frac{Xi - \min(X)}{\max(X) - \min(X)}$$

O “*X*” representa o vetor de marcador biológico e “*Xi*” o valor de um determinado tratamento que foi convertido em escala normalizada. No parâmetro “Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$),” que a avaliação resultou na diminuição da fluorescência (despolarização), foi aplicada normalização inversa para garantir que qualquer expansão além da área delimitada do gráfico represente um aumento do dano celular e impacto farmacológico.

Na confecção do gráfico de calor, duas análises de correlação foram realizadas para evidenciar a consistência dos efeitos farmacológicos. As matrizes foram feitas utilizando mapas de calor em paleta de cores divergentes, no qual valor próximo a +1 (vermelho escuro) indica relação positiva linear, já os valores próximos a -1 (azul escuro) aponta para uma relação negativa e valores próximos a 0 (branco) indica ausência de correlação linear. Na matriz de correlação de marcadores, foi aplicada uma máscara triangular superior para evitar redundância.

Para matriz de correlação dos tratamentos, a fim de quantificar a semelhança entre a ação biológica dos grupos experimentais, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), calculado pelos vetores de resposta médica dos tratamentos (Controle, **TQCL** 6,29 μM , **TQCL** 12,58 μM e Miltefosina). Essa etapa tem o objetivo de medir o grau de convergência do “modo de ação” entre o composto e o fármaco de referência.

Na matriz de correlação de marcadores biológicos foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre todas as variáveis e condições de tratamento com o objetivo de identificar relações funcionais e dependências entre os processos celulares analisados.

3.13 Análise estatística

Os programas GraphPad Prism 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA) e Probit foram utilizados para realizar as análises estatísticas realizadas nos experimentos. Os resultados foram comparados através da análise de variância Oneway-ANOVA com posterior teste de Dunnett. Foram considerados significativos valores de p menores que 0,0001 (***), 0,001 (**) e 0,01 (*), sendo representados na parte superior de cada gráfico.

4 RESULTADOS

Os resultados abaixo descritos fazem parte do artigo submetido para publicação no “Chemico-Biological Interactions (Manuscript Number: CHEMBIOINT-D-26-00559), sob o título “Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*”, no qual sou a primeira autora (Apêndice A).

4.1 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmanial e citotoxicidade em células de mamíferos do composto TQCL em *L. infantum*

Os resultados da atividade antileishmanial *in vitro* e da citotoxicidade em macrófagos murinos do composto TQCL são mostrados na Tabela 1. Como pode ser observado, o composto TQCL apresentou CI_{50} de 6,29 μ M e 9,76 μ M para promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, respectivamente. Estes valores indicam atividade antileishmanial promissora uma vez que o CI_{50} foi abaixo de 10 μ M. Além disso, o valor de CI_{50} observado em promastigotas, é próximo ao valor da droga de referência, miltefosina, que apresentou CI_{50} de 6,47 μ M.

Em relação ao CC_{50} , concentração que inibe 50% da viabilidade dos macrófagos, foi possível observar que o composto apresentou baixa citotoxicidade para a célula hospedeira demonstrando um CC_{50} de 115,33 μ M. A partir desses dados, foi calculado o índice de seletividade (IS), razão entre CC_{50} para macrófagos e CI_{50} para amastigotas e promastigotas, o qual mostrou que o composto apresentou IS de 18,33 e 11,82 em amastigotas e promastigotas respectivamente, revelando uma boa seletividade ao parasito em relação à célula hospedeira.

Tabela 1: Valores de CI_{50} em promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, CC_{50} em macrófagos e o índice de seletividade do TQCL.

Composto	Promastigotas CI_{50} μ M ^{a,c}	Macrófagos CC_{50} μ M ^{b,c}	Amastigotas CI_{50} μ M ^{a,c}	Índice de Seletividade (IS) ^d
TQCL	6,29 (5,35-7,39)	115,33 (86,41-153,92)	9,76 (7,77-12,25)	18,33 ^e / 11,82 ^f
Miltefosina	6,47 $\pm$ 0,11	131,90 $\pm$ 3,9	0,65 (0,51-0,83)	20,39 ^e / 202,90 ^f

^a CI_{50} : Concentração necessária para inibir 50% do crescimento dos parasitos. ^b CC_{50} : Concentração que inibe 50% da viabilidade dos macrófagos. ^cConcentração que inibe 50% do

crescimento dos parasitos. ^dI.S: Razão entre CC₅₀ para macrófagos e CI₅₀ para ^epromastigotas e ^famastigotas.

A figura 8 ilustra a atividade do **TQCL** em macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. infantum*. É possível verificar que o composto foi ativo em todas as concentrações testadas, incluindo naquelas mais baixas. Foi observada uma inibição expressiva da carga global dos parasitos nas concentrações de 50 µM, 25 µM e 12,5 µM do composto, inibindo 77,55%, 71,90% e 66,5% da carga global dos amastigotas, respectivamente. Já nas concentrações de 6,25 µM e de 3,12 µM a inibição foi de 31,53% e 28,84% respectivamente. Os dados acima demonstram que o composto teve uma ação dose dependente quanto à inibição dos parasitos intracelulares.

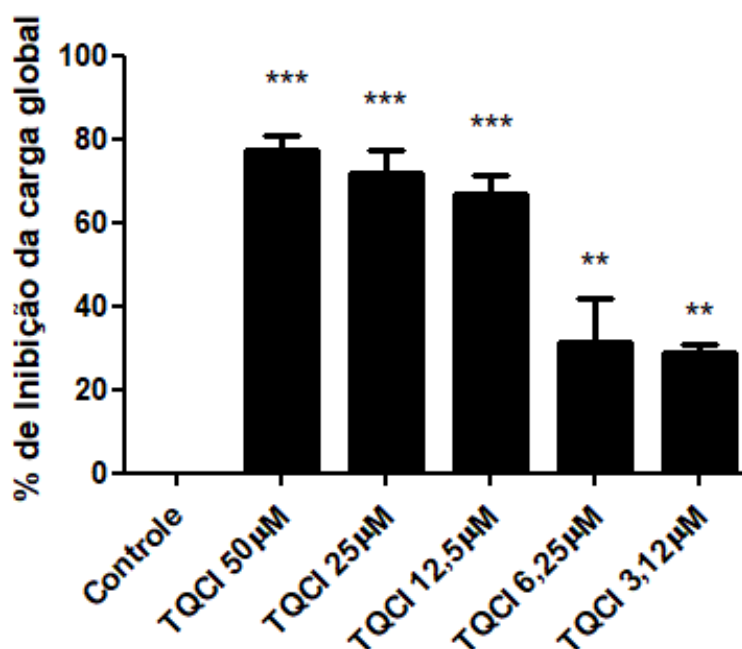


Figura 8: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*. Foi realizada a infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por 24 horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa para posterior leitura em microscópio óptico. A avaliação da atividade antileishmanial foi realizada através de três experimentos em duplicata, pela contagem de amastigotas de macrófagos infectados e não infectados, respeitando um total de 200 macrófagos para cada lamínula. O resultado foi expresso em % de inibição da carga global em relação ao controle não-tratado (Controle). As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

Além da inibição da carga parasitária global, **TQCL** também foi efetivo na redução da porcentagem de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. infantum* (Figura 9). Como pode ser observado, a porcentagem de macrófagos infectados após tratamento com o composto a 50 μM , 25 μM e 12,5 μM foi de 28%, 39% e 38%, respectivamente, enquanto o controle negativo, ou seja, sem tratamento, teve 79% de células infectadas.

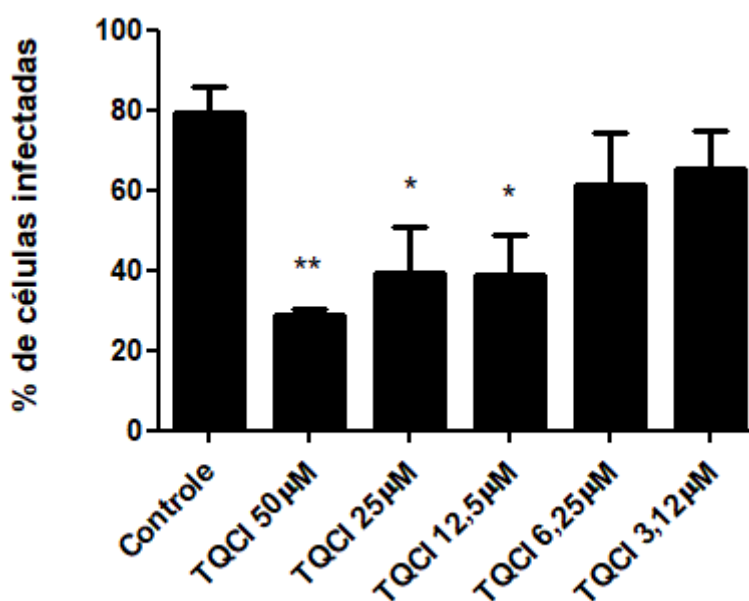


Figura 9: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*. A infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* foi realizada na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por 24 horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa para posterior leitura em microscópio óptico. A avaliação da atividade antileishmanial foi realizada em três experimentos em duplicata, pela contagem do número de amastigotas, de macrófagos infectados e não infectados, respeitando um total de 200 macrófagos para cada lamínula. O resultado foi expresso em (%) de células infectadas em relação ao controle não-tratado (Controle). As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,01$ (*) e $P < 0,001$ (**).

Ilustrando o efeito do **TQCL** nas concentrações de 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM e 3,12 μM , é possível evidenciar a redução expressiva da carga parasitária (setas) por macrófago infectado, proporcionalmente à concentração do composto utilizada (Figura 10).

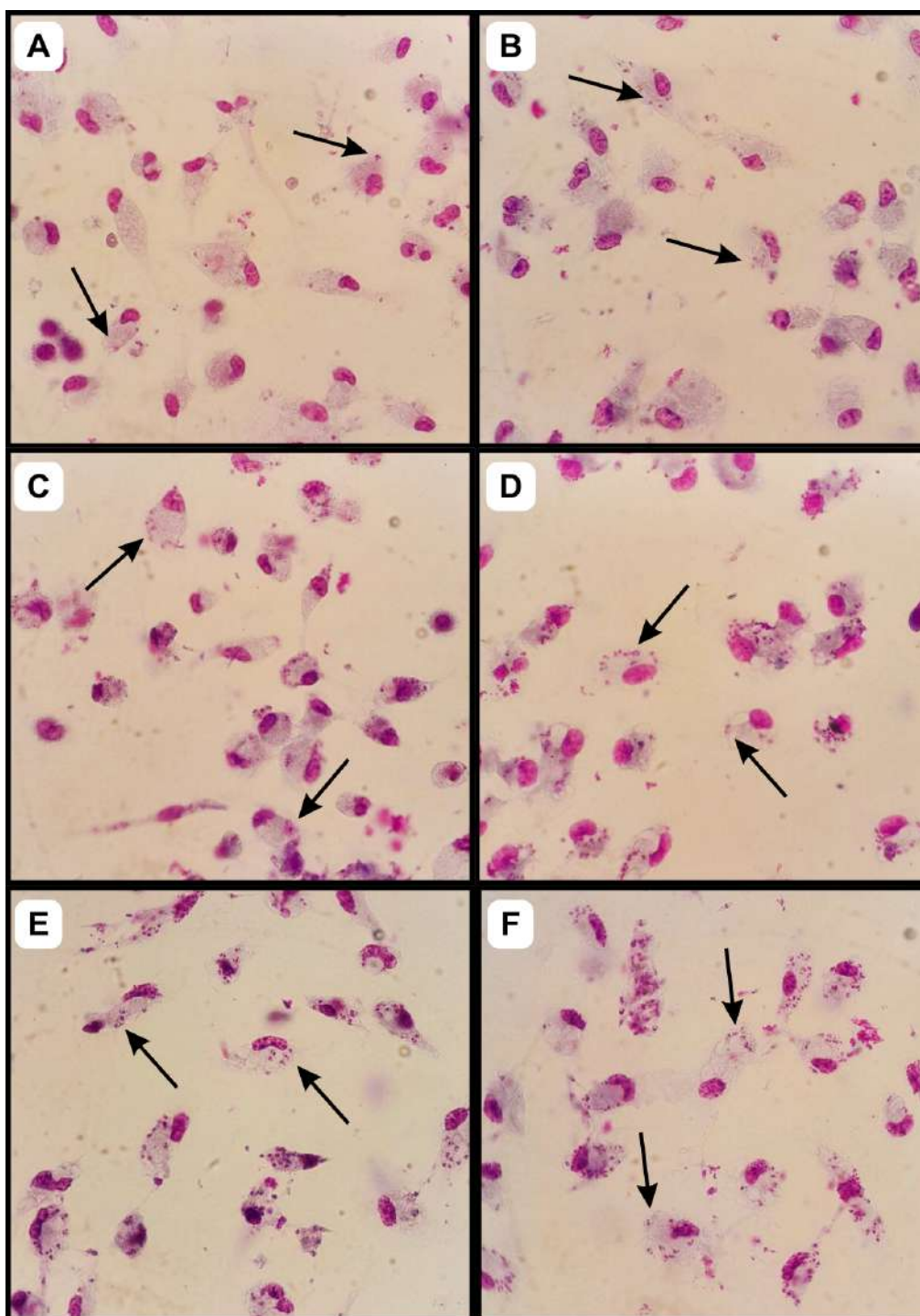


Figura 10: Atividade do composto TQCL em macrófagos infectados com *L. infantum*.

Foi realizada a infecção dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. infantum* na proporção 1:10 (macrófago/parasito) com interação por quatro horas. Após a lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com o composto por 72 horas, as células foram coradas com Giemsa com leitura em microscópio óptico. As concentrações utilizadas foram de 50 μM (A), 25 μM (B), 12,5 μM (C), 6,25 μM (D) e 3,12 μM (E), além do controle sem tratamento (F). As setas indicam formas amastigotas de *L. infantum* no interior de macrófagos. Imagens analisadas e fotografadas através da técnica de Microscopia Óptica observadas em aumento de 1000x. Fonte: Próprio autor.

4.2 Modo de ação do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum*

A fim de ampliar os estudos sobre o efeito do TQCL em *L. infantum*, foram utilizadas técnicas variadas e específicas para determinar os alvos associados ao modo de ação do composto. Nos ensaios com promastigotas, os parasitos foram tratados, por 24 horas, nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM , correspondentes a 1 e 2 vezes o CI_{50} (72 horas de tratamento). A escolha da dose do composto para estes estudos deve ser feita com cautela e, com base em dados do grupo, optou-se por utilizar o valor de CI_{50} como "concentração de referência" porém em um curto período de tratamento (24 horas), com o intuito de observar as alterações biológicas e bioquímicas antes da morte celular.

Nos ensaios com macrófagos infectados com *L. infantum*, foram utilizadas as mesmas concentrações dos ensaios da atividade em amastigotas intracelulares, ou seja, 50,0 μM ; 25,0 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM e 3,12 μM , uma vez que os sobrenadantes deste teste foram coletados para determinar os níveis de NO associados ao tratamento com TQCL.

4.2.1 Avaliação do composto TQCL na manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

A manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) desempenha um papel fundamental na homeostase mitocondrial. A disfunção mitocondrial em promastigotas tratados com o composto TQCL foi analisada pelo corante potenciométrico JC-1 que demonstrou uma redução significativa na razão de intensidade de fluorescência vermelha/verde de 52,96% e 51,73% após tratamento com o composto TQCL nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM , o que indicou despolarização da membrana mitocondrial (Figura 11). Parasitos tratados com FCCP reduziram o $\Delta\Psi\text{m}$ em 39,87%.

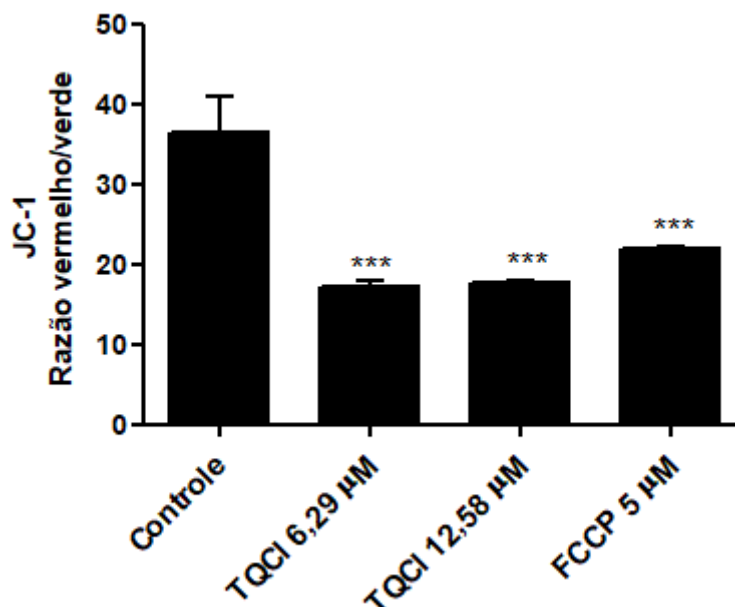


Figura 11: Alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL. Os parasitos não tratados (controle negativo) ou tratados com composto TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) foram marcados com corante fluorescente JC-1 após 24h de tratamento. FCCP a 5 μM foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos pela razão da fluorescência vermelha/verde. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,0001$ (***).

4.2.2 Efeito do composto TQCL na produção de EROs em promastigotas de *L. infantum*

A cadeia respiratória mitocondrial é o principal sítio de produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) (Fidalgo; Gille, 2011; Menna-Barreto, 2014). O estresse mitocondrial desencadeado pela perturbação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pode desencadear a geração excessiva de EROs. Esses EROs mitocondrial podem atravessar a membrana mitocondrial, atingir organelas e outras estruturas celulares no citoplasma, induzindo a oxidação de macromoléculas essenciais como proteínas, DNA e lipídios, desencadeando um acúmulo de danos irreversíveis que culminam na morte do parasito (Menna-Barreto, 2014).

Visto que o composto induziu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, avaliou-se se ocorreu a geração de radicais de oxigênio tóxicos na mitocôndria do parasito. Inicialmente, utilizou-se a sonda fluorescente H_2DCFDA , que é altamente sensível na quantificação de diferentes radicais derivados do oxigênio, principalmente radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Os resultados apresentados na Figura 12 mostraram que o tratamento com **TQCL** a $12\ \mu M$ levou ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em 188% em relação ao controle. A miltefosina, usada para comparação, também levou a um aumento de 262% nos níveis de ROS total.

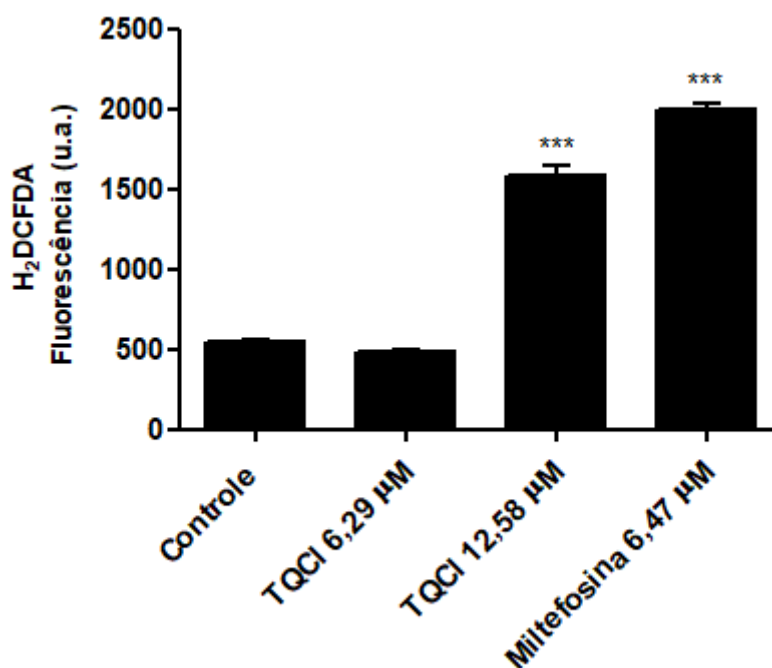


Figura 12: Produção de ROS em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas não tratados (controle negativo) ou tratados com o composto TQCL ($6,29\ \mu M$ ou $12,58\ \mu M$) foram marcados com H_2DCFDA após 24 h de tratamento. Miltefosina $6,47\ \mu M$ foi utilizado como controle positivo. A intensidade da fluorescência foi medida por fluorimetria e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (u.a.) dos resultados de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,0001$ (***).

4.4.3 Avaliação dos níveis de superóxido mitocondrial em promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL

Em seguida, avaliou-se os níveis de EROs utilizando-se o indicador Mitosox, que é específico para quantificação dos níveis de superóxido mitocondrial. O ânion superóxido são radicais intermediários formados pela redução incompleta do oxigênio, sendo um precursor para a geração dos radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (Menna-Barreto, 2014). O tratamento com a molécula induziu um aumento nos níveis de radicais superóxido de 26,11% após tratamento com a concentração de 12,58 μM do composto. O aumento na produção desses radicais após tratamento com miltefosina foi de 38,92% (Figura 13).

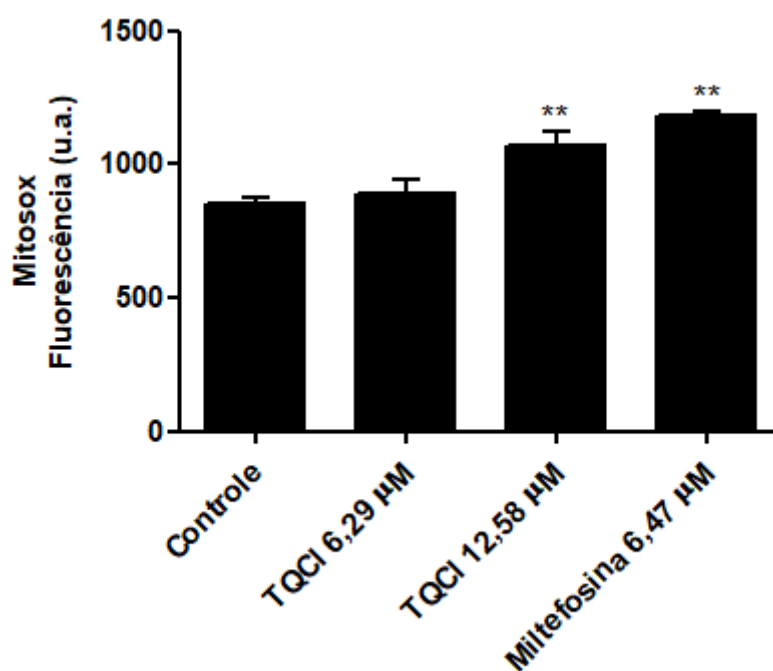


Figura 13: Produção de radicais superóxido em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas não tratados (controle negativo) ou tratados com o composto TQCL (6,29 μM ou 12,58 μM) foram marcados com MitoSOX após 24 h de tratamento. A miltefosina foi utilizada como controle positivo. Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com TQCL (6,29 μM e 12,58 μM) por 24 horas a 25 °C. Os parasitos foram então marcados com MitoSOX e a intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro a 540/600 nm de excitação/emissão. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**).

4.4.4 Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL

Considerando o dano mitocondrial e o estresse oxidativo observados nos promastigotas após o tratamento com o composto, os níveis de produção de corpúsculos lipídicos foi investigado usando a sonda fluorescente Nile Red que detecta principalmente lipídios neutros. O acúmulo destas organelas pode estar associado a uma tentativa de sobrevivência da célula para suprir sua necessidade energética sob condições de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Lee, 2013; Das Chagas Almeida, 2022). A formação de corpúsculos lipídicos também tem sido observada em decorrência da alteração na composição lipídica da membrana plasmática da *Leishmania*, devido ao acúmulo de lipídios precursores (Rodrigues, 2008). De acordo com os dados apresentados na Figura 14, os níveis de fluorescência foram significativamente maiores (15,33% e 34,62%) após tratamento com TQCL a 6,29 μ M e 12,58 μ M quando comparado ao controle não tratado.

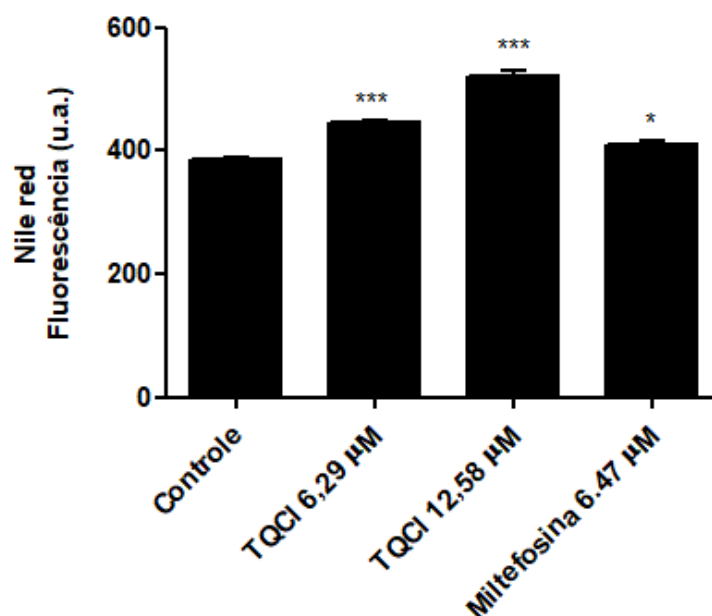


Figura 14: Avaliação da formação de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Promastigotas de *Leishmania infantum* foram incubados com o composto TQCL por 24 h e após foram marcados com o corante fluorescente Nile Red, e a intensidade da fluorescência foi avaliada usando um fluorímetro de microplacas. Miltefosina foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,01$ (*) e $P < 0,0001$ (***).

4.4.5 Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL

No intuito de avaliar se o modo de ação do composto TQCL envolve ruptura da membrana plasmática, evento associado à morte celular por necrose, realizou-se a marcação com iodeto de propídeo (PI). A membrana plasmática da *Leishmania* spp. e outros tripanossomatídeos apresenta diferenças constitutivas na sua composição lipídica e proteica em relação à membrana do hospedeiro mamífero, o que a torna um alvo crucial para a ação de drogas. Alterações na integridade da membrana plasmática podem levar à morte do parasito devido à formação de poros na membrana, falha no transporte de nutrientes e íons e no equilíbrio do pH (Amaral, 2024). De fato, os resultados demonstraram que o tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com o composto TQCL na concentração de 12,56 μM causou danos à membrana do parasito, evidenciado pelo aumento dos níveis de fluorescência do PI em aproximadamente 113,33% (Figura 15).

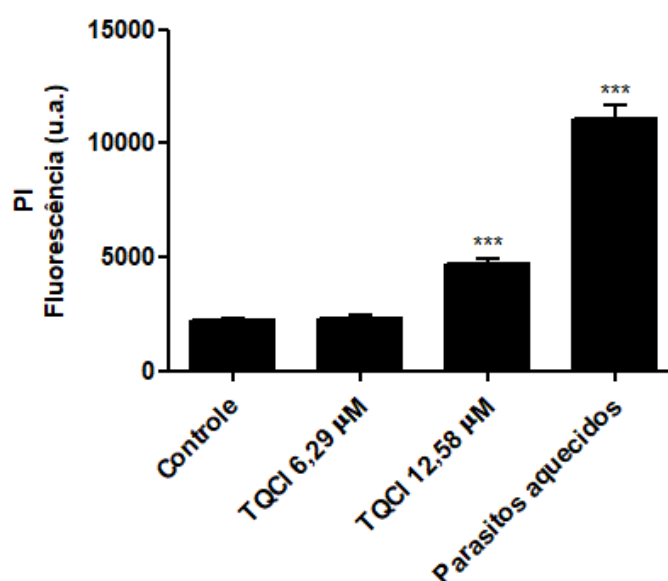


Figura 15: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL. Após o tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com 6,29 ou 12,56 μM do composto TQCL por 24h, os parasitos foram marcados com iodeto de propídeo (PI) e a intensidade de fluorescência foi avaliada usando um fluorímetro de microplacas. Como controle positivo foi realizado o aquecimento dos promastigotas por 10 minutos a 65°C. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,0001$ (***).

4.4.6 Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com TQCL

Foi também avaliada a possível ocorrência de morte por autofagia em promastigotas de *L. infantum* induzida pelo tratamento com o composto TQCL. Para isto foi realizada a marcação com MDC, um marcador para vacúolos autofágicos e as amostras foram avaliadas por fluorimetria. Os resultados mostraram que a intensidade de fluorescência foi significativamente reduzida em todas as concentrações avaliadas em comparação ao controle não tratado. Promastigotas submetidas à estarvação de nutrientes com PBS tiveram um aumento na formação de vacúolos autofágicos de 124,68% em relação ao controle não tratado (Figura 16).

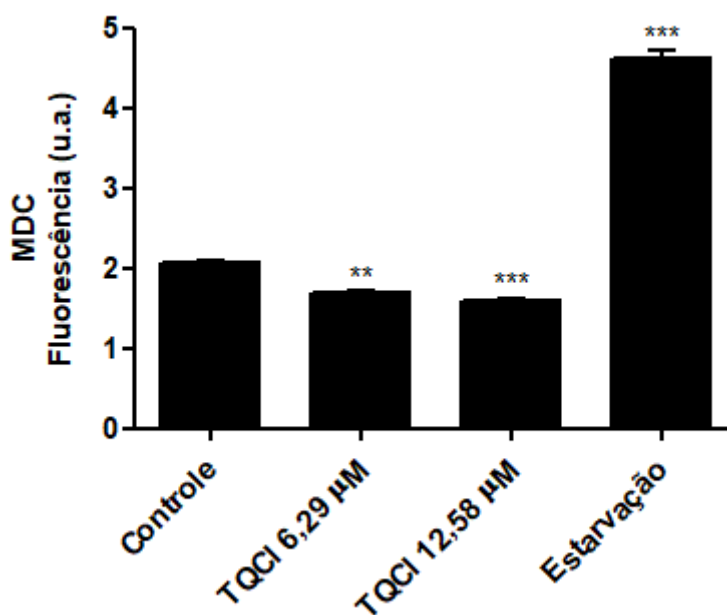


Figura 16: Avaliação do acúmulo de vacúolos autofágicos após tratamento dos promastigotas de *L. infantum* com TQCL. A formação de vacúolos de autofagia em promastigotas tratados com TQCL foi avaliada por fluorimetria após 24 h de incubação com o composto a 6,29 e 12,58 µM. Promastigotas incubadas com PBS por 24 horas foram utilizados como controle positivo. Os dados foram expressos como as médias de três experimentos independentes, que foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

4.4.7 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TQCL

A avaliação da externalização da fosfatidilserina foi realizada utilizando dupla coloração com Anexina V-FITC e PI, e conduzida por citometria de fluxo. O composto TQCL, na concentração de 12,58 μM , causou um aumento na população de promastigotas em estágios iniciais de apoptose (anexina V+, PI-), estágios tardios de apoptose (anexina V+, PI+) e necrose (anexina V-, PI+) de 4,65, 24,98 e 21,44 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle não tratado. Para a miltefosina, as alterações observadas foram: estágio inicial de apoptose (4,24 vezes), estágio tardio de apoptose (21,96 vezes) e necrose (5,02 vezes) (Figura 17).

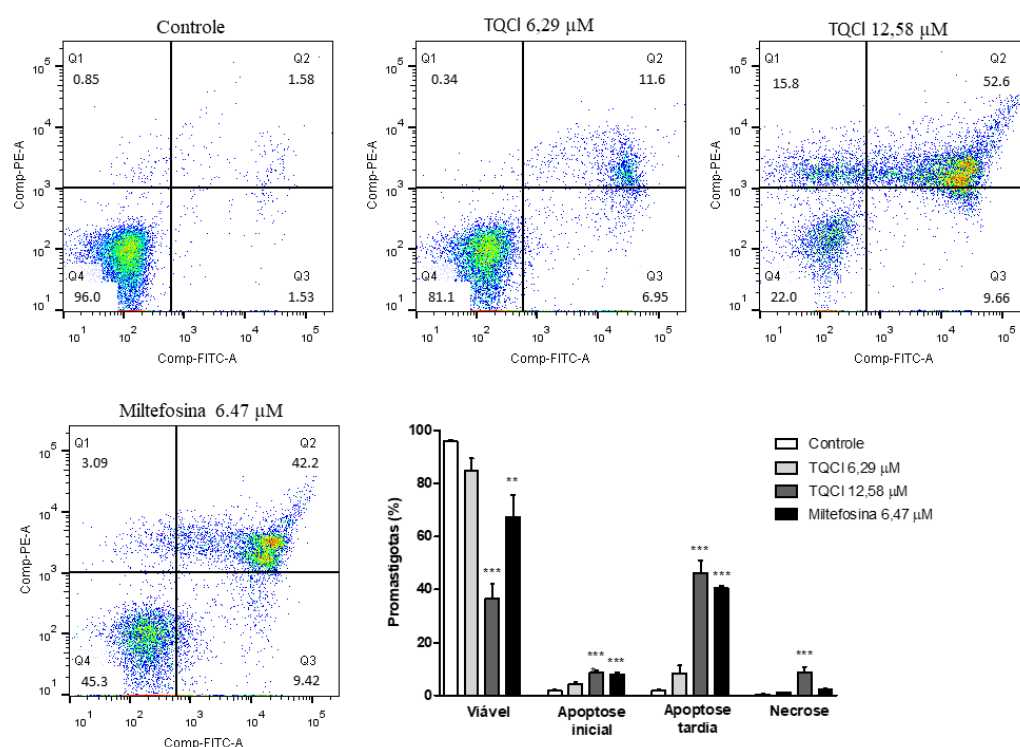


Figura 17: TQCL induz a exposição de fosfatidilserina na membrana celular de promastigotas de *L. infantum*. Os parasitos foram tratados com CI_{50} e $2 \times \text{CI}_{50}$ de TQCL por 24h. A exposição de fosfatidilserina foi avaliada por dupla coloração com as sondas fluorescentes anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). As células foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo BD FACSCanto II, com gráficos de dispersão representativos de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

4.4.8 Avaliação das alterações do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum* tratados com TQCL

Para avaliar o efeito do TQCL na regulação do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum*, realizamos coloração com iodeto de propídio (PI), um corante intercalante ao DNA, seguida de análise por citometria de fluxo. A Figura 18 mostra que o tratamento com TQCL interfere na progressão do ciclo celular dos parasitos. Observou-se que 34,5% dos parasitos não tratados estavam na fase G0/G1 do ciclo celular, enquanto que, no tratamento com TQCL nas concentrações de 6,29 μM ou 12,58 μM , observou-se que 42,8% e 47,6% dos parasitos estavam nessa fase, respectivamente. Além disso, houve uma diminuição significativa na fase G2/M do ciclo celular após o tratamento com TQCL.

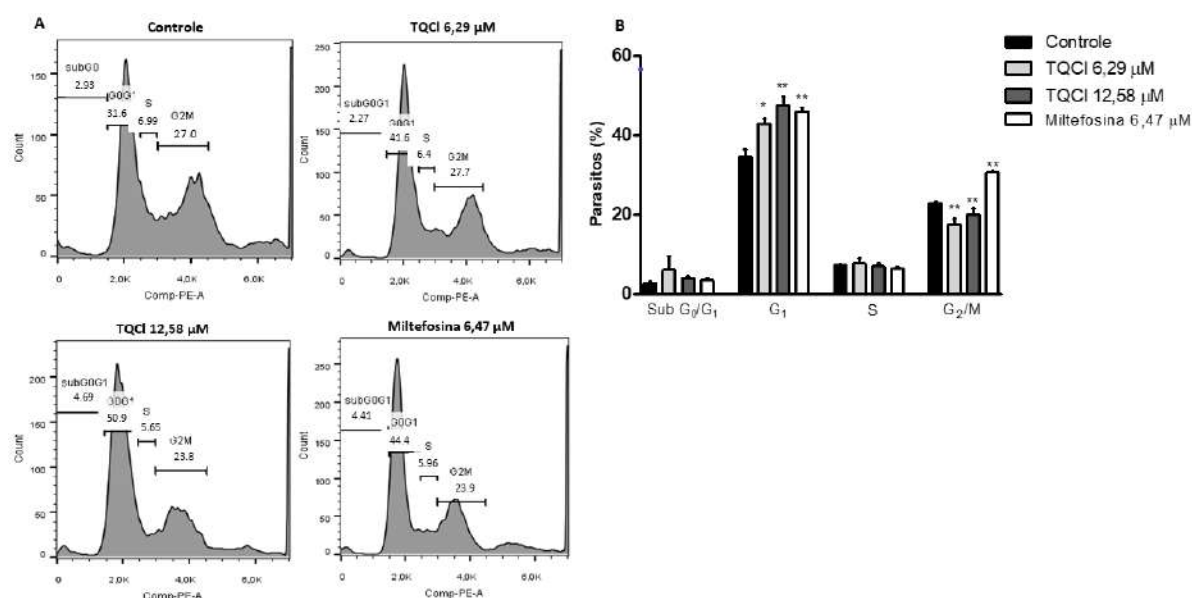


Figura 18: Análise das alterações do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL. (A) Histograma mostrando a análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo após tratamento com TQCL (6,29 μM e 12,58 μM) ou miltefosina (6,47 μM) por 24 h. Um total de 10.000 eventos foram analisados. Os histogramas foram obtidos utilizando o software FlowJo versão 10. (B) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os dados foram expressos como a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,01$ (*) e $P < 0,001$ (**).

4.4.9 Avaliação dos níveis de NO produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum*

Com o objetivo de verificar o estímulo da atividade microbicida de macrófagos infectados com promastigotas de *L. infantum* tratados com TQCL, avaliou-se a produção de NO, quantificado de forma indireta através da determinação dos níveis de oxidação do nitrito. O tratamento com TQCL nas concentrações de 50 μ M, 25 μ M e 12,5 μ M induziu significativamente, de maneira dose-dependente, aumento nos níveis de nitrito de 18,1, 11,7 e 8 vezes, respectivamente, em macrófagos tratados quando comparados aos macrófagos infectados não tratados (Figura 19).

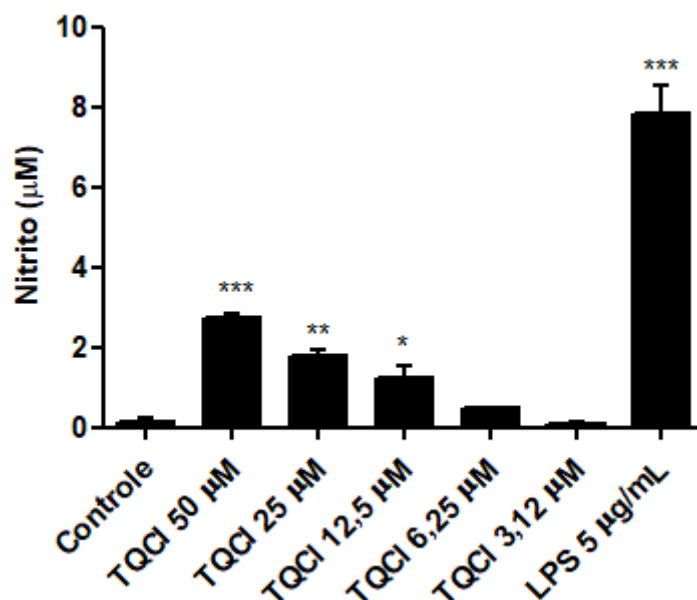


Figura 19: Avaliação dos níveis de NO produzidos por macrófagos infectados com *L. infantum*. Macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. infantum* foram incubados em diferentes concentrações do composto (3.12 μ M - 50 μ M) durante 48h. Os níveis de nitrito foram quantificados utilizando sobrenadante da cultura de macrófagos infectados pela metodologia de Griess. Macrófagos infectados e estimulados com LPS foram utilizados como controle positivo. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Dunnett: $P < 0,01$ (*), $P < 0,001$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

4.5 Avaliação das alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. infantum* tratadas com TQCL

A avaliação ultraestrutural em promastigotas de *L. infantum* foi realizada por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com as concentrações de 1x e 2x o valor para CI_{50} , para análise em ambas as técnicas de microscopia. Os achados estão descritos a seguir.

4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Analisando as imagens obtidas após a MEV, o controle negativo (sem tratamento) e as células incubadas com DMSO não apresentaram alterações morfológicas, mantendo preservada sua morfologia típica alongada. Já no tratamento com 1x o CI_{50} , o composto TQCL induziu alterações importantes, sendo observadas células arredondadas com leve rugosidade na membrana, com alguns parasitos apresentando debris próximos ao flagelo. Estes efeitos foram ainda mais marcantes quando os promastigotas foram tratados na concentração de 2x o CI_{50} , com pronunciada redução e arredondamento do corpo celular, encurtamento do flagelo e grande número de debris celular (Figura 20).

Tais achados da MEV reforçam o efeito tóxico do composto em promastigotas de *L. infantum*, com alterações morfológicas significativas detectadas a partir da menor concentração utilizada (1x IC_{50}), indicando possível comprometimento da membrana plasmática e da estrutura flagelar. Além disso, é possível observar que o aumento da dose para de 2x CI_{50} , potencializa o efeito danoso, sugerindo perda da viabilidade celular.

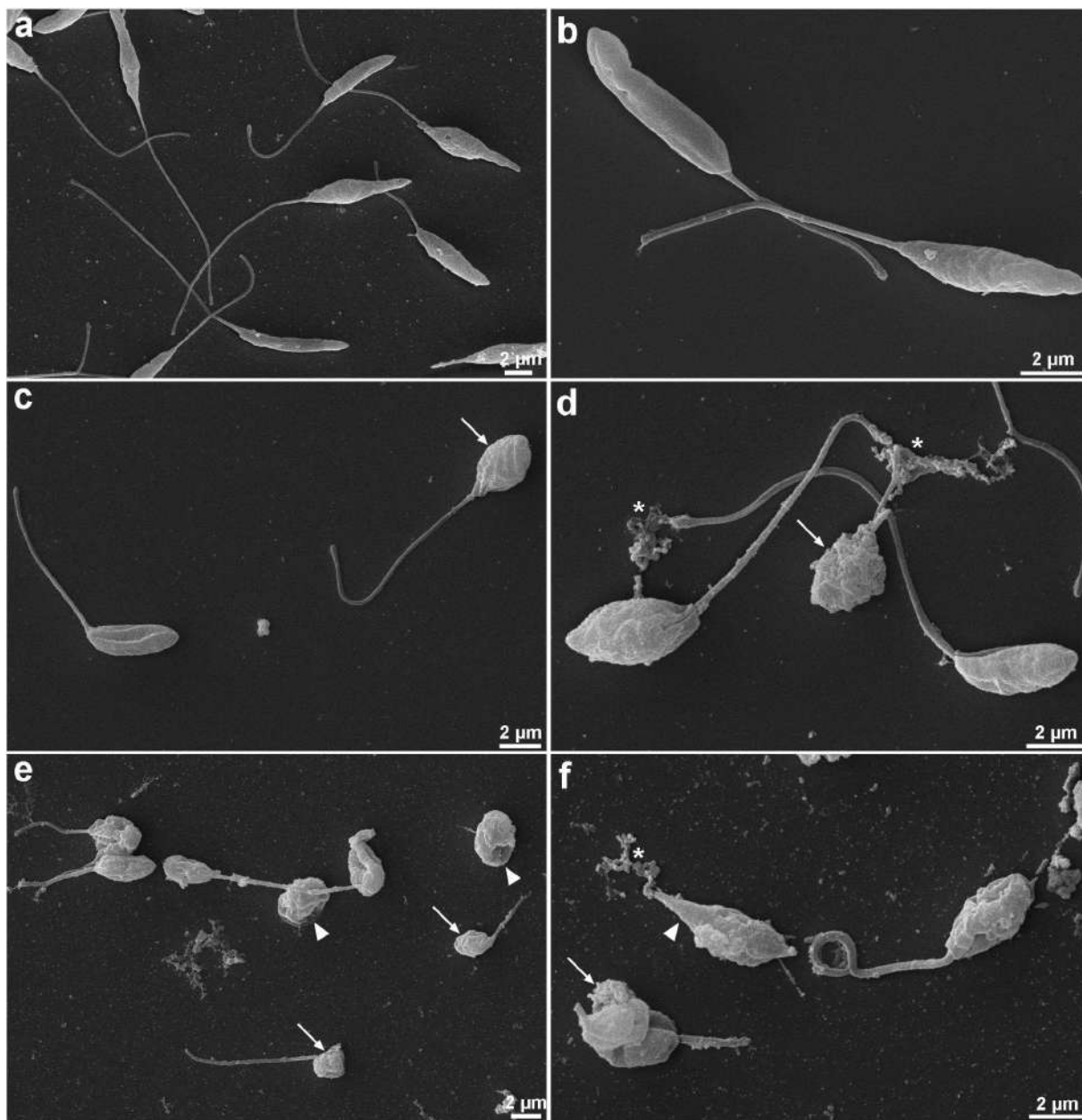


Figura 20: Análise morfológica do efeito do TQCL em promastigotas de *Leishmania infantum*. (a-f) São apresentadas as micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (a) Controle demonstrando diferentes parasitos em sua morfologia alongada típica. (b) Parasitos apresentando morfologia preservada após incubação com o solvente orgânico DMSO. (c-d) **TQCL** a 6,29 μM : Células com morfologia arredondada (seta) e com leve rugosidade na membrana. Alguns parasitos apresentam debris próximo ao flagelo (asterisco). (e-f) **TQCL** a 12,58 μM : Parasitos com a morfologia arredondada (seta), encurtamento do flagelo (cabeça de seta) e debris celular (asterisco).

4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Inicialmente é possível observar na Figura 21 que os parasitos no grupo controle (sem tratamento - Figura 21A e B) e nos tratadas com DMSO (Figura 21C), apresentam formas típicas bem preservadas, com corpo celular alongado e citoplasma íntegro sem alteração ultraestrutural. Já para o tratamento de promastigotas na concentração de 1x o CI_{50} , foram observadas alterações ultraestruturais significativas, tais como inchaço mitocondrial, presença de gotas lipídicas, além de vacúolos com membranas eletrondensas ao lado da bolsa flagelar, bem como células com conteúdo citoplasmático extraído (Figura 21D e E). Assim como observado na MEV, as alterações em promastigotas tratados com 2x CI_{50} foram ainda mais evidentes, com dano mitocondrial acentuado, caracterizado não apenas pelo inchaço da organela mas também pela ausência das cristas, indicando prejuízo celular avançado e possível comprometimento da viabilidade do parasito.

As alterações observadas na MET indicam forte atuação do composto **TQCL** em promastigotas de *L. infantum*, provocando alterações progressivas com dano direcionado principalmente à mitocôndria, evidenciado pelo inchaço mitocondrial, além de possivelmente alterar o metabolismo lipídico dos parasitos em resposta ao estresse celular, devido a presença de gotas lipídicas observadas no tratamento com a menor concentração analisada.

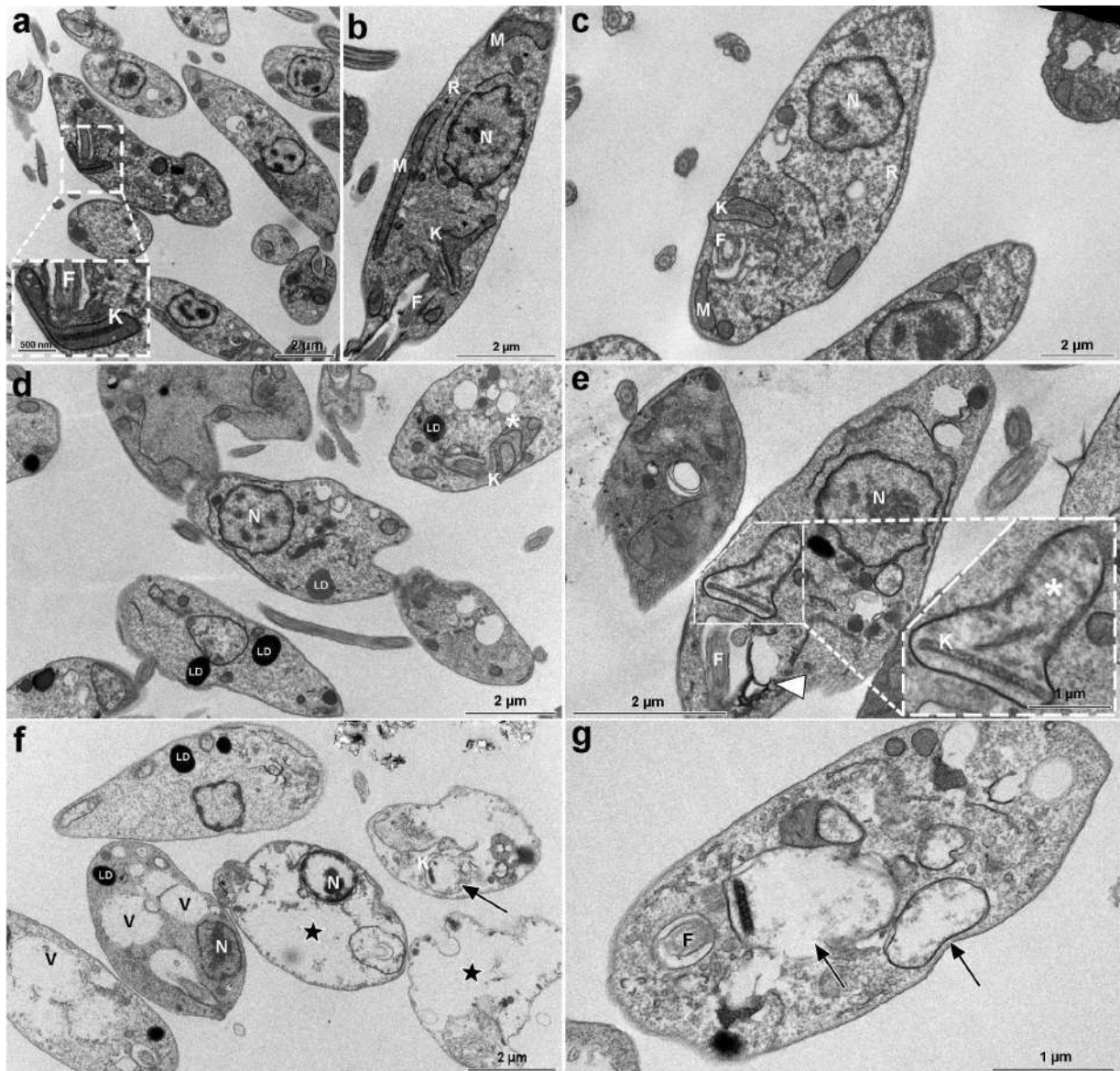


Figura 21: Análise ultraestrutural dos efeitos do TQCL em promastigotas de *Leishmania infantum*. (a-b) Controle apresentando algumas estruturas citoplasmáticas do parasito bem preservadas, além do corpo celular alongado e citoplasma íntegro. (c) Parasitos tratados com o DMSO não apresentam alteração ultraestrutural. (d-e) Parasitos tratados com TQCL a 6,29 μM . (d) Note um inchaço mitocondrial (asterisco) e a presença de gotas lipídicas (LD). (e) É possível observar inchaço mitocondrial (inset, asterisco). Foi observado vacúolo com membranas eletrondensas ao lado da bolsa flagelar (cabeça de seta). (f, g) Parasitos tratados com TQCL a 12,58 μM : Presença de gotas lipídicas (LD), inchaço mitocondrial sem a presença de cristas (seta). Note presença de grandes vacúolos (v) e células com conteúdo citoplasmático extraído (estrela). Núcleo (N), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), retículo endoplasmático (R), flagelo (F).

4.6 Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL utilizando gráfico no modelo “Mapa de calor” e “Spider plot”

Com o objetivo de obter uma maior compreensão do modo de ação do composto TQCL e a interação entre eles, foi realizada análise gráfica quantitativa em modelo de “Mapa de Calor” e “Spider plot” com base nos resultados obtidos nos experimentos. Os dados experimentais utilizados na confecção dos gráficos incluem: avaliação do potencial de membrana mitocondrial, estresse oxidativo (ROS e superóxido), quantificação de gotículas lipídicas, permeabilização da membrana (captação de iodeto de propídio), exposição de fosfatidilserina (coloração com Anexina V/PI), distribuição do ciclo celular e ensaios de autofagia. Os dados foram normalizados na escala de 0 (controle) a 1 (efeito máximo). As concentrações do composto TQCL utilizadas foram de 6,29 μM e 12,58 μM .

4.6.1 Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL em gráfico no modelo “Mapa de calor”

Com base no Mapa de calor, que correlaciona os efeitos do composto TQCL, é possível observar uma forte relação causal entre alguns eventos bioquímicos com correlação quase absoluta entre ROS total, radicais superóxido e permeabilidade da membrana plasmática ($r \geq 0,99$). Tal fato corrobora com a hipótese de que a peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo gera, consequentemente, dano à membrana plasmática. A exposição de fosfatidilserina (PS) e a parada do ciclo celular (G0/G1) obteve correlação de $r = 0,96$, indicando que a interrupção da replicação do DNA e a sinalização de morte celular a partir da externalização da fosfatidilserina são eventos correlacionados e integrados (Figura 22).

O coeficiente negativo entre a alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) e os marcadores de dano confirma a hipótese de que a perda do potencial de membrana é o gatilho central para uma cascata de eventos subsequentes. Os eventos como ROS total, formação de radicais superóxido, corpúsculos lipídicos, alteração da permeabilidade de membrana e exposição de fosfatidilserina apresentam correlações muito altas entre si (0,71 a 0,99), sugerindo que o aumento do estresse oxidativo está fortemente associado a danos de membrana e ativação de apoptose.

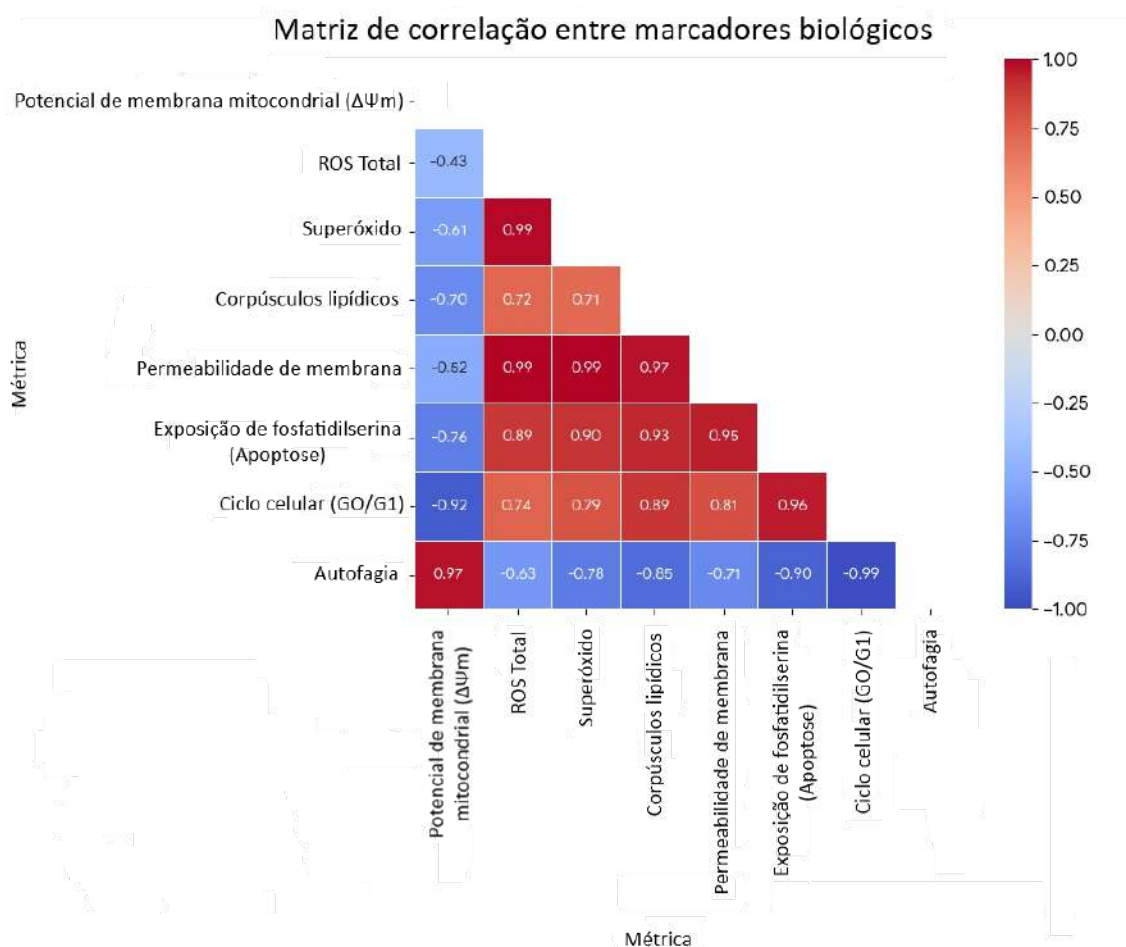


Figura 22: Mapa de calor dos efeitos celulares integrados do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum* após 24h de tratamento nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM . As relações entre os processos celulares induzidas pelo composto foi realizada através da “Matriz de correlação entre marcadores biológicos.” As relações foram representadas em escala de cores variando de intensidade na cor azul e vermelha, sendo mais próximo da cor vermelha (+1) indicativo de forte correlação linear, enquanto valores mais próximos da cor azul (-1), indicam relação negativa. Valores próximos de zero representam ausência de correlação linear. As análises computacionais, normalização de dados e representação gráfica foram realizadas utilizando software Python (3.10), biblioteca Pandas (v1.5), NumPy (v1.23), Matplotlib (v3.6) e Seaborn (v0.12).

4.6.2 Avaliação integrada do modo de ação do composto TQCL em gráfico no modelo “Spider plot”

O gráfico em modelo “Spider plot”, como mostra a Figura 23, demonstra que alguns efeitos do composto foram bem relevantes, incluindo a alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que atingiu o impacto máximo (próximo a 1,0) na concentração de 6,29 μM e também na concentração de 12,58 μM , evidenciando que o composto apresenta foco biológico na mitocôndria, precocemente a outros danos bioquímicos.

O composto demonstrou efeito mesmo na menor concentração analisada (6,29 μM), com efeito moderado na parada do ciclo celular, indução da exposição da fosfatidilserina, formação de corpúsculos lipídicos e discreta alteração na permeabilidade de membrana, indicando um efeito moderado, mas ainda presente, sem provocar colapso multissistêmico.

Na concentração de 12,58 μM , o gráfico revela que os danos causados pelo TQCL são mais relevantes, principalmente para os ensaios de exposição de fosfatidilserina, formação de corpúsculos lipídicos, alteração da permeabilidade da membrana plasmática e parada do ciclo celular. Além disso, ainda é observada uma ação direcionada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de superóxido. Esses dados revelam que o composto na concentração mais elevada gera uma resposta biológica que evolui para um colapso multissistêmico e perda da viabilidade celular, sugerindo dano mitocondrial e estresse oxidativo intenso.

A miltefosina, fármaco de referência utilizado como comparativo dos ensaios experimentais, apresentou forte ação na produção de ROS total, produção de superóxido, parada do ciclo celular e exposição de fosfatidilserina. Ressalta-se que o composto TQCL apresentou efeito maior que a miltefosina nos parâmetros de produção de corpúsculos lipídicos, exposição de fosfatidilserina e parada do ciclo celular.

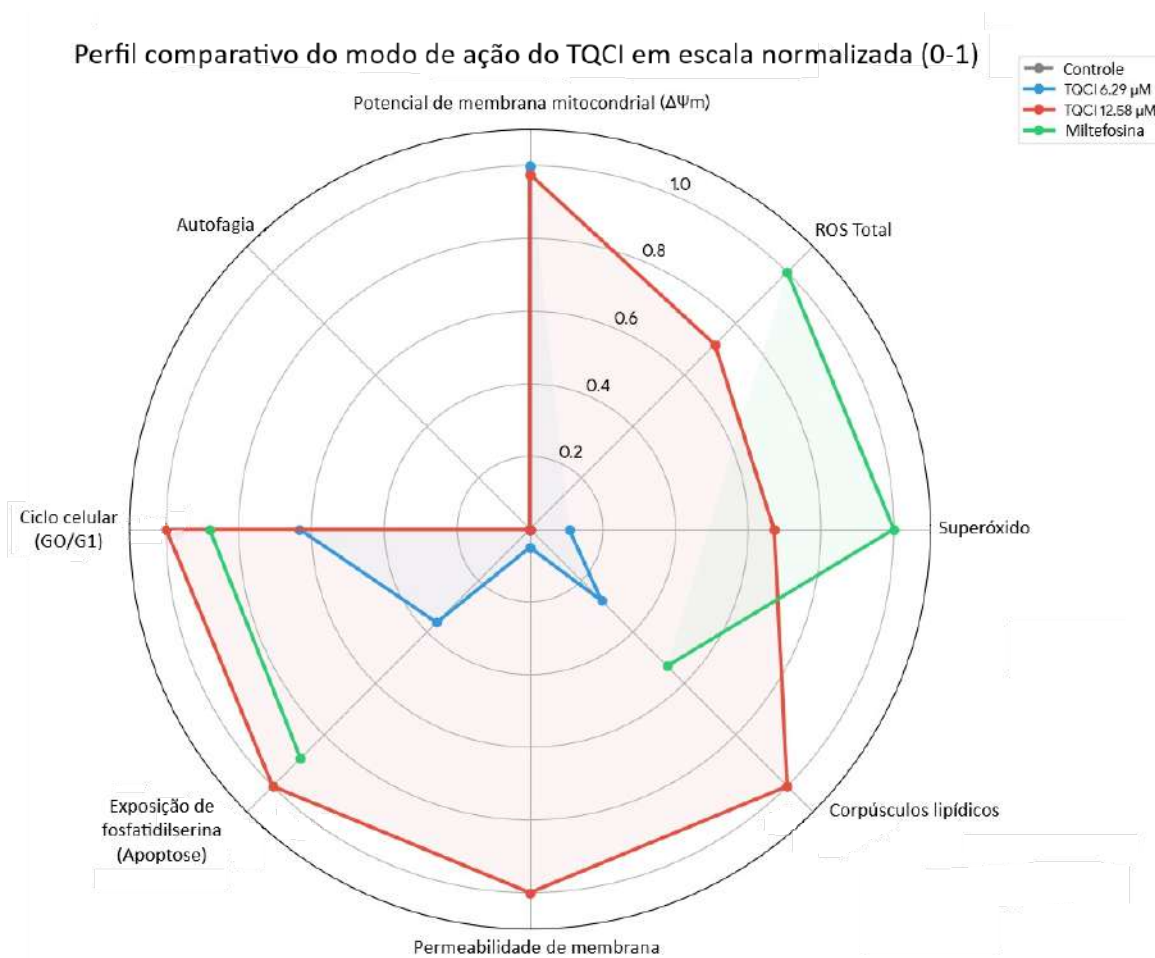


Figura 23: Gráfico em modelo “Spider plot” dos efeitos celulares integrados do composto TQCL em promastigotas de *L. infantum* após 24h de tratamento nas concentrações de 6,29 μM e 12,58 μM . Cada eixo do gráfico representa um parâmetro experimental normalizado em uma escala de 0 (nenhum efeito detectável) a 1 (efeito máximo observado em relação aos controles não tratados). A normalização foi fundamentada na variação percentual ou na razão de mudança obtida a partir do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), estresse oxidativo (ROS e superóxido), acúmulo de corpúsculos lipídicos, permeabilização da membrana plasmática, exposição de fosfatidilserina, distribuição do ciclo celular e avaliação da autofagia. O gráfico “Spider plot” reflete a magnitude do efeito e não implica relevância biológica hierárquica entre as vias. As análises computacionais, normalização de dados e representação gráfica foram realizadas utilizando software Python (3.10), biblioteca Pandas (v1.5), NumPy (v1.23), Matplotlib (v3.6) e Seaborn (v0.12).

5 DISCUSSÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças transmitidas por vetores que afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. Com diversos tipos de manifestações clínicas, a forma visceral é a apresentação considerada mais grave, com taxa de óbito acima de 95% para casos sem tratamento. Ainda há bastante dificuldade na identificação e diagnóstico correto da doença, além das limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, que provocam múltiplos efeitos colaterais nos pacientes. Em virtude da ausência de imunização preventiva, o tratamento medicamentoso configura-se como a única alternativa terapêutica atualmente disponível, que apresenta falhas importantes, incluindo resistência medicamentosa e recidivas (Majoor, 2025). Considerando esses fatores, a investigação de novos agentes terapêuticos surge como uma estratégia para superação dessas limitações.

Neste trabalho, o composto análogo de quinolina contendo 2-aminotiofenol, denominado **TQCL** foi avaliado para verificar seu efeito antileishmanial e o modo de ação em *L. infantum*, espécie responsável por causar a leishmaniose visceral humana (LVH) e a leishmaniose visceral canina (LVC). Os derivados de quinolina têm sido avaliados como potenciais agentes terapêuticos em estudo com *Leishmania* spp. devido a suas propriedades farmacológicas e versatilidade estrutural (Antinarelli, 2015; 2016; 2023; Coimbra, 2016; Glanzmann, 2021). Estudos com compostos quinolínicos recentes demonstraram que esse grupo possui atividade leishmanicida expressiva associada ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Essas alterações predominantes levam a perturbações em processos celulares bioenergéticos que convergem para perda da viabilidade celular e consequente morte parasitária (Romero, 2025b).

Em relação aos resultados da atividade antileishmanial do composto **TQCL**, pode-se destacar que sua atividade em promastigotas e amastigotas de *L. infantum* foi relevante, apresentando $CI_{50} < 10 \mu M$ e índice de seletividade (IS) > 10 , indicando alta potência, atuando em baixas concentrações, além da boa seletividade para o parasito, demonstrando um perfil antileishmanial promissor. Além disso, o composto atende aos critérios definidos pelo DNDi “Drugs for Neglected Diseases initiative” que estabeleceu que novos compostos antileishmaniais devem apresentar $CI_{50} < 10 \mu M$ para amastigotas intracelulares e IS > 10 , além de um adequado perfil farmacocinético *in silico* pelas análises ADMET (Don, 2014).

O efeito antileishmanial de derivados de quinolina tem sido relacionado a sua lipofilicidade e natureza básica, que favorecem a atividade antiparasitária. Essas características promovem o acúmulo do composto dentro do fagolissossomo e em determinadas organelas, como lisossomos, mitocôndria, e também no citosol, devido sua penetração lipofílica e mecanismo de “aprisionamento iônico,” no qual a captação da molécula é estabelecida através da geração de uma forma polar e catiônica pela protonação de grupos básicos em ambiente ácido (Romero, 2025a,b).

A mitocôndria presente em *Leishmania* spp. possui características morfológicas e funcionais distintas de células de mamíferos. A principal diferença que torna essa organela singular neste protozoário e em outros tripanossomatídeos é a disponibilidade de uma única mitocôndria de tamanho grande, que percorre grande parte do corpo do parasito, desempenhando diversas funções relacionadas a energia e processos metabólicos oxidativos, homeostase de cálcio, atividade enzimática antioxidante, dentre outros mecanismos. Além disso, a mitocôndria apresenta uma região denominada cinetoplasto, cuja função principal é compartimentar o DNA mitocondrial. Para o adequado funcionamento da cadeia respiratória, é essencial a preservação da integridade mitocondrial, incluindo o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$); sua alteração ou redução compromete a homeostase celular, levando ao esgotamento energético e à consequente ativação de vias de morte celular no parasito. (Souza, 2025; Fidalgo 2011).

Nos ensaios com **TQCL** em promastigotas de *L. infantum*, o composto induziu alterações ultraestruturais e bioquímicas em nível mitocondrial relevantes após o tratamento nas duas concentrações avaliadas, evidenciadas pelo inchaço mitocondrial e perdas de cristas, além da disfunção mitocondrial observada pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), detectadas por análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ensaios com sondas específicas. Ainda, promastigotas de *L. infantum* tratados com **TQCL** exibiram altos níveis de radicais superóxido e espécies reativas de oxigênio (EROs) “total”, os quais incluem peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos e peroxinitrito, demonstrando estresse oxidativo induzido pelo composto. A cadeia respiratória mitocondrial gera EROs, que são biomoléculas sinalizadoras nos processos de proliferação e crescimento celular (Tomás, 2013; Menna-Barreto, 2014).

O equilíbrio entre a atividade mitocondrial e a produção de EROs constitui fator importante para a homeostase celular do parasito. Dessa forma, alterações mitocondriais ocasionadas pelo desequilíbrio do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) podem resultar em formação exacerbada de EROs, os quais ao ultrapassar a membrana mitocondrial, leva a danos a organelas e estruturas citoplasmáticas, gerando alterações em vias metabólicas e biossintéticas, resultando em danos em biomoléculas como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Tomás, 2013).

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas com características dinâmicas formadas por um núcleo de lipídio neutro que é envolto por fosfolipídios e proteínas vinculadas. Sua principal função é o armazenamento de energia em situação de privação de nutrientes, além de atuar na regulação da homeostase lipídica e síntese de lipídios de membrana utilizados durante a replicação e diferenciação do parasito. Desempenha também papel nos processos de sinalização celular, fundamentais na resposta imune e inflamatória do hospedeiro, como a produção de eicosanóides (Tavares, 2022).

O tratamento com o composto **TQCL** em promastigotas de *L. infantum* resultou em acúmulo de CLs, como pode ser demonstrado no ensaio celular por meio de fluorescência detectada pela sonda Nile Red e pela análise ultraestrutural através da MET. Tais dados sugerem que o composto interrompe o metabolismo lipídico, que pode estar relacionado a resposta frente ao estresse oxidativo, servindo dessa forma como aporte energético ao parasito, se comportando como um mecanismo de sobrevivência celular. Outros trabalhos com derivados de quinolina também apontam para a interferência no sistema bioenergético, modificando processos bioquímicos relacionados a despolarização do potencial da membrana mitocondrial, ao aumento dos níveis de EROS e à formação de gotículas lipídicas (Calixto, 2018; Antinarelli, 2015, 2023; Staderini, 2019; Sousa, 2019).

Além da mitocôndria, a membrana plasmática da *Leishmania* spp. difere dos mamíferos, com composição única e estrutura altamente especializada. Sua estrutura é formada por bicamada lipídica, uma série de proteínas e glicoconjugados, que em sua maioria estão ancorados na superfície da membrana. A membrana plasmática é um dos principais alvos de compostos e fármacos antileishmanicidas, esse fato é explicado pela ação que a membrana promove, absorvendo nutrientes, participando do processo de diferenciação do protozoário, proteção do sistema imune, ou seja, representa papel essencial na sobrevivência do parasito (Rios-Barros, 2025).

As membranas celulares e das organelas são particularmente sensíveis a danos por EROS devido a sua característica altamente lipídica. Dessa forma, a produção de EROS em excesso pode ocasionar oxidação lipídica desmesurada alterando os fosfolipídios presentes na membrana, formando poros, desequilibrando o pH e transporte de nutrientes, processos que atuando em conjunto e de forma contínua, provocam em último estágio a morte celular (Glanzmann, 2021; Amaral, 2019).

Conforme discutido sobre a importância que a membrana plasmática e a membrana das organelas representam, sendo foco de fármacos com alvo em *Leishmania* spp., podemos evidenciar que a marcação com iodeto de propídeo (PI) mostrou que o composto na concentração de 12,56 μ M provocou danos a membrana do parasito, alterando a integridade da membrana plasmática, fator esse que está intimamente relacionado à morte celular por necrose e alterações celulares que culminam com a perda da viabilidade parasitária. Além disso, o **TQCL** demonstrou promover a intensa externalização de fosfolipídios da membrana plasmática na concentração de 12,56 μ M, caracterizada pela mudança substancial nas populações de parasitos em direção a estágios iniciais e tardios de apoptose, evidenciando alterações importantes em membrana celular, alterando sua permeabilidade e composição fosfolipídica.

A compreensão do tipo de morte celular em *Leishmania* spp. constitui fator importante em estudos com compostos antileishmaniais, pois há evidências de que a exposição a determinados agentes farmacológicos ativam diferentes vias de morte celular no parasito. A necrose é um processo de morte celular passivo, relacionado muitas vezes a falhas de processos bioenergéticos, com depleção de ATP ocasionados por danos físicos ou agressões tóxicas. Ao contrário da apoptose, no processo de necrose há ruptura da membrana plasmática, com liberação de conteúdo celular e consequente inflamação, além de vacuolização do citoplasma. Os processos de morte celular muitas vezes podem estar interligados como ocorre, por exemplo, na produção de EROs, na qual em estágio inicial são observados em processos apoptóticos, mas em produções excessivas, podem induzir morte por necrose (Rodrigues, 2006; Luder, 2010).

A apoptose é um tipo de morte celular programada e está relacionada com o processo biológico responsável por manter o equilíbrio celular. Esse processo envolve eventos bioquímicos com a função de eliminar células sem extravasamento de conteúdo celular e, por conseguinte, sem relevante resposta inflamatória. Em resposta contra organismos intracelulares, macrófagos podem disparar a apoptose como estratégia de defesa, limitando a

multiplicação e realizando eliminação desses patógenos. A apoptose constitui, assim, um mecanismo importante de homeostase geral, com participação em eventos celulares e imunológicos. Não somente, há evidências de que parasitos como *Leishmania* spp. tem a capacidade de modular vias de apoptose em células hospedeiras, favorecendo sua sobrevivência no ambiente intracelular. Especificamente em *Leishmania* spp., marcadores de apoptose incluem exposição de fosfatidilserina, encolhimento celular, fragmentação de DNA, perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e produção de ROS (Luder, 2010; Fernandes, 2024).

Neste sentido, promastigotas de *L. infantum* tratados com **TQCL** demonstraram indicativos de morte por apoptose. Por exemplo, foram observadas alterações importantes no ciclo celular do parasito, seja pela técnica de citometria de fluxo que demonstrou parada do ciclo celular na fase G0/G1 e, consequente inibição da progressão para as fases subsequentes de síntese (S) e G2/M (Ali, 2021), mas também pela MEV, na qual foram verificadas alterações flagelares indicativas de comprometimento do ciclo celular do parasito, tais como encurtamento ou duplicação de flagelos. O ciclo celular em *Leishmania* spp. permite que os processos de crescimento, diferenciação e replicação sejam realizados de forma adequada, além disso, essa progressão do ciclo celular é sensível ao estresse oxidativo eventual ou induzido por drogas, o qual pode resultar em parada do ciclo celular e prejudicar a divisão celular do parasito (Assis, 2021; Ventura Silva, 2025).

Tripanossomatídeos apresentam a característica de possuir um sistema autofágico com função essencial na renovação e reciclagem celular, além de remover componentes celulares danificados, favorecendo dessa forma, uma boa regulação da homeostase durante os processos de diferenciação e crescimento parasitário, que atua na prevenção contra a autodestruição excessiva. A autofagia é caracterizada como um processo de autodigestão de organelas não funcionais e/ou macromoléculas, sendo restrita a componentes celulares danificados. Esse processo promove a homeostase através da reciclagem de elementos, principalmente em condições de estresse e falta de nutrientes, além disso, também configura como um processo essencial na fase de crescimento e diferenciação celular. A formação de vacúolos autofágicos, delimitados por dupla membrana, associados à intensa vacuolização citoplasmática e ao sequestro de organelas, constitui uma das principais características morfológicas observadas do processo de autofagia em *Leishmania* spp. (Luder, 2010; Pedra-Rezende, 2022).

A autofagia atua principalmente como mecanismo de sobrevivência, mas a sua ativação exacerbada contribui para evolução para morte celular, configurando-se como um fator associado a esse processo. (Rodrigues, 2006). Assim, quando há perda da homeostase celular, ocorre ativação do sistema autofágico, que em níveis exacerbados ocasiona degradação do citosol e organelas essenciais, resultando em perda da integridade do parasito e de suas funções celulares (Pedra-rezende, 2022 e Romano, 2023). Na avaliação da ocorrência de morte por autofagia, o composto **TQCL** nas duas concentrações analisadas não demonstrou a indução de vacúolos autofágicos característicos do processo de autofagia, mas evidenciou uma intensa vacuolização citoplasmática em promastigotas de *L. infantum*, indicando um processo de paraptose nessas células.

A paraptose é um tipo de morte celular recentemente descoberta nos anos 2000, sua definição está relacionada com o prefixo “para” indicando proximidade a apoptose. A paraptose está intimamente vinculada à apoptose, ocorrendo de forma simultânea nas células, mas diferentemente da apoptose, a paraptose não envolve ativação de caspases e não há fragmentação do DNA. Algumas características da paraptose incluem o inchaço do retículo endoplasmático e mitocôndrias, levando a formação de grandes vacúolos citoplasmáticos e ativação de vias de sinalização. Os mecanismos envolvidos na indução da paraptose incluem alterações na proteostase celular, desequilíbrios na homeostase iônica, além de indução por agentes quimioterápicos. A indução da paraptose tem sido investigada em quimioterápicos nos estudos com células tumorais, pois compostos que induzem paraptose apresentam vantagem para os tumores resistentes à quimioterapia, obtendo diferencial por possuírem múltiplos mecanismos, em relação aqueles que induzem somente apoptose (Park, 2023; Wen, 2025; Zheng, 2016). Os resultados obtidos mostram que o efeito do tratamento com **TQCL** apresenta características que se assemelham ao processo de paraptose com presença de inchaço mitocondrial e formação de grandes vacúolos citoplasmáticos. Semelhante à paraptose também foi observada a translocação da fosfatidilserina para a superfície celular, despolarização do potencial de membrana mitocondrial, sem ocorrer alterações nucleares como fragmentação do DNA.

As espécies reativas de nitrogênio (RNS), em especial o óxido nítrico (NO) produzido a partir de macrófagos ativados, possuem papel fundamental na resposta imune em *Leishmania* spp., atuando no controle e eliminação do parasito. Moléculas do parasito podem reduzir ou inibir a síntese de NO em células de macrófagos, se comportando como um mecanismo de evasão para facilitar a sobrevivência e multiplicação dentro das células

hospedeiras. Essa estratégia celular tem sido descrita não somente para *Leishmania* spp, mas está presente em outros patógenos intracelulares como tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em cultura de macrófagos peritoneais (Balestieri, 2002). Neste sentido, foi interessante verificar que o tratamento com **TQCL** dos macrófagos infectados com *L. infantum* induziu níveis elevados de NO, sugerindo potencial estímulo da atividade microbida pelos macrófagos.

O composto **TQCL** provocou alterações significativas em promastigotas de *L. infantum* visualizadas por meio da MEV, caracterizado pelo arredondamento do parasito, perdendo sua forma típica alongada, além do encurtamento do flagelo. Além disso, o **TQCL** também gerou modificações na mitocôndria nas análises observadas na MET em promastigotas de *L. infantum*, mais precisamente inchaço mitocondrial, além da presença de vacúolos. Os dados de microscopia eletrônica corroboram com os ensaios de modo de ação, evidenciando que o composto atua predominantemente sobre a mitocôndria, além de promover alterações estruturais em múltiplos componentes celulares que levam ao comprometimento da viabilidade do parasito.

A avaliação integrada do modo de ação do **TQCL** por meio de análise gráfica quantitativa em modelo “mapa de calor” evidenciou que o composto atua em uma série de eventos inter-relacionados, que se inicia com a alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e ocasiona como desfecho bioquímico final, a indução de processos que levam a apoptose. A análise realizada por meio de gráfico “spider plot” colabora com os achados do gráfico em mapa de calor, demonstrando que o composto atua principalmente com foco na mitocôndria, alterando o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas duas concentrações analisadas. De modo geral, a concentração de 12,58 μM do **TQCL** induziu alterações mais pronunciadas, gerando um colapso disseminado que desempenha papel fundamental na perda da viabilidade celular do parasito. A análise de dados utilizando gráficos em modelo “mapa de calor” e “spider plot”, é uma técnica ainda incipiente, mas representa potencial por permitir análise conjunta dos eventos, principalmente na área biológica. Mapas de calor têm sido utilizados em pesquisas para melhor visualização de expressão gênica em flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp., revelando uma ferramenta para explorar padrões entre diferentes categorias investigadas. (Catta-Preta, 2024; Coutinho-Abreu, 2020).

Nos experimentos conduzidos de modo de ação, a miltefosina foi utilizada como controle positivo em diversos ensaios, servindo como referência para a atividade do **TQCL**. Pode-se ressaltar que o aumento na produção de ROS, foi observado tanto para a miltefosina na concentração de 6,47 μM e para o **TQCL** a 12,58 μM , ambos apresentando resultado estatístico altamente significativo. No que se refere à produção e ao aumento dos níveis de superóxido mitocondrial, o **TQCL** na concentração de 12,58 μM apresentou efeito estatisticamente equivalente ao da miltefosina, com elevada significância. Para a produção de corpúsculos lipídicos, exposição de fosfatidilserina e parada do ciclo celular, o efeito do **TQCL** foi estatisticamente superior à miltefosina, reforçando o potencial biológico antileishmanial do composto. A miltefosina apresenta mecanismo de ação multi alvo, atuando sobre o DNA, favorecendo a apoptose pela inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e esfingomielina, altera a integridade de membrana, equilíbrio de cálcio celular, promove produção de ROS pela alteração da função mitocondrial e altera vias de sinalização celular, culminando na morte do parasito (Singh, 2025; Majoor, 2025).

Em síntese, a análise integrada dos estudos do modo de ação do **TQCL** em *L. infantum* demonstra um efeito antileishmanial multifatorial, envolvendo múltiplos mecanismos. A disfunção mitocondrial representa o evento central em promastigotas tratadas com **TQCL**. Embora a despolarização mitocondrial represente aproximadamente 50% em relação às células não tratadas, trata-se de um evento precoce, que precede e se correlaciona com as alterações subsequentes, como amplificação do estresse oxidativo, permeabilização da membrana, exposição da fosfatidilserina, acúmulo de corpúsculos lipídicos e parada do ciclo celular. Estes achados, associados às alterações observadas pela MET e MEV a ativação de morte celular do tipo apoptótica. Adicionalmente, a presença de vacúolos citoplasmáticos sugere a indução da paraptose, tipo de morte celular intimamente relacionado à apoptose. Por fim, a perda da integridade da membrana plasmática revela que a via de morte celular por necrose também é um dos mecanismos envolvidos na ação do **TQCL**.

A falta de resposta de processos relacionados à autofagia sugere que o **TQCL** compromete outros mecanismos de sobrevivência do parasito, gerando consequentemente alterações que levam a morte celular irreversível. Essas alterações provocadas pelo composto estão intimamente relacionadas com eventos com foco em mitocôndria, que gera desfechos heterogêneos de morte celular, com perfil fenotípico semelhante a necrose e apoptose-like. Esse modo de ação diverso e voltado para múltiplos alvos celulares torna o composto um potente agente antileishmanial, além de reduzir a chance de seleção de fenótipos de

Leishmania resistentes à fármacos. O desenvolvimento de fármacos com múltiplos alvos tem sido considerado como uma ferramenta terapêutica mais eficiente para provocar alteração do equilíbrio de vários complexos celulares de forma mais significativa do que medicamentos que atuam exclusivamente em um alvo (Csermely, 2005; Gomes, 2024).

A análise conjunta dos resultados demonstram que o composto **TQCL** gera disfunção mitocondrial profunda e estresse oxidativo em promastigotas de *L. infantum*, provocando alterações heterogêneas nos parasitos, com características semelhantes a apoptose e paraptose e necrose secundária, evidenciando que o composto atua em vias distintas e promove alterações citotóxicas que podem estar interligadas e intimamente relacionadas com a dose e tempo de ação.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados e discutidos, foi evidenciado que o composto denominado **TQCL**, um análogo de quinolina contendo 2-aminotiofenol mostrou atividade relevante em *L. infantum* atribuída a múltiplos alvos, com fenótipos que sustentam a ativação de morte celular do tipo necróticas, apoptóticas e paraptóticas. Salienta-se que o modo de ação multifatorial do **TQCL**, atuando por diferentes vias metabólicas ou estruturas do parasito simultaneamente, torna-se um fator relevante e valioso, o qual pode prevenir o desenvolvimento de resistência medicamentosa e falha terapêutica. Este trabalho também destaca o potencial dos derivados de quinolina nas pesquisas com *Leishmania* spp., abrindo perspectivas para estudos com **TQCL** associado a nanoformulações no intuito de otimizar a eficácia terapêutica, bem como a avaliação em modelo murino “in vivo” de LV, visando um perfil adicional de resposta biológica complementar aos resultados obtidos nas avaliações “in vitro”.

7 REFERÊNCIAS

ABBIATI, T. C.; FREITAS, D. M.; ALVES, L. C.; FREITAS, B. G. de; REZENDE, R. S. de; BARBOSA, S. G.; JORGE, A. L. T. A.; SANTOS, S. M. dos; LOPES, M. C. Leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Pubvet**, v. 13, n. 4, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a307.1-8>.

AGRAWAL, V. K.; SINGH, Z. Miltefosine: First oral drug for treatment of visceral leishmaniasis. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 62, n. 1, p. 66–67, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(06\)80162-0](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(06)80162-0).

ALI R.; TABREZ S.; AKAND S.K.; RAHMAN F.; HUSEIN A., ARISH M.; ALQAHTANI A.S.; AHMED M.Z.; HUSAIN M.; RUB A. Sesamol induces apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, art. 749420, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.749420>.

AMARAL, M.; FERNANDES, A. R.; SOUZA, F. S.; GARCIA, C. R. S.; SANTOS, R. P.; ALVES, M. J. M.; SOUZA, L. A.; COSTA, R. F.; SANTOS, C. L.; SILVA, M. A. A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. **Scientific Reports**, v. 9, art. 6114, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42273-z>.

AMARAL, M.; ROMANELLI, M. M.; ASIKI, H.; BICKER, J.; LAGE, D. P.; FREITAS, C. S.; TANIWAKI, N. N.; LAGO, J. H. G.; COELHO, E. A. F.; FALCÃO, A.; FORTUNA, A.; ANDERSON, E. A.; TEMPONE, A. G. Synthesis of a dehydrodieugenol B derivative as a lead compound for visceral leishmaniasis: mechanism of action and in vivo pharmacokinetic studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 68, n. 11, art. e00831-24, 2024. <https://doi.org/10.1128/aac.00831-24>.

ANTINARELLI, L. M.; DIAS, R. M.; SOUZA, I. O.; LIMA, W. P.; GAMEIRO, J.; SILVA, A. D. da; COIMBRA, E. S. 4-aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 704–714, 2015. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12540>.

ANTINARELLI, L. M.; SOUZA, I. O.; GLANZMANN, N.; ALMEIDA, A. D.; PORCINO, G. N.; VASCONCELOS, E. G.; SILVA, A. D. da; COIMBRA, E. S. Aminoquinoline compounds: effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazones against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 10–16, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.009>.

ANTINARELLI, L. M. R.; MIDDLEJ, V.; SILVA, E. D. S. da; COELHO, E. A. F.; SILVA, A. D. da; COIMBRA, E. S. Exploring the repositioning of the amodiaquine as potential drug against visceral leishmaniasis: the in vitro effect against *Leishmania infantum* is associated with multiple mechanisms, involving mitochondria dysfunction, oxidative stress and loss of cell cycle control. **Chemical Biology Interactions**, v. 371, art. 110333, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110333>.

ASSIS, L. H. C.; SILVA, A. M.; SOARES, M. J.; FERNANDES, O.; MENDONÇA, S. M. Cell cycle, telomeres, and telomerase in *Leishmania* spp.: what do we know so far? **Cells**, v. 10, n. 11, art. 3195, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10113195>.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 1, p. 23–29, 2002. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01505-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01505-2).

BOITÉ, M. C.; MAURICIO, I. L.; MILES, M. A.; CUPOLILLO, E. Trans-Atlantic spillover: deconstructing the ecological adaptation of *Leishmania infantum* in the Americas. **Genes**, v. 11, n. 1, art. 4, 2019. <https://doi.org/10.3390/genes11010004>.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes. **Diário Oficial da União: seção 1**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm. Acesso em: 15 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 27 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 001/2016, de 2016. Dispõe sobre o registro e uso de medicamento veterinário à base de miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Nota técnica conjunta, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/notas-tecnicas/nota-tecnica-no-11-2016-cpv-dfip-sda-gm-mapa-de-1-09-2016.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Manual, Brasília, DF, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 27 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Painel de indicadores da leishmaniose visceral. **Portal de leishmanioses do Ministério da Saúde**, Brasília, DF, [s.d.]. Disponível em: https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/041e37d7-6f08-463e-8dd0-e43c5c2b34c4. Acesso em: 27 jan. 2026.

BRASIL. Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Estabelece a proibição do tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jul. 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em: 27 jan. 2026.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).

CALIXTO, S. L.; LIMA, L. A.; FERREIRA, M. G.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. O.; OLIVEIRA, R. B.; GOMES, M. A. Novel organic salts based on quinoline derivatives: the in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp. **Chemical Biology Interactions**, v. 293, p. 141–151, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.003>.

CATTA-PRETA, C. M. C.; GHOSH, K.; SACKS, D. L.; FERREIRA, T. R. Single-cell atlas of *Leishmania* development in sandflies reveals the heterogeneity of transmitted parasites and their role in infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 121, n. 52, e2406776121, 2024. <https://doi.org/10.1073/pnas.2406776121>.

COIMBRA, E. S.; ANTINARELLI, L. M.; SILVA, N. P.; SOUZA, I. O.; MEINEL, R. S.; ROCHA, M. N.; SOARES, R. P.; SILVA, A. D. Quinoline derivatives: synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50–57, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017>.

COSTA, C. H. N.; CHANG, K.-P.; COSTA, D. L.; CUNHA, F. V. M. From infection to death: an overview of the pathogenesis of visceral leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 969, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>.

COSTA, I. S. F. **Ação da molécula doadora de óxido nítrico S-nitrosoglutathione (GSNO) na leishmaniose cutânea experimental**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. <https://doi.org/10.11606/D.42.2009.tde-27012010-091210>.

COSTA FILHO, A. V.; LUCAS, Í. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimonio de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 424–427, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000400022>.

CRUMP, A. **Menino com leishmaniose visceral mostrando hepatoesplenomegalia e atrofia muscular**. Fotografia. Manual MSD, versão profissional. TDR, WHO/Science Photo Library. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 23 jan. 2026.

CSERMELY, P.; AGOSTON, V.; PONGOR, S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 178–182, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.02.007>.

COUTINHO-ABREU, I. V.; SERAFIM, T. D.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; OLIVEIRA, F.; VALENZUELA, J. G. *Leishmania* infection induces a limited differential gene expression in the sand fly midgut. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 608, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07025-8>.

DAS CHAGAS, A. A.; MEINEL, R. S.; LEAL, Y. L.; SILVA, T. P.; GLANZMANN, N.; MENDONÇA, D. V. C.; PERIN, L.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; COELHO, E. A. F.; MELO, R. C. N.; SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. Functionalized 1,2,3-triazolium salts as potential agents against visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 121, n. 5, p. 1389–1406, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07469-9>.

DON, R. O. B.; IOSET, J.-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014. <https://doi.org/10.1017/S003118201300142X>.

EVANS, B. R.; LEIGHTON, F. A. A history of One Health. **Revue Scientifique et Technique**, v. 33, n. 2, p. 413–420, 2014. <https://doi.org/10.20506/rst.33.2.2297>.

FEREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. E-book. p. 93. ISBN 9788527737166. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527737166/>. Acesso em: 23 fev. 2025.

FERNANDES, J. C. R.; ZAMBONI, D. S. Mechanisms regulating host cell death during *Leishmania* infection. **mBio**, v. 15, n. 11, e01980-23, 2024. <https://doi.org/10.1128/mbio.01980-23>.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0509-1>.

GLANZMANN, N.; ANTINARELLI, L. M. R.; COSTA NUNES, I. K.; PEREIRA, H. M. G.; COELHO, E. A. F.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. Synthesis and biological activity of novel 4-aminoquinoline/1,2,3-triazole hybrids against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111857, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111857>.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 25–40, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S103321>.

GOMES, M. C.; PADILHA, E. K. A.; DINIZ, G. R. A.; GOMES, E. C.; SANTOS-JÚNIOR, P. F. S.; ZHAN, P.; SILVA-JÚNIOR, E. F. Multi-target compounds against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Drug Targets**, v. 25, n. 9, p. 602–619, 2024. <https://doi.org/10.2174/0113894501306843240606114854>.

GONÇALVES, G.; CAMPOS, M. P.; GONÇALVES, A. S.; FIGUEIREDO, F. B. Therapeutic success and failure in using miltefosine to treat dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, n. 1, e015023, 2024. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612024012>.

HARTMAN, C. B.; DUBE, P. S.; LEGOABE, L. J.; VAN PELT, N.; MATHEEUSSEN, A.; CALJON, G.; BETECK, R. M. Novel quinoline derivatives with broad-spectrum antiprotozoal activities. **Archiv der Pharmazie**, v. 357, n. 6, e2300319, 2024. <https://doi.org/10.1002/ardp.202300319>.

INÁCIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. In vitro and in vivo effects of (–)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 10, p. 1993–1996, 2013. <https://doi.org/10.1021/np400624d>.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 251, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>.

LEE, S. J.; ZHANG, J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 327167, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/327167>.

LÜDER, C. G. K.; GROSS, U.; LOPES, M. F. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 116, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-116>.

LUZ, Y.; REBOUÇAS, A.; BERNARDES, C. P. O. S.; ROSSI, E. A.; MACHADO, T. S.; SOUZA, B. S. F.; BRODSKYN, C. I.; VERAS, P. S. T.; DOS SANTOS, W. L. C.; DE MENEZES, J. P. B. **Leishmania infection alters macrophage and dendritic cell migration in a three-dimensional environment**. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1206049, 2023. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1206049>.

MAJOOR, A.; MICHEL, G.; MARTY, P.; BOYER, L.; POMARES, C. Leishmaniasis: strategies in treatment development. **Parasite**, v. 32, p. 18, 2025. <https://doi.org/10.1051/parasite/2025009>.

MAXFIELD, L.; CRANE, J. S. Leishmaniasis. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/>. Acesso em: 16 fev. 2026.

MENNA-BARRETO, R. F.; CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, p. 614014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/614014>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: doenças tropicais negligenciadas no Brasil**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/janeiro/ministerio-da-saude-divulga-boletim-epidemiologico-doencas-negligenciadas-no-brasil>. Acesso em: 10 fev. 2025.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; SANCHES, M. A.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R. B.; PAULA, F. H.; PEREIRA, L. G.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2827–2833, 2008. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2008001200011>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas**. n. 9, dez. 2020. Washington, D.C.: OPAS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-de-zembro-2020-0>. Acesso em: 23 jan. 2026.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Plano de ação para fortalecer a vigilância e o controle das leishmanioses nas Américas, 2023–2030**. Washington, D.C.: OPAS, 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/items/21ad768a-5921-4781-8b9e-7fb01ffc5929>. Acesso em: 22 fev. 2026.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas**. n. 13, dez. 2024. Washington, D.C.: OPAS, 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em 10 fev. 2026.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis: visceral leishmaniasis overview**. Brazzaville: WHO Regional Office for Africa, 2024. Disponível em: <https://www.afro.who.int/health-topics/Leishmaniasis>. Acesso em: 9 fev. 2026.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 21 fev. 2025.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas**. 2. ed. Washington, D.C.: OPAS, 2022. <https://doi.org/10.37774/9789275725030>.

PAREYN, M.; ALVES, F.; BURZA, S.; CHAKRAVARTY, J.; ALVAR, J.; DIRO, E.; KAYE, P. M.; VAN GRIENSVEN, J. Leishmaniasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 11, n. 1, p. 81, 2025. <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00663-w>.

PARK, W.; KIM, H. J.; KIM, J. Y.; LEE, S. Y.; KIM, J. H. Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 8, p. 1573–1594, 2023. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01035-7>.

PATHANIA, Y. S.; BUDANIA, A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 114, n. 11, p. 824–825, 2021. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcab236>.

PEDRA-REZENDE, Y.; MACEDO, I. S.; MIDDLEJ, V.; MARIANTE, R. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S. Different drugs, same end: ultrastructural hallmarks of autophagy in pathogenic protozoa. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 856686, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856686>.

PESSOA, P. H. D.; SILVA, J. R.; SOUZA, L. M.; OLIVEIRA, A. C.; SANTOS, M. F. Apresentação clínica da leishmaniose visceral: uma revisão integrativa. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 16, n. 2, ed. esp., 2024. Disponível em: <https://ojs.cuadernoseducacion.com/ojs/index.php/ced/article/view/2619>. Acesso em: 15 fev. 2026.

PIJPERS, J.; DEN BOER, M. L.; ESSINK, D. R.; RITMEIJER, K. The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia: a review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, e0007173, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007173>.

RIOS-BARROS, L. V.; CHIARADIA, R. M.; SERRAVITE, A. M.; HORTA, M. F.; CASTRO-GOMES, T. Leishmania plasma membrane: general composition, structure and biological functions. In: **Current Topics in Membranes**. v. 95. Amsterdam: Elsevier, p. 215–247, 2025. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2025.06.009>.

ROATT, B. M.; OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; BRITO, R. C. F.; COURA-VITAL, W.; OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, A. B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>.

RODRIGUES, J. C. F.; SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, p. 925–938, 2008. <https://doi.org/10.2174/138161208784041033>.

RODRIGUES, J. C. F.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 995–1004, 2006.

ROMANO, P. S.; AKEMATSU, T.; BESTEIRO, S.; BINDSCHEDLER, A.; CARRUTHERS, V. B.; CHAHINE, Z.; COPPENS, I.; DESCOTEAUX, A.; DUQUE, T. L. A.; HE, C. Y.; HEUSSLER, V.; LE ROCH, K. G.; LI, F. J.; MENEZES, J. P. B.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; MOTTRAM, J. C.; SCHMUCKLI-MAURER, J.; TURK, B.; VERAS, P. S. T.; SALASSA, B. N.; VANRELL, M. C. Autophagy in protists and their hosts: when, how and why? **Autophagy Reports**, v. 2, n. 1, p. 2149211, 2023. <https://doi.org/10.1080/27694127.2022.2149211>.

ROMERO, A. H. Are basic and lipophilic chain groups highly required in leishmanicidal quinolines to favor the phagolysosome accumulation? **Frontiers in Chemistry**, v. 13, p. 1655979, 2025a. <https://doi.org/10.3389/fchem.2025.1655979>.

ROMERO, A. H.; DELGADO, F. 4-aminoquinoline as a privileged scaffold for the design of leishmanicidal agents: structure-property relationships and key biological targets. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1527946, 2025b. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1527946>.

SAMPAIO, R. N. R. Pharmacotherapy in leishmaniasis: old, new treatments, their impacts and expert opinion. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 24, n. 2, p. 153–158, 2023. <https://doi.org/10.1080/14656566.2022.2157208>.

SANTOS, A. T. O. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral humana. **RSV**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 19–37, 2023. Disponível em: <https://rsv.ojsbr.com/rsv/article/view/5>. Acesso em: 22 mar. 2026.

SANTOS, T. S.; CARVALHO, R. S.; SILVA, M. F. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Revista Odonto Ciência**, v. 28, n. 2, 2013. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1808-52102013000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 22 mar. 2026.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BANETH, G.; COLOMBO, S.; DANTAS-TORRES, F.; FERRER, L.; FONDATI, A.; MIRÓ, G.; ORDEIX, L.; OTRANTO, D.; NOLI, C. World Association for Veterinary Dermatology consensus statement for diagnosis and evidence-based clinical practice guidelines for treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 36, n. 6, p. 723–787, 2025. <https://doi.org/10.1111/vde.70006>.

SCARPINI, S.; DONDI, A.; TOTARO, C.; BIAGI, C.; MELCHIONDA, F.; ZAMA, D.; PIERANTONI, L.; GENNARI, M.; CAMPAGNA, C.; PRETE, A.; LANARI, M. Visceral leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101887>.

SCHWABL, P.; BOITÉ, M. C.; BUSSOTTI, G.; JACOBS, A.; ANDERSSON, B.; MOREIRA, O.; FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; TELLERIA, E. L.; TRAUB-CSEKÖ, Y.; VASELEK, S.; LEŠTINOVÁ, T.; VOLF, P.; MORGADO, F. N.; PORROZZI, R.; LLEWELLYN, M.; SPÄTH, G. F.; CUPOLILLO, E. Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**, v. 4, p. 139, 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01658-5>.

SINGH, V. K.; TIWARI, R.; RAJNEESH; KUMAR, A.; CHAUHAN, S. B.; SUDARSHAN, M.; MEHROTRA, S.; GAUTAM, V.; SUNDAR, S.; KUMAR, R. Advancing treatment for leishmaniasis: from overcoming challenges to embracing therapeutic innovations. **ACS Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 47–68, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00693>.

SILVA, D. P. C.; SCHRÖDER, N. T.; SILVEIRA, E. F. D. A. Spread of human visceral leishmaniasis in Brazil. **InterEspaço: Revista de Geografia e Interdisciplinaridade**, v. 11, p. e202508, 2025. <https://doi.org/10.18764/2446-6549.e20857>.

SILVEIRA, F. T.; LIMA, L. V. R.; SANTOS, T. V.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B. Reviewing the trajectory of American visceral leishmaniasis in Brazilian Amazon: from Evandro Chagas to the current days. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. e202000642, 2020. Disponível em: <https://ojs.iec.gov.br/rpas/article/view/642>. Acesso em: 22 mar. 2026.

SOARES, A. G. R.; LANDIM, J. S.; FRANÇA, N. G.; ALENCAR FILHO, E. B.; CARMO, R. F. Differential diagnosis of visceral leishmaniasis in children: a five-year retrospective study at a pediatric referral hospital. **BMC Pediatrics**, v. 24, n. 1, p. 726, 2024a. <https://doi.org/10.1186/s12887-024-05160-9>.

SOARES, G. H. C.; BARBOSA, G. R.; COELHO, A. J. S.; CAETANO, G. B.; AZEVEDO, C. M. P. E. S.; COELHO, A. C.; LIMA, M. I. S.; STOLF, B. S. Isolation and characterisation of *Leishmania (Leishmania) infantum* from cutaneous leishmaniasis patients in northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, p. e240026, 2024b. <https://doi.org/10.1590/0074-02760240026>.

SOUSA, J. K. T.; ANTINARELLI, L. M. R.; MENDONÇA, D. V. C.; LAGE, D. P.; TAVARES, G. S. V.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; LUDOLF, F.; COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; PERIN, L.; OLIVEIRA, B. A.; ALVARENGA, D. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; BRANDÃO, G. C.; NOBRE, V.; PEREIRA, G. R.; COIMBRA, E. S.; COELHO, E. A. F. A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 73, p. 101966, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101966>.

SOUZA, A. R.; ANTINARELLI, L. M. R.; LEMOS, A. S. O.; GLANZMANN, N.; VICENTE, B.; MIDDLEJ, V. D. V.; SILVA NETO, A. F.; MACHADO, R. R. P.; SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. Multiple mechanisms of action of a triazole-derived salt against *Leishmania amazonensis*: apoptosis-like death and autophagy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 409, p. 111409, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.111409>.

STADERINI, M.; PIQUERO, M.; ABENGÓZAR, M. Á.; NACHÉR-VÁZQUEZ, M.; ROMANELLI, G.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; RIVAS, L.; BOLOGNESI, M. L.; MENÉNDEZ, J. C. **Structure-activity relationships and mechanistic studies of novel mitochondria-targeted, leishmanicidal derivatives of the 4-aminostyrylquinoline scaffold**, European Journal of Medicinal Chemistry. 171, p. 38-53, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.007>.

STROPPA, P. H. F.; ANTINARELLI, L. M. R.; CARMO, A. M. L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.051>.

SURESHKUMAR, B.; SHEENA MARY, Y.; PANICKER, C. Y.; SUMA, S.; ARMAKOVIĆ, S.; ARMAKOVIĆ, S. J.; VAN ALSENOY, C.; NARAYANA, B. Quinoline derivatives as possible lead compounds for anti-malarial drugs: spectroscopic, DFT and MD study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 632–648, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.07.006>.

TAVARES, V. S.; DE CASTRO, M. V.; SOUZA, R. D. S. O.; GONÇALVES, I. K. A.; LIMA, J. B.; BORGES, V. M.; ARAÚJO-SANTOS, T. Lipid droplets of protozoan parasites: survival and pathogenicity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e210270, 2022. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210270>.

TOLENTINO JÚNIOR, D. S.; SILVA, H. T.; RIBEIRO, A. M.; AMADOR, A. M. R.; SILVA, B. O. S.; GUIMARÃES, B. M.; NOGUEIRA, M. B. L.; TEIXEIRA, H. K. C.; ASSIS, E. M. Different levels of endemicity of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 4, p. 28, 2025. <https://doi.org/10.3390/zoonoticdis5040028>.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 696–707, 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4948>.

UPADHYAY, A.; KUSHWAHA, P.; GUPTA, S.; DODDA, R. P.; RAMALINGAM, K.; KANT, R.; GOYAL, N.; SASHIDHARA, K. V. Synthesis and evaluation of novel triazolyl quinoline derivatives as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 154, p. 172–181, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.014>.

VENTURA SILVA, D. B.; GALUÉ-PARRA, A. J.; QUEIROZ-SOUZA, P.; PINHEIRO, L. P.; PACHECO, V.; DE SENA, C. B.; SILVA, E. O. Kojic Acid Promotes Apoptosis-like Death and Cell Cycle Arrest in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promastigotes, **ACS Omega**. v. 10, n. 32, p. 36376-36381, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c04741>.

WEN, X.; MA, H. Cytoplasmic vacuolization: a fascinating morphological alteration from cellular stress to cell death. **Cancer Science**, v. 116, n. 5, p. 1181–1192, 2025. <https://doi.org/10.1111/cas.70013>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) atlas: a manual for health workers**. Geneva: World Health Organization, 2012. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504102>. Acesso em fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines**. Geneva: WHO, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: fact sheet**. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 24 jan. 2026.

ZHENG, H.; DONG, Y.; LI, L.; SUN, B.; LIU, L.; YUAN, H.; LOU, H. Novel benzo[a]quinolizidine analogs induce cancer cell death through paraptosis and apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5063–5076, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00484>.

APÊNDICE A - “Quinoline-Aminothiazole Derivate Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*” (Artigo submetido)

Chemico-Biological Interactions

Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Mechanisms of toxic injury and disease
Keywords:	Visceral leishmaniasis; <i>Leishmania infantum</i> ; quinolines; aminothiophenol.
Corresponding Author:	Luciana Maria Ribeiro Antinarelli Federal University of Juiz de Fora Juiz de Fora, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Luciana Maria Ribeiro Antinarelli
Order of Authors:	Luciana Maria Ribeiro Antinarelli Stephane França Ribeiro Wander Luiz Alves Amorim, Master Bruno Vicente, Master Victor do Valle Midlej, Doctor Adolfo Firmino da Silva Neto, Professor Nicolas Glanzmann, Doctor Priscila V. S. Z. Capriles, Professor Adilson David da Silva, Professor Elaine Soares Coimbra, Professor
Abstract:	Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the <i>Leishmania donovani</i> complex, with <i>L. infantum</i> being widely distributed globally and responsible for zoonotic transmission. Current therapies for VL remain limited by prolonged treatment regimens, parenteral administration, and significant toxic effects, underscoring the need for new therapeutic alternatives for both humans and dogs, the primary domestic reservoirs of <i>L. infantum</i> . Here, we investigated the activity of a novel quinoline analogue containing 2-aminothiophenol, designated TQCL, against <i>L. infantum</i> and sought to provide initial insights into its mode of action. TQCL exhibited potent antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes, with IC ₅₀ values below 10 μ M and a selectivity index greater than 10. The compound induced pronounced morphological, ultrastructural, and biochemical alterations in promastigote forms, including severe mitochondrial swelling, loss of cristae, oxidative stress, accumulation of lipid droplets, and membrane alterations with increased permeability. TQCL also disrupted the parasite cell cycle, leading to abnormal flagellar phenotypes and extensive cytoplasmic vacuolation. In infected macrophages, TQCL increased NO production without altering ROS levels. Collectively, the results indicate that TQCL inhibits <i>L. infantum</i> through multiple mechanisms, including apoptosis-like and necrosis-related events and immunomodulatory effects. In silico analyses further suggest favorable pharmacokinetic properties for oral use, supporting subsequent in vivo evaluation in murine VL models.

Cover Letter



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
 Instituto de Ciências Biológicas
 Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia

To: Prof. Dr. Daniel R. Dietrich
Editor-in-Chief of Chemico-Biological Interactions

Juiz de Fora, february 4th, 2026

Dear Prof. Dr. Dr. Daniel R. Dietrich

Given the scope of Chemico-Biological Interactions, we submit our manuscript, titled "Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*," by Stephane França Ribeiro and colleagues. This manuscript describes the antileishmanial potential of a novel quinoline analogue containing 2-aminothiophenol, designated TQCl, and its mechanism of action against *Leishmania infantum*. TQCl exhibited potent antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes, with IC₅₀ values below 10 µM and a selectivity index greater than 10. The antileishmanial activity of TQCl involved a multi-targeted cell death process, characterized by morphological and ultrastructural alterations, as well as biochemical disorders, including severe mitochondrial swelling, loss of cristae, oxidative stress, accumulation of lipid droplets, and membrane alterations with increased permeability. In infected macrophages, TQCl increased NO production without altering ROS levels. Collectively, the results indicate that TQCl inhibits *L. infantum* through multiple mechanisms, including apoptosis-like and necrosis-related events and immunomodulatory effects.

This manuscript has not been published in this or a substantially similar form (in print or electronically including on a website), nor accepted for publication elsewhere, nor is under consideration by another publication, falsified or plagiarized from another academic source. The authors declare any potential competing interests and all the listed authors in the manuscript have read and approved the submitted manuscript.

We are thankful for your kind attention.

Sincerely yours,

Luciana M. Ribeiro Antinarelli

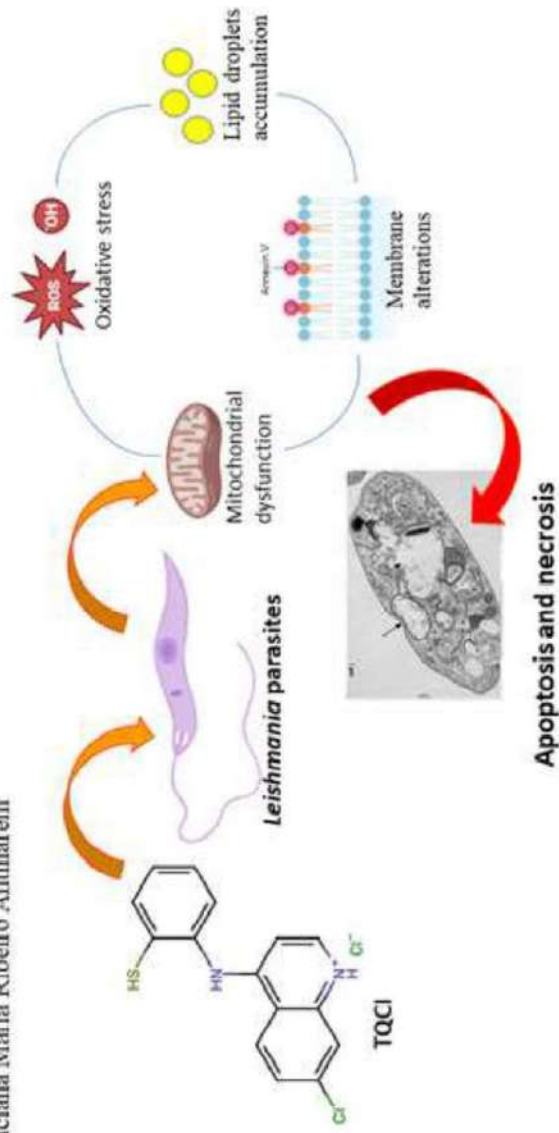
Highlights

Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*

- A novel quinoline analogue containing 2-aminothiophenol, designated **TQCI** was synthesized.
- Biological studies using *L. infantum* species were performed.
- **TQCI** was 12-fold more active against parasites than to host cells.
- **TQCI** inhibits *L. infantum* through multiple mechanisms, including apoptosis-like and necrosis-related events
- The mechanism of action of **TQCI** suggests a multi-target action, including apoptosis-like and necrosis-related events
- **TQCI** presented promising results for the treatment of visceral leishmaniasis.

Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*

Stephane Franca Ribeiro, Wander Luiz Alves Amorim, Bruno Vicente, Víctor do Valle Midlej, Adolfo Firmino da Silva Neto, Nicolas Glanzmann, Priscila Vanessa da Silva Zabala Capriles, Adilson David da Silva, Elaine Soares Coimbra, Luciana Maria Ribeiro Antinarelli



1 Quinoline-Aminothiazole Derivative Targets Mitochondrial Function and Triggers
2 Lethal Cellular Collapse in *Leishmania infantum*

3

4 Stephane França Ribeiro^{1#}, Wander Luiz Alves Amorim^{2#}, Bruno Vicente³, Victor do
5 Valle Midlej³, Adolfo Firmino da Silva Neto⁴, Nicolas Glanzmann², Priscila V. S. Z.
6 Capriles⁵, Adilson David da Silva^{2*}, Elaine Soares Coimbra¹, Luciana Maria Ribeiro
7 Antinarelli^{1*}.

8 [#]*The authors contributed equally to this work.*

9

10 * Corresponding authors

11 Dr. Adilson D. da Silva, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas,
12 Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, Juiz
13 de Fora, Minas Gerais, Brazil, 36036-900. E-mail: david.silva@ufjf.br

14 Dr. Luciana M. R. Antinarelli. Departamento de Parasitologia, Microbiologia e
15 Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São
16 Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, 36036-900. E-mail:
17 lucianantinarelli@yahoo.com.br

18

19 ¹Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz
20 de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil.

21 ²Institute of Exact Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG
22 36036-900, Brazil.

23 ³Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
24 RJ, 21040-900, Brazil.

25 ⁴Department of Veterinary Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de
26 Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil.

27 ⁵Postgraduate Program in Computational Modeling, Department of Computer Science,
28 I.C.E., Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil.

29

1

2 **Abstract**

3 Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the *Leishmania donovani*
4 complex, with *L. infantum* being widely distributed globally and responsible for
5 zoonotic transmission. Current therapies for VL remain limited by prolonged treatment
6 regimens, parenteral administration, and significant toxic effects, underscoring the need
7 for new therapeutic alternatives for both humans and dogs, the primary domestic
8 reservoirs of *L. infantum*. Here, we investigated the activity of a novel quinoline
9 analogue containing 2-aminothiophenol, designated **TQCL**, against *L. infantum* and
10 sought to provide initial insights into its mode of action. **TQCL** exhibited potent
11 antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes, with IC₅₀
12 values below 10 μ M and a selectivity index greater than 10. The compound induced
13 pronounced morphological, ultrastructural, and biochemical alterations in promastigote
14 forms, including severe mitochondrial swelling, loss of cristae, oxidative stress,
15 accumulation of lipid droplets, and membrane alterations with increased permeability.
16 **TQCL** also disrupted the parasite cell cycle, leading to abnormal flagellar phenotypes
17 and extensive cytoplasmic vacuolation. In infected macrophages, **TQCL** increased NO
18 production without altering ROS levels. Collectively, the results indicate that **TQCL**
19 inhibits *L. infantum* through multiple mechanisms, including apoptosis-like and
20 necrosis-related events and immunomodulatory effects. *In silico* analyses further
21 suggest favorable pharmacokinetic properties for oral use, supporting subsequent *in vivo*
22 evaluation in murine VL models.

23

24 **Keywords:** Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, quinolines, aminothiophenol,

25

26

1 1. Introduction

2 Leishmaniasis are complex, high-burden diseases whose etiological agents
3 comprise several *Leishmania* spp., associated with a broad clinical spectrum ranging
4 from cutaneous lesions to visceral involvement, and transmitted by more than 200
5 phlebotomine sand fly species [1]. In this context, approximately 350 million people
6 live in areas at risk, particularly in tropical and subtropical regions of the world's
7 poorest countries [2]. The World Health Organization classifies these diseases as
8 Neglected Tropical Diseases, given their strong epidemiological association with
9 poverty and the vulnerability of populations living in endemic areas; however,
10 additional social and environmental determinants also hinder effective disease control
11 [3].

12 Based on the complex interactions between *Leishmania* species and the host
13 immune response, leishmaniasis can be clinically categorized into cutaneous
14 leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and visceral leishmaniasis
15 (VL). CL is the most common form worldwide and typically presents with skin lesions;
16 MCL is characterized by lesions affecting mucosal tissues, predominantly
17 oropharyngeal, and is found mainly in Latin America. Both clinical forms may result in
18 disfiguring lesions that substantially impact the psychosocial well-being and quality of
19 life of affected individuals [4]. VL, in contrast, is a systemic condition associated with
20 progressive debilitation and immunosuppression in infected mammalian hosts, which
21 can lead to death if untreated, especially in children, the elderly, and individuals with
22 immunosuppressive disorders [5,6].

23 VL is primarily associated with Old World species belonging to the *L. donovani*
24 complex, namely *L. donovani* (anthroponotic) and *L. infantum* (zoonotic) [3].
25 *Leishmania infantum* has a broad global distribution, occurring in approximately 60
26 countries, including Latin America (previously referred to as *L. chagasi*), the
27 Mediterranean basin, North Africa, and the Middle East. The disease is difficult to
28 control, continues to expand, and poses a risk of a global outbreak due to increasing
29 urban transmission. In addition, domestic dogs are considered the main reservoirs of *L.*
30 *infantum*, and VL/AIDS co-infection remains a severe public health concern [6,7].

31 Current VL treatment options have several limitations, including prolonged
32 therapeutic regimens, the need for parenteral administration, significant adverse effects,
33 and the high cost of some formulations [1,8]. Liposomal amphotericin B, for example,

1 is first-line therapy in many countries but is often limited by its high cost. Alternatively,
2 pentavalent antimonials remain in use for long dates, but are associated with substantial
3 toxicity and several contraindications; furthermore, countries such as India have
4 reported widespread resistance to these drugs. Other therapeutic agents, such as
5 paromomycin, pentamidine, and miltefosine, are also employed, with restrictions [9].
6 Miltefosine is the first oral drug approved for VL treatment, but it presents multiple
7 limitations for clinical use and does not achieve parasitological cure in dogs [10].

8 From this standpoint, 4-aminoquinoline derivatives have emerged as promising
9 therapeutic candidates, owing to their well-studied antiprotozoal activity and the
10 structural flexibility of the quinolinic scaffold, which can accommodate a wide range of
11 functional groups that enhance biological activity [11,12]. Our research group has
12 recently focused on designing and evaluating a series of 4-aminoquinoline derivatives
13 incorporating diverse functional groups, including alkynes, 1,2,3-triazoles, hydrazines,
14 and sulfonamide-based moieties, to optimize antiparasitic activity. These studies have
15 identified multiple promising candidates with significant potency against *Leishmania*
16 spp., underscoring the importance of structural diversification in advancing quinoline-
17 based chemotherapeutic strategies [13-16].

18 Furthermore, chalcogen-containing molecules—particularly those incorporating
19 sulfur—have repeatedly demonstrated potent activity against trypanosomatid pathogens,
20 including *Leishmania* spp., reinforcing the rationale for exploring sulfur-based
21 functionalities, such as thiophenol groups, in new chemotherapeutic designs [17]. In this
22 work, we explore the combination of a 2-aminothiophenol unit with the 4-
23 aminoquinoline scaffold as a strategy to integrate two bioactive motifs with
24 complementary potential against *Leishmania* spp.

25

26

27 2. Materials and Methods

28 2.1 Chemistry

29 **2.1.1 Chemicals and equipment:** The chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (St.
30 Louis, Missouri, USA). The melting point was determined using a digital MQAPF-301
31 (Microquímica) apparatus. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance
32 III HD 500. Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to
33 tetramethylsilane. The FTIR spectrum was obtained using a Bruker Alpha spectrometer

equipped with an ATR module, over the 400–4000 cm^{-1} range. The UV–vis spectrum was obtained using a Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer. The HR-ESI-MS analysis was performed using a Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), equipped with an electrospray ionization source and operating in both positive and negative ion modes via direct injection.

2.1.2 Compound: The synthesis of compound **TQCl** was carried out as follows. In a round-bottom flask, 300 mg of 2-aminothiophenol (2.4 mmol) was solubilized in ethanol under heating. After complete dissolution, 395 mg of 4,7-dichloroquinoline (2.0 mmol) was added to the reaction mixture. The system was stirred at 60 °C for three days, during which a beige solid precipitated. After cooling to room temperature, the solid was isolated by vacuum filtration. After drying, 447.7 mg of **TQCl** was obtained, corresponding to a 70% yield (2.4 mmol). The chemical structure for the **TQCl** compound can be found in Figure 1. Melting point: 245 °C (decomposition). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 15.01 (s, 1H), 11.37 (s, 1H), 8.92 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 7.43 (dt, J = 8.6, 4.5 Hz, 1H), 6.24 (d, J = 6.9 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 155.47, 143.61, 138.96, 138.57, 134.94, 133.95, 129.75, 129.50, 129.19, 128.97, 127.69, 126.10, 119.39, 115.56, 100.53. HR-ESI-MS: m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{S}^+ [\text{M}]^+$ 287.04042, found 287.04008. ATR-FTIR (cm^{-1}): 3413 (ν N–H), 3050 (ν C–H aromatic), 1625 (ν C=N / C=C aromatic), 1469 (ν C–N / δ C–H_{arom}), 1211 (ν C–S / C–N), 754 (δ C–H out-of-plane), 652 (ν C–Cl). UV–Vis λ_{max} (DMSO) 334 nm. All spectra are included in the supplementary material.



Figure 1. Chemical structure of **TQCl**.

2.2. Biological

2.2.1 Mice: BALB/c mice, female, 4–6 weeks old, were purchased from the Reproductive Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF). The

1 protocols were approved by the Committee of Ethical Handling of Research Animals
2 (CEUA) of the Federal University of Juiz de Fora (CEUA Protocols 018/2023 and
3 019/2023).

4 **2.2.2 Parasites:** *Leishmania infantum* strain (MHOM/MA/67/ITMAP-263) isolated
5 from a patient with VL in Morocco was cultured in complete Warren medium [medium
6 with bovine brain and heart infusion (Himedia, Mumbai, Maharashtra, India)],
7 supplemented with folic acid and hemin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 10%
8 fetal bovine serum, plus the addition of 0.1% penicillin 100 IU/mL and 0.1%
9 streptomycin 0.1 mg/mL (Cultilab, São Paulo, SP, Brazil) and incubated at 25°C in a
10 BOD incubator [18].

11 **2.2.3 Antipromastigote activity:** *Leishmania infantum* promastigotes (3×10^6 cells/well)
12 in the log phase were seeded in 96-well plates and added to compounds at serial
13 concentrations ranging from 100 μ M to 3.12 μ M, and incubated for 72 hours in a BOD
14 incubator at 25°C. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by the MTT
15 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) colorimetric method at 5 mg/mL. After four
16 hours of incubation, 100 μ L of isopropanol/HCl (0.7%) was added, and the reading was
17 performed on a spectrophotometer (Multiskan EX - Thermo Electron Corporation,
18 Vanta, Finland) at 570 nm [18].

19 **2.2.4 Cytotoxicity to mammalian cells:** Resident macrophages were obtained from the
20 peritoneal cavity, and the cells were plated at 2×10^5 macrophages in 96-well plates
21 with RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with
22 10% FBS (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂
23 humidified incubator to allow cell adhesion. After, the adherent cells were treated with
24 serial dilutions of TQCI (150.0-9.4 μ M) or miltefosine (150.0-9.4 μ M) for 72 h at 37 °C
25 in 5% CO₂. Macrophage viability was assessed using the MTT assay and quantified by
26 spectrophotometry (Multiskan EX; Thermo Electron Corporation, Vanta, Finland) at
27 570 nm [19].

28 **2.2.5 Effect of compound in the treatment of *L. infantum*- intramacrophagic:**
29 Peritoneal macrophages were placed at 6×10^5 cells/well in RPMI 1640 medium, added
30 to 10% FBS and 0.1% solution of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis,
31 MO, USA), and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂ incubator. After, adherent
32 macrophages were infected with 6×10^6 *L. infantum* promastigotes in the stationary
33 phase (at a ratio 10:1, parasites/macrophage), and cultures were maintained for 24 h at
34 37°C in 5% CO₂. Subsequently, cells were washed five times with 1X PBS to remove

1 noninternalized parasites. Infected macrophages were incubated in RPMI medium
 2 supplemented with 2% horse serum (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and treated with
 3 **TQCI** (3.12-50 μM) or miltefosine (0.39-25.0 μM) for 72 h at 37°C in 5% CO_2 . After
 4 incubation, cells were fixed in absolute ethanol, then stained with Giemsa, and
 5 dehydrated in acetone/xylol mixtures of varying proportions. A total of 200
 6 macrophages were counted using an optical microscope to determine the reduction in
 7 the global burden [19].

8

9 **2.3 Mode of action studies**

10 **2.3.1. Mitochondrial membrane potential analysis:** Promastigotes of *L. infantum* (10^7
 11 cells/mL) were treated with 6.29 or 12.58 μM of **TQCI** at 25 °C. After 24 h of
 12 treatment, the parasite concentration was adjusted to 5×10^6 cells/mL, and 10 $\mu\text{g/mL}$ JC-
 13 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added, and the samples were incubated for
 14 30 min in the dark. After washing twice with HBSS, the samples were added to a black
 15 96-well plate, and fluorescence was measured using a spectrofluorometer (FLx800,
 16 BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with both filter pairs, 485/528 nm and
 17 540/600 nm. Promastigotes incubated with FCCP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 18 at 5.0 μM for 10 minutes were used as a positive control. The relative Δym value was
 19 calculated as the ratio of the 600 nm to the 528 nm reading [14].

20 **2.3.2. Quantification of reactive oxygen species (ROS) production:** Promastigote
 21 forms of *L. infantum* (10^7 cells/mL) were treated with **TQCI** (6.29 or 12.58 μM). After
 22 24 h of treatment, the parasites were added to a black 96-well plate at a concentration of
 23 5×10^6 promastigotes/well and incubated with H_2DCFDA (Invitrogen, Eugene, OR,
 24 USA) at 20 μM or Mitosox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at five μM for 30
 25 min in the dark at room temperature. ROS products were measured using a fluorimetric
 26 microplate reader (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with
 27 excitation and emission wavelengths of 485 nm/528 nm for H_2DCFDA and 540 nm/600
 28 nm for Mitosox, respectively. Promastigotes incubated with Miltefosine (Cayman
 29 Chemical Company, Denver, CO, USA) at 6.47 μM were used as a positive control
 30 [14].

31 **2.3.3. Quantification of lipid bodies formation:** Promastigotes of *L. infantum* (10^7
 32 cells/mL) were incubated with **TQCI** (6.29 or 12.58 μM) at 25 °C for 24 h. After, the
 33 parasites (5×10^6 parasites/well) were washed with PBS and incubated with Nile Red
 34 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1.0 $\mu\text{g/mL}$ for 15 min in the dark at room

1 temperature. Fluorescence was spectrofluorometrically measured (FLx800, BioTek
2 Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and
3 an emission wavelength of 528 nm [19].

4 **2.3.4. Determination of the cell membrane permeabilization:** Promastigotes of *L.*
5 *infantum* (10^7 cells/mL) were treated with **TQCI** at 6.29 or 12.58 μ M at 25 °C for 24 h.
6 After a further wash with PBS 1x, the promastigotes (5×10^6 parasites/well) were
7 incubated with propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1.0
8 μ g/mL for 15 min in the dark at room temperature. The fluorescence intensity was
9 analysed using a spectrofluorometer (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT,
10 USA) using an excitation wavelength of 540 nm and an emission wavelength of 600 nm
11 [19].

12 **2.3.5. Evaluation of phosphatidylserine exposure:** Promastigotes of *L. infantum* (10^7
13 cells/mL) were incubated with **TQCI** (6.29 or 12.58 μ M) for 24 h. A suspension of $5 \times$
14 10^6 promastigotes was washed once with PBS and incubated with 1 μ L of annexin V-
15 FITC (Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 20 minutes in the dark. Afterwards, PI was
16 added at a concentration of 1 μ g/mL, and the cells were incubated in the dark for 15
17 minutes. Miltefosine at a concentration of 6.47 μ M was used as a positive control. The
18 data were acquired using the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson,
19 Rutherford, NJ, USA) equipped with DIVA software (Joseph Trotter, Scripps Research
20 Institute, La Jolla, CA, USA) [20].

21 **2.3.6. Cell cycle analysis:** *Leishmania infantum* promastigotes (10^7 cells/mL) were
22 treated with **TQCI** (6.29 or 12.58 μ M) for 24 hours at 24°C, washed with PBS,
23 permeabilized with 1 mL of 70% ethanol, and incubated at -20°C for 1 hour. They were
24 then incubated with 1 μ g/mL of Ribonuclease A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
25 for 1 hour at 37°C. Subsequently, the samples were incubated with PI (Sigma-Aldrich,
26 St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1.0 μ g/mL for 20 minutes at room
27 temperature. The data were acquired using the FACsCanto II cytometer (Becton
28 Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with DIVA software (Joseph Trotter,
29 Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) [20].

30 **2.3.7. Assessment of autophagic vacuole formation:** *Leishmania infantum*
31 promastigotes (10^7 cells/mL) in logarithmic growth phase were treated with compound
32 **TQCI** at concentrations of 6.29 μ M and 12.58 μ M and incubated for 24 hours at 25°C.
33 After this period, the parasites were centrifuged and washed with PBS. They were
34 labeled with 100 μ M monodansylcadaverine (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

1 USA) for 1 hour at 37°C. They analyzed in a fluorimeter (FLx800, BioTek Instruments,
2 Inc., Winooski, VT, USA) at 335 nm (excitation) and 460 nm (emission). Stationary-
3 phase promastigotes were used as a positive control [21].

4 **2.3.8 Morphological and ultrastructural analysis:** Promastigotes treated with **TQCI**
5 (6.29 or 12.58 μ M) for 24 h were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) or
6 transmission electron microscopy (TEM), as described by Souza et al. [20]. For SEM
7 analysis, the parasites were washed with PBS, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M
8 sodium cacodylate buffer for 60 min, and post-fixed in 1% osmium tetroxide. After
9 dehydration in increasing concentrations of ethanol, cells were dried with CO₂, coated
10 with a thick layer of gold, and analyzed using a scanning electron microscope (JEOL
11 JSM-6390, Tokyo, Japan). For TEM analysis, after treatment, promastigotes were
12 washed with PBS, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for
13 60 min, and post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide.
14 After, the cells were dehydrated in increasing concentrations of acetone, embedded in
15 Epon resin, sectioned into ultrathin slices (60-70 nm), and stained with uranyl acetate
16 (5%) and lead citrate (0.2%). The sections were examined with a Hitachi HT 7800
17 (Tokyo, Japan) transmission electron microscope. All assays were performed in three
18 independent experiments, each in triplicate [20].

19 **2.3.9 Measurement of ROS and NO levels produced by *L. infantum*-infected**
20 **macrophages:** Macrophages were infected with *L. infantum* and non-treated or treated
21 with different concentrations of **TQCI** (50-3.12 μ M) for 48 h. For ROS level evaluation,
22 cells were washed with PBS and incubated with 20 μ M H₂DCFDA (Invitrogen,
23 Eugene, OR, USA) for 30 min in the dark at 37 °C in 5% CO₂. The fluorescence
24 intensity was measured in a spectrofluorimeter (FLx800, BioTek Instruments, Inc.,
25 Winooski, VT, USA), with 485 nm excitation and 528 nm emission. Infected
26 macrophages incubated with 4 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 30 minutes served as
27 a positive control [22]. To evaluate the NO content, the supernatant from the culture of
28 *L. infantum*-infected macrophages treated with **TQCI** was collected. NO production was
29 indirectly measured by quantifying nitrite oxidation using the colorimetric Griess
30 method. The absorbance was measured at 540 nm using a spectrophotometer (Multiskan
31 EX; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland). Non-stimulated, infected
32 macrophages cultured in RPMI medium alone served as the negative control. For
33 positive stimulation, cells were cultured with 5 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS)
34 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [22].

1

2 **2.4 *In silico* evaluation of Physicochemical and Pharmacokinetic Properties:**

3 Physicochemical properties of **TQCI** and miltefosine were analyzed *in silico* according
 4 to Lipinski's RO5 using the SwissADME website [23]. The properties of molecular
 5 mass (MW), consensus partition coefficient (ClogP), number of hydrogen bond donors
 6 (NHBD), and number of hydrogen bond acceptors (NHBA) were predicted. The
 7 pharmacokinetic parameters were estimated using the web server ADMETlab 2.0 [24].

8 **2.5 Statistical analysis:** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0
 9 software (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Data were compared using one-way
 10 ANOVA with Dunnett's post-hoc test. P-values less than 0.001 (***), 0.01 (**), and 0.1
 11 (*) were considered statistically significant.

12 **2.6 Statistical Analysis and Data Visualization (Spider Plot and Heatmaps):**

13 **2.6.1 Data Processing and Software:** Experimental results were processed as the mean
 14 values of at least three independent biological replicates for each parameter. All
 15 computational analyses, data normalization, and graphical representations were
 16 performed using Python (version 3.10), utilizing the pandas (v1.5) and numpy (v1.23)
 17 libraries for data manipulation, and matplotlib (v3.6) and seaborn (v0.12) for high-
 18 resolution data visualization.

19 **2.6.2 Comparative Biochemical Profiling (Spider Plot):** To visualize the
 20 multidimensional biological signature of **TQCI** at 6.29 μ M and 12.58 μ M relative to the
 21 negative control and the reference drug miltefosine, a radar chart (Spider Plot) was
 22 constructed. Due to the different units and magnitudes of the measured biological
 23 markers (e.g., mean fluorescence intensity versus percentages), data were normalized to
 24 a non-dimensional scale ranging from 0.0 to 1.0. The normalization logic was
 25 standardized so that the center of the plot (0.0) represents the baseline physiological
 26 state (Control), and the periphery (1.0) represents the maximum biological impact
 27 observed for each marker. For parameters where the drug effect is characterized by an
 28 increase (e.g., ROS, Superoxide, PS exposure, Lipid accumulation, Membrane
 29 permeability, and Cell Cycle arrest), a Min-Max normalization was applied:

$$x_{norm} = \frac{x_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

30

31 where x is the vector of biological markers, and x_i represents the specific value of a
 32 given treatment to be converted to the normalized scale. For the Mitochondrial
 33 Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$), where the pharmacological effect is characterized by a

1 decrease in fluorescence (depolarization), an inverse normalization was employed. This
 2 ensures that any expansion of the plotted area consistently represents an increase in
 3 cellular damage or pharmacological impact.

4 **2.6.3 Correlation Analysis (Heatmaps):** Two distinct correlation analyses were
 5 performed to evaluate the consistency of the pharmacological effects. Both matrices
 6 were visualized as heatmaps using the coolwarm diverging color palette, where values
 7 close to +1 (dark red) indicate a strong positive linear relationship, values near -1 (dark
 8 blue) indicate a strong negative relationship, and values near 0 (white) indicate a lack of
 9 linear correlation. For the marker correlation matrix, an upper triangle mask was applied
 10 to avoid redundancy.

11 **2.6.3.1 Treatment Correlation Matrix:** To quantify the similarity between the
 12 biological signatures of the different experimental groups, the Pearson correlation
 13 coefficient (r) was calculated between the mean response vectors of the treatments
 14 (Control, TQCl 6.29 μ M, TQCl 12.58 μ M, and Miltefosine). This analysis measures the
 15 degree of convergence in the "mode of action" between the tested compound and the
 16 reference drug.

17 **2.6.3.2 Biological Marker Correlation Matrix:** To identify functional relationships and
 18 dependencies between the measured cellular processes, pairwise Pearson correlation
 19 coefficients were calculated across all variables and treatment conditions.

20

21 **3. Results**

22 ***Anti-L. infantum effect of TQCl***

23 The *in vitro* antileishmanial action of **TQCl** was evaluated against promastigotes
 24 and intracellular amastigotes of *L. infantum*. The compound **TQCl** showed a strong
 25 effect against promastigote forms, with an IC_{50} of 6.29 μ M, which is lower than that of
 26 the reference drug, miltefosine (Table 1).

27 Regarding its effect on intramacrophage forms of *L. infantum*, the compound
 28 was highly effective at reducing the parasite burden in infected macrophages, with an
 29 IC_{50} of 9.76 μ M. Miltefosine, used as the reference drug, presents IC_{50} values of 0.65
 30 μ M.

31 Cytotoxicity analysis of the compound against murine macrophages showed low
 32 toxicity (CC_{50} = 115.33 μ M), indicating an excellent cytotoxic profile. The selectivity
 33 index (SI), calculated as the ratio of the macrophage CC_{50} to the parasite IC_{50} , was

1 18.33 and 11.82 for promastigotes and amastigotes, respectively, indicating high
2 selectivity for the parasite relative to the host cell (Table I).

3

4 **Table 1:** *In vitro* *L. infantum* activity and cytotoxicity on mammalian cells of
5 compound **TQCI**.

6

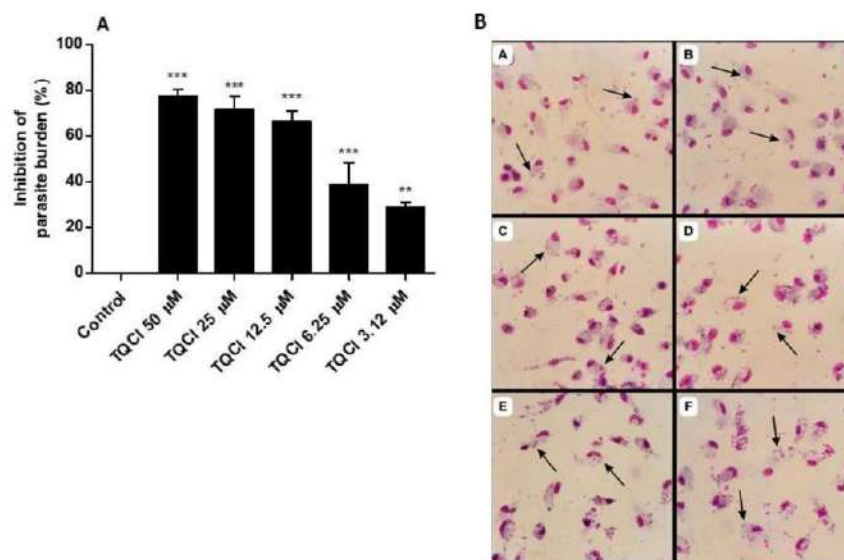
Compound	Promastigotes <i>L. infantum</i> IC ₅₀ μM ^{a,c}	Macrophages CC ₅₀ μM ^{b,c}	Amastigotes <i>L. infantum</i> IC ₅₀ μM ^{a,c}	SI ^d
TQCI	6.29 (5.35-7.39)	115.33 (86.41-153.92)	9.76 (7.77-12.25)	18.33 [*] /11.82 [#]
Miltefosine	6.47 (6.36- 6.58)	131.90 (128.00-135.80)	0.65 (0.51-0.83)	20.39 [*] /202.90 [#]

7 ^aIC₅₀ = Inhibitory concentration of 50% of parasites. ^bCC₅₀ = Cytotoxic concentration of 50% of murine
8 macrophages. ^c95% confidence intervals (in parentheses). ^dSI= Selectivity index, calculated by: CC₅₀
9 against macrophages/IC₅₀ against promastigotes^{*} or amastigotes[#] of *L. infantum*.

10 Miltefosine was used as the reference drug. All experiments were performed three times, each in
11 duplicate.

12

13 Regarding the activity of **TQCI** in macrophages infected with amastigote forms
14 of *L. infantum*, a significant inhibition of the global burden of amastigotes was observed
15 in all concentrations evaluated, with inhibition of 77.55%, 71.90%, 66.5%, 31.53%, and
16 28.84% at concentrations of 50.00 μM, 25.00 μM, 12.50 μM, 6.25 μM, and 3.12 μM,
17 respectively (Figure 2).



1
2 **Figure 2:** (A) *In vitro* action of **TQCI** in the treatment of intramacrophagic amastigotes of *L.*
3 *infantum*. Murine macrophages were infected with *L. infantum* promastigotes (at a ratio of 10:1
4 parasites per macrophage), and later treated with **TQCI** (3.12-50 μ M), for 72 h at 37 °C in 5%
5 CO₂. The cells were stained with Giemsa, and the percentage reduction in global burden was
6 determined by counting 200 cells in duplicate under a light microscope. (B) Photomicrographs
7 of macrophages infected with *L. infantum* amastigotes and treated with **TQCI** for 72 h. (a)
8 **TQCI** at 50 μ M; (b) 25 μ M; (c) 12.5 μ M; (d) 6.25 μ M; (e) 3.12 μ M; (f) control. Statistical
9 analyses were performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test: P<0.001
10 (***) and P<0.0001 (**).
11

12 *In silico* evaluation of physicochemical and pharmacokinetic properties

13 In silico predictions of physicochemical and pharmacokinetic parameters
14 were performed to assess the compound's potential for future *in vivo* studies. The
15 prediction of oral bioavailability of new drug candidate is well evaluated through its
16 physicochemical properties by using the Lipinski's rule of 5, which considers the
17 following criteria: molecular weight $\leq$ 500 g/mol, octanol/water partition
18 coefficient (Log P) $\leq$ 5, number of hydrogen donors (NH + OH) $\leq$ 5 and number of
19 hydrogen acceptors (N + O) $\leq$ 10 [25]. According to the results presented in Table
20 3, the compound **TQCI** presented a good hydrophilic-lipophilic balance (LogP < 5)
21 and a suitable molecular weight (MW < 500) to allow adequate absorption and
22 distribution by the plasma membranes and be delivered to the site of action. In

1 addition, the compound showed several suitable donors to acceptors of hydrogen
2 bonds, suggesting favorable pharmacokinetic properties related to absorption.

3 Theoretical analyses of the pharmacokinetic parameters for absorption,
4 distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) showed that TQCI exhibits
5 high human intestinal absorption (HIA) in Caco-2 cells, indicating good oral
6 bioavailability. Regarding toxicity, **TQCI** demonstrated a favorable profile, with no
7 indication of oral acute toxicity or carcinogenicity. In contrast, the reference drug
8 miltefosine was classified as high acute toxicity. According to the metabolic simulation,
9 **TQCI** is proposed to be an inhibitor of three of the five main isoforms of the
10 cytochrome P450 superfamily of enzymes (CYP1A2, CYP2C19, and CYP2D6).

11

12 **Table 3:** *In silico* evaluation of physicochemical and pharmacokinetic properties of **TQCI** by
13 the SwissADME platform.

14

Properties	TQCI	Miltefosine
MW (g/mol)	323.24	407.57
CLogP	3.06	3.35
NHBD	2	0
NHBA	0	5
Lipinski rules	Pass	Pass
Caco-2 Permeability	-4.759, optimal	-5.337, non-optimal
HIA ($\geq 30\%$)	Yes	No
Oral bioavailability	< 30% F	< 30% F
BBB penetration	No	No
CYP1A2 inhibitor	Yes	No
CYP2C9 inhibitor	No	No
CYP2D6 inhibitor	Yes	No
CYP2C19 inhibitor	Yes	Yes
CYP3A4 inhibitor	No	Yes
Rat Oral Acute Toxicity	Low	High

Carcinogenicity	No	No
-----------------	----	----

1 MW: molecular weight; CLogP: Consensus Partition coefficient; NHBD: number of hydrogen bond donors; NHBA:
 2 number of hydrogen bond acceptors; Lipinski: number of violations of Lipinski's rule; Source: results obtained
 3 through the SwissADME online website. BBB: blood-brain barrier; HIA: human intestinal absorption; Caco-2:
 4 human epithelial colorectal adenocarcinoma cells.

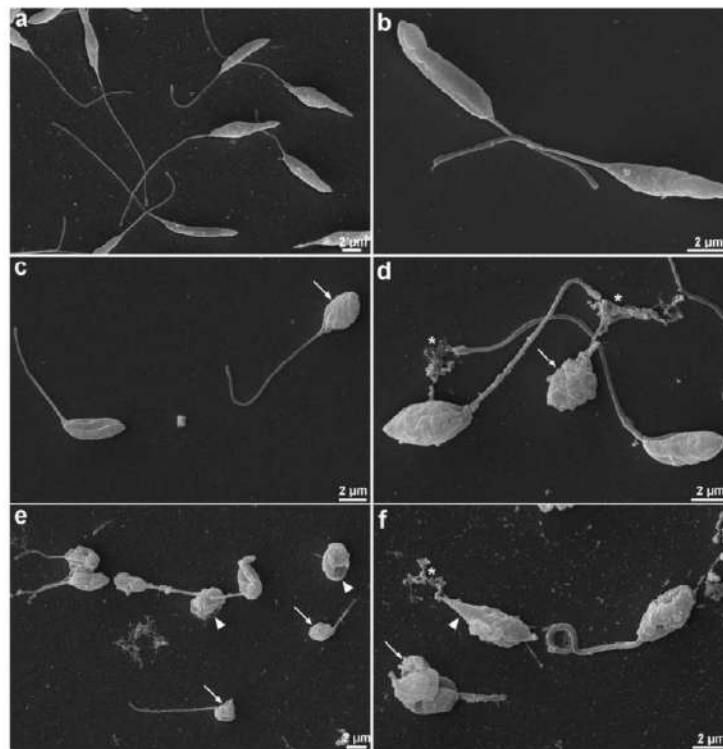
5

6 *Mode of action studies of TQCI*

7

8 Having demonstrated that the compound has a promising effect on
 9 promastigotes and intramacrophage amastigotes of *L. infantum*, it is essential to
 10 elucidate the compound's mode of action. First, we characterized the parasites'
 11 morphology using scanning electron microscopy (SEM). SEM images of untreated
 12 promastigotes control showing standard cell shape and typical morphology (Fig. 3A-B).
 13 However, SEM images revealed that the exposure of the parasites to **TQCI** results in
 14 severe morphological alterations. Parasites treated for 24 h with **TQCI** at 6.29 μ M
 15 showed a rounded shape, reduced body size, and roughness on the membrane surface.
 16 Some parasites present debris near the flagellum (Fig. 3C-D). In parasites treated with
 17 **TQCI** at 12.58 μ M, it is possible to note parasites with rounded morphology (arrow),
 18 shortened flagellum (arrowhead), and cellular debris (asterisk) (Fig. 3E-F).

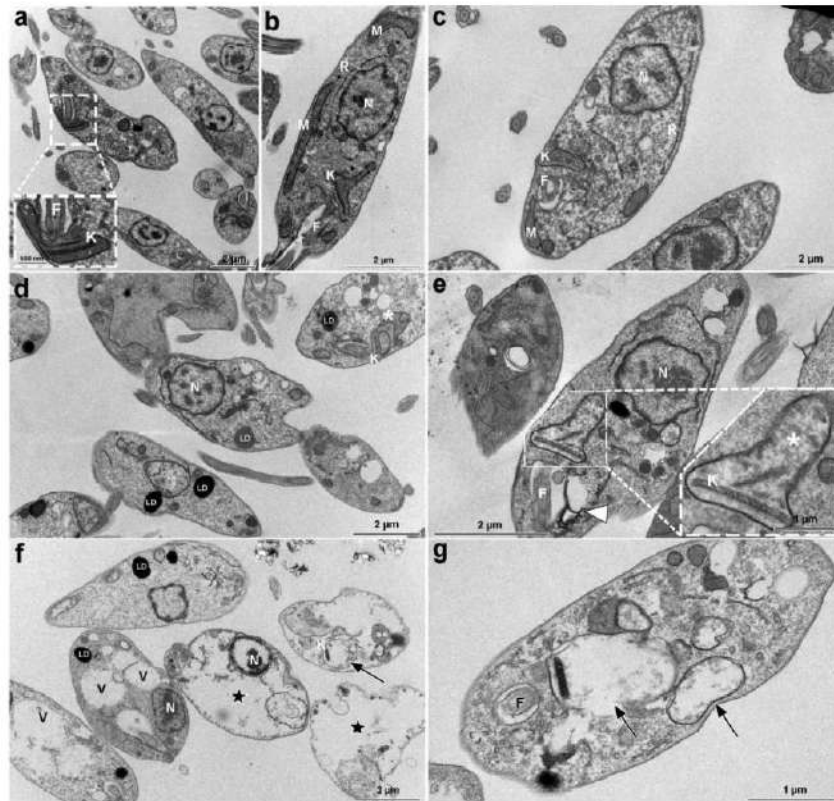
19



1
2 **Figure 3: Morphological analysis of the effect of TQCI on *L. infantum* promastigotes by**
3 **scanning electron microscopy (SEM) micrographs.** (a) Control demonstrating different
4 parasite morphologies along with the typical one. (b) Parasites presenting preserved
5 morphology after incubation with the organic solvent DMSO. (c-d) Parasites treated with **TQCI**
6 at 6.29 μM . Cells with rounded morphology (arrow) and slight membrane roughness. Some
7 parasites have debris near the flagellum (asterisk). (e-f) Parasites treated with **TQCI** at 12.58
8 μM : parasites with inserted morphology (arrow), shortened flagellum (arrowhead), and cellular
9 debris (asterisk).

10
11
12 In parallel, TEM analysis was conducted. As shown in images of untreated
13 control promastigotes of *L. infantum*, the cells exhibited normal cellular organization,
14 with well-preserved cytoplasmic structures, an elongated cell body, and intact
15 cytoplasm (Fig. 4A-C). This contrasts with the cellular disorganization observed in
16 parasites after 24 h of **TQCI** treatment. Promastigotes treated with **TQCI** at 6.29 μM
17 show mitochondrial swelling (inset, asterisk) and the presence of lipid droplets (LD), as
18 well as a vacuole with electron-dense membranes was observed next to the flagellar
19 pocket (Fig. 4D-E). Cellular disorganization was more intense after treatment with the
20 compound at 12.58 μM . Figure 11F-G indicated that mitochondrial ultrastructure was

1 dramatically altered after treatment, with pronounced mitochondrial swelling without
 2 the presence of cristae (arrow). Moreover, several LDs, numerous large vacuoles in the
 3 cytoplasm, and cells with extracted cytoplasmic content were observed (star).
 4



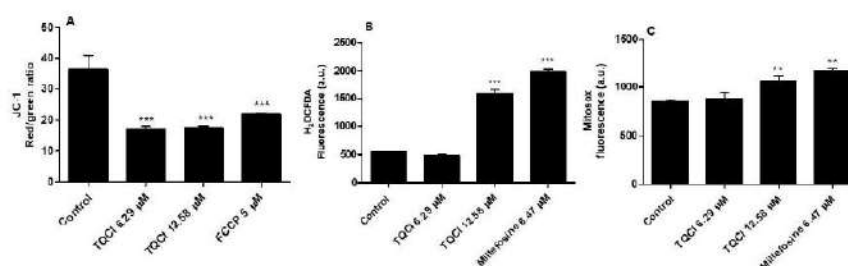
5
 6 **Figure 4: Ultrastructural analysis of the effects of TQCl on *Leishmania infantum***
 7 **promastigotes.** (a-b) Control showing well-preserved cytoplasmic structures of the parasite,
 8 along with an elongated cell body and intact cytoplasm. (c) Parasites treated with DMSO show
 9 no ultrastructural alterations. (d-e) Parasites treated with TQCl at 6.29 μ M (d). Note
 10 mitochondrial swelling (asterisk) and the presence of lipid droplets (LD). (e) Mitochondrial
 11 swelling can be observed (inset, asterisk). A vacuole with electron-dense membranes was
 12 observed next to the flagellar pocket (arrowhead). (f, g) Parasites treated with TQCl at 12.58
 13 μ M. Presence of lipid droplets (LD), mitochondrial swelling without the presence of cristae
 14 (arrow). Note the presence of large vacuoles (v) and cells with extracted cytoplasmic content
 15 (star). Nucleus (N), kinetoplast (K), mitochondria (M), endoplasmic reticulum (R), flagellum
 16 (F).
 17

18 Because the parasite's mitochondria were severely affected, subsequent studies
 19 focused on alterations in this organelle. Additionally, this single organelle in

1 *Leishmania* spp. is considered an attractive pharmacological target because of consistent
 2 structural and functional differences relative to mammalian mitochondria [26].
 3 Maintenance of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is essential for
 4 mitochondrial homeostasis. Mitochondrial dysfunction in **TQCI**-treated parasites was
 5 analysed using the JC-1 potentiometric dye, which demonstrated a remarkable decrease
 6 in red/green fluorescence intensity ratio by 52.96% and 51.73% at 6.29 μM and 12.58
 7 μM of **TQCI**, respectively, indicating depolarization of the mitochondrial membrane
 8 (Fig. 5A). Parasites treated with FCCP reduced the $\Delta\Psi_m$ in 39.87%.

9 Based on the results of the effect of **TQCI** on mitochondrial depolarization, we
 10 further evaluated whether it induces the formation of toxic oxygen radicals. It was found
 11 that treatment of **TQCI** at 12.58 μM increased the production of total ROS and
 12 superoxide radicals by approximately 188% and 26%, respectively, relative to the
 13 untreated control (Fig. 5B and C). Miltefosine, used for comparison, also led to a 262%
 14 increase in total ROS and a 39% increase in superoxide, respectively.

15



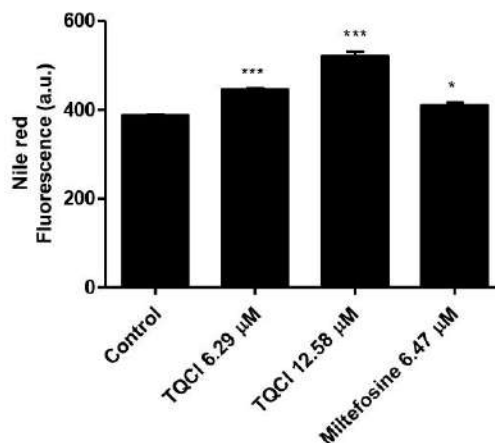
16

17 **Figure 5: Alterations in mitochondrial function of *L. infantum* promastigotes after treatment with TQCI.** Parasites were either untreated (negative control) or treated with **TQCI**
 18 (6.29 μM or 12.58 μM), and after 24 h, cells were stained with fluorescent dyes. (A)
 19 Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of *L. infantum* forms treated with **TQCI** and
 20 incubated with the JC-1 fluorescent dye was determined. Results were expressed as the ratio of
 21 red to green fluorescence. (B) ROS levels were detected by staining with H₂DCFDA. (C)
 22 Superoxide anions were assessed with the Mitosox probe. Fluorescence intensity was measured
 23 by fluorimetry, and results were expressed as arbitrary units (a.u.) from three independent
 24 experiments. (** and ***) indicate significant statistical differences compared to the control
 25 group (P < 0.01 and P < 0.001, respectively).
 26

27

28 Given the mitochondrial damage and oxidative stress observed in promastigotes
 29 following **TQCI** treatment, the lipid droplet content was assessed using the Nile Red
 30 fluorescent probe. According to the data presented in Figure 5, the lipid droplet content

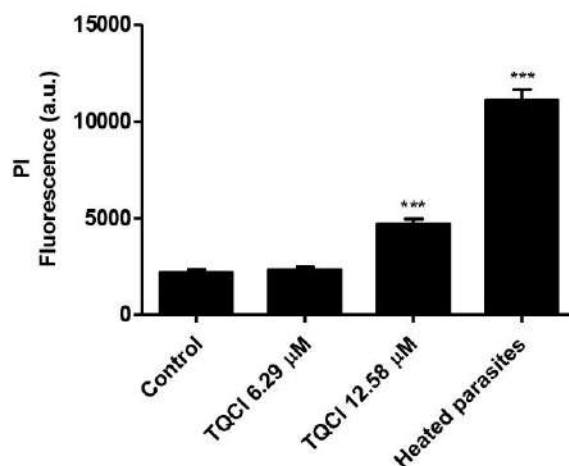
1 was significantly higher (15.33% and 34.62%) after treatment with **TQCl** at 6.29 μM
 2 and 12.58 μM , respectively, than in untreated parasites (Fig. 6).



3
 4 **Figure 6: Effect of TQCl on the accumulation of lipid droplets.** *Leishmania infantum*
 5 promastigotes were incubated with **TQCl** for 24 h and stained with Nile Red, and the
 6 fluorescence intensity was evaluated using a fluorimetric microplate reader. (*), (**) and (***)
 7 indicate a statistically significant difference relative to the control group ($P < 0.1$, $P < 0.01$, and
 8 $P < 0.001$, respectively).

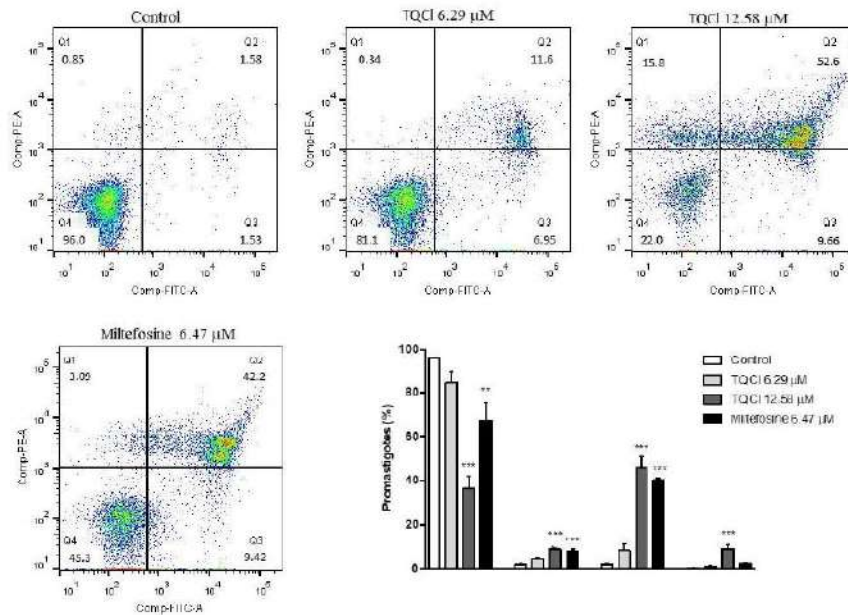
9
 10 The effect of the compound on the plasma membrane permeabilization was
 11 determined using the propidium iodide (PI) fluorescence dye. Treatment of *L. infantum*
 12 promastigotes with **TQCl** caused damage to the parasite membrane, as demonstrated by
 13 an enhancement of PI fluorescence levels by approximately 113.3% at a concentration
 14 of 12.58 μM (Fig. 7).

15
 16



1
2 **Figure 7: Cell membrane integrity of *L. infantum* promastigotes.** Parasites were either
3 untreated or treated with **TQCl** (6.29 μ M or 12.58 μ M) for 24 h and then stained with PI.
4 Positive control: promastigotes heated at 65 °C for 10 min. (***) indicate a significant statistical
5 difference compared with the control group ($P < 0.001$).

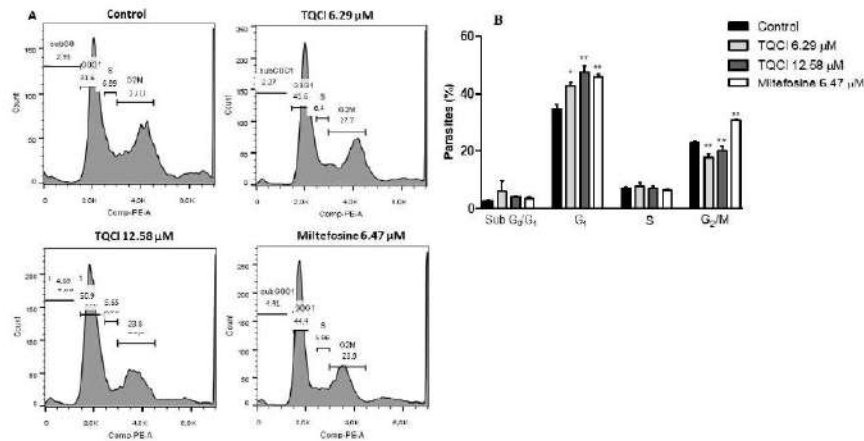
6
7 Phosphatidylserine externalization was assessed by double staining with
8 Annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. The compound **TQCl** at
9 12.58 μ M caused an increase in the population of promastigotes in early apoptosis-like
10 (annexin V+, PI-), late apoptosis-like (annexin V+, PI+), and necrosis (annexin V-, PI+)
11 by 4.65, 24.98, and 21.44-fold, respectively, when compared to the non-treated control.
12 For miltefosine, the changes observed were: early apoptosis-like (4.24-fold), late
13 apoptosis-like (21.96-fold), and necrosis (5.02-fold) (Fig. 8).



1
2 **Figure 8: TQCl induces phosphatidylserine exposure on the cell membrane in**
3 **promastigotes of *L. infantum*.** Parasites were treated with TQCl at IC₅₀ and 2×IC₅₀ for 24 h.
4 Phosphatidylserine exposure was assessed by double staining with the fluorescent probes
5 annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Cells were analyzed using a BD FACSCanto II
6 flow cytometer, and representative dot plots from three independent experiments are shown.
7 (**) and (***) indicates significant differences compared to the non-treated control group (P <
8 0.01 and P < 0.001, respectively).
9

10 To evaluate the effect of TQCl on parasite cell cycle regulation, we performed
11 PI staining, an intercalating dye that binds DNA, followed by flow cytometry analysis.
12 Figure 9 shows that the TQCl treatment interferes with the progression of the cell cycle
13 in parasites (Figures 9A and 9B). It was observed that 34.5% of untreated parasites were
14 in the G₀/G₁ phase, whereas in TQCl treatment at 6.29 μ M and 12.58 μ M, 42.8% and
15 47.6% of parasites, respectively, were in the G₀/G₁ phase. Moreover, a significant
16 decrease was observed in the G₂/M phase of the cell cycle following TQCl treatment.

1



2

3 **Figure 9. Analysis of the cell cycle alterations of *L. infantum*-promastigotes treated with**
4 **TQCI. (A)** Histogram showing cell cycle distribution analysis by flow cytometry after treatment
5 with TQCI (6.29 μ M or 12.58 μ M) or miltefosine (6.47 μ M) for 24 h. A total of 10,000 events
6 were analyzed. Histograms were obtained using FlowJo software Version 10. **(B)** Percentage of
7 cells in each phase of the cell cycle. Data were expressed as the means of three independent
8 experiments, which were performed in triplicate. (*), (**) and (***) represent statistically
9 significant differences in relation to the non-treated control ($P < 0.1$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$,
10 respectively).

11

12 The possible occurrence of autophagic death in *L. infantum* promastigotes
13 induced by treatment with compound TQCI was also evaluated. For this purpose, the
14 parasites were labeled with MDC, a marker for autophagic vacuoles, and the samples
15 were analyzed by fluorimetry. The results showed that the fluorescence intensity was
16 significantly reduced at all concentrations evaluated compared to the untreated control.
17 Promastigotes subjected to nutrient starvation in PBS showed a 124.68% increase in
18 autophagic vacuole formation relative to the untreated control (data not shown).

19 To provide an integrated overview of the cellular mechanisms underlying the
20 antileishmanial activity of TQCI, quantitative multivariate graphical analyses were
21 performed. Experimental data obtained from mitochondrial membrane potential assays,
22 oxidative stress measurements (ROS and superoxide), lipid droplet quantification,
23 membrane permeabilization (propidium iodide uptake), phosphatidylserine exposure
24 (Annexin V/PI staining), cell cycle distribution, and autophagy assays were normalized
25 relative to untreated controls. Normalized values were scaled between 0 (level of
26 control/healthy) and 1 (maximal observed effect) based on variation of absolute values.

1 These normalized datasets were used to generate spider plots and heatmaps, enabling
 2 the comparative visualization of dose-dependent cellular alterations induced by **TQCI** at
 3 IC_{50} and $2 \times IC_{50}$ concentrations. As shown, the graph "Comparative Profile Including
 4 Control (Normalized 0-1)" reveals a dose-dependent transition in the parasite death
 5 phenotype. Normalization of the data allows identification of the specific "cytotoxic
 6 signature" of each treatment. Note that the Mitochondrial Potential marker ($\Delta\Psi_m$)
 7 reaches its maximum impact (close to 1.0) at a concentration of $6.29 \mu M$ (IC_{50} value).
 8 This suggests that mitochondria are the most sensitive biological target to **TQCI**,
 9 preceding other structural damages. When the dose is increased to $12.58 \mu M$, the
 10 damage profile expands significantly in the PS Exposure and Lipid Droplets axes,
 11 evidencing progression to a multisystemic collapse.

12 The "Correlation Matrix between Biological Markers" analysis establishes
 13 causal links between the biochemical events observed during cell death. The near-
 14 absolute brightness between Total ROS, Superoxide, and Membrane Permeability ($r \geq$
 15 0.99) supports the hypothesis that plasma membrane damage may be a direct
 16 consequence of lipid peroxidation caused by oxidative stress. The transparency of $r =$
 17 0.96 between PS Exposure and Cell Cycle arrest (G_0/G_1) indicates that the interruption
 18 of DNA replication and death signaling via phosphatidylserine externalization are
 19 integrated events. The negative coefficient between $\Delta\Psi_m$ and damage markers confirms
 20 the hypothesis that the loss of membrane potential is the central trigger for a cascade of
 21 excluded events.

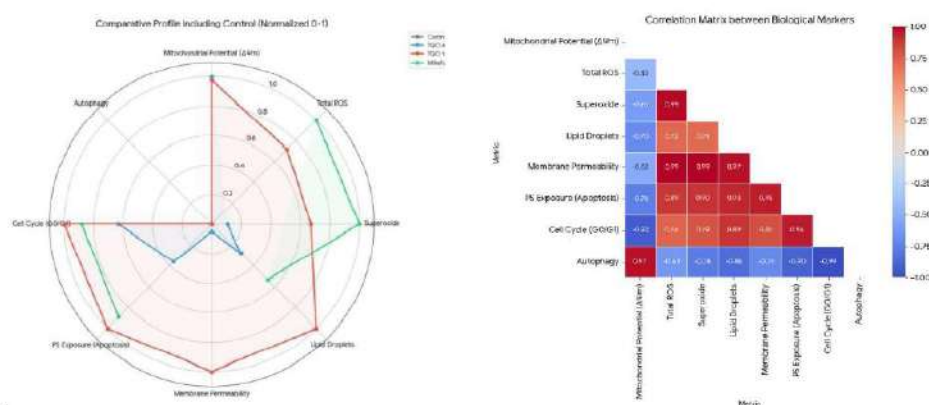
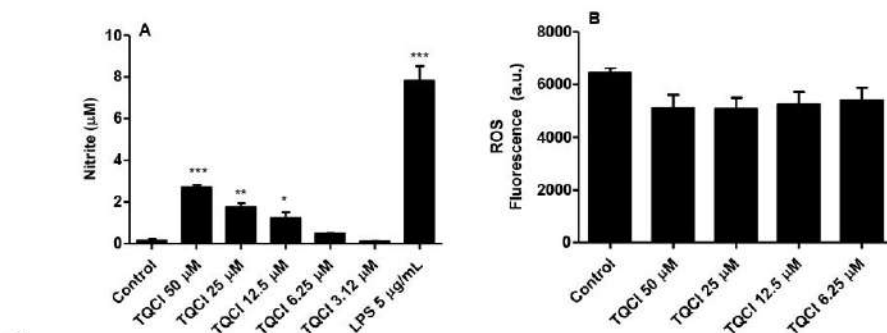


Figure 10: Quantitative spider plot and heatmap of integrated cellular effects induced by TQCl in *L. infantum* promastigotes after 24 h of treatment at IC₅₀ and 2×IC₅₀. (A) Each axis of the spider plot represents a normalized experimental parameter, scaled from 0 (no detectable effect) to 1 (maximum observed effect relative to untreated controls). Normalization was based on fold-change or percentage variation obtained from mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), oxidative stress (ROS and superoxide), lipid droplet accumulation, membrane permeabilization (propidium iodide uptake), phosphatidylserine exposure (Annexin V), cell cycle distribution, and autophagy assays. The spider plot reflects the magnitude of the effect and does not imply hierarchical biological relevance among pathways. (B) The "Correlation Matrix between Biological Markers" analysis examines the relationships between various cellular processes. It highlights strong correlations, such as between Total ROS and Superoxide, and a negative correlation between Mitochondrial Potential and cell death markers.

13

Following the strong effect observed in treated promastigote forms, we intend to assess the potential immunomodulatory effect of TQCl on *L. infantum*-infected macrophages. Treatment with TQCl at 50 μ M, 25 μ M, and 12.5 μ M significantly induced an increase in the nitrite level of 18.1, 11.7, and 8-fold higher in macrophages treated than in non-treated infected macrophages (Fig. 11A). In contrast, the ROS production remained unaltered in infected macrophages treated with the different concentrations of TQCl (Fig. 11B).



21

Fig. 11: Evaluation of NO and ROS production in macrophages infected with *L. infantum* and treated with TQCl. Macrophages were infected with *L. infantum* and incubated with different concentrations of TQCl (50-3.12 μ M) for 48 hours. (A) Nitrite levels were quantified in the culture supernatant of infected macrophages by the Griess method. As a positive control, infected macrophages stimulated with LPS were used. (B) ROS levels were quantified using the H₂DCFDA fluorescent probe. Fluorescence intensity was measured using fluorimetry with a 485/528 nm filter pair. (*), (**) and (***) indicate statistically significant differences compared to the negative control ($P < 0.1$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively).

29

1

2 **Discussion**

3 In this work, we determined the antileishmanial effect of a new quinoline
 4 analogue, **TQCI**, containing a 2-aminothiophenol, and provided initial insight into its
 5 mechanism of action. The compound assayed displayed antileishmanial activity against
 6 promastigotes and intracellular amastigotes of *L. infantum*, with an $IC_{50} < 10 \mu M$ and a
 7 selectivity index > 10 , indicating its potency and selectivity. In addition, **TQCI** can be
 8 considered a promising lead compound, since it fulfills the criteria defined by the Drugs
 9 for Neglected Diseases initiative (DNDi) rules for new antileishmanial drug candidates:
 10 $IC_{50} < 10 \mu M$ for intracellular amastigotes together with a selectivity index (SI) > 10 and
 11 an appropriate *in silico* ADMET profile [27].

12 Several studies have correlated lipophilicity and basicity with the leishmanicidal
 13 activity of quinoline scaffolds. The authors proposed that the selective accumulation
 14 inside the phagolysosome and into cell organelles (e.g., cytosol, lysosomes, or
 15 mitochondria) can be mediated through lipophilic penetration and the subsequent “ion
 16 trapping” mechanism, in which the capture of the molecule is achieved by generating a
 17 polar and cationic form through the protonation of the basic moieties in an acidic
 18 environment [11,28].

19 *Leishmania* spp. and other trypanosomatids, unlike mammalian cells, possess a
 20 single, large, and highly specialized mitochondrion that plays multifunctional roles in
 21 regulating bioenergetics and oxidative metabolism, calcium homeostasis, biosynthetic
 22 pathways, and antioxidant enzyme activity, among other processes. In addition,
 23 mitochondrial DNA is compartmentalized into a kinetoplast, among other processes.
 24 Maintenance of mitochondrial integrity is crucial for the physiological function of the
 25 respiratory chain, and a significant loss of $\Delta\Psi_m$ depletes cells of energy, thereby
 26 activating the cell death machinery in parasites [20, 29].

27 The TEM analysis of *L. infantum* promastigotes treated with **TQCI** revealed
 28 profound alterations in mitochondrial ultrastructure, including intense mitochondrial
 29 swelling and loss of cristae. These ultrastructural alterations were associated with
 30 mitochondrial dysfunction, as evidenced by a decrease in $\Delta\Psi_m$ after **TQCI** treatment.

31 Reactive oxygen species (ROS) are biomolecules generated in the mitochondrial
 32 respiratory chain used as signalization in cell proliferation and growth [30,31]. The
 33 relationship between mitochondria and reactive species must be fully regulated. Thus,

1 mitochondrial derangements resulting from perturbation of the mitochondrial membrane
 2 potential ($\Delta\psi_m$) can lead to excessive ROS generation. The oxidative stress induced by
 3 high ROS levels was evident in **TQCI**-treated parasites, as evidenced by increased
 4 superoxide radicals and “total” ROS, including hydrogen peroxide, hydroperoxides, and
 5 peroxynitrite. In excess, these mitochondrial ROS can cross the mitochondrial
 6 membrane and damage organelles and other cytoplasmic structures, interfering with
 7 various biosynthetic and metabolic pathways and causing irreversible damage to
 8 biomolecules, such as lipids, proteins, and nucleic acids [30].

9 Lipid droplets (LDs) are dynamic and multifunctional organelles composed of a
 10 neutral lipid core surrounded by phospholipids and associated proteins. LDs are
 11 involved in essential processes, including energy storage during nutrient deprivation,
 12 regulation of lipid homeostasis, synthesis of membrane lipids required for replication
 13 and differentiation, and production of signaling molecules such as eicosanoids that
 14 interfere with host immune responses [32]. The accumulation of lipid droplets observed
 15 in **TQCI**-treated promastigotes suggests that the compound disrupts lipid metabolism,
 16 which may reflect a cellular response to oxidative stress and serve as a lipid source for
 17 energy and cell survival. Previous works with quinoline derivatives have shown the
 18 interference in the bioenergetic system of the parasite with modifications to biochemical
 19 processes associated with mitochondrial membrane potential depolarization, the
 20 increase in ROS levels, and lipid droplets formation [15,19,33,34,35].

21 The plasma membrane of *Leishmania* is a highly specialized and dynamic
 22 structure with a unique composition that differs significantly from mammalian
 23 membranes. It comprises a lipid bilayer containing ergosterol-like sterols, proteins, and
 24 glycoconjugates, many of which are anchored to the membrane surface. It plays a
 25 crucial role in the parasite's survival by regulating nutrient uptake and coordinating
 26 parasite differentiation; harbors key virulence factors; protects against immune attack;
 27 and serves as a significant target for chemotherapy [36]. Cell membranes and organelle
 28 membranes are particularly susceptible to ROS-induced damage due to their high lipid
 29 content. Lipid oxidation mediated by ROS directly damages phospholipids, altering
 30 membrane structure via pore formation and disrupting pH balance and nutrient
 31 transport, ultimately leading to cell death [14,37].

32 The results showed that the **TQCI** treatment alters the permeability of
 33 the parasite's plasma membrane, providing additional evidence of irreversible cellular
 34 effects that may have contributed to parasite killing. Additionally, the plasma membrane

1 phospholipid externalization was analysed. Our data showed a profound induction of
 2 phospholipid externalization at the $2 \times \text{IC}_{50}$ dose, as evidenced by a substantial shift of
 3 parasite populations toward early- and late-stage apoptosis-like. Therefore, the results
 4 demonstrated herein confirm structural and morphological alterations of the cell
 5 membrane (permeability and changes in phospholipid composition).

6 The cell cycle of *Leishmania* promastigotes is precisely regulated to allow
 7 adequate growth, differentiation, and replication [38]. Cell cycle progression is highly
 8 sensitive to oxidative or drug-induced stress, which can trigger cell cycle arrest, thereby
 9 impairing the parasite's normal cell division [39]. In addition to growth inhibition and
 10 various flagellar alterations, such as double or short flagella, and the absence of flagella
 11 observed by SEM, flow cytometric analysis revealed that treatment of *L. infantum*
 12 promastigotes with **TQCI** induces changes in the parasite cell cycle. These results
 13 suggest that the compound **TQCI** induces a G_0/G_1 cell cycle arrest in the parasites, an
 14 event also associated with apoptosis-like cell death [40], preventing them from
 15 progressing normally into the synthesis (S) and subsequent G_2/M phases.

16 Trypanosomatids possess a functional autophagic system that mediates turnover
 17 and recycling by removing damaged cellular components, which appears essential for
 18 regulating homeostasis during parasite differentiation and growth, thereby preventing
 19 excessive self-destruction. However, when homeostatic balance is lost, extensive
 20 autophagic activation may lead to indiscriminate degradation of a large portion of the
 21 cytosol and organelles, and to a complete collapse of cellular functions [26,41]. In fact,
 22 ultrastructural analysis revealed intense cytoplasmic vacuolation in *L. infantum*
 23 promastigotes following treatment with **TQCI** at all concentrations tested, indicating
 24 that autophagy is exacerbated in these cells.

25 Integrated visualization of the experimental data revealed that mitochondrial
 26 dysfunction represents the central initiating event in **TQCI**-induced cytotoxicity in *L.*
 27 *infantum* promastigotes. Although mitochondrial depolarization reached approximately
 28 50% relative to untreated controls, this early alteration preceded and correlated with
 29 multiple downstream events, including amplification of oxidative stress, membrane
 30 permeabilization, phosphatidylserine exposure, lipid droplet accumulation, and cell
 31 cycle arrest. The reduction in autophagy-related signaling suggests that **TQCI** interferes
 32 with parasite survival mechanisms, thereby favoring irreversible cell death. Together,
 33 these findings support a mitochondria-centered cascade triggered by **TQCI**, leading to
 34 heterogeneous cell death outcomes, including apoptosis-like and necrotic phenotypes.

1 This multifaceted mode of action may contribute to the potent antileishmanial activity
2 of **TQCI** and reduce the likelihood of resistance development.

3 We extended the investigation into the mechanism of action of **TQCI** in
4 macrophages infected with *L. infantum* amastigotes. Given that reactive nitrogen
5 species (RNS) and ROS play a crucial role in the immune response against *Leishmania*
6 spp. by mediating parasite killing in activated macrophages, we evaluated whether
7 incubation with **TQCI** enhances the production of these effector molecules in
8 macrophages infected with *L. infantum*. Our data demonstrated that **TQCI** induced
9 higher levels of NO production, indicating its role in parasite killing. Interestingly, no
10 difference was observed in ROS production.

11 Collectively, our results demonstrate that **TQCI** induces profound mitochondrial
12 dysfunction and oxidative stress in *L. infantum* promastigotes, resulting in
13 heterogeneous death outcomes within the parasite population: a subset of promastigotes
14 exhibits apoptosis-like features, whereas another fraction exhibits necrotic morphology.
15 In some cells, severe apoptotic-like injury may progress to secondary necrosis,
16 indicating that **TQCI** acts through multiple, and dose-dependent cytotoxic pathways
17 rather than a single uniform mechanism. Additionally, an immunomodulatory effect is
18 observed in infected macrophages.

19

20 **Conclusion**

21 Here, we describe the synthesis and antileishmanial activity of a new compound,
22 **TQCI**, formed by combining a 2-aminothiophenol unit with the 4-aminoquinoline
23 scaffold. **TQCI** exhibited potent and selective antileishmanial activity against
24 promastigote and intracellular amastigote forms of *L. infantum*. Our results indicate that
25 this compound induces multi-target cell death, including apoptosis-like and necrosis, as
26 well as immunomodulatory events.

27

28 **Funding**

29 This work was supported by FAPEMIG (APQ-01646-23; RED-00198-23; APQ-01357-
30 21) and CNPq (408700/2021-1). SFR is a grant recipient of FAPEMIG. ESC is a CNPq
31 grant recipient. The authors thank the “Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph
32 Bart (IOC/FIOCRUZ)” for supporting the electron microscopy analysis.

33

1 Declaration of competing interest

2 The authors declare that they have no known competing financial interests or
3 personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this
4 paper.

5

6 References

- 7
- 8 [1] Burza, Sakib, Simon L. Croft, and Marleen Boelaert, Leishmaniasis, *The Lancet*.
9 392.10151 (2018) 951-970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)33046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33046-0).
- 10 [2] Pan American Health Organization – PAHO, Leishmaniasis.
11 <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>, 2025 (accessed 16 January 2026).
- 12 [3] World Health Organization – WHO, Leishmaniasis.
13 <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>, 2025 (accessed 10 January 2026).
- 14 [4] Silveira, Fernando, T, What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous
15 leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil,
16 *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 113.9 (2019) 505-
17 516. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz037>.
- 18 [5] Costa, Carlos HN, et al, From infection to death: an overview of the pathogenesis of
19 visceral leishmaniasis, *Pathogens*. 12.7 (2023) 969.
20 <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>.
- 21 [6] Pareyn M, Alves F, Burza S, Chakravarty J, Alvar J, Diro E, et al, Leishmaniasis,
22 *Nat Rev Dis Primers*. 20;11(1) (2025) 81. <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00663-w>.
- 23 [7] Cosma, Claudia, et al, Leishmaniasis in humans and animals: A One Health
24 approach for surveillance, prevention and control in a changing world, *Tropical*
25 *Medicine and Infectious Disease*. 9.11 (2024) 258.
26 <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10030074>.
- 27 [8] De Menezes, Juliana Perrone Bezerra, et al, Advances in development of new
28 treatment for leishmaniasis, *BioMed research international* 2015.1 (2015) 815023.
29 <https://doi.org/10.1155/2015/815023>.
- 30 [9] Majoor A, Michel G, Marty P, Boyer L, Pomares C, Leishmaniasis: Strategies in
31 treatment development, *Parasite*. 32:18 (2025).<https://doi.org/10.1051/parasite/2025009>.
- 32 [10] Gonçalves G, Campos MP, Gonçalves AS, Figueiredo FB, Therapeutic success and
33 failure in using miltefosine to treat dogs naturally infected with *Leishmania infantum*,
34 *Rev Bras Parasitol Vet*. 12;33(1) e015023 (2024). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612024012>.
- 35
- 36 [11] Romero AH, Delgado F, 4-Aminoquinoline as a privileged scaffold for the design
37 of leishmanicidal agents: structure-property relationships and key biological targets,
38 *Front Chem*. 29;12:1527946 (2025). <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1527946>.

- 1 [12] Silva CFM, Pinto DCGA, Fernandes PA, Silva AMS, Evolution of the Quinoline
2 Scaffold for the Treatment of Leishmaniasis: A Structural Perspective, *Pharmaceuticals*
3 (Basel). 22;17(3) (2024) 285. <https://doi.org/10.3390/ph17030285>.
- 4 [13] Ribeiro Antinarelli LM, Glanzmann N, Mendonça DVC, Lage DP, Oliveira-da-
5 Silva JA, Tavares GSV, Carvalho AMRS, Freitas CS, Martins VT, Duarte MC,
6 Menezes-Souza D, da Silva AD, Coelho EAF, Soares Coimbra E, Parasitological and
7 immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric
8 micelle formulation against *Leishmania infantum* infection, *Parasitol Res.* 121(7)
9 (2022) 2129-2140. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07544-1>.
- 10 [14] Glanzmann N, Antinarelli LMR, da Costa Nunes IK, Pereira HMG, Coelho EAF,
11 Coimbra ES, da Silva AD, Synthesis and biological activity of novel 4-
12 aminoquinoline/1,2,3-triazole hybrids against *Leishmania amazonensis*, *Biomed*
13 *Pharmacother.* 141 (2021) 111857. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111857>.
- 14 [15] Calixto, Stephane Lima, et al, Novel organic salts based on quinoline derivatives:
15 The in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp,
16 *Chemico-biological interactions.* 293 (2018) 141-151.
17 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.003>.
- 18 [16] R Soares, Roberta, et al, In vivo antimalarial and in vitro antileishmanial activity of
19 4-aminoquinoline derivatives hybridized to isoniazid or sulfa or hydrazine groups,
20 *Letters in Drug Design & Discovery.* 14.5 (2017) 597-604.
21 <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00053>.
- 22 [17] Henriquez-Figueroa A, Morán-Serradilla C, Angulo-Elizari E, Sanmartín C, Plano
23 D, Small molecules containing chalcogen elements (S, Se, Te) as new warhead to fight
24 neglected tropical diseases, *Eur J Med Chem.* 15;246 (2023) 115002.
25 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115002>.
- 26 [18] Das Chagas Almeida, Ayla, et al, Functionalized 1, 2, 3-triazolium salts as
27 potential agents against visceral leishmaniasis, *Parasitology Research.* 121.5 (2022)
28 1389-1406. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07431-9>.
- 29 [19] Antinarelli, Luciana M. Ribeiro, et al, Exploring the repositioning of the
30 amodiaquine as potential drug against visceral leishmaniasis: The in vitro effect against
31 *Leishmania infantum* is associated with multiple mechanisms, involving mitochondria
32 dysfunction, oxidative stress and loss of cell cycle control, *Chemico-Biological*
33 *Interactions.* 371 (2023) 110333. <https://doi.org/10.1111/cbdd.70227>.
- 34 [20] Souza AR, Antinarelli LMR, Lemos ASO, Glanzmann N, Vicente B, Midlej VDV,
35 Silva Neto AFD, Machado RRP, da Silva AD, Coimbra ES, Multiple mechanisms of
36 action of a triazole-derived salt against *Leishmania amazonensis*: Apoptosis-like death
37 and autophagy, *Chem Biol Interact.* 409 (2025) 111409.
38 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.111409>.
- 39 [21] Stroppa PHF, Antinarelli LMR, Carmo AML, Gameiro J, Coimbra ES, da Silva
40 AD, Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on
41 *Leishmania amazonensis*, *Bioorg Med Chem.* 15;25 (12) (2017) 3034-3045.
42 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.051>.
- 43 [22] Antinarelli LMR, Meinel RS, Coelho EAF, da Silva AD, Coimbra ES, Resveratrol
44 analogues present effective antileishmanial activity against promastigotes and

- 1 amastigotes from distinct *Leishmania* species by multitarget action in the parasites, *J*
- 2 *Pharm Pharmacol.* 71(12) (2019) 1854-1863. <https://doi.org/10.1111/jphp.13177>.
- 3 [23] Daina A, Michielin O, Zoete V, SwissADME: a free web tool to evaluate
- 4 pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small
- 5 molecules, *Sci Rep.* 3;7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- 6 [24] Amaral, Maiara, et al, Biological activity and structure–activity relationship of
- 7 dehydrodieugenol B analogues against visceral leishmaniasis, *RSC Medicinal*
- 8 *Chemistry.* 14.7 (2023) 1344-1350. <https://doi.org/10.1039/d3md00081h>.
- 9 [25] Lipinski, Christopher A., et al, Experimental and computational approaches to
- 10 estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,
- 11 *Advanced drug delivery reviews.* 64 (2012) 4-17. [https://doi.org/10.1016/s0169-](https://doi.org/10.1016/s0169-12)
- 12 [409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-12409x(00)00129-0).
- 13 [26] Pedra-Rezende, Yasmin, et al, Different drugs, same end: Ultrastructural hallmarks
- 14 of autophagy in pathogenic protozoa, *Frontiers in microbiology* 13 (2022) 856686.
- 15 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856686>.
- 16 [27] Don, R. O. B., and Jean-Robert Ioset, Screening strategies to identify new chemical
- 17 diversity for drug development to treat kinetoplastid infections, *Parasitology.* 141.1
- 18 (2014) 140-146. <https://doi.org/10.1017/S003118201300142X>.
- 19
- 20 [28] Romero, Angel H, Are basic and lipophilic chain groups highly required in
- 21 leishmanicidal quinolines to favor the phagolysosome accumulation, *Frontiers in*
- 22 *Chemistry.* 13 (2025) 1655979. <https://doi.org/10.3389/fchem.2025.1655979>.
- 23 [29] Fidalgo, Lianet Monzote, and Lars Gille, Mitochondria and trypanosomatids:
- 24 targets and drugs, *Pharmaceutical research.* 28.11 (2011) 2758-2770.
- 25 <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0586-3>.
- 26 [30] Tomás, Ana M., and Helena Castro, Redox metabolism in mitochondria of
- 27 trypanosomatids, *Antioxidants & redox signaling* 19.7 (2013) 696-707.
- 28 <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4948>.
- 29 [31] Menna-Barreto, Rubem Figueiredo Sadok, and Solange Lisboa de Castro, The
- 30 double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in
- 31 oxidative stress and bioenergetics, *BioMed research international.* 2014.1 (2014)
- 32 614014. <https://doi.org/10.1155/2014/614014>.
- 33
- 34 [32] Tavares, Victor de Souza, et al, Lipid droplets of protozoan parasites: survival and
- 35 pathogenicity, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 116 (2022) e210270.
- 36 <https://doi.org/10.1590/0074-02760210270>.
- 37
- 38 [33] Antinarelli, Luciana MR, et al, 4-aminoquinoline derivatives as potential
- 39 antileishmanial agents, *Chemical Biology & Drug Design* 86.4 (2015) 704-714.
- 40 <https://doi.org/10.1111/cbdd.12540>.
- 41
- 42 [34] Staderini, Matteo, et al, Structure-activity relationships and mechanistic studies of
- 43 novel mitochondria-targeted, leishmanicidal derivatives of the 4-aminostyrylquinoline
- 44 scaffold, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 171 (2019) 38-53.
- 45 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.007>.

- 1
- 2 [35] Sousa, Jessica KT, et al, A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and
- 3 in vivo antileishmanial activity against Leishmania species that cause tegumentary and
- 4 visceral leishmaniasis, *Parasitology International* 73 (2019) 101966.
- 5 <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101966>.
- 6
- 7 [36] Rios-Barros, Laura Valeria, et al, Leishmania plasma membrane-general
- 8 composition, structure and biological functions, *Current Topics in Membranes*. 95
- 9 (2025) 215-247. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2025.06.009>.
- 10
- 11 [37] Amaral, Maiara, et al, A semi-synthetic neolignan derivative from
- 12 dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of Leishmania infantum
- 13 and inhibits cell division, *Scientific Reports*. 9.1 (2019) 6114.
- 14 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42273-z>.
- 15
- 16 [38] Assis, Luiz HC, et al, Cell cycle, telomeres, and telomerase in leishmania spp.:
- 17 What do we know so far?, *Cells* 10.11 (2021) 3195.
- 18 <https://doi.org/10.3390/cells10113195>.
- 19
- 20 [39] Ventura Silva, Danny B., et al, Kojic Acid Promotes Apoptosis-like Death and Cell
- 21 Cycle Arrest in Leishmania (Leishmania) amazonensis Promastigotes, *ACS omega*.
- 22 10.32 (2025) 36376-36381. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c04741>.
- 23
- 24 [40] Ali, Rahat, et al, Sesamol induces apoptosis-like cell death in Leishmania
- 25 donovani, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 11 (2021) 749420.
- 26 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.749420>.
- 27
- 28 [41] Romano, Patricia Silvia, et al, Autophagy in protists and their hosts: When, how
- and why?, *Autophagy Reports*. 2.1 (2023) 2149211.
- <https://doi.org/10.1128/msphere.00829-24>.

Declaration of Interest Statement

Declaration of interests

☐ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☒ The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Elaine Soares Coimbra reports financial support was provided by Minas Gerais State Foundation of Support to the Research. Elaine Soares Coimbra reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ANEXO A - Certificado 018/2023 - CEUA/UFJF

09/11/2023, 16:29

SEI/UFJF - 1566323 - GERAL 15: Parecer



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CERTIFICADO 018/2023

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da atividade antileishmanial in vitro de produtos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com Leishmania spp, referentes aos lotes 2024, 2025 e 2026.”** Protocolo número **018/2023**, sob responsabilidade de **Elaine Soares Coimbra, Ari Sérgio de Oliveira Lemos, Patrícia de Almeida Machado, Luciana M Ribeiro Antinarelli e Andreza Rodrigues de Souza** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (excetohomem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, bem como normas editadas pelo Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora na reunião de 07/11/2023.

We certify that the proposal entitled **“Evaluation of the in vitro antileishmanial activity of synthetic or natural products in macrophages infected with Leishmania spp, referring to batches 2024, 2025 and 2026.”** Protocol number **018/2023**, under the responsibility of **Elaine Soares Coimbra, Ari Sérgio de Oliveira Lemos, Patrícia de Almeida Machado, Luciana M Ribeiro Antinarelli and Andreza Rodrigues de Souza** – which involves the use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except man), for scientific research purposes - is in accordance with the precepts of Law 11,794 of October 8, 2008, with Decree 6,899 of July 15, 2009, as well as standards published by the Control Council of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Juiz de Fora at the meeting on 11/07/2023.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2024 a 31/12/2026.
Médico Veterinário responsável pela pesquisa ART e vigência	Adolfo Firmino da Silva Neto ART 15003/2022, validade 08/12/2023 validador: 615e71ef621f0ad6460db88b3c9e2870
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico - BALB/c
Nº de animais	432
Peso/Idade	15-20 gramas / 4-6 semanas
Sexo	Fêmea

09/11/2023, 16:29

SEI/UFJF - 1566323 - GERAL 15: Parocar

Procedência dos animais	CBR/UFJF
Local de manutenção dos animais	Biotério de Experimentação - NUPEP/ICB/UFJF

APROVEITAMOS A OPORTUNIDADE PARA INFORMAR QUE:

- 1) O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;
- 2) A CEUA/UFJF deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a e evento não previstos.
- 3) Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/UFJF de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas.
 - No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/UFJF e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
 - No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 12 (doze meses), a partir da data de aprovação da CEUA/UFJF.
- 4) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Atenciosamente,

CEUA/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Coordenador(a) em exercício**, em 09/11/2023, às 14:43, 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 Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1566323** e o código CRC **8F7B40FE**.

ANEXO B - Certificado 019/2023 - CEUA/UFJF

09/11/2023, 16:30

SEI/UFJF - 1566331 - GERAL 15: Parecer



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CERTIFICADO 019/2023**

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da citotoxicidade in vitro de produtos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, referentes aos lotes 2024, 2025 e 2026.”** Protocolo número **019/2023**, sob responsabilidade de **Elaine Soares Coimbra, Ari Sérgio de Oliveira Lemos, Patrícia de Almeida Machado, Luciana M Ribeiro Antinarelli e Andrezza Rodrigues de Souza** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (excetohomem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, bem como normas editadas pelo Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora na reunião de 07/11/2023.

We certify that the proposal entitled **“Evaluation of in vitro cytotoxicity of synthetic or natural products in peritoneal macrophages from BALB/c mice, referring to batches 2024, 2025 and 2026.”** Protocol number **019/2023**, under the responsibility of **Elaine Soares Coimbra, Ari Sérgio de Oliveira Lemos, Patrícia de Almeida Machado, Luciana M Ribeiro Antinarelli and Andrezza Rodrigues de Souza** – which involves the use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except man), for scientific research purposes - is in accordance with the precepts of Law 11,794 of October 8, 2008, with Decree 6,899 of July 15, 2009, as well as standards published by the Control Council of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Juiz de Fora at the meeting on 11/07/2023.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2024 a 31/12/2026.
Médico Veterinário responsável pela pesquisa ART e vigência	Adolfo Firmino da Silva Neto ART 15003/2022, validade 08/12/2023 validador: 615e71ef621f0ad6460db88b3c9e2870
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico - BALB/c
Nº de animais	108
Peso/Idade	15-20 gramas / 4-6 semanas
Sexo	Fêmea

09/11/2023, 16:30

SEI/UFJF - 1566331 - GERAL 15: Parecer

Procedência dos animais	CBR/UFJF
Local de manutenção dos animais	Biotério de Experimentação - NUPEP/ICB/UFJF

APROVEITAMOS A OPORTUNIDADE PARA INFORMAR QUE:

- 1) O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;
- 2) A CEUA/UFJF deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a e evento não previstos.
- 3) Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/UFJF de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas.
 - No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/UFJF e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
 - No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 12 (doze meses), a partir da data de aprovação da CEUA/UFJF.
- 4) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Atenciosamente,

CEUA/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Coordenador(a) em exercício**, em 09/11/2023, às 14:43, 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 Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1566331** e o código CRC **F591C19D**.