

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAYANNE REGINA BELTRAME MACHADO

**EFEITO BIOLÓGICO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO (ACET-1)  
EM *Leishmania amazonensis*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS,  
MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS**

Maringá

2021

RAYANNE REGINA BELTRAME MACHADO

**EFEITO BIOLÓGICO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO (ACET-1)  
EM *Leishmania amazonensis*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS,  
MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Lazarin-Bidóia

Maringá

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M149e

Machado, Rayanne Regina Beltrame

Efeito biológico de um derivado tiofênico (ACET-1) em *Leishmania amazonensis* : alterações bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais / Rayanne Regina Beltrame Machado. -- Maringá, PR, 2021.  
69 f.color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Lazzarin-Bidóia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

1. Morte celular - Autofagia - Apoptose.. 2. Leishmaniose - Atividade antileishmania. 3. Tiofenos. I. Nakamura, Celso Vataru, orient. II. Lazzarin-Bidóia, Danielle, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 616.9364

# FOLHA DE APROVAÇÃO

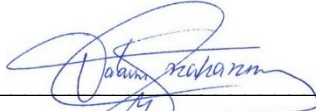
RAYANNE REGINA BELTRAME MACHADO

## **EFEITO BIOLÓGICO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO (ACET-1) EM *Leishmania amazonensis*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em 25/08/2021

### **BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

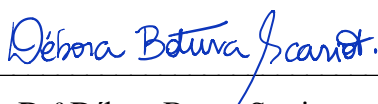
Universidade Estadual de Maringá



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli Fumie Yamada Ogatta

Universidade Estadual de Londrina



---

Dr.<sup>a</sup> Débora Botura Scariot

Northwestern University

## **BIOGRAFIA**

Nascida em 26 de dezembro de 1998 em Maringá-Paraná, Rayanne Regina Beltrame Machado é filha de Silvana Regina Beltrame da Rosa e Agnaldo dos Santos Machado. Concluiu ensino fundamental (2012) e médio (2015) no Colégio Regina Mundi em Maringá. Em 2016, iniciou a graduação de Bioquímica na Universidade Estadual de Maringá, onde se formou Bacharela em Bioquímica, em março de 2020. Neste mesmo mês/ano, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Celular e Molecular) na Universidade Estadual de Maringá e atualmente é membro do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos. Participa de projetos de pesquisa que avaliam a atividade antiparasitária de substâncias sintéticas além de possuir experiência na área de biologia celular e bioquímica de parasitos, com ênfase em microscopia eletrônica.

## AGRADECIMENTOS

Nada seria possível muito menos gratificante se fosse feito sozinho. Por isso, agradeço imensamente todos aqueles que de alguma forma, cruzaram meu caminho e contribuíram para a formação pessoal e profissional de quem hoje aqui escreve.

Agradeço primeiramente aos meus pais Silvana e Agnaldo, por nunca medirem esforços para sustentar os objetivos de uma garota que nunca viu limites para seus sonhos, mas que também sempre que preciso, colocaram meus pés de volta no chão.

Às minhas irmãs mais velhas Karen e Maria Eduarda pelas lições da vida adulta e apoio nos momentos mais cruciais.

Aos meus avós Gherta, Helena e Luiz que sempre se preocuparam com meu bem-estar e acima de tudo se enchem de alegria ao me ver formada e sonhando cada vez mais alto.

Ao meu orientador Celso Vataru Nakamura, pela confiança depositada sobre mim, pelas oportunidades que me proporcionou e pelos ensinamentos que me transmitiu.

À minha coorientadora Danielle Lazarin Bidóia por todos os ensinamentos desde o início em 2017, por despertar em mim a paixão pela microscopia, me acompanhar em congressos, além da parceria e amizade construída ao longo dos anos que vai além da orientação.

À minha *lab sister* Amanda Bakoshi e ao Rodolfo Balbinot por tudo! Desde aceitar a resolver problemas metodológicos, escrever protocolos, fazer companhia enquanto terminava experimentos para não ir embora sozinha, até mesmo esperar para almoçar ou tomar um café no meio da tarde.

Aos meus amigos da graduação e conseqüentemente do mestrado, Bárbara Nogueira, Julia Urbano, Leonardo Martins, Natália Storck e Nathália Miranda que acompanham minha vida profissional desde o início e me dão suporte e conselhos na carreira belíssima que escolhemos para a vida.

A todos os amigos que já fizeram ou ainda fazem parte do laboratório B08, que compartilharam momentos e deixaram um pouco de sua bagagem comigo.

Aos meus amigos de fora da Universidade que mesmo não convivendo comigo todos os dias, nunca deixaram de me apoiar na minha profissão pois sabem o quão significativo é para mim.

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo aporte financeiro.

Obrigada!!

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um resumo geral, em português e inglês, e um artigo científico contemplando os principais resultados, obtidos em sua maioria durante o mestrado. Este artigo descreve a atividade antiparasitária de uma substância sintética tiofênica, bem como os efeitos biológicos por ela causada sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. O artigo científico deverá ser submetido na revista Parasitology International do grupo editorial Japanese Society of Parasitology, que possui fator de impacto de 1,866 (Qualis CBI-B2).



## RESUMO GERAL

As leishmanioses permanecem entre as doenças tropicais negligenciadas, tendo a manifestação cutânea como a forma predominante em todo o mundo em números de casos. *Leishmania amazonensis* é uma das espécies causadoras da leishmaniose cutânea e possui tratamento inadequado devido à toxicidade e resistência dos parasitos. Logo, o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses se torna extremamente necessário. Em virtude disto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiparasitária e as principais vias de morte celular induzidas pela ação da substância tiofênica **ACET-1**, sobre formas parasitárias de *L. amazonensis*. A substância apresentou atividade leishmanicida seletiva sobre promastigotas e amastigotas e, através de técnicas de microscopia eletrônica e bioquímicas, ficou demonstrado que **ACET-1** provocou um estresse oxidativo nos parasitos, representado principalmente pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, lipoperoxidação, despolarização mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos, além de alterações estruturais e morfológicas, sugerindo que as principais vias de morte dos parasitos são autofagia e morte semelhante à apoptose em promastigotas, e em amastigotas majoritariamente morte foi consequência da atividade efetora aumentada de macrófagos J774A.1.

**Palavras-chave:** tiofenos, atividade antileishmania, morte celular, autofagia, apoptose.

## ABSTRACT

Leishmaniasis remains among neglected tropical diseases, presenting the cutaneous manifestation as the predominant form in number of cases on the world. *Leishmania amazonensis* is one of the species that causes cutaneous leishmaniasis and has inadequate treatment due to toxicity and resistance of the parasites. Therefore, the development of new alternatives for the treatment of leishmaniasis is extremely necessary and because of this, the present study aimed to evaluate the antiparasitic activity and the main cell death pathways induced by the action of the thiophenic substance **ACET-1**, on parasitic forms of *L. amazonensis*. The substance exhibited selective leishmanicidal activity on promastigotes and amastigotes, and regarding the mechanism of action, electron microscopy and biochemical techniques were performed. It was demonstrated that **ACET-1** caused oxidative stress in the cells, represented by the increase in reactive oxygen and nitrogen species, lipoperoxidation, mitochondrial depolarization, lipid bodies accumulation, in addition to structural and morphological changes, suggesting that the main pathways of parasites death are autophagy and apoptosis-like death in promastigotes, and in amastigotes mostly death was a consequence of increased effector activity of J774A.1 macrophages.

**Keywords:** thiophenes, antileishmanial activity, cell death, autophagy, apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura molecular de 4-(5'-formil-[2,2'-bitiofen]-5-il)but-3-in-1-il acetato (ACET-1). ..... 30
- Figura 2:** Microscopia ótica de macrófagos J774A.1 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* tratados com ACET-1 por 48 h e corados com Giemsa. .... 31
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com CI<sub>50</sub> de ACET-1 por 72 h..... 32
- Figura 4:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com CI<sub>50</sub> de ACET-1 por 72 h..... 33
- Figura 5:** Alterações ultraestruturais, morfológicas e acúmulo de corpos lipídicos tempo-dependente em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com CI<sub>50</sub> de ACET-1..... 34
- Figura 6:** Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com ACET-1 por 48 h..... 36
- Figura 7:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com ACET-1 por 48 h..... 37
- Figura 8:** Determinação de ERO totais em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h, usando o marcador não-fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA.. 38
- Figura 9:** Determinação da peroxidação lipídica em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> com ACET-1 por 24 h usando o marcador não-fluorescente DPPP.39
- Figura 10:** Determinação de ATP intracelular em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> μM de ACET-1 por 24 h..... 40
- Figura 11:** Acúmulo de corpos lipídicos em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h..... 41
- Figura 12:** Presença de vacúolos autofágicos em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h..... 42
- Figura 13:** Determinação da presença de vacúolos ácidos em *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h, utilizando o marcador laranja de acridina.....44
- Figura 14:** Determinação da produção de óxido nítrico em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h, utilizando o marcador DAF-FM DA. .... 45
- Figura 15:** Ensaio do ΔΨ<sub>m</sub> em parasitos de *L. amazonensis*, usando o marcador Rh123, tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h..... 46

<b>Figura 16:</b> Ensaio da integridade de membrana em parasitos de <i>L. amazonensis</i> tratados com ACET-1 por 24 h usando IP.....	47
<b>Figura 17:</b> Determinação do volume celular em parasitos de <i>L. amazonensis</i> tratados com $CI_{50}$ e $2xCI_{50}$ de ACET-1 por 24 h.....	48
<b>Figura 18:</b> Determinação da exposição de fosfatidilserina em parasitos de <i>L. amazonensis</i> tratados com $CI_{50}$ e $2xCI_{50}$ de ACET-1 por 24 h.....	49
<b>Figura 19:</b> Análise de conteúdo de DNA de parasitos de <i>L. amazonensis</i> após 24 h de tratamento com ACET-1.....	50
<b>Figura 20:</b> Determinação da produção de óxido nítrico em macrófagos J774A.1 infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> tratados com $CI_{50}$ e $2xCI_{50}$ de ACET-1 por 24 h, utilizando o marcador DAF-FM DA .....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> de ACET-1 frente a promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1.....	30
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACET-1	4-(5'-formil-[2,2'-bitiofeno]-5-il)but-3-in-1-il acetato
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CC <sub>50</sub>	concentração citotóxica para 50% das células
CI <sub>50</sub>	concentração inibitória de 50% dos parasitos
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DAF-FM	diacetato de diaminofluoresceína
DCF	diclorofluoresceína
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPP	difenil-1-pirenilfosfina
DTNs	doenças tropicais negligenciadas
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
H <sub>2</sub> DCFDA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IP	iodeto de propídio
KCN	cianeto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
K <sub>4</sub> [Fe (CN) <sub>6</sub> ]	ferrocianeto de potássio
M	molar
MET	microscopia eletrônica de transmissão

MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MTT	brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
°C	graus Celsius
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	radical superóxido
•OH	radical hidroxila
OsO <sub>4</sub>	tetróxido de ósmio
PBS	tampão salina fosfato
pH	potencial de hidrogênio
RE	retículo endoplasmático
Rh123	rodamina 123
RPMI 1640	meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	soro fetal bovino
U.A	unidades arbitrárias
XTT	(hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)carbonil]-2H- tetrazólio)
µg	micrograma
µm	micrômetro
µM	micromolar
ΔΨ <sub>m</sub>	potencial de membrana mitocondrial
λem	comprimento de onda de emissão

$\lambda_{ex}$

comprimento de onda de excitação



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Reagentes .....	21
2.2 Parasitos .....	21
2.3 Cultura de células.....	21
2.4 Substância .....	22
2.5 Atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	22
2.6 Ensaio antiproliferativo sobre formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	22
2.7 Ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos de linhagem J774A.1.....	23
2.8 Avaliação tempo dependente das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por microscopia eletrônica.....	23
2.9 Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .....	24
2.10 Isolamento de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	24
2.11 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	25
2.12 Avaliação da peroxidação lipídica .....	25
2.13 Avaliação dos níveis de ATP intracelular.....	25
2.14 Avaliação de corpos lipídicos .....	25
2.15 Avaliação de vacúolos autofágicos .....	26
2.16 Avaliação de vacúolos ácidos .....	26
2.17 Avaliação da produção de óxido nítrico .....	27
2.18 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	27

2.19	Avaliação da integridade da membrana celular .....	27
2.20	Determinação do volume celular .....	28
2.21	Detecção da exposição de fosfatidilserina .....	28
2.22	Análise do ciclo celular.....	29
2.23	Análise estatística .....	29
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Avaliação da atividade antiproliferativa de ACET-1 sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1 .....	30
3.2	Efeitos de ACET-1 sobre a ultraestrutura, morfologia e formação de corpos lipídicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> avaliados de forma tempo-dependente .....	31
3.3	Efeitos de ACET-1 sobre a morfologia e ultraestrutura de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	35
3.4	Efeitos de ACET-1 sobre o aumento de espécies reativas de oxigênio em <i>L. amazonensis</i> .....	38
3.5	Efeitos de ACET-1 sobre a peroxidação lipídica em <i>L. amazonensis</i> .....	38
3.6	Efeitos de ACET-1 sobre os níveis de ATP intracelular de <i>L. amazonensis</i> ...	39
3.7	Efeitos de ACET-1 no acúmulo de corpos lipídicos em <i>L. amazonensis</i> .....	40
3.8	Efeitos de ACET-1 na formação de vacúolos autofágicos em <i>L. amazonensis</i>	41
3.9	Efeitos de ACET-1 sobre a formação de compartimentos ácidos em <i>L. amazonensis</i> .....	43
3.10	Efeitos de ACET-1 sobre a produção de óxido nítrico em <i>L. amazonensis</i> ....	44
3.11	Efeitos de ACET-1 sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de <i>L. amazonensis</i> .....	45

3.12	Efeitos de ACET-1 sobre a integridade da membrana celular de <i>L. amazonensis</i> .....	46
3.13	Efeitos de ACET-1 sobre o volume celular de <i>L. amazonensis</i> .....	47
3.14	Efeitos de ACET-1 sobre a exposição de fosfatidilserina de <i>L. amazonensis</i> .	48
3.15	Efeitos de ACET-1 sobre o ciclo celular de parasitos de <i>L. amazonensis</i> .....	49
3.16	Efeitos de ACET-1 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos J774A.1 .....	50
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares obrigatórios que são transmitidos por algumas espécies de insetos flebotomíneos. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas encontram-se em risco de infecção nos 98 países considerados endêmicos. São caracterizadas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), visto que as regiões mais afetadas são geralmente as mais pobres em países de clima tropical e subtropical e não têm a devida atenção das indústrias farmacêuticas. Estão associadas à desnutrição, condições precárias de habitação, falta de recursos financeiros, desmatamento e urbanização, afetando regiões onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento do seu agente transmissor [1,2].

Causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, as leishmanioses são classificadas de acordo com suas manifestações clínicas em: (1) visceral, a forma mais grave, na qual os parasitos deixam o local de inoculação e se proliferam nos órgãos internos, afetando principalmente o fígado, baço e medula óssea, resultando na imunossupressão e até a morte do hospedeiro, quando não tratada; (2) cutânea, que manifestam-se de diferentes formas, como a forma cutânea localizada (que causa lesões ulceradas na pele no local da picada do flebotomíneo), cutânea difusa (que causa múltiplas lesões não-ulceradas por disseminação hematogênica ou linfática) e mucocutânea (a qual se desenvolve a partir da cutânea e causa inflamação destrutiva do tecido da mucosa) [3-5].

*Leishmania amazonensis* é a espécie causadora da leishmaniose cutânea (LC) no Brasil, a forma mais comum de leishmaniose. Esta forma da doença causa lesões na pele, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida e graves incapacidades ou estigma, podendo evoluir para leishmaniose cutânea difusa em indivíduos imunossuprimidos [6]. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2019, o Brasil esteve entre os países que mais apresentaram novos casos. Estima-se que ocorram anualmente entre 600.000 e 1 milhão de novos casos em todo o mundo [7,8].

O gênero *Leishmania*, é composto por parasitos flagelados que pertencem à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e agrupa espécies de protozoários unicelulares e heteroxenos, que inclui os flebotomíneos como hospedeiros invertebrados, e os mamíferos como hospedeiros vertebrados. A transmissão da leishmaniose ocorre por meio de vetores hematófagos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e do gênero

*Phlebotomus*, no Velho Mundo, sendo conhecidos popularmente como birigui ou mosquito palha [9,10].

Esses organismos têm um ciclo de vida digenético que inclui formas promastigotas (extracelular e flagelada, presente no trato digestório do inseto vetor) e formas amastigotas (intracelular, presente no hospedeiro vertebrado). Durante a hematofagia, o mosquito-fêmea ao inocular anticoagulantes no sangue, libera formas promastigotas no tecido epitelial. Nesse local, ocorre a fagocitose dos parasitos, que irão se diferenciar em amastigotas no interior dos fagolisossomos de células do sistema fagocítico mononuclear, sendo a mais comum delas, o macrófago. No interior dessas células, as amastigotas se multiplicam por divisão binária simples e são responsáveis pelas infecções, que podem persistir por todo o tempo de vida do hospedeiro, com risco provável de acarretar lesões cutâneas e viscerais, dependendo da espécie causadora da infecção e da resposta imunológica do hospedeiro [11-13].

Nenhuma vacina humana eficaz está atualmente disponível contra qualquer espécie de *Leishmania* e o tratamento depende de uma gama limitada de medicamentos. A quimioterapia é baseada no uso de antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha (Pentostam® e Glucantime®) [14], além de pentamidina, anfotericina B (formas livres ou lipossomais), paromomicina e miltefosina, como fármacos de segunda escolha [15]. Embora esses medicamentos sejam geralmente eficazes, eles apresentam várias limitações, como toxicidade no hospedeiro, tratamento de longo prazo, ampla resistência dos parasitos, além de alto custo [16-19]. Considerando as desvantagens e restrições dos tratamentos disponíveis, torna-se necessária a busca por novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

Os tiofenos, compostos orgânicos heterocíclicos aromáticos, com anéis de cinco membros e enxofre como heteroátomo [20], apresentaram atividade antileishmania, a partir de extratos naturais isolados de *Porophyllum ruderale* [21], e de substâncias sintéticas em estudos já realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa [22,23]. Na literatura, essa classe de compostos já era descrita como de grande interesse da indústria farmacológica, por sua atividade anti-inflamatória, antitumoral, anticonvulsivante, antiarrítmica e antileishmania [24]. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa da substância tiofênica sintética **ACET-1** (4-(5'-formil-[2,2'-bitiofeno]-5-il)but-3-in-1-il acetato) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, além de investigar as principais vias de morte induzidas por **ACET-1** sobre ambas as formas parasitárias.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Ácido fólico, cianeto de carbonila 3-clorofeni-hidrazona (CCCP), cianeto de potássio (KCN), diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), difenil-1-pirenilfosfina (DPPP), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), hemina, monodansilcadaverina (MDC), rodamina 123 (Rh123), wortmanina e 9-dietilamino-5H-benzo( $\alpha$ )fenoxazina-5-ona (vermelho do Nilo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anexina V-FITC, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), diacetato de diaminofluoresceína-FM (DAF-FM DA), hidróxido de (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H tetrazolio (XTT), iodeto de propídeo (IP) e RNase A foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (NY, USA). Acetato de uranila, cacodilato de sódio, citrato de chumbo, ferrocianeto de potássio, glutaraldeído, resina Polybed<sup>®</sup> 812 e tetróxido de ósmio foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (EMS- Hatfield, USA). Kit de viabilidade celular luminescente CellTiter-GLO foi obtido da Promega (Madison, Wisconsin, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.2 Parasitos

Para o estudo foi utilizada a cepa de *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). As formas promastigotas foram mantidas axenicamente em garrafas esterilizadas e descartáveis para cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco” acrescido de hemina e ácido fólico - 50 mg mL<sup>-1</sup>) pH 7,2 e esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 min. O meio foi suplementado com 10% de SFB (inativado a 56 °C, pH 7,4), e as culturas mantidas em estufa a 25 °C. Os protozoários foram submetidos a passagens semanais.

### 2.3 Cultura de células

Macrófagos da linhagem J774A.1 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 5000 U mL<sup>-1</sup> de penicilina e 5 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina a 37 °C em estufa com tensão

de 5% de CO<sub>2</sub>. A observação da cultura celular foi realizada diariamente em microscópio invertido, e o meio foi trocado quando observado pH ácido. Após a formação da monocamada celular, a fim de promover a manutenção das células de linhagem contínua, as células aderidas foram retiradas com o auxílio de um *cell scraper*, ressuspensas em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB (inativado a 56 °C, pH 7,4).

## 2.4 Substância

A substância foi sintetizada pelo grupo de pesquisa da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Sarragiotto, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. A estrutura molecular da substância está demonstrada na Figura 1.

As soluções estoques de **ACET-1** foram preparadas assepticamente em DMSO e diluídas em meio de cultura, de forma que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% nos experimentos.

## 2.5 Atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliação da atividade antiproliferativa de **ACET-1**, foi utilizado o ensaio de XTT, um sal solúvel que sofre redução pela enzima desidrogenase presente nas mitocôndrias de células vivas dando origem a um composto solúvel em água, o formazan [25]. Para isso, promastigotas de *L. amazonensis* na densidade de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> em meio Warren, suplementado com 10% SFB, foi dispensada em placa estéril de 96 poços, na ausência e na presença de concentrações crescentes (0,1 µM - 100 µM) de **ACET-1**. Após incubação por 72 h a 25 °C, foi adicionado 50 µL de XTT (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) e incubado por 4 h na ausência de luz. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) a 450 nm. O valor de CI<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% dos parasitos) foi calculado por análise de regressão não linear dos dados.

## 2.6 Ensaio antiproliferativo sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliação da atividade antiproliferativa sobre formas amastigotas, promastigotas metacíclicas ( $5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) e macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram dispensadas sobre lamínulas de vidro redondas, em uma placa de 24 poços por um período de 24 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 34 °C. Após a interação entre macrófagos e parasitos, **ACET-1** foi adicionado em concentrações crescentes (0,1 µM – 100 µM), e então

incubados em estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 34 °C por 48 h. Depois do período de tratamento, as lamínulas foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa/água destilada 1:10 e montadas sobre lâmina de vidro com meio de montagem PermOUNT®. A visualização de 100 células foi realizada em microscópio óptico comum e o índice de sobrevivência foi estabelecido multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófagos totais [26]. O valor de CI<sub>50</sub> foi determinado por análise de regressão não linear dos dados obtidos.

## **2.7 Ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos de linhagem J774A.1**

Para a avaliação da citotoxicidade de ACET-1, foi utilizado o método colorimétrico de MTT, um sal de tetrazólio que é reduzido por mitocôndrias viáveis em cristais de púrpuras de formazan. Para isso, uma suspensão de macrófagos de linhagem J774A.1, na densidade de 5x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, foi dispensada em placa estéril de 96 poços e incubados por 24 h, a 37 °C e 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, foram adicionadas concentrações crescentes de ACET-1 (10 µM – 1000 µM), e as células foram incubadas por 48 h, nas mesmas condições citadas anteriormente. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão salina-fosfato (PBS) 0,01 M, e 50 µL de MTT (2 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionado em cada poço da placa e incubada na ausência de luz, a 37 °C. Após 4 h, foi adicionado 150 µL de DMSO, a fim de romper as células e solubilizar os cristais de púrpuras de formazan, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) a 570 nm [27]. O valor de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica de 50%) foi calculado por regressão não linear dos dados.

## **2.8 Avaliação tempo dependente das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis* por microscopia eletrônica**

Promastigotas foram tratadas com a concentração referente ao CI<sub>50</sub> de ACET-1 e incubados por 72 h ou de forma tempo-dependente por 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, a 25 °C. Após o período de incubação, foi realizada a fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitos foram aderidos à poli-L-lisina em lamínula, e lavados três vezes com PBS. Após adesão dos parasitos, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (30 - 100%). Em seguida, foi realizado o ponto crítico, metalização com ouro e os



parasitos foram analisados no microscópio eletrônico duplo feixe FEI Scios (FEI, EUA). Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos foram pós-fixados em uma solução de 1% OsO<sub>4</sub>, 0,8% de K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] e 10 mM CaCl<sub>2</sub> em 0,1 M de tampão cacodilato. Após, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%), incluídas em resina epóxi (Polybed® 812) e polimerizadas em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (JEOL, Japão) [28].

## **2.9 Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis***

Macrófagos J774A.1 infectados com amastigotas foram tratados com concentrações referentes ao CI<sub>50</sub> e 2x CI<sub>50</sub> de **ACET-1** e incubados por 48 h, a 34 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foi realizada a fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico 30% - 100%. Em seguida, foi realizado o ponto crítico, metalização com ouro e realizada a extração mecânica da membrana dos macrófagos, para que os parasitos intracelulares fossem analisados no microscópio eletrônico duplo feixe FEI Scios (FEI, EUA). Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos foram pós-fixados em uma solução de 1% de OsO<sub>4</sub>, 0,8% de K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] e 10 mM CaCl<sub>2</sub> em 0,1 M de tampão cacodilato. Após, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%), incluídas em resina epóxi (Polybed® 812) e polimerizadas em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (JEOL Japão) [29].

## **2.10 Isolamento de amastigotas de *L. amazonensis***

Para os subseqüentes ensaios, amastigotas intracelulares foram isoladas. Para isso, macrófagos infectados foram tratados com a concentração de CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1** por 24 h a 34 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois do tratamento, os macrófagos foram descolados usando *cell scraper*, aspirados com uma seringa e dispensados sob pressão através de uma agulha 13x0,3 mm (30G x 1/2") para lisar as células. Amastigotas foram separadas por

centrifugação diferencial (1000 rpm/1 min; 5000 rpm/5 min) e foram coletadas no sobrenadante, lavadas e ressuspensas em PBS [26].

### **2.11 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com  $10 \mu M$  de  $H_2DCFDA$  por 45 min, protegidos da luz.  $H_2DCFDA$  é um marcador não fluorescente permeável a célula, que sofre desesterificação pelas esterases intracelulares na presença de ERO, e após a oxidação é convertido em diclorofluoresceína (DCF) que é altamente fluorescente [29]. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 488 e 530 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA).  $H_2O_2$   $50 \mu M$  foi utilizado como controle positivo.

### **2.12 Avaliação da peroxidação lipídica**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com  $50 \mu M$  de DPPP durante 15 min a temperatura ambiente. DPPP é uma molécula não fluorescente até ser oxidado por hidroperóxidos a um óxido de fosfina (DPPP-O) que se torna fluorescente [30]. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 355 e 460 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA).  $H_2O_2$   $50 \mu M$  foi utilizado como controle positivo.

### **2.13 Avaliação dos níveis de ATP intracelular**

Promastigotas e amastigotas foram tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h e foram lavados e ressuspensos em PBS, e os níveis de ATP foram analisados seguindo o protocolo do kit CellTiter-GLO<sup>®</sup>, utilizado para determinar a viabilidade celular. Este ki baseia-se na reação catalisada pela luciferase luciferina/oxiluciferina para a quantificação de [31] A luminescência foi determinada utilizando leitor de microplacas (Victor X3; iaPerkinElmer, EUA). KCN  $500 \mu M$  foi utilizado como controle positivo [32].

### **2.14 Avaliação de corpos lipídicos**

Promastigotas e amastigotas foram tratadas com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h ou de forma tempo-dependente (como descrito no item 2.8) e incubadas com

10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de vermelho do Nilo, um marcador lipofílico, por 30 min a 25 °C [6,33]. A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 535 nm. Adicionalmente, a fluorescência foi visualizada utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan), e as imagens capturadas por câmera UC30 (Olympus, Tóquio, Japão).  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controle positivo.

### **2.15 Avaliação de vacúolos autofágicos**

Promastigotas e amastigotas foram tratadas com  $\text{CI}_{50}$  e  $2\times\text{CI}_{50}$  de **ACET-1** por 24 h. Como controle de autofagia, as células foram tratadas com 1  $\mu\text{M}$  de wortmanina, um potente inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase), uma enzima que está envolvida na regulação da autofagia [34]. Após, as células foram incubadas com MDC 0,05 mM, um marcador fluorescente que se acumula em vacúolos autofágicos, por 1 h a 37 °C [35]. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 nm e 525 nm. Adicionalmente, a fluorescência foi visualizada utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e as imagens capturadas por câmera UC30 (Olympus, Tóquio, Japão). PBS foi usado como controle positivo a fim de induzir estresse nutricional.

### **2.16 Avaliação de vacúolos ácidos**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $\text{CI}_{50}$  e  $2\times\text{CI}_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de laranja de acridina durante 15 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS. Laranja de acridina é um marcador permeável a membrana que apresenta fluorescência verde. Sua característica de base fraca permite que quando em meios ácidos receba um próton e forme um dímero, se tornando não permeável as membranas e apresentando fluorescência vermelha [36]. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito e a razão entre a fluorescência vermelha e verde foi calculada e relacionada com a quantidade de compartimentos ácidos presentes nas células [37].  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controle positivo.

## **2.17 Avaliação da produção de óxido nítrico**

Promastigotas, amastigotas, macrófagos infectados e não infectados tratados com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubados no escuro com DAF-FM DA  $1 \mu M$  por 30 min a  $37^\circ C$ . Depois, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS, e incubados por mais 15 min. DAF-FM diacetato é um marcador não fluorescente permeável a membrana plasmática. Uma vez dentro das células, é desacetilado por esterases intracelulares para se tornar um benzotriazol fluorescente [38]. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com as células.  $H_2O_2$   $50 \mu M$  foi utilizado como controle positivo.

## **2.18 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com  $5 \mu g mL^{-1}$  de Rh123 por 15 min a  $37^\circ C$ , a fim de verificar o  $\Delta\Psi_m$ . Rh123 é um marcador específico mitocondrial, dependente de sua polarização e, desse modo, células com potencial mitocondrial inalterado acumulam Rh123 e apresentam alta fluorescência, enquanto mitocôndrias com alterações no  $\Delta\Psi_m$  levam ao efluxo da Rh123 de dentro da mitocôndria, apresentando baixa fluorescência [39,40]. Assim, após o período de incubação inicial com Rh123, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS para análise em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. CCCP  $100 \mu M$  foi utilizado como controle positivo.

## **2.19 Avaliação da integridade da membrana celular**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com  $0,2 \mu g mL^{-1}$  de IP por 10 min em temperatura ambiente. Células com membrana íntegra captam pouco IP, apresentando baixa

fluorescência, porém, células cuja membrana esteja alterada permitirão entrada de IP, que se intercala ao DNA, emitindo alta fluorescência [38]. A aquisição de dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. Alterações na fluorescência do IP foram quantificadas como percentual de células alteradas para membrana plasmática. Digitonina 40  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo.

## **2.20 Determinação do volume celular**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $\text{CI}_{50}$  e  $2\times\text{CI}_{50}$  de ACET-1 por 24 h foram lavadas duas vezes em PBS, e ressuspensas no mesmo tampão. Em seguida, o volume celular foi analisado por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Gráficos da densidade (FSC-H) versus a dispersão (Counts) representam a aquisição de 30.000 eventos. Histogramas e análises foram realizados utilizando o software CellQuest [38]. Miltefosina 40  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo.

## **2.21 Detecção da exposição de fosfatidilserina**

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $\text{CI}_{50}$  e  $2\times\text{CI}_{50}$  de ACET-1 por 24 h foram lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em tampão de ligação (140 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 10 mM HEPES-Na, pH 7,4), marcadas com anexina V-FITC e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado IP 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e a aquisição de dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. Células marcadas com anexina-V (IP positivo ou negativo) foram consideradas apoptóticas, e células somente positivas para IP, foram consideradas necróticas [41-43]. Miltefosina 40  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo [44].

## 2.22 Análise do ciclo celular

Promastigotas e amastigotas tratadas com concentração referente ao  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram fixadas em metanol-PBS 70% a 4 °C por 24 h. Após esse período, os parasitos foram lavados em PBS e incubados com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IP-RNAase, seguido de incubação a 37 °C por 45 min [44]. A aquisição de dados e análise foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasito. A porcentagem de células em cada estágio do ciclo celular foi determinada de acordo com a fluorescência de IP, que é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA [46]. Miltefosina  $40 \mu\text{M}$  e Taxol  $10 \mu\text{M}$  foram usados como controle positivo.

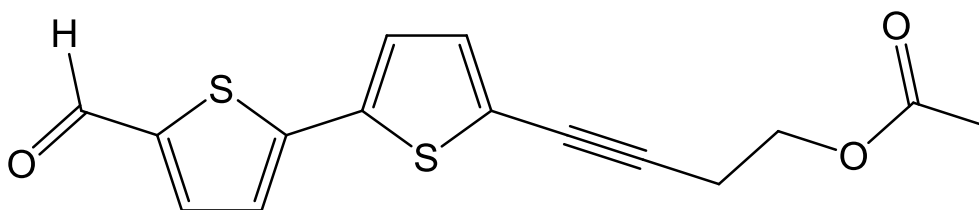
## 2.23 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA (*one-way* ou *two-way*), seguido do pós-teste de Tukey. Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa de ACET-1 sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1

A atividade antiproliferativa realizada pelo método de XTT demonstrou que ACET-1 tem capacidade de inibir o crescimento de 50% das promastigotas na concentração de 28,9  $\mu\text{M}$  após 72 h de tratamento, e de amastigotas na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , ao passo que a citotoxicidade avaliada pelo método de MTT apresentou um valor de 234,4  $\mu\text{M}$  para macrófagos. Dessa forma, a razão de  $\text{CI}_{50}/\text{CC}_{50}$  nos apresenta um valor de índice de seletividade de 4,69 (Tab. 1, Fig. 2).

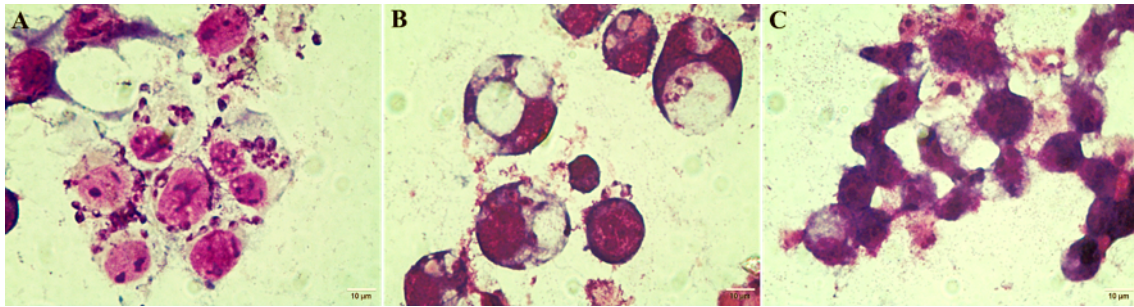


**Figura 1:** Estrutura molecular de 4-(5'-formil-[2,2'-bitiofen]-5-il)but-3-in-1-il acetato (ACET-1).

**Tabela 1:** Atividade antiproliferativa *in vitro* de ACET-1 frente a promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1.

<i>L. amazonensis</i> (promastigota) $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>L. amazonensis</i> (amastigota) $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Macrófago J774A.1 $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	IS (amastigota)
28,9 $\pm$ 1,8	50,0 $\pm$ 0,66	234,7 $\pm$ 2,4	4,69

\*IS: índice de seletividade, obtido pela equação:  $\text{IS}=\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$ .



**Figura 2:** Microscopia ótica de macrófagos J774A.1 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* tratados com **ACET-1** por 48 h e corados com Giemsa. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 50  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ); (C) células tratadas com  $2\times\text{CI}_{50}$  (100  $\mu\text{M}$ ). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

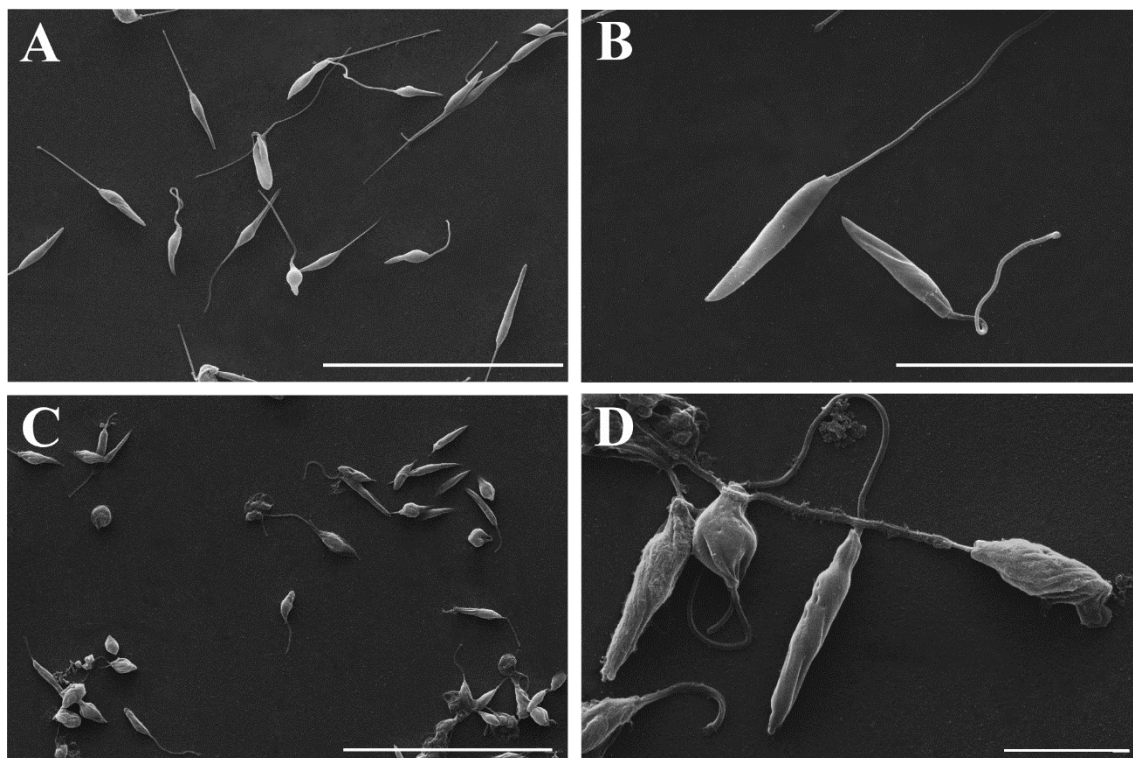
### 3.2 Efeitos de **ACET-1** sobre a ultraestrutura, morfologia e formação de corpos lipídicos em promastigotas de *L. amazonensis* avaliados de forma tempo-dependente

Após determinação das concentrações inibitórias de **ACET-1** frente a *L. amazonensis*, foi realizada microscopia eletrônica dos parasitos, com a finalidade de acessar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pela substância. Tanto por MEV (Fig. 3) quanto por MET (Fig. 4) foi observado a presença de alterações na organização da membrana plasmática e citoesqueleto de promastigotas tratadas com 28,9  $\mu\text{M}$  de **ACET-1** por 72 h. Para mais detalhes, na análise tempo-dependente observou-se o surgimento das alterações na membrana plasmática e no citoesqueleto somente a partir de 8 h após o tratamento, e se tornaram mais evidentes de forma tempo-dependente, enquanto o acúmulo de corpos lipídicos foi observado em todos os tempos de tratamento analisados (Fig. 5).

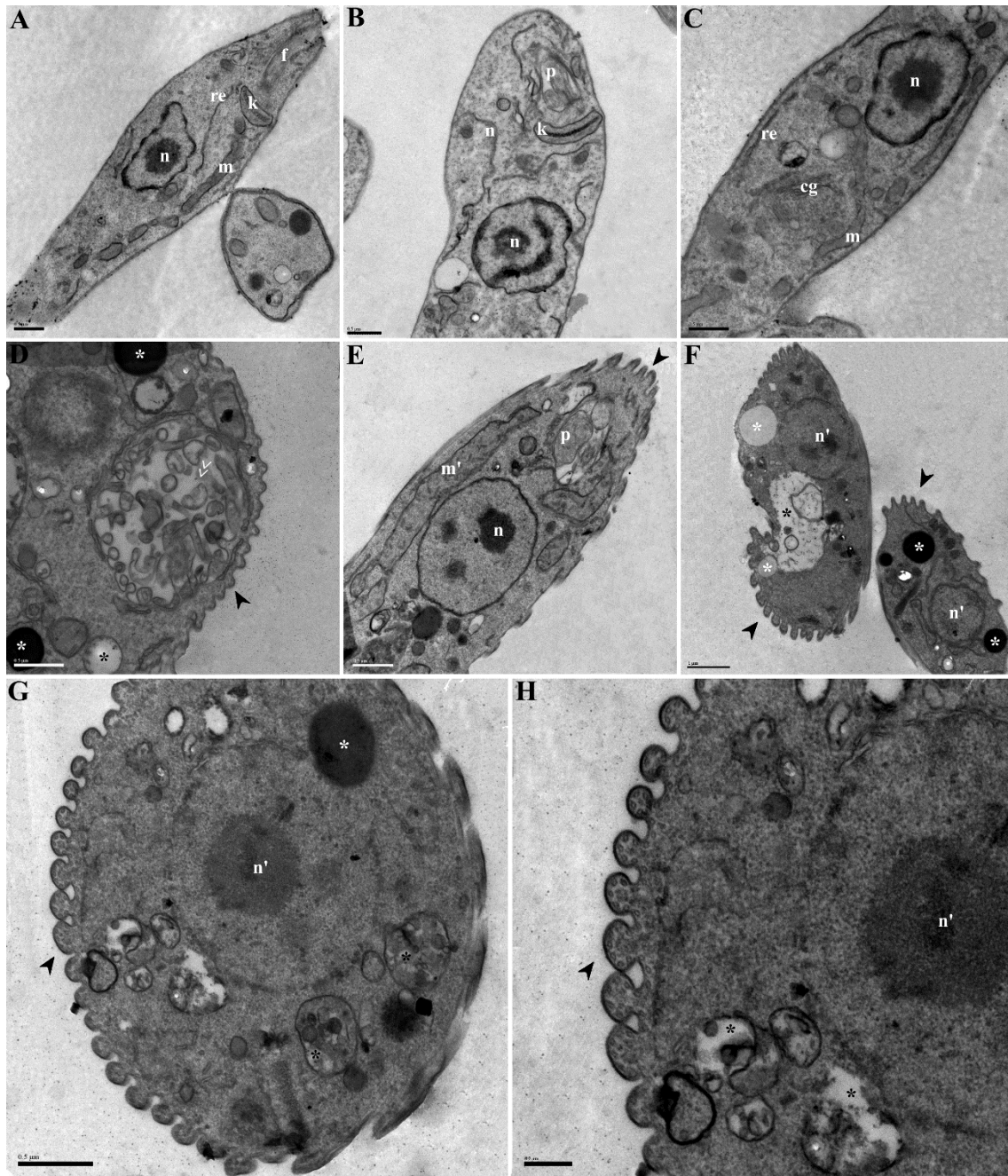
Por MEV é possível observar também o arredondamento do corpo celular de promastigotas, extravasamento de conteúdo celular, diminuição do tamanho do flagelo (Fig. 3C-D), ao passo que parasitos não tratados apresentaram flagelo proporcional ao tamanho do corpo e membrana lisa e íntegra (Fig. 3A-B).

Desorganização do conteúdo e da membrana nuclear, inchaço mitocondrial, alta atividade exocítica e presença de vacúolos autofágicos são alterações ultraestruturais observadas a partir das análises de MET (Fig. 4D-H), enquanto parasitos não tratados exibiram estruturas bem preservadas (Fig. 4A-C).

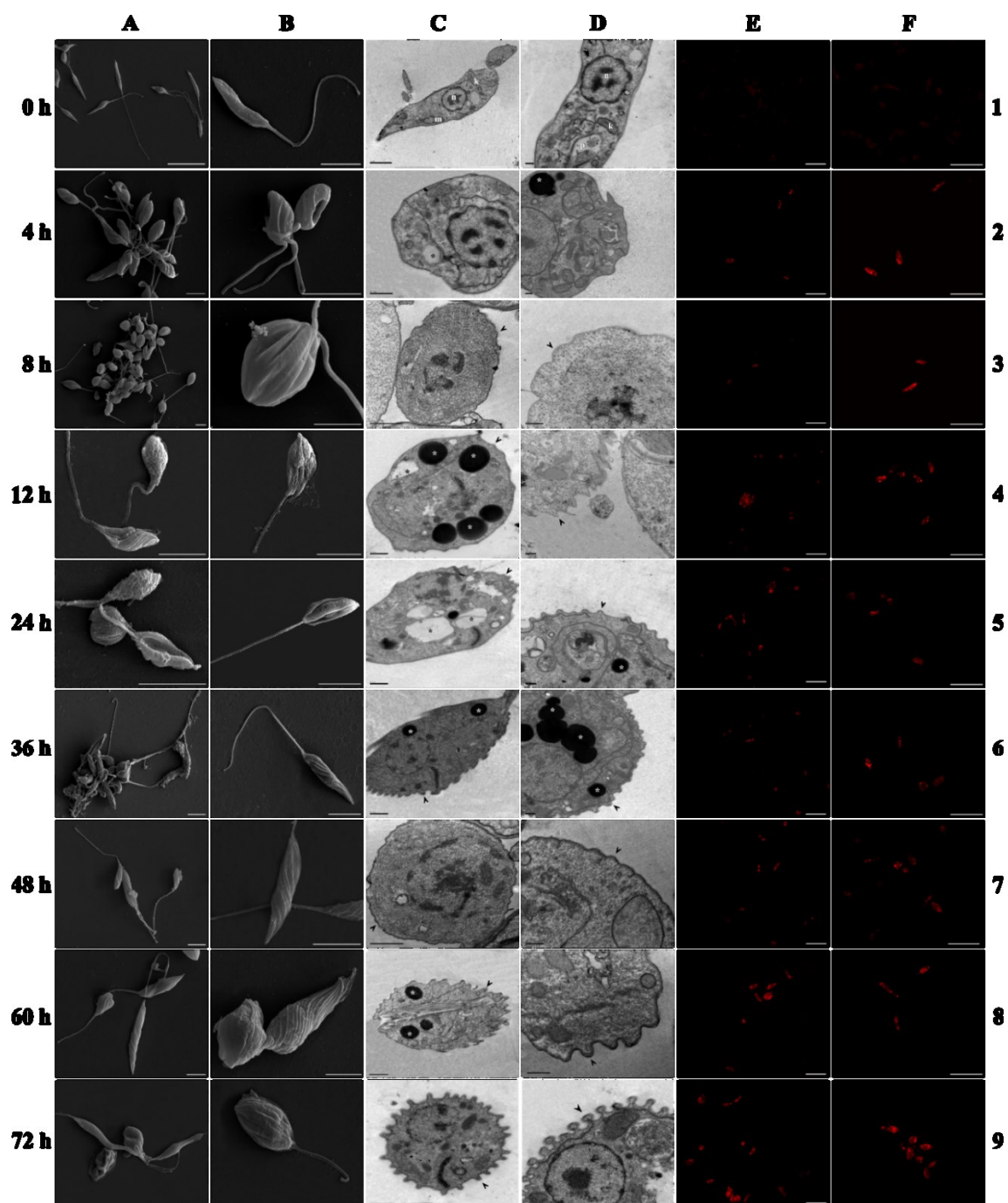




**Figura 3:** Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com  $CI_{50}$  de ACET-1 por 72 h. (A-B) promastigotas não tratadas. (C-D) promastigotas tratadas com 28,9  $\mu\text{M}$  ( $CI_{50}$ ). Barra de escala: (A,C) 30  $\mu\text{m}$ ; (B) 10  $\mu\text{m}$ ; (D) 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com  $CI_{50}$  de ACET-1 por 72 h. (A-C) promastigotas não tratadas. (D-H) promastigotas tratadas com  $28,9 \mu M$  ( $CI_{50}$ ); (k) cinetoplasto; (m) mitocôndria; (m') mitocôndria inchada; (n) núcleo; (n') conteúdo nuclear desestruturado; (p) bolsa flagelar; (cg) complexo de Golgi; (re) retículo endoplasmático; (\* branco): corpos lipídicos; (\* preto): vacúolos autofágicos; (>>) aumento no número de vesículas na bolsa flagelar; (▶) alterações na membrana celular e no citoesqueleto. Barra de escala: (A-E, G)  $0,5 \mu m$ ; (F)  $1 \mu m$ ; (H)  $0,2 \mu m$ .

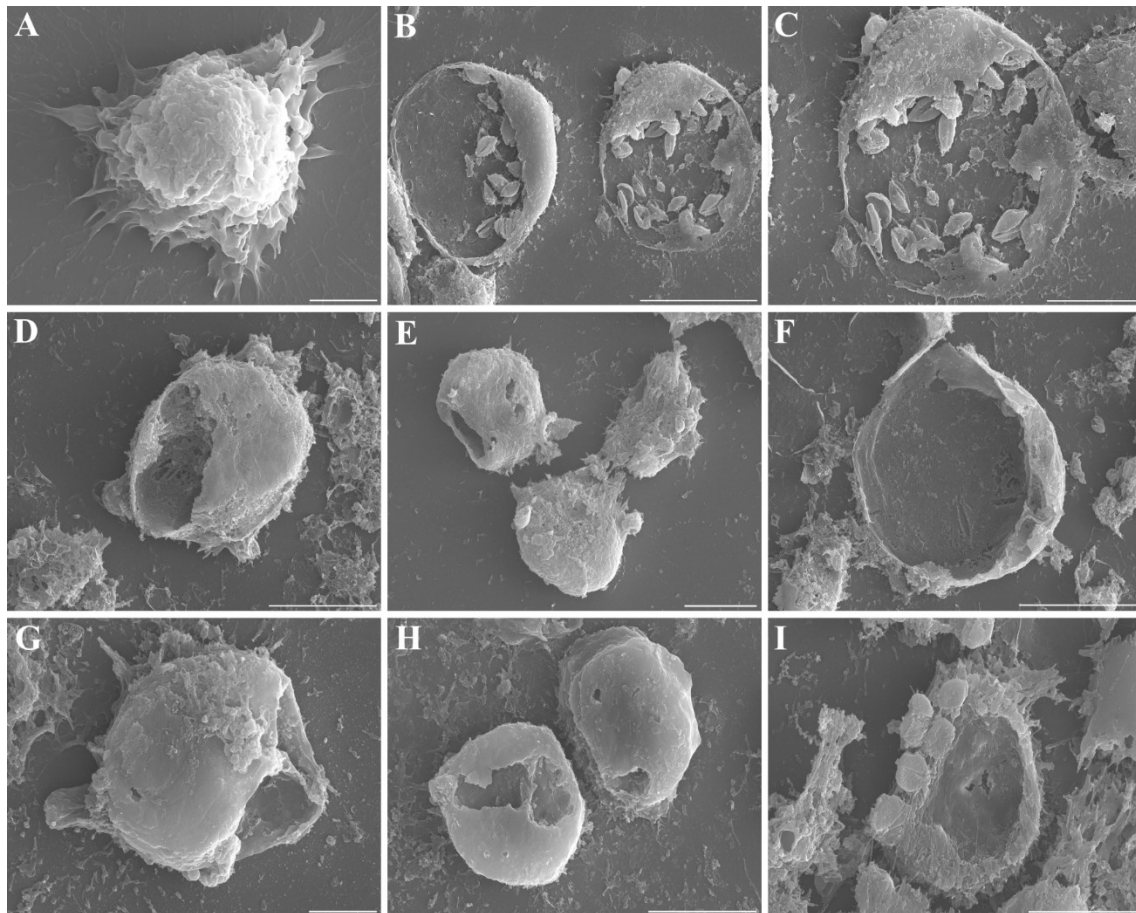


**Figura 5:** Alterações ultraestruturais, morfológicas e acúmulo de corpos lipídicos tempo-dependente em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com  $CI_{50}$  de ACET-1. (n) núcleo; (m) mitocôndria; (k) cinetoplasto; (p) bolsa flagelar; (\* branco): corpos lipídicos; (\* preto): vacúolos autofágicos; (►) alterações na membrana plasmática. Barra de escala: (A1-A9,B1-B2,B4-B7,B9) 5  $\mu$ m; (B3, B8) 2  $\mu$ m; (C1) 1  $\mu$ m; (C2-C9) 0,5  $\mu$ m; (D1-D9) 0,2  $\mu$ m; (E1-E9,F1-F9) 20  $\mu$ m.

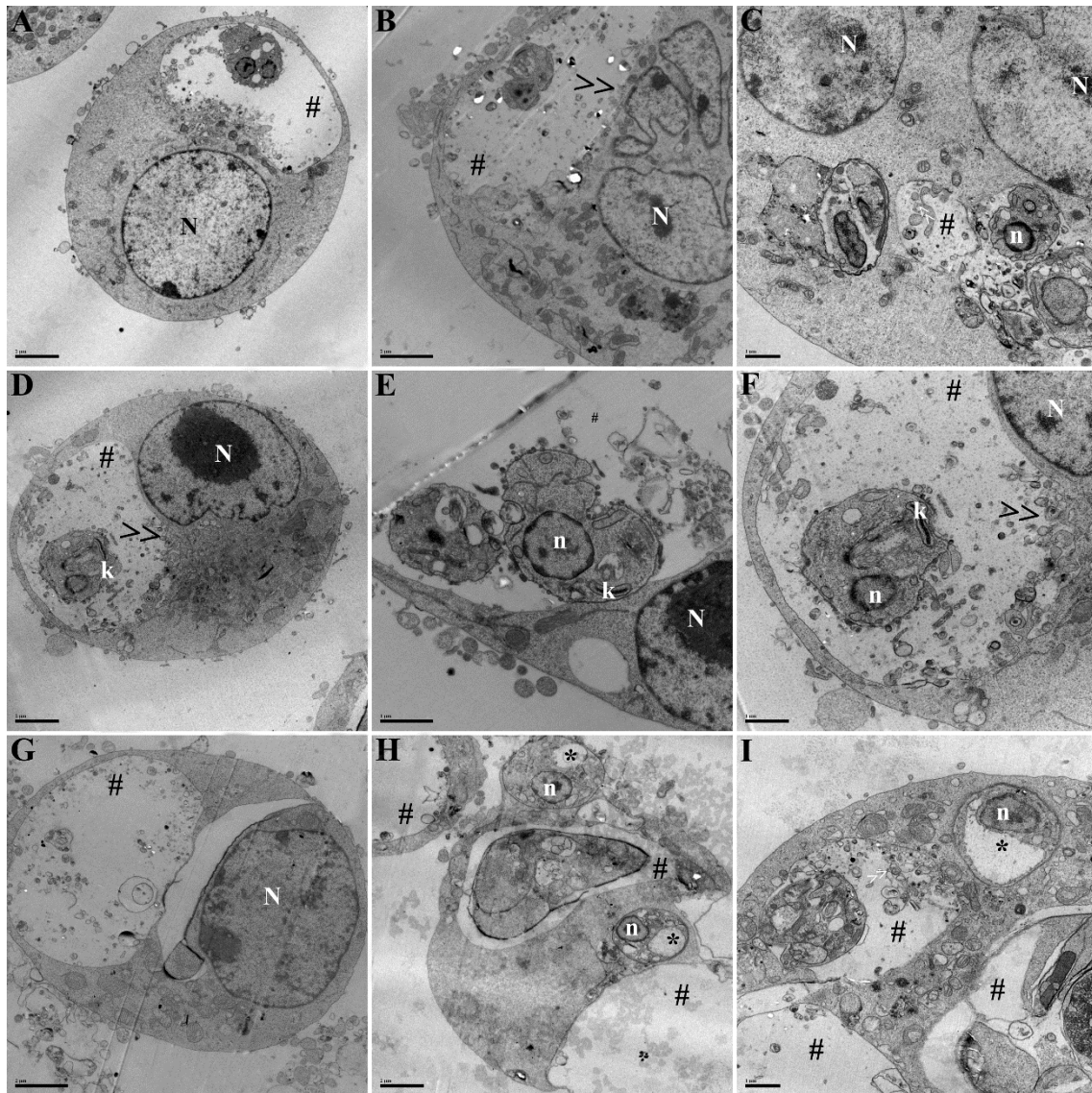
### **3.3 Efeitos de ACET-1 sobre a morfologia e ultraestrutura de amastigotas de *L. amazonensis***

Através das imagens de MEV (Fig. 6) foi possível observar também que a substância **ACET-1** reduziu a quantidade de amastigotas por macrófago após o tratamento, além de possibilitar a observação do formato oval típico de amastigotas. No entanto, nenhuma alteração morfológica explícita foi observada nas amastigotas.

Através das micrografias obtidas por MET (Fig. 7), é possível observar claramente as amastigotas dentro dos vacúolos fagocíticos do macrófago, bem como alta atividade metabólica dessas células infectadas, indicada pela grande quantidade de vesículas excretoras, na tentativa de combater o parasito. Alterações como desorganização dos compartimentos celulares, alteração nuclear e presença de vacúolos após o tratamento com **ACET-1** foram observadas em amastigotas intracelulares.



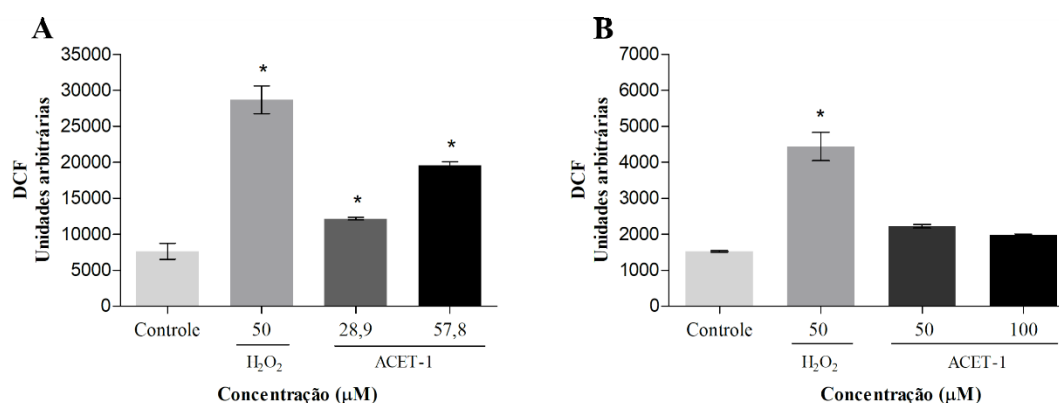
**Figura 6:** Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com **ACET-1** por 48 h. (A-C): células não tratadas; (D-F): células tratadas com valor referente ao  $CI_{50}$  ( $50 \mu M$ ); (G-I): células tratadas com valor referente a  $2xCI_{50}$  ( $100 \mu M$ ). Barra de escala: (A,G)  $5 \mu m$ ; (C-E,H-I)  $10 \mu m$ ; (B,F)  $20 \mu m$ .



**Figura 7:** Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com ACET-1 por 48 h. (A-C): células não tratadas; (D-F): células tratadas com valor referente ao  $CI_{50}$  (50  $\mu$ M); (G-I): células tratadas com valor referente a  $2xCI_{50}$  (100  $\mu$ M). (n) núcleo de amastigotas; (N) núcleo de macrófagos; (k) cinetoplasto; (\*) preto: vacúolos autofágicos; (#) vacúolos parasitóforos; (>>) vesículas secretoras de macrófagos; Barra de escala: (A-B, D, G-H) 2  $\mu$ m; (C, E-F, I): 1  $\mu$ m;

### 3.4 Efeitos de ACET-1 sobre o aumento de espécies reativas de oxigênio em *L. amazonensis*

A avaliação de ERO foi realizada por espectrofluorimetria, através do marcador não fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Um aumento significativo de ERO totais em promastigotas após 24 h de tratamento com ACET-1 pôde ser detectado (Fig. 8A), enquanto em amastigotas a diferença de ERO totais não foi significativa (Fig. 8B), quando comparado aos grupos controles. Esse aumento de ERO em promastigotas foi dose-dependente, de 1,59 e 2,56 vezes após o tratamento com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub>, respectivamente. Células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram aumento de 3,76 e 2,92 vezes em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

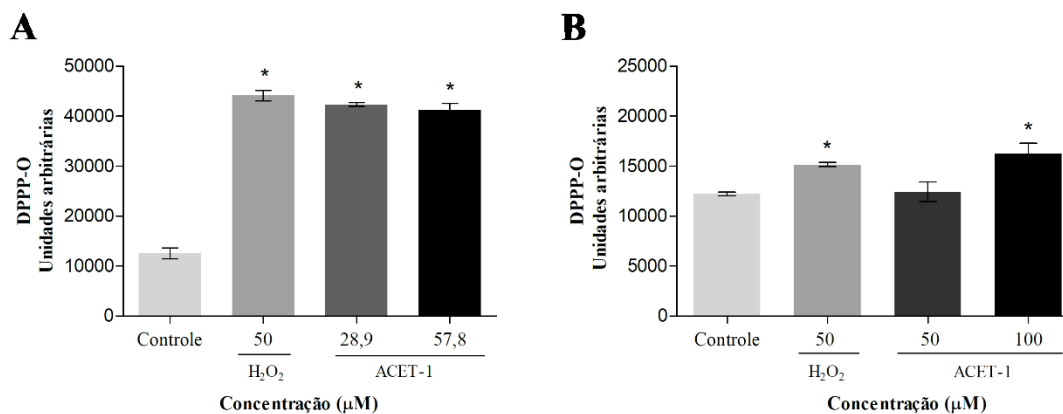


**Figura 8:** Determinação de ERO totais em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h, usando o marcador não-fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Parasitos tratados foram incubados com H<sub>2</sub>DCFDA e a fluorescência de DCF foi medida. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Efeitos de ACET-1 sobre a peroxidação lipídica em *L. amazonensis*

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por espectrofluorimetria, através do marcador não fluorescente DPPP. Foi possível observar que promastigotas tratadas com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h exibiram um aumento significativo da peroxidação lipídica de 3,38 e 3,29 vezes, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Fig. 9A), enquanto em amastigotas observou-se apenas um aumento significativo de 1,33 vezes após o tratamento com 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 (Fig. 9B). Em

promastigotas, o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou em 3,52 vezes a peroxidação lipídica, enquanto em amastigotas o aumento foi de 1,24 vezes.

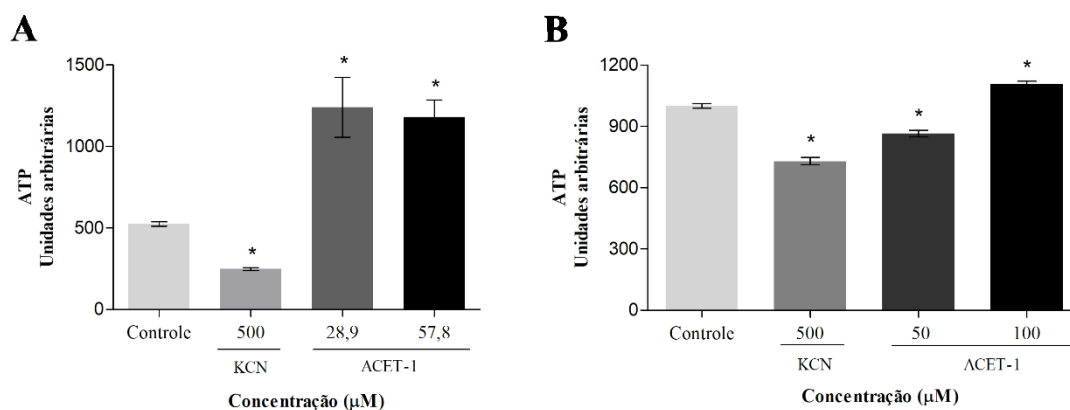


**Figura 9:** Determinação da peroxidação lipídica em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> com ACET-1 por 24 h usando o marcador não-fluorescente DPPH. Parasitos tratados foram marcados com DPPH e a fluorescência de DPPH-O foi medida. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.6 Efeitos de ACET-1 sobre os níveis de ATP intracelular de *L. amazonensis*

Os níveis de ATP intracelular foram avaliados pelo método luminescente usando o kit CellTiter-GLO. Um aumento significativo de ATP intracelular em promastigotas tratadas com ACET-1 após 24 h de tratamento foi observado quando comparado com o grupo controle. Esse aumento foi de aproximadamente 2,36 e 2,25 vezes, após o tratamento com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub>, respectivamente (Fig. 10A). Já em amastigotas, foi possível observar uma diminuição de 1,16 vezes dos níveis de ATP intracelular quando tratadas com CI<sub>50</sub> de ACET-1 e um aumento de 1,10 vezes quando tratadas com 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 (Fig. 10B). O inibidor do complexo citocromo-oxidase KCN, foi utilizado como controle positivo e apresentou redução significativa dos níveis de ATP intracelular, com redução de 2,11 e 1,37 vezes em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

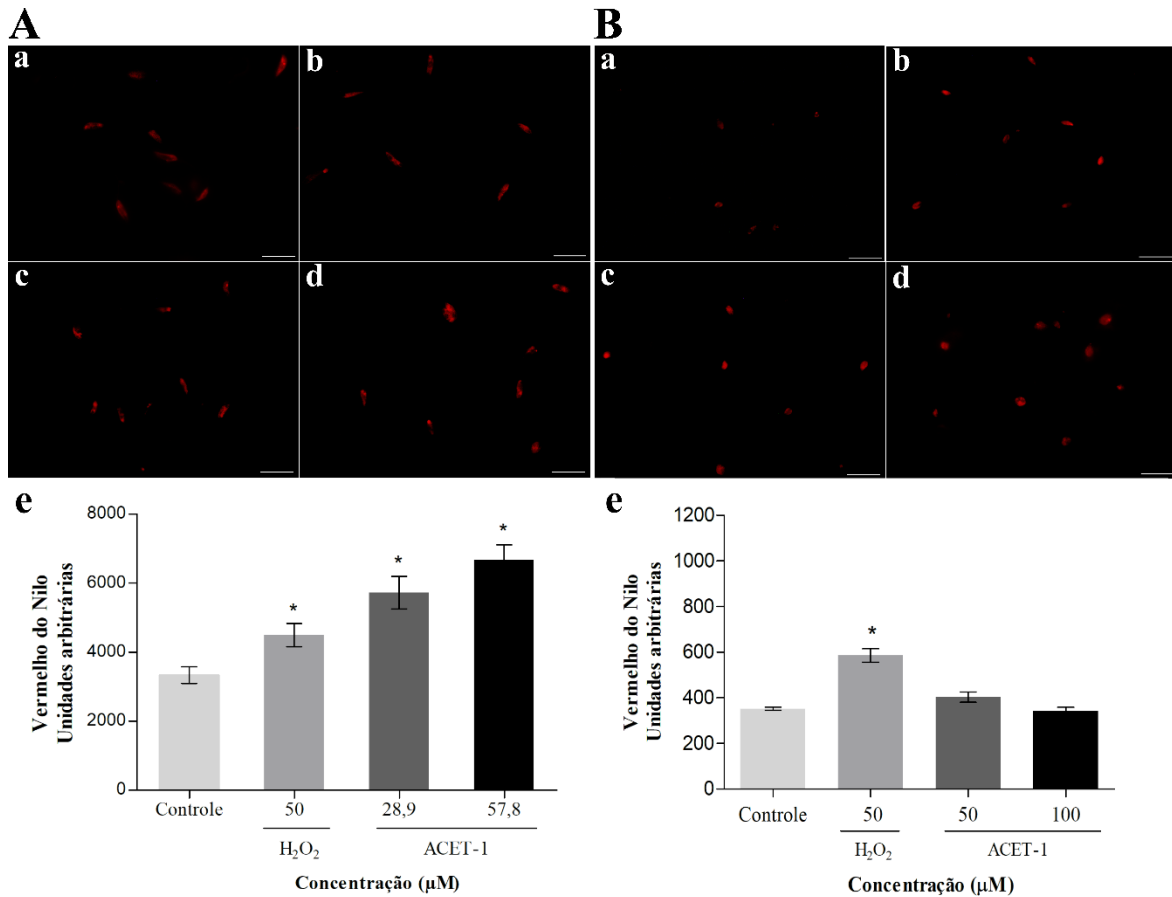




**Figura 10:** Determinação de ATP intracelular em parasitos de *L. amazonensis* tratados com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$   $\mu M$  de **ACET-1** por 24 h. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Efeitos de ACET-1 no acúmulo de corpos lipídicos em *L. amazonensis*

Para a avaliação da presença de corpos lipídicos nos parasitos, o corante fluorescente vermelho do Nilo foi utilizado, devido a sua afinidade por lipídios neutros. A formação e acúmulo de corpos lipídicos após o tratamento com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h foram observados por microscopia de fluorescência e quantificados por espectrofluorimetria. O aumento na quantidade de vacúolos lipídicos em promastigotas tratadas com **ACET-1** foi significativamente maior quando comparado com parasitos não tratados (Fig. 11A), apresentando um aumento de 1,33 e 1,92 vezes após o tratamento com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$ , respectivamente, enquanto amastigotas não apresentaram aumento significativo na quantidade de vacúolos lipídicos após o tratamento com **ACET-1** (Fig. 11B). Parasitos tratados com  $H_2O_2$  apresentaram um aumento significativo na presença de corpos lipídicos, com valor de 1,26 vezes sobre promastigotas e 1,66 vezes sobre amastigotas, quando comparadas ao controle. Esses dados confirmam os resultados obtidos pela análise tempo dependente sobre promastigotas, realizada por microscopia eletrônica e de fluorescência.

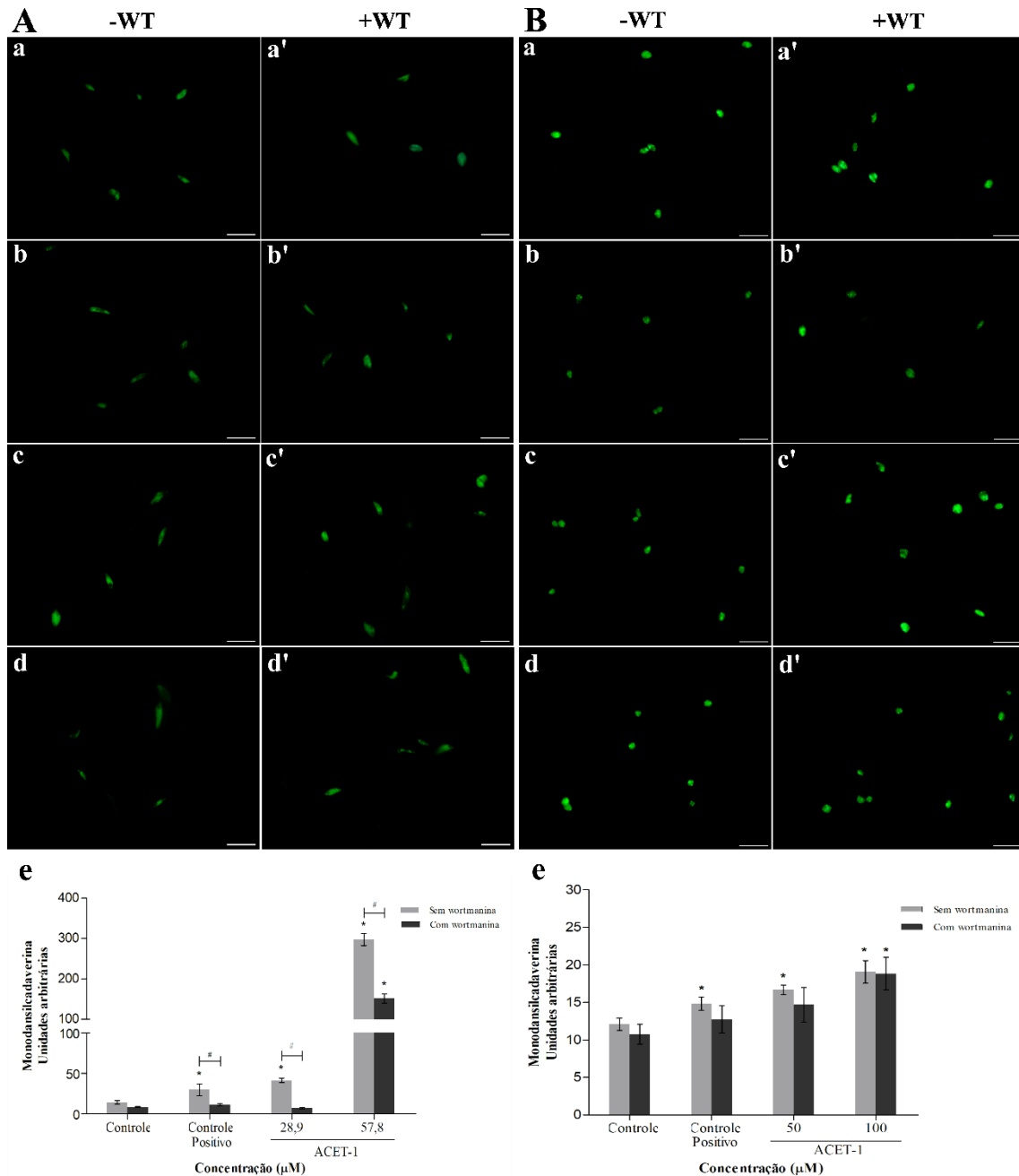


**Figura 11:** Acúmulo de corpos lipídicos em parasitos de *L. amazonensis* tratados com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h. (A) promastigotas; (B) amastigotas. Imagens de microscopia de fluorescência de (a) parasitos não tratados, (b) parasitos tratados com controle positivo, (c) parasitos tratados com  $CI_{50}$ , (d) parasitos tratados com  $2xCI_{50}$ . (e) Intensidade da fluorescência obtida por espectrofluorimetria. Barra de escala: 20 µm; (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.8 Efeitos de ACET-1 na formação de vacúolos autofágicos em *L. amazonensis*

O marcador fluorescente MDC, que se acumula em vacúolos ácidos, foi utilizado para a avaliação de vacúolos autofágicos. É possível observar através da microscopia de fluorescência a presença dos vacúolos autofágicos, corroborando com as observações feitas a partir das imagens de MET. Na quantificação, os dados mostram que, após o tratamento com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h sem wortmanina, ocorreu um aumento significativo na formação de vacúolos autofágicos tanto em promastigotas de 2,86 e 20,35 vezes (Fig. 12A) quanto em amastigotas de (Fig. 12B) de 1,38 e 1,58 vezes respectivamente, representados pelo aumento da fluorescência de MDC, quando

comparado aos grupos controles. Os controles positivos apresentaram um aumento de 2,06 e 1,22 vezes, em promastigotas e amastigotas respectivamente. Porém, somente em promastigotas o inibidor de apoptose wortmanina foi capaz de prevenir a formação dos vacúolos autofágicos, gerando uma diminuição de 2,57, 5,90 e 1,94 vezes após o tratamento com controle positivo,  $CI_{50}$  e  $2x CI_{50}$ , nessa ordem.

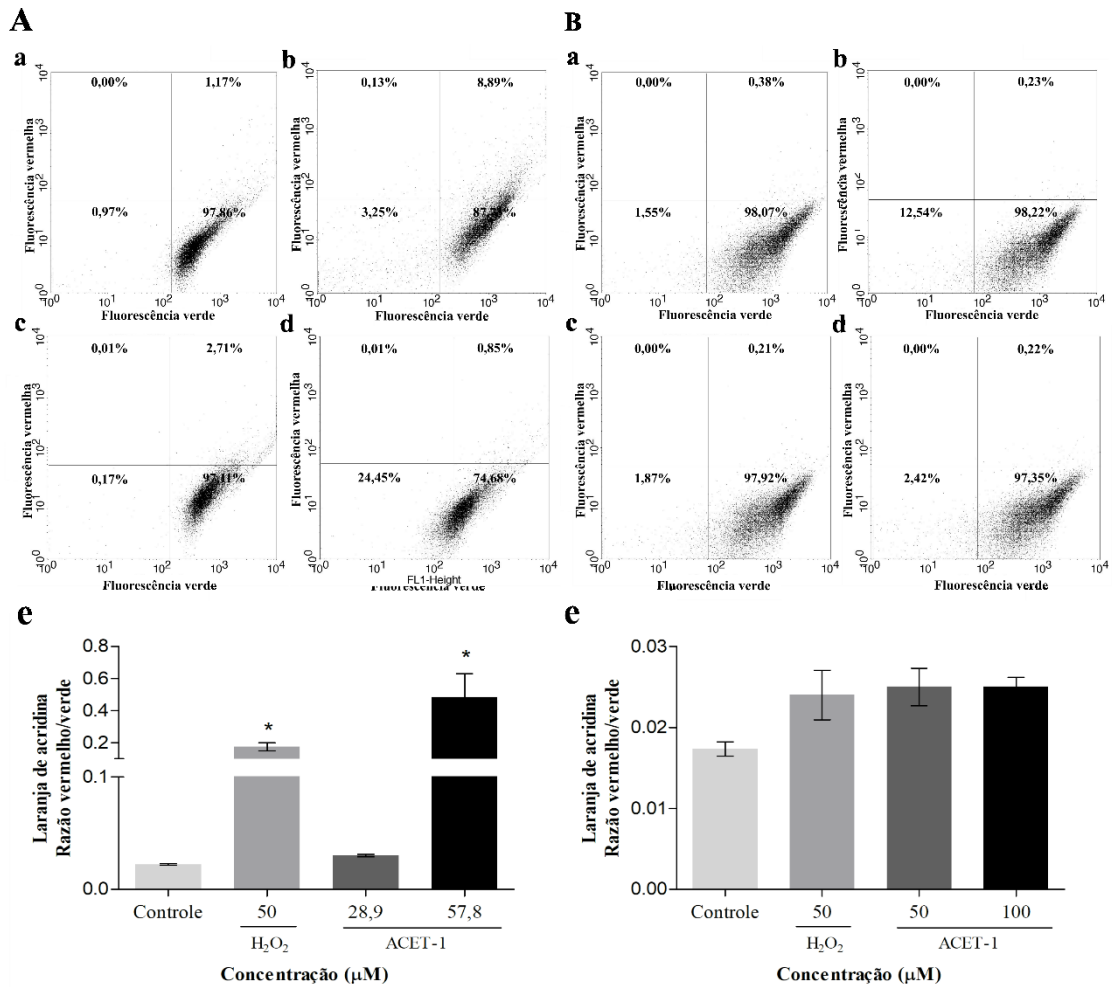


**Figura 12:** Presença de vacúolos autofágicos em parasitos de *L. amazonensis* tratados com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de ACET-1 por 24 h. (A) promastigotas; (B) amastigotas. Imagens de microscopia de fluorescência de (a) parasitos não tratados, (b) parasitos tratados com

PBS, como controle positivo, (c) parasitos tratados com  $CI_{50}$ , (d) parasitos tratados com  $2xCI_{50}$ , (a') parasitos tratados somente com wortmanina, (b') parasitos tratados com controle positivo e wortmanina, (c') parasitos tratados com  $CI_{50}$  e wortmanina, (d') parasitos tratados com  $2xCI_{50}$  e wortmanina; (e) Intensidade da fluorescência obtida por espectrofluorimetria. Barra de escala: 20  $\mu m$ ; (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). (#) indicam diferenças significativas em relação ao grupo com wortmanina.

### **3.9 Efeitos de ACET-1 sobre a formação de compartimentos ácidos em *L. amazonensis***

A avaliação da presença de vacúolos ácidos foi realizada por citometria de fluxo, através da fluorescência do marcador laranja de acridina. A partir dos gráficos de pontos, pode-se observar a população de células concentradas no quadrante inferior direito, as quais apresentam fluorescência na faixa do verde devido ao pH neutro intracelular (Fig. 13Aa 13Ba). Após os tratamentos com  $H_2O_2$ ,  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1**, houve um deslocamento de células para o quadrante inferior esquerdo, indicado a diminuição da fluorescência verde, adicionado ao deslocamento para o quadrante superior direito, indicando aumento da fluorescência vermelha devido ao aumento de compartimentos ácidos nas células (Fig. 13Ac-d e 13Bc-d). No gráfico de barras é possível observar que somente em promastigotas houve o aumento da razão da fluorescência vermelha/verde, o que representa um aumento significativo de vacúolos ácidos de 7,95 e 22,03 vezes, depois do tratamento com  $H_2O_2$  e  $CI_{50}$  respectivamente.

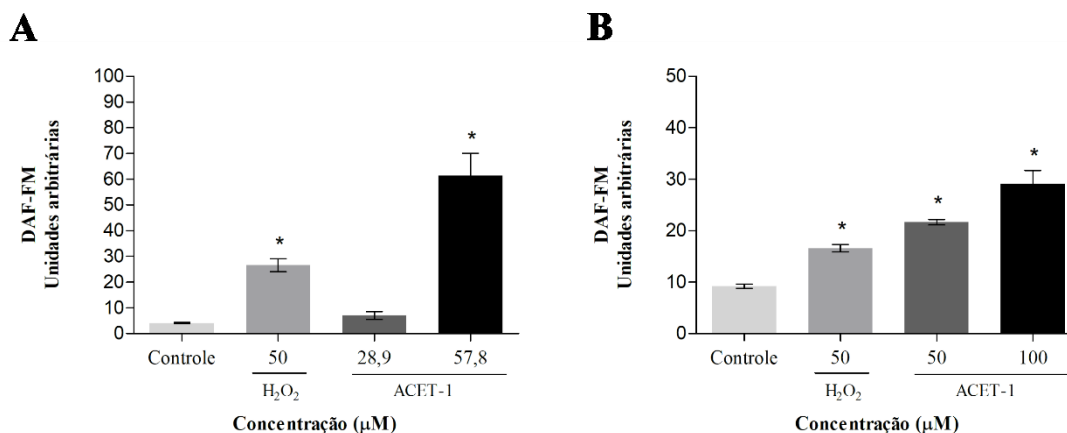


**Figura 13:** Determinação da presença de vacúolos ácidos em *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 por 24 h, utilizando o marcador laranja de acridina. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (a) parasitos não tratados; (b) parasitos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM; (c) parasitos tratados com CI<sub>50</sub>; (d) parasitos tratados com 2xCI<sub>50</sub>; (e) Razão de células que apresentaram fluorescência vermelho e verde. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.10 Efeitos de ACET-1 sobre a produção de óxido nítrico em *L. amazonensis*

A produção de óxido nítrico foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o marcador não fluorescente DAF-FM DA. É possível observar um aumento significativo da produção de óxido nítrico intracelular de 15,31 vezes em promastigotas tratadas com 2xCI<sub>50</sub> de ACET-1 após 24 h de tratamento, quando comparado com o grupo controle (Fig. 14A). Em amastigotas foi observado um aumento significativo da produção de óxido nítrico de forma dose-dependente, sendo de 2,36 e 3,17 vezes quando comparado ao grupo controle (Fig. 14B). Células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram um aumento

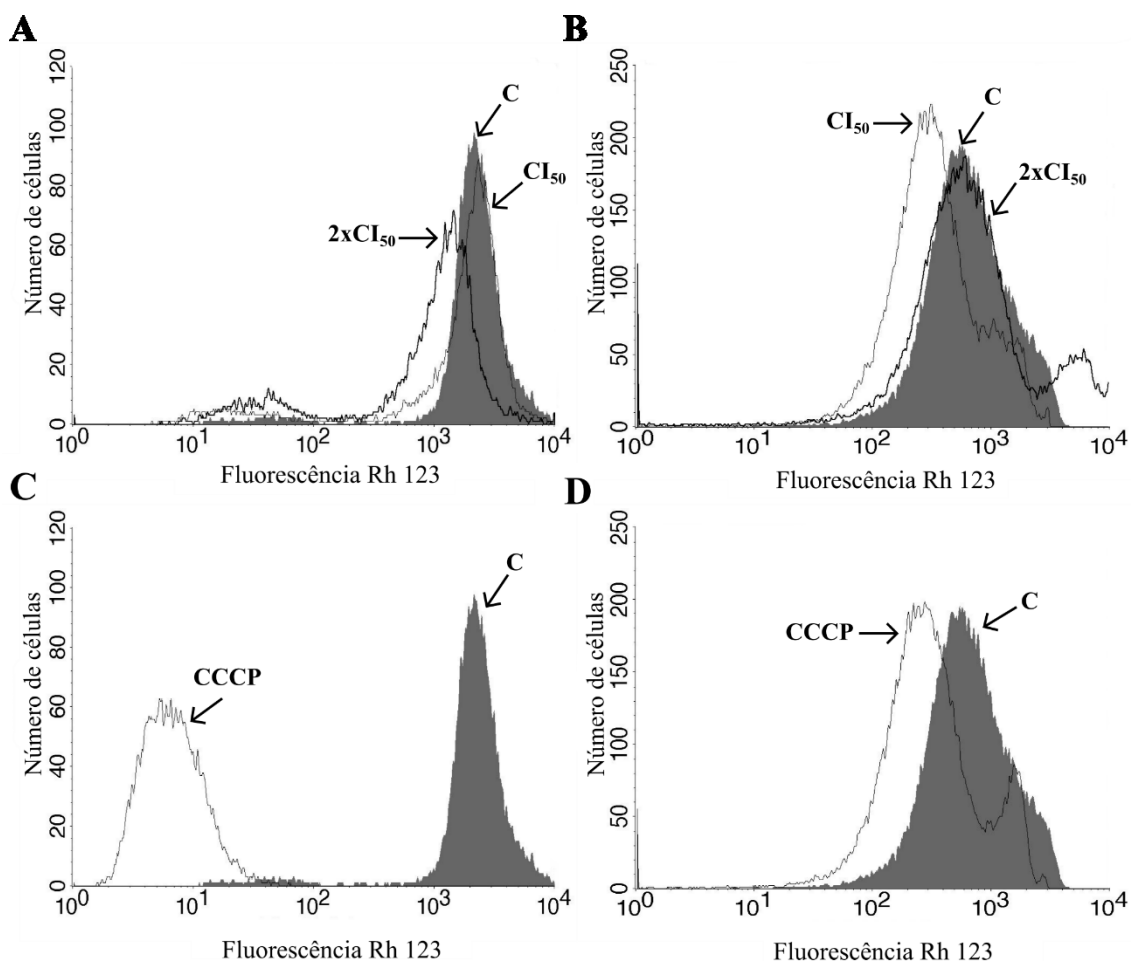
significativo na produção de óxido nítrico, de 6,63 e 1,82 vezes em promastigotas e amastigotas, respectivamente.



**Figura 14:** Determinação da produção de óxido nítrico em parasitos de *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1** por 24 h, utilizando o marcador DAF-FM DA. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.11 Efeitos de **ACET-1** sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de *L. amazonensis*

O marcador fluorescente Rh123 foi utilizado neste ensaio a fim de avaliar o potencial mitocondrial, uma vez que sua afinidade pela mitocôndria é dependente do potencial eletroquímico. Os histogramas mostram uma diminuição na intensidade de fluorescência total de Rh123, que em promastigotas apresentou uma redução significativa de 1,91 vezes após 24 h de tratamento com 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1** (Fig. 15A), enquanto em amastigotas apresentou uma redução significativa de 1,96 vezes após 24 h de tratamento com CI<sub>50</sub> de **ACET-1** (Fig. 15B). O desacoplador mitocondrial CCCP foi utilizado como controle positivo e foi apresentou uma redução na fluorescência de Rh123 em 342,64 vezes em promastigotas (Fig. 15C) e 2,17 vezes em amastigotas (Fig. 15D). Ambas reduções no  $\Delta\Psi_m$  indicam despolarização mitocondrial.

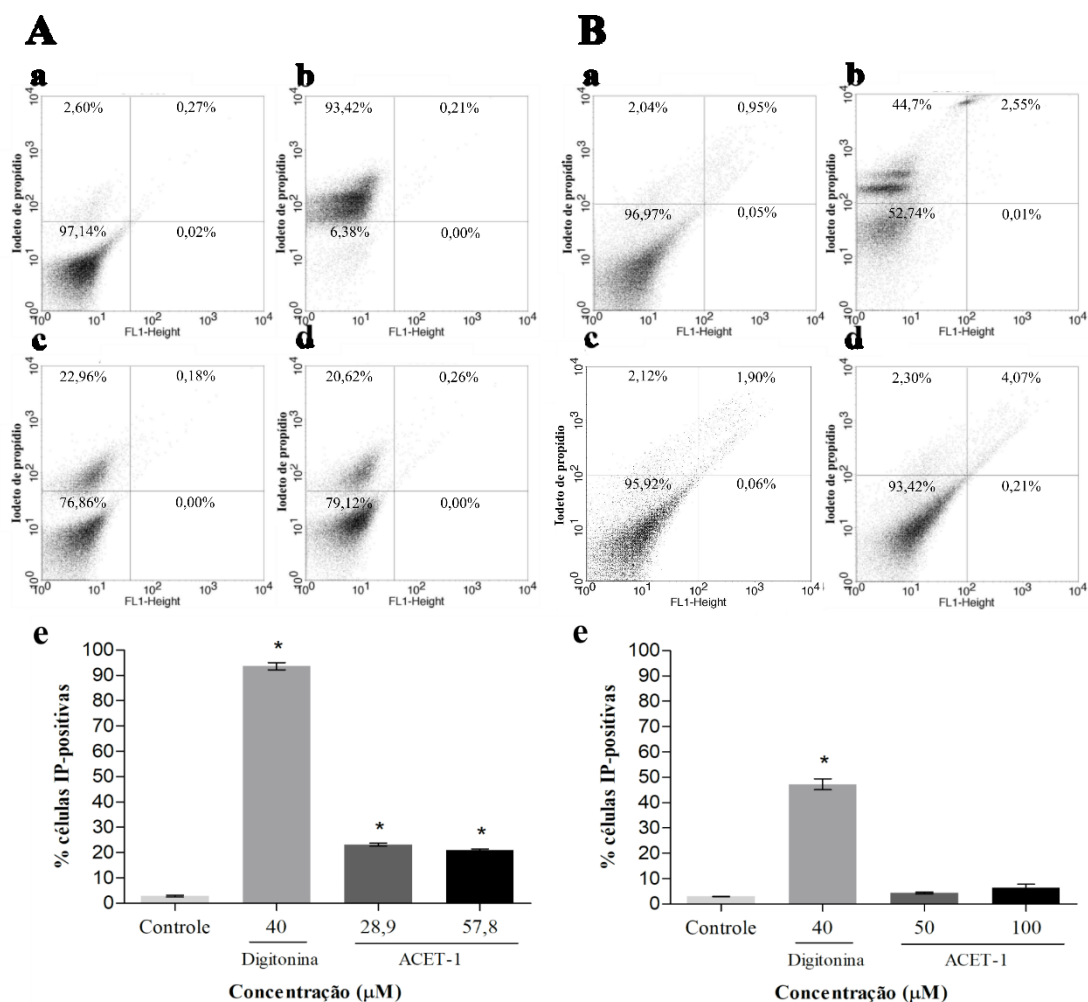


**Figura 15:** Ensaio do  $\Delta\Psi_m$  em parasitos de *L. amazonensis*, usando o marcador Rh123, tratados com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de ACET-1 por 24 h. (A e C) promastigotas; (B e D) amastigotas. Controle negativo (C); (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.12 Efeitos de ACET-1 sobre a integridade da membrana celular de *L. amazonensis*

IP é um agente intercalante fluorescente de ácidos nucleicos, porém impermeável à membrana plasmática e, por isso, foi utilizado para avaliar a integridade da membrana celular dos parasitos. Os gráficos de pontos mostram um aumento na intensidade de fluorescência de IP em promastigotas tratadas com  $CI_{50}$  (Fig. 16Ac) e  $2xCI_{50}$  (Fig. 16Ad) de ACET-1 por 24 h, indicando ruptura da membrana celular, ao passo que, em amastigotas, não houve aumento significativo de fluorescência de IP (Fig. 15Bc e 15Bd), indicando que a integridade da membrana celular das amastigotas não foi afetada por ACET-1. Células tratadas com digitonina tiveram a integridade de suas membranas afetada, apresentando altos valores de fluorescência de IP (Fig. 16Ab e 16Bb). A partir

do gráfico de barras, pode-se concluir que o aumento da fluorescência de IP em promastigotas tratadas com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  foi de 8,15 e 7,35 vezes, respectivamente, e em células tratadas com digitonina foi de 32,96 e 15,80 vezes, em promastigotas e amastigotas, respectivamente.



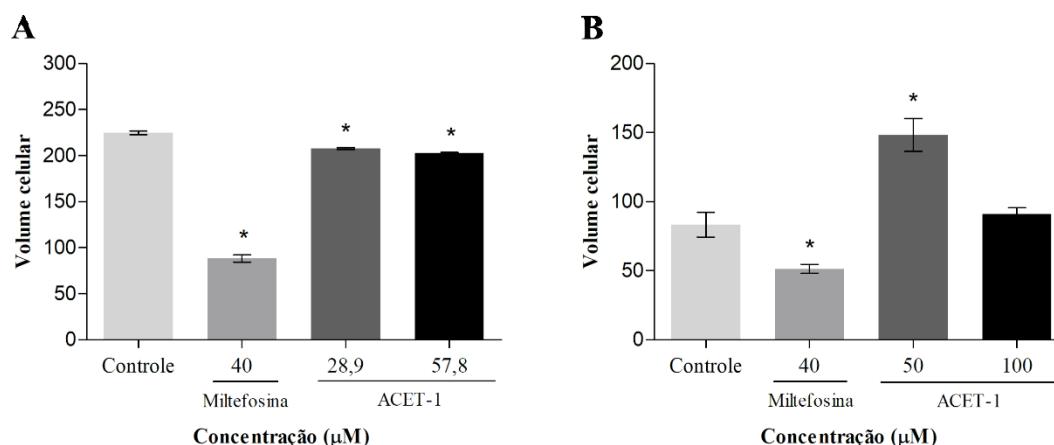
**Figura 16:** Ensaio da integridade de membrana em parasitos de *L. amazonensis* tratados com ACET-1 por 24 h usando IP, um marcador que se liga ao DNA de células com a membrana rompida. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (a) parasitos não tratados; (b) parasitos tratados com digitonina 40  $\mu M$ ; (c) parasitos tratados com  $CI_{50}$ ; (d) parasitos tratados com  $2xCI_{50}$ ; (e) Análise quantitativa de % de células IP-positivas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.13 Efeitos de ACET-1 sobre o volume celular de *L. amazonensis*

O volume das células foi avaliado por citometria de fluxo e, a partir dos gráficos de barras, é possível observar uma ligeira redução no volume total das promastigotas, de



cerca de 1,10 vez após o tratamento com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h, quando comparado ao grupo controle (Fig. 17A). Já em amastigotas, foi observado um aumento de 1,78 vez no volume das células após o tratamento com  $CI_{50}$  de **ACET-1**, seguido da diminuição do volume total das células após o tratamento com  $2xCI_{50}$  de **ACET-1**, porém, essa redução não foi significativa quando comparada ao controle (Fig. 17B). Células tratadas com miltefosina apresentaram redução significativa de 2,54 e 1,62 vezes, em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

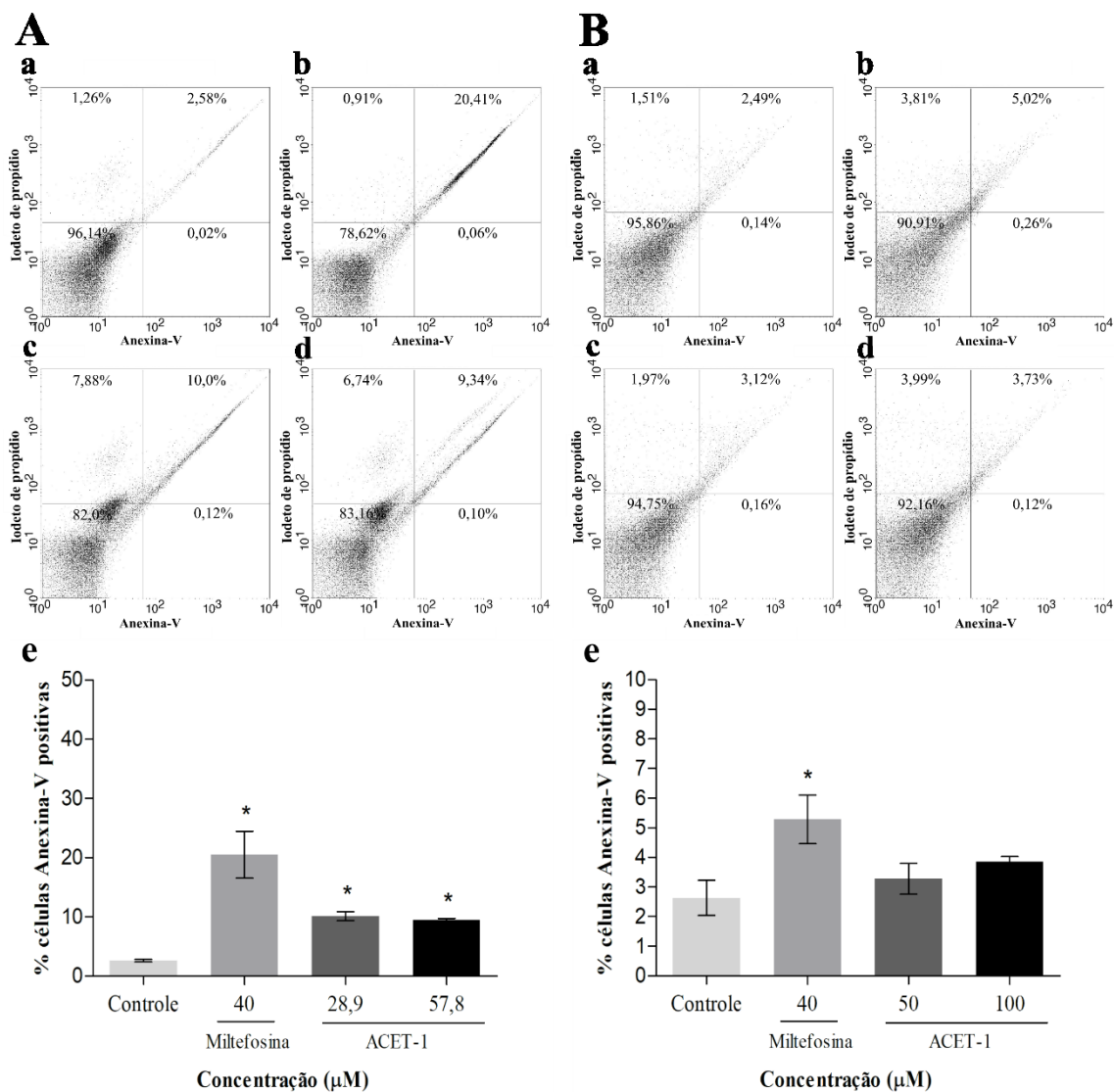


**Figura 17:** Determinação do volume celular em parasitos de *L. amazonensis* tratados com  $CI_{50}$  e  $2xCI_{50}$  de **ACET-1** por 24 h. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.14 Efeitos de **ACET-1** sobre a exposição de fosfatidilserina de *L. amazonensis*

A partir dos gráficos de pontos, pode-se observar em promastigotas um aumento de 3,88 e 3,64 vezes da porcentagem de células anexina-V positivas (representadas no quadrante superior e inferior direito dos gráficos de pontos) quando comparadas ao controle, indicando que o tratamento com  $CI_{50}$  (Fig. 18Ac) e  $2xCI_{50}$  (Fig. 18Ad) de **ACET-1** por 24 h induziu a exposição da fosfatidilserina na membrana dos parasitos. Em amastigotas, o aumento da porcentagem das células anexina-V positivas não foi significativo (Fig. 18Ac-d). Parasitos tratados com miltefosina (Fig. 18Ab e 18Bb) apresentaram aumento significativo de 7,87 e 1,62 vezes na quantidade de células anexina-V positivas, em promastigotas e amastigotas, respectivamente. Fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana plasmática em condições saudáveis, mas que se expõe na superfície de células que sofrem apoptose, indicando que

ACET-1 pode ter induzido um processo semelhante a apoptose em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

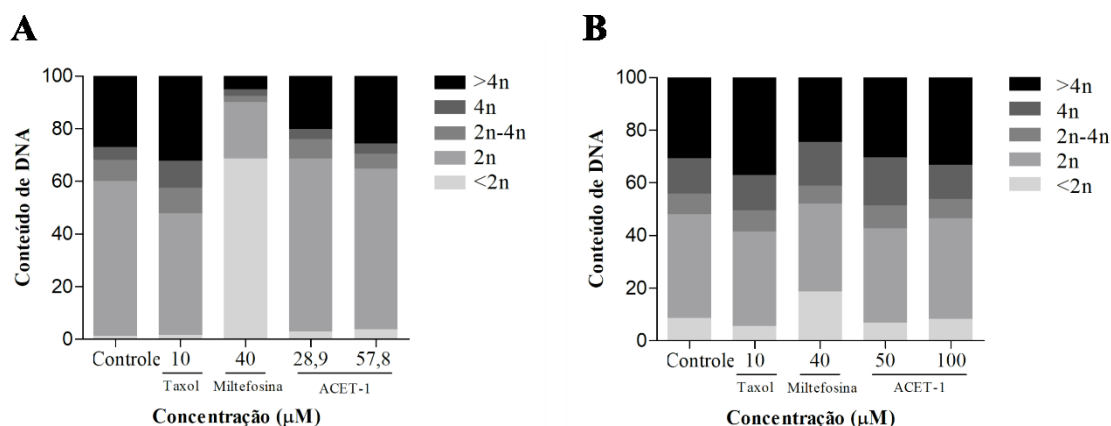


**Figura 18:** Determinação da exposição de fosfatidilserina em parasitos tratados com ACET-1. Foi utilizado IP e anexina-V, um intercalante do DNA e um marcador que se liga ao fosfolípido de membrana. (A) promastigotas; (B) amastigotas. (a) parasitos não tratados; (b) parasitos tratados com miltefosina 40 μM; (c) parasitos tratados com CI<sub>50</sub>; (d) parasitos tratados com 2xCI<sub>50</sub>; (e) Análise quantitativa de % de células anexina-V positivas. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.15 Efeitos de ACET-1 sobre o ciclo celular de parasitos de *L. amazonensis*

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, com a finalidade de observar as mudanças no conteúdo de DNA presente nos parasitos através da intensidade de

fluorescência de IP. Miltefosina, usado como controle positivo, notadamente induziu parada na fase sub  $G_0$  do ciclo celular tanto em promastigotas quanto em amastigotas, o que pode ser observado pelo aumento significativo do número de células em  $<2n$ , indicando assim, fragmentação do DNA (Fig. 19A e 19B). Taxol claramente também causou parada no ciclo celular, uma vez que é possível observar um acúmulo de células aneuploides, com  $>4n$ , sugerindo o impedimento da realização da citocinese. Já o tratamento com **ACET-1** resultou em um ligeiro acúmulo de células em fase  $G_0/G_1$  ( $2n$ ) em promastigotas (Fig. 19A) e uma diminuição do número de células em fase S e  $G_2/M$  ( $2n-4n$  e  $4n$ ), porém essa diferença não foi significativa quando comparada ao controle. Em amastigotas, nenhuma diferença nas fases do ciclo celular foi observada, sinalizando que a substância avaliada não altera o ciclo de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

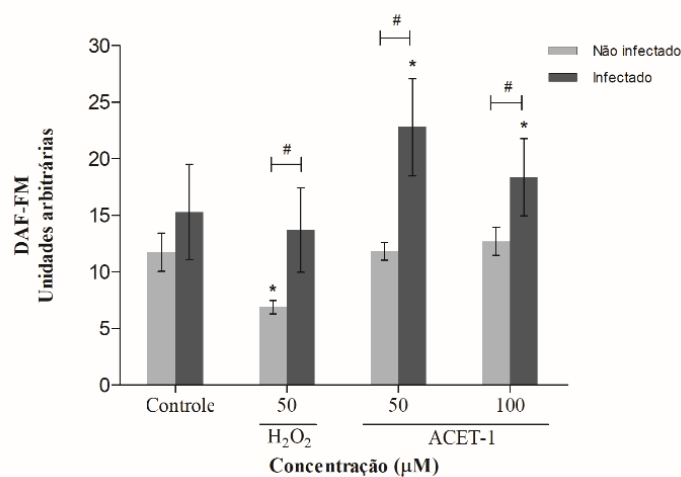


**Figura 19:** Análise de conteúdo de DNA de parasitos de *L. amazonensis* após 24 h de tratamento com **ACET-1**. Representação gráfica do conteúdo de DNA de cada população com base nos gráficos de citometria de fluxo. (A) promastigotas; (B) amastigotas. As fases do ciclo são indicadas pela intensidade da fluorescência de IP, que é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA. Fase sub $G_0$ : células com DNA fragmentado ( $<2n$ ); Fase  $G_0/G_1$ : células diploides ( $2n$ ); Fase S: replicação do DNA ( $2n-4n$ ); Fase  $G_2/M$ : Células com conteúdo de DNA duplicado ( $4n$ ); Células que apresentaram conteúdo de DNA alto: aneuploides ( $>4n$ ). Valor de  $p < 0,05$ .

### 3.16 Efeitos de ACET-1 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos J774A.1

Através da citometria de fluxo, utilizando o marcador DAF-FM DA, a produção de óxido nítrico também foi avaliada sobre macrófagos infectados ou não com

*L. amazonensis*. É possível observar que a produção de óxido nítrico foi aumentada em macrófagos infectados quando comparados aos não infectados, sendo ainda mais expressivo esse aumento, após os tratamentos com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1**. Quando comparados ao controle não infectado, macrófagos não infectados e tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram uma diminuição significativa de 1,72 vezes na produção de óxido nítrico, ao passo que os macrófagos infectados tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1** exibiram um aumento significativo de 1,93 e 1,55 vezes. Todos os tratados e infectados, quando comparados aos tratados não infectados apresentaram um aumento significativo nos níveis de óxido nítrico de 1,99, 1,93 e 1,44 vezes nos tratamentos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub>, respectivamente.



**Figura 20:** Determinação da produção de óxido nítrico em macrófagos J774A.1 infectados ou não com *L. amazonensis* tratados com CI<sub>50</sub> e 2xCI<sub>50</sub> de **ACET-1** por 24 h, utilizando o marcador DAF-FM DA. (\*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). (#) indicam diferenças significativas em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

É notável que algumas DTNs são mais negligenciadas que outras. Podemos enquadrar a leishmaniose neste contexto, uma vez que o tratamento se baseia quase exclusivamente em medicamentos que existem há 80 anos e que exibem alta toxicidade, administração parenteral com efeitos adversos potencialmente fatais, podendo não atingir o nível clínico e cura parasitológica [47-51].

Apesar dos avanços recentes, o tratamento da leishmaniose continua insatisfatório e, considerando que as indústrias farmacêuticas têm pouco interesse em DTNs do ponto de vista comercial, a pesquisa acadêmica continua como única alternativa para o desenvolvimento de novos métodos que poderiam ser aplicados no tratamento da leishmaniose [51,52]. Dado este cenário, o presente estudo objetivou a avaliação da atividade antiparasitária da substância tiofênica **ACET-1**, motivado por estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que relataram potencial leishmanicida desta classe de compostos [21].

Inicialmente, foi investigada a atividade antiproliferativa de **ACET-1**, e os dados mostraram a eficácia contra parasitos de *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para macrófagos, apresentando um valor de  $CI_{50}$  de 28,9  $\mu$ M sobre promastigotas e 50  $\mu$ M sobre amastigotas e um interessante índice de seletividade de 4,69 sobre amastigotas, corroborando com os estudos anteriores que comprovaram a atividade leishmanicida de tiofenos [22,23].

Sendo assim, para a determinação das vias de morte induzidas por **ACET-1** sobre *L. amazonensis*, foram realizadas análises por microscopia eletrônica, dado que estas técnicas são consideradas valiosas para detecção da morte celular [53-55]. Por MEV, as alterações morfológicas observadas em promastigotas, como arredondamento do corpo celular, extravasamento de conteúdo citoplasmático, diminuição do tamanho do flagelo, além das alterações superficiais da membrana plasmática, sugerem que as células estão submetidas a um estresse oxidativo. Hipótese essa que foi sustentada pelas imagens de MET, nas quais as alterações estruturais ficaram mais explícitas, sendo possível observar desorganização do conteúdo e da membrana nuclear, presença de corpos lipídicos, alta atividade exocítica e presença de vacúolos autofágicos, tanto em promastigotas quanto em amastigotas. Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa [18,26,56].

A atividade exocítica pode estar relacionada à secreção de moléculas que sofreram danos e não são mais úteis à célula, ou ainda à produção excessiva de proteínas que gera um mau enovelamento proteico e devem ser recuperadas. Estas avarias podem ser causadas pela perturbação da homeostase do retículo endoplasmático (RE), como consequência da ação das ERO [57-61]. O RE e complexo de Golgi são organelas envolvidas tanto no processo de biossíntese de moléculas quanto no processo de secreção, e podem atuar como sensores do estresse celular, participando na inicialização da morte celular semelhante a apoptose quando lesionados [62]. O inchaço mitocondrial observado pode indicar um interessante alvo de **ACET-1**, visto que parasitos tripanossomatídeos apresentam uma mitocôndria única e ramificada [26,39].

Adicionalmente, foi observado uma alteração ultraestrutural inédita na interface membrana/microtúbulos-subpeliculares das promastigotas tratadas com **ACET-1**. O citoesqueleto localizado abaixo da membrana plasmática apresenta um rígido arranjo de microtúbulos subpeliculares que correm paralelamente ao longo do eixo do corpo do parasito e outros componentes estruturais, sendo responsável pela manutenção da forma do parasito durante as fases de diferenciação no seu ciclo de vida e para a divisão celular. A presença deste *corset* inflexível não permite a formação de vesículas ao longo do corpo celular, portanto esta desorganização arquitetônica pode ser crucial para a manutenção da célula [63,64]. A endocitose e exocitose ocorre exclusivamente na bolsa flagelar, uma invaginação da membrana responsável por permitir a formação de vesículas para a entrada de nutrientes e excreção, sendo também de onde emerge o flagelo, já que é o único local que não se encontra microtúbulos subpeliculares. O flagelo é formado por um arranjo de 11 filamentos proteicos conectados aos pares de microtúbulos, e é responsável pela motilidade dos parasitos e adesão às células-alvo [65,66].

Todas essas alterações, sejam elas morfológicas ou ultraestruturais, foram reafirmadas pelas análises tempo-dependente que revelaram que os corpos lipídicos estão presentes logo nas primeiras horas de tratamento com **ACET-1**, ao passo que as alterações na membrana plasmática começam a se tornar evidentes após as 8 h de tratamento e são intensificadas de forma tempo-dependente.

Os corpos lipídicos são organelas intracelulares dinâmicas compostos por um núcleo de lipídios neutros envoltos por uma monocamada de fosfolipídios e proteínas associadas, que interagem com outros componentes celulares. A formação dessas estruturas é um processo comum na célula e seu papel é funcionar como reservatório de energia, mas o seu acúmulo pode ser indicativo de degeneração patológica causada por

exemplo, pela inibição da via sintética lipídica, ou pelo efeito oxidativo das espécies reativas sobre os lipídios [67-70].

As ERO abrangem diversas moléculas quimicamente reativas derivadas da redução incompleta de um elétron do oxigênio molecular, as quais são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbios, mas altas concentrações podem induzir danos oxidativos [70-72]. Além das ERO, outras moléculas com alto poder oxidante podem ser deletérias às células, como por exemplo, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), compostos derivados do óxido nítrico (NO) que estão relacionados à regulação fisiológica das células, mas que em altos níveis podem induzir o estresse nitrosativo [73]. Estes radicais livres contêm um número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, e o não-emparelhamento de elétrons conduz à alta reatividade destas moléculas. [74].

A formação de ERO e ERN são processos significantes envolvidos em degeneração de macromoléculas, principalmente proteínas, lipídios, DNA, e também aumento da formação de corpos lipídicos [75]. Como esperado, constatou-se que a produção de ERO e ERN foi aumentada em ambas formas parasitárias de *L. amazonensis* após o tratamento com **ACET-1**, bem como a lipoperoxidação, que pode ser uma consequência da ação oxidante dessas moléculas. A produção de energia também foi afetada, representada pelo aumento nos níveis intracelulares de ATP em promastigotas, e uma redução seguida de aumento de ATP em amastigotas. O aumento exacerbado de ATP pode ser considerado como uma última tentativa das células para evitar morte, antes que ocorra a despolarização mitocondrial [76].

A peroxidação lipídica pode interferir na integridade funcional e estrutural das membranas celulares, induzindo a ruptura da membrana [77,9], e alterando o  $\Delta\Psi_m$ , além de contribuir também para o acúmulo de corpos lipídicos [75]. Por isso, a despolarização da mitocôndria observada no presente estudo nos leva a supor que **ACET-1** pode causar um aumento do conteúdo de espécies reativas que culminam em uma disfunção mitocondrial, ou, de forma recíproca, afeta a mitocôndria e conseqüentemente gera mais espécies reativas [78], uma vez que, durante a fosforilação oxidativa pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, os elétrons podem ser transferidos diretamente para as moléculas de oxigênio, gerando  $O_2^{\bullet}$ , podendo resultar na geração de outras espécies, como  $H_2O_2$  e  $\bullet OH$ , e, conseqüentemente, danos celulares [6,79].

A formação rápida verificada pela análise tempo-dependente e acúmulo de corpos lipídicos reforçam ainda mais a hipótese de morte celular apoptótica [70,75].

Outros estudos também relataram um aumento na formação de corpos lipídicos em tripanossomatídeos sob condições de estresse [6,80].

Perda da integridade da membrana plasmática, diminuição do volume celular (picnose) e exposição da fosfatidilserina, também são características que marcam fenótipos apoptóticos e que foram observadas apenas em promastigotas tratadas com **ACET-1**. Em condições fisiológicas normais, fosfatidilserina está predominantemente localizada no folheto interno da membrana plasmática. Sob início de apoptose, este lipídio perde sua distribuição assimétrica na bicamada fosfolipídica e é translocado para o folheto da membrana extracelular, onde identifica tais células como alvos para fagocitose [81-83].

Em contrapartida, os vacúolos autofágicos observados sugerem também a morte dos parasitos por autofagia, processo que pode ser desencadeado pela presença de ERO e ERN. De modo a prevenir maiores danos, a autofagia é caracterizada pela agregação de material citoplasmático dentro de vacúolos dupla-membranosos denominados vacúolos autofágicos [84,85]. É através destes vacúolos que as células coordenam respostas ao estresse oxidativo, degradando componentes que tenham sofrido algum dano, para ser reciclado ou eliminado. Em protozoários cinetoplastídeos, a autofagia parece ter um grande papel durante as diferentes fases do ciclo de vida de acordo com as alterações ambientais. No entanto, apesar de seu papel benéfico, dependendo das condições fisiológicas, a autofagia pode resultar em morte [86].

Wortmanina, usado para prevenir a autofagia, foi capaz de reduzir os vacúolos autofágicos somente em promastigotas, sugerindo que em amastigotas, a via autofágica não foi significativamente importante para a morte dos parasitos. Esse inibidor atua na proteína PI3k, que desempenha papel essencial para iniciar a maturação do autofagossomo e promover a interação com endossomos iniciais e tardios e lisossomos. [87,88].

Além dos vacúolos autofágicos, outros compartimentos celulares ácidos como os acidocalcissomos foram detectados em níveis aumentados em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com **ACET-1**. Os acidocalcissomos são estruturas esféricas, distribuídas por todo o corpo do parasita e com diâmetro de 0.2 – 0.6  $\mu\text{m}$ , contendo em seu interior uma matriz eletróluscente, encontradas em maior número nas formas amastigotas, estão envolvidas principalmente na reserva de íons tais como: o cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e de compostos fosfatados, além de desempenhar um papel na regulação do pH intracelular e na osmorregulação em



associação com o vacúolo contrátil [89-91] O aumento da quantidade dessas estruturas intracelulares pode ser uma tentativa de regulação homeostática por consequência de todo desequilíbrio osmótico e energético causada por **ACET-1** [92].

Podemos considerar outras características autofágicas identificadas nos parasitos tratados com **ACET-1**, como por exemplo, a extensão do RE, presença de vacuolização citoplasmática, degeneração da organização intracelular e degradação do aparelho de Golgi [57,93].

O ciclo celular das formas parasitárias também foi analisado, mas **ACET-1** não foi capaz de causar quaisquer alterações no ciclo de vida de parasitos de *L. amazonensis*.

Por último, a ativação de macrófagos foi observada pelo aumento de óxido nítrico em células infectadas quando comparadas às células não infectadas. Isso acontece porque após o reconhecimento de *Leishmania* spp., macrófagos são ativados e se tornam as chamadas “células efetoras” que podem fagocitar e destruir o hóspede indesejado[94]. Vários processos celulares começam após a ativação de macrófagos, incluindo a produção de fagolisossomos enzimas de degradação (por exemplo, proteases, nucleases, fosfatases, lipases e esterases), geração de explosão oxidativa e óxido nítrico ( $\bullet$ NO) [95]. Esse fato confirma a seletividade de **ACET-1** sobre macrófagos, e corrobora com as imagens de MET, nas quais foi visualizado grande atividade metabólica dos macrófagos e intensa deposição vesicular dentro dos vacúolos parasitóforos.

*Leishmania* pode ser amplamente adaptada para a sobrevivência e replicação no vetor ou hospedeiro macrófago, utilizando um conjunto apropriado de genes e proteínas para diferentes ambientes e, apesar da maioria de seus mRNAs serem expressos constitutivamente, a virulência e a patogênese podem ser dependentes da abundância de nutrientes disponíveis para estes parasitos [96,97]. Dessa forma, fica claro o porquê que a resposta à substância pode não ser a mesma entre as formas parasitárias, dependendo do estágio de vida que o parasito se encontra e a forma de experimentação. Dada a limitação das técnicas utilizadas neste trabalho para a avaliação das amastigotas intracelulares, a via intrínseca de morte das amastigotas não foi identificada.

Em conclusão, demonstramos que **ACET-1** possui atividade antileishmania seletiva, e que o tratamento induziu ativamente a perda de função dos parasitos de *L. amazonensis*, tendo como principal mecanismo de ação a indução de um estresse oxidativo nas células, desencadeando morte semelhante a apoptose e/ou autofagia em promastigotas, e a morte das amastigotas foi consequência da atividade efetora dos macrófagos, que por sua vez foram ativados por **ACET-1**. Todavia, nenhum relato na

literatura foi encontrado em relação as alterações ultraestruturais inéditas encontradas neste trabalho e, por isso, mais estudos a nível molecular devem ser realizados, a fim de estabelecer o mecanismo de ação de **ACET1** sobre formas parasitárias de *L. amazonensis*.

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] W.H.O, Leishmaniasis (2020). <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acessado em 14 de maio de 2021.
- [2] W.H.O, Leishmaniasis, Leishmaniasis Fact Sheet (2019).
- [3] F.T. Silveira, R. Lainson, C.E.P. Corbett, Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil, A review. Mem. I. Osw. Cruz. 3 (2004) 239-51.
- [4] W.H.O. Leishmaniasis, Key facts (2018). <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- [5] T.F. Stefanello, M.R. Panice, T. Ueda-Nakamura, M.H. Serragiotto, R. Auzély-Velty, C.V. Nakamura, N-Butyl-[1-(4-Methoxy)Phenyl-9H- $\beta$ -Carboline]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*, Antimicrob. Agents Chemother. 58 (2014) 7112-7120.
- [6] F.P. Garcia, D. Lazarin-Bidóia, T. Ueda-Nakamura, S.O. Silva, C.V. Nakamura, Eupomatenoid-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*, Evid. Based Complement. Alternat. Med. (2013). [dx.doi.org/10.1155/2013/940531](https://doi.org/10.1155/2013/940531).
- [7] W.H.O. Leishmaniasis, Key facts (2021). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em 20 de maio de 2021.
- [8] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, PLoS ONE. 7 (2012). [doi:10.1371/journal.pone.0035671](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671).
- [9] C.G. Silva, R.M.M Silva, V.A. Diniz, S. Côrte-Real, Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: F. Conceição-Silva, C.R. Alves, Leishmanioses do continente americano, Ed. Fiocruz. 3 (2014) 53-71.
- [10] M.E. Rogers, T. Ilg, A.V. Nikolaev, M.A.J. Ferguson, P.A. Bates, Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nat. 430 (2004) 463-467. [doi:10.1038/nature02675](https://doi.org/10.1038/nature02675).

- [11] A. Debrabant, M.B. Joshi, P.F. Pimenta, D.M. Dwyer, Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics, *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 205-217. doi:10.1016/j.ijpara.2003.10.011.
- [12] D.E. Teixeira, M. Benchinol, J.C.F. Rodrigues, P.H. Crepaldi, P.F.P. Pimenta, W. Souza, The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations, *PLOS Pathog.* 9 (2013). doi:10.1371/journal.ppat.1003594.
- [13] T.K. Karam, Desenvolvimento de microcápsulas de quitosana contendo óleo essencial de *Matriarca chamomilla L.* e avaliação da atividade biológica frente à *Leishmania amazonensis* Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). (2019).
- [14] E. Cardoso, A. Silva, G. Carvalho, A. Fraga, M. Barbosa, A. Santos, H. Castro, V. Lione, Leishmaniasis: history, evolution of treatment and the need for new drugs. *Curr. Biotechnol.* 3-4 (2015) 279–288.
- [15] F. Chappuis, E. Alirol, D.T. Worku, Y. Mueller, High mortality among older patients treated with pentavalent antimonials for visceral Leishmaniasis in East Africa and rationale for switch to Liposomal Amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 455–456.
- [16] P. Desjeux, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2004) 305–318.
- [17] E.F. Cunha-Júnior, W. Pacienza-Lima, G.A. Ribeiro, C.D. Netto, M.M. Canto-Cavalheiro, A.J.M. Silva, P.R. Costa, B. Rossi-Bergmann, E.C. Torres-Santos, Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 1555-1559.
- [18] E.A. Britta, D.B. Scariot, H. Falzirolli, T. Ueda-Nakamura, C.C. Silva, B.P.Dias Filho, R. Borsali, C.V. Nakamura, Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene, *BMC Microb.* 14 (2014). doi:10.1186/s12866-014-0236-0.
- [19] E. Torres-Guerrero, M.R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, R. Arenas. Leishmaniasis: a review. *F1000Res.* 6 (2017) 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1.

- [20] Bruice, P. Y. Química Organica II, 4<sup>a</sup> ed., São Paulo: Editora Pearson Education, 2 (2006).
- [21] H.T. Takahashi, C.R. Novello, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, J.C.P. de Mello, C.V. Nakamura, Thiophene Derivatives with Antileishmanial Activity Isolated from Aerial Parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules*. 16 (2011) 3469-3478. doi:10.3390/molecules16053469.
- [22] H. Volpato, D.B. Scariot, D. F. P. Soares, A. P. Jacomini, F. A. Rosa, M. H. Sarragiotto, T. Ueda-Nakamura, A. F. Rubira, G. M. Pereira, R. Manadas, A. J. leitão, O. Borges, C. V. Nakamura, M. C. Sousa, In vitro anti-*Leishmania* activity of T6 synthetic compound encapsulated in yeast-derived  $\beta$ -(1,3)-d-glucan particles. *Biomac*. 119. (2018) 1264–1275. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.019
- [23] D. B. Scariot, H. Volpato, N. S. Fernandes, D. Lazari-Bidóia, O. Borges, M. C. Sousa, F. A. Rosa, A. P. Jacomini, S. O. Silva, T. Ueda-Nakamura, A. F. Rubira, C. V. Nakamura, Oral treatment with T6-loaded yeast cell wall particles reduces the parasitemia in murine visceral leishmaniasis model. *Sci. Rep.* 9 (2019) 20080. doi: 10.1038/s41598-019-56647-w
- [24] A.M. al-Obaid, H.I. el-Subbagh, O.A. al-Shabanah, M.A. Mahran, Synthesis and biological evaluation of new cyclopenteno[b]thiophene derivatives as local anesthetic and antiarrhythmic agents. *Die Pharmazie*. 53 (1998) 24-28.
- [25] T. Meshulam, S.M. Levitz, L. Christin, R.D. Diamond, A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT), *J. Infect. Dis.* 4 (1995). doi:10.1093/infdis/172.4.1153.
- [26] N. Miranda, H. Volpato, J.H.S. Rodrigues, W. Caetano, T. Ueda-Nakamura, S.O. Silva, C.V. Nakamura, The photodynamic action of pheophorbide  $\alpha$  induces cell death through oxidatvie stress in *Leishmania amazonensis*, *J. Photochem. Photobiol.* 174 (2017) 342-354. dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.016.
- [27] T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*. 65 (1983) 55–63.

- [28] J.C. de Paula, A.B.K. Bakoshi, D. Lazarin-Bidoia, Z.U. Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4- (4-nitrophenyl)but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 211 (2020) 1-11.
- [29] A.K. Shukla, S. Patra, V.K. Dubey, Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 49-54. doi:10.1016/j.ejmech.2012.04.034.
- [30] Y. Okimotoa, A. Watanabea, E. Nikia, T. Yamashitab, N. Noguchia, A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 2 (2000). doi:10.1016/s0014-5793(00)01587-8.
- [31] E. Nowak, S. Kammerer, J.H. Kupper, ATP-basd cell viability assay is superior to trypan blue exclusion and XTT assay in measuring cytotoxicity of anticancer drugs Taxol an Imatinib, and proteasome inhibitor MG-132 on human hepatoma cell line Hep-G2, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 69 (2018) 327-336. Doi: 10.3233/CH-189120
- [32] F.P. Garcia, J.H.S. Rodrigues, Z.U. Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, R. Auzély-Velty, C.V. Nakamura. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. *Apopt.* 22 (2016) 57–71.
- [33] P. Greenspan, E.P. Mayer, S.D. Fowler, Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *J. Cell. Biol.* 100 (1985) 965-973.
- [34] D.B. Munafó, M.I. Colombo, A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation, *J. Cell Sci.* (2001) 3619-3629. doi.org/10.1242/jcs.114.20.3619.
- [35] A. Biederbick, H.F. Kern, H.P. Elsasser, Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Bio.* 66 (1995) 3-14.
- [36] K. Kusuzaki, H. Murata, H. Takeshita, S. Hashiguchi, T. Nozaki, K. Emoto, T. Ashihara, Y. Hirasawa, Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells,, *Anticancer Res.* 20 (20A) (2000) 971-975.

- [37] M.P. Tomé, E.C. Filippi-Chiela, E.S. Villodre, C.B. Migiavaca, G.R. Onzi, K.B. Filipe, G. Lenz, Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy, *J. Cell Sci.* (2016) 4622-4632.
- [38] D. Lazarin-Bidóia, V.C. Desoti, S.C. Martins, F.M. Ribeiro, Z.U Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, S.O. Silva, Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System, *Antimic. Agents Chem.* 60 (2016) 890-903.
- [39] R.F.S. Menna-Barreto, R.L.S. Gonçalves, E.M. Costa, R.S.F. Silva, A.V. Pinto, M.F. Oliveira, S.L de Castro, The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction, *Free Radic. Biol. Med.* 5 (2009) 644-653. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.004.
- [40] X. Ronot, L. Benel, M. Adolphe, J.C. Mounolou, Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry, *Biol. Cell.* 57 (1986) 1-7. doi:10.1111/j.1768-322x.1986.tb00458.x.
- [41] R. Argüello-García, M. Vega-Arnaud, I.J. Loredó-Rodríguez, A.M. Meija-Corona, E. Melgarejo-Trejo, E.A. Espinoza-Contreras, R. Fonseca-Liñán, A. González-Robles, N. Pérez-Hernández, M.G. Ortega-Pierres, Activity of Thioallyl Compounds For Garlic Against *Giardia duodenalis* Trophozoites and in Experimental Giardiasis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 8 (2018). doi:10.3389/fcimb.2018.00353.
- [42] F. Zahedifard, H. Lee, J.H. No, M. Salimi, N. Seyed, A. Asoodeh, S. Rafati, Anti-leishmanial activity of Brevinin 2R and its Lauric acid conjugate type against *L. major*: *In vitro* mechanism of actions and *in vivo* treatment potentials, *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 13 (2019). doi.org/10.1371/journal.pntd.0007217.
- [43] R.F.A. Zwaal, P. Comfurius, E.M. Bevers, Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 971–988. doi:10.1007/s00018-005-4527-3.
- [44] F. A. Marinho, K. C. S. Gonçalves, S. S. de Oliveira, A. C. D. C. de Oliveira, M. Bellio, C. M. d'Avila-Levy, A. L. S. dos Santos, M. H. Branquinha, Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 106 (2011) 507-509.

- [45] K.G. Jayanarayan, S. Dey, Altered tubulin dynamics, localization and post-translational modifications in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani* in response to paclitaxel, trifluralin and a combination of both and induction of apoptosis-like cell death, *Parasit.* 131 (2005) 215–230. doi:10.1017/S0031182005007687C.
- [46] C. Ferreira, D.C. Soares, C.B. Barreto-Junior, M.T. Nascimento, L. Freire-de-Lima, J.C. Delorenzi, M.E. Lima, G.C. Atella, E. Folly, T.M. Carvalho, E.M. Saraiva, L.H. Pinto-da-Silva, Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*, *Phytochem.* 17 (2011) 2155-2164.
- [47] F. Novais, B.T. Nguyen, P. Scott, Granzyme B inhibition by tofacitinib blocks pathology induced by CD8 T cells in cutaneous leishmaniasis, *J. Invest. Dermatol.* 141 (2021) 575–585. doi:10.1016/j.jid.2020.07.011.
- [48] A. Ponte-Sucre, F. Gamarro, J-C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21<sup>st</sup> century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017). doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0006052.
- [49] P. Machado, C. Araújo, A.T. da Silva, R.P. Almeida, A. D’Oliveira, A. Bittencourt, E.M. Carvalho, Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer, *Clin. Infect. Dis.* 34 (2002) 69–73. doi:10.1086/340526.
- [50] A. Unger, S. O’Neal, P.R.L. Machado, L.H. Guimarães, D.J. Morgan, A. Schriefer, O. Bacellar, M.J. Glesby, E.M. Carvalho, Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (2009) 574–579.
- [51] S.H. Carvalho, F. Frezard, N.P. Pereira, A.S. Moura, L.M.Q.C. Ramos, G.B. Carvalho, M.O.C. Rocha, American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment, *Trop. Med. Inter. Health.* 24 (2019) 380-391. doi:10.1111/tmi.13210.
- [52] E. Chatelain E, J-R Ioset, Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model, *Drug Des. Devl. Ther.* 5 (2011) 175–181. doi:10.2147/DDDT.S16381.



- [53] W. Souza, From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality, *Kinetoplastid Biol. Dis.* (2002).
- [54] S. Yasuhara, Y. Zhu, T. Matsui, N. Tipirneni, Y. Yasuhara, M. Kaneki, A. Rosenzweig, J.A.J Martyn, Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis, *J. Histochem. Cytochem.* 51 (2003) 873-885.
- [55] M. Kathuria, A. Bharracharjee, K.V. Sashidhara, S.P. Singh, K. Mitra, Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 5916–5928. doi:10.1128/AAC.02459-14.
- [56] J.H.S. Rodrigues, N. Miranda, H. Volpato, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway, *Parasitol. Res.* 118 (2019) 977–989.
- [57] M.C. Vendrametto, A.O. Santos, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho, D.A.G. Cortes, T. Ueda-Nakamura, Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*, *Parasit. Int.* 59 (2010) 154-158.
- [58] S. Dolai, S. Adak, Endoplasmic reticulum stress responses, *Mol. Biochem. Parasitol.* (2014) 1-8. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.09.002.
- [59] T.S. Tiunan, T. Ueda-Nakamura, D.A.G. Cortez, B.P. Dias Filho, J.A. Morgado-Díaz, W. Souza, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 176–82. doi:10.1128/AAC.49.11.176–182.2005.
- [60] S.O. Lorente, J.C.F. Rodrigues, C.J. Jiménez, M. Joyce-Menekse, C. Rodrigues, S.L. Croft, V. Yardley, K. Luca-Fradley, L.M. Ruiz-Pérez, J. Urbina,, W. Souza, D.G. Pacanowska, I.H. Gilbert, Novel Azasterols as Potential Agents for Treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2937-2950. doi:10.1128/AAC.48.8.2937–2950.2004.
- [61] P. Walter, D. Ron, The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation, *Sci.* 334 (2011) 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038.

- [62] R.S. Maag, S.W. Hicks, C.E. Machamer, Death from within: apoptosis and the secretory pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 456-461. doi:10.1016/S0955-0674(03)00075-9.
- [63] L. Kohl, K. Gull, Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton, *Mol. Biochem. Parasitol.* 93 (1998) 1-15. doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00014-0.
- [64] A. Woods, A.J. Baines, K. Gull, A high molecular mass phosphoprotein defined by a novel monoclonal antibody is closely associated with the intermicrotubule cross bridges in the *Trypanosoma brucei* cytoskeleton, *J. Cell. Sci.* 103 (1992) 665-675.
- [65] H. Field, M. Farjah, A. Pal, K. Gull, M.C. Field, Complexity of Trypanosomatid Endocytosis Pathways Revealed by Rab4 and Rab5 Isoforms in *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32102-32110.
- [66] F. Weise, Y.D. Stierhof, C. Kühn, M. Wiese, P. Overath, Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells, *J. Cell. Sci.* 113 (2000) 4587-4603.
- [67] D.J. Murphy, The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, *Prog. Lipid. Res.* 40 (2001) 325-438. doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00013-3.
- [68] D.B. Scariot, E.A. Britta, A.L. Moreira, H. Falzirolli, C.C. Silva, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone, *Front. Microbiol.* 8 (2017). doi:10.3389/fmicb.2017.00255.
- [69] C. Younce, P. Kolattukudy, MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Physiol. Biochem.* 30 (2012) 307–320. doi:10.1159/000339066.
- [70] J. Boren, K.M. Brindle. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation, *Cell. Death Differ.* 19 (2012) 1561-1570. doi:10.1038/cdd.2012.34.

- [71] K.B.F. Barbosa, N.M.B. Costa, R.C.G. Alfenas, S.O. de Paula, V.P.R. Minim, J. Bressan, Oxidative stress: concept, implications and modulating factors, *Rev. Nutr.* 23 (2010). doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013.
- [72] E. Cadenas, K.J. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 222-230. doi:10.1016/s0891-5849(00)00317-8.
- [73] M.C. Matínez, R. Andriantsitohaina, Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 669-702. doi:10.1089/ars.2007.1993.
- [74] A.L.A. Ferreira, L.S. Matsubara, Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43 (1997). doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014.
- [75] S-J. Lee, J. Zhang, A.M.K. Choi, H.P. Kim, Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2013). doi:10.1155/2013/327167.
- [76] A. Jiménez-Ruiz, J. F. Alzate, E.T. MacLeod, C.G.K. Lüder, N. Fasel, H. Hurd, Apoptotic markers in protozoan parasites, *Parasit. Vectors.* 3 (2010). doi:10.1186/1756-3305-3-104
- [77] R. Pamplona, Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity, *Biochim. Biophys. Acta.* 1777 (2008) 1249–1262. doi:10.1016/j.bbabi.2008.07.
- [78] J. Vamecq, A-F. Dessen, M. Fontaine, G. Briand, N. Porchet, N. Latruffe, P. Andreolotti, M. Cherkaoui-Malki, Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis, *Curr. Drug Metab.* 3 (2012) 1388-400. doi:10.2174/138920012803762792.
- [79] L. Mandelker, Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38 (2008) 1–30. dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005.

- [80] A.P Dantas, H.S. Barbosa, S.L. Castro, Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 35 (2003) 287–294.
- [81] C.M. Adade, G.S.F. Chagas, T. Souto-Padrón, *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit.* 139 (2012) 1444 –1461. [dx.doi.org/10.1017/S0031182012000790](https://doi.org/10.1017/S0031182012000790).
- [82] C. Guimarães, R. Linden, Programmed cell deaths: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1638 –1650. [dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x).
- [83] A. Debrabant, H. Nakhasi, Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 2 (2003). [dx.doi.org/10.1186/1475-9292-2-7](https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-7).
- [84] B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell.* 11 (2008) 27-42. [doi:10.1016/j.cell.2007.12.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018).
- [85] R. Kiffin, U. Bandyopadhyay, A.M. Cuervo, Oxidative stress and autophagy, *Antioxid. Redox Sig.* 8 (2006) 152-62. [doi:10.1089/ars.2006.8.152](https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.152).
- [86] A. Brennand, E. Rico, P.A. Michels, Autophagy in trypanosomatids. *Cells.* 1 (2012) 346–371. [doi:10.3390/cells1030346](https://doi.org/10.3390/cells1030346).
- [87] J. Yin, A.J.J. Ye, K.S.W. Tan, Autophagy is involved in starvation response and cell death in *Blastocystis*, *Microbiol.* 156 (2009) 665-677. [doi:10.1099/mic.0.033944-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.033944-0)
- [88] R.F. S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill, *Cell Death Dis.* (2019).
- [89] D.F.P. Neto, Estudo da atividade biológica de adutos de morita-baylissillman sobre *Trypanosoma cruzi*, *Fund. Osw. Cruz.* (2013) 90p.
- [90] K. Miranda, R. Docampo, O. Grillo, W. de Souza, Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist.* 155 (2004) 395- 405.

- [91] R. Docampo, W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, S.N.J. Moreno, Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 251-261.
- [92] R.F.S. Menna-Barreto, A. Henriques-Pons, A.V. Pinto, J.A. Morgado-Diaz, M.J. Soares, S.L.de Castro, Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles, *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005) 1034-1041.
- [93] A. Bera, S. Singh, R. Nagaraj, T. Vaidya, Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 127 (2003) 23-35.
- [94] T.V. Assche, M. Deschacht, R.A.I. da Luz, L. Maes, P. Cos, *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox Biology, *Free Rad. Bio. Med.* 51 (2011) 337-351.
- [95] T. Naderer, M.J. McConville, The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective, *Cell. Microbiol.* 10 (2008) 301-308.
- [96] L.A. Rosenthal, F. S. Sutterwala, M.E. Kehrl, D. M. Mosser, *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect. Immun.* 64 (1996) 2206-2215. doi: 10.1128/iai.64.6.2206-2215.1996.
- [97] K. Leifso, G. Cohen-Freue, N. Dogra, A. Murray, W. R. McMaster, Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol. Biochem Parasitol.* 156 (2007) 35-46. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.11.009