



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA BEATRIZ KAWANO BAKOSHI

**CARACTERIZAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELO ISOXAZOL 35-a SOBRE *Leishmania amazonensis***

Maringá

2022

AMANDA BEATRIZ KAWANO BAKOSHI

**CARACTERIZAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELO ISOXAZOL 35-a SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Lazarin-Bidóia

Coorientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maringá

2022

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

B168c

Bakoshi, Amanda Beatriz Kawano

Caracterização das vias de morte celular induzida pelo isoxazol 35-a sobre *Leishmania amazonensis* / Amanda Beatriz Kawano Bakoshi. -- Maringá, PR, 2022.
57 f.: il. color., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Lazarin-Bidóia.

Coorientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Leishmaniose. 2. Atividade antileishmania. 3. Estresse oxidativo. 4. Apoptose. 5. Morte celular. I. Lazarin-Bidóia, Danielle, orient. II. Nakamura, Celso Vataru, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572.8

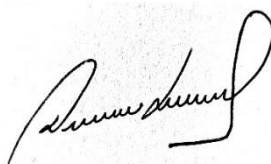
AMANDA BEATRIZ KAWANO BAKOSHI

**CARACTERIZAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELO ISOXAZOL 35-a SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 09/03/2022

COMISSÃO JULGADORA



Prof.ª Dr.ª Danielle Lazarin-Bidóia
Universidade Estadual de Maringá



Prof.ª Dr.ª Elizandra Aparecida Britta Stefano
Universidade Cesumar – UNICESUMAR



Prof. Dr. Hélio Volpato
Universidade Estadual do Paraná

BIOGRAFIA

Amanda Beatriz Kawano Bakoshi, nascida em Maringá-PR em 24/02/1998, é filha de Míriam Regina Kawano Bakoshi e Lúcio Rogério Nery Bakoshi. Concluiu ensino fundamental (2012) e médio (2015) no Colégio Nobel em Maringá. Graduou-se em Bioquímica-Bacharelado na Universidade Estadual de Maringá em 2020. Neste mesmo ano, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) na Universidade Estadual de Maringá. Atualmente, é membro do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (Bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá, onde desenvolve pesquisas que avaliam a atividade antiprotozoário de compostos sintéticos frente *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, além de possuir experiência nas áreas de bioquímica e biologia celular de parasitos, microscopia óptica e eletrônica e estudos *in vivo* em modelo animal de substâncias biologicamente ativas contra protozoários.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais, Míriam e Lúcio, e minha irmã Larissa, por todo suporte em todos os momentos da minha vida, por acreditarem em mim e apoiarem minhas decisões, e por toda demonstração de amor principalmente nos momentos em que mais preciso. Ao meu avô, Jorge, que me incentiva a ir cada vez mais longe em busca de minhas conquistas. Aos meus padrinhos, Márcia e Marconi, pelo apoio e por se mostrarem presentes também nesse período de mestrado.

Ao meu namorado, Victor Dias, pelo amor, incentivo e suporte nos momentos cruciais, por ser tão atencioso e buscar auxiliar em todos os momentos da melhor maneira possível.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Danielle Lazarin-Bidóia, pela orientação e conhecimentos transmitidos. A considero um exemplo de profissional, em quem me espelho e admiro enquanto cientista e pessoa. Agradeço pelo auxílio em incontáveis experimentos, por me apresentar a áreas incríveis da ciência, inclusive a microscopia, e também pela amizade construída.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, que é também um cientista que tenho como exemplo. Agradeço pela confiança e oportunidades concedidas, e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos de pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Tânia Ueda-Nakamura pela contribuição em minha formação acadêmica, desde o período de minha graduação.

À Rayanne Regina Beltrame Machado e Rodolfo Bento Balbinot, por todo auxílio em experimentos, desenvolvimento de protocolos, pela companhia até tarde, e pela amizade que vai além do laboratório.

À toda equipe do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, aos que estão presentes no grupo e aos que já passaram pelo laboratório, pelos ensinamentos transmitidos, discussões enriquecedoras e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade. Aos professores, pelos ensinamentos repassados. À Érica Nagasava, secretária do programa, que auxiliou em todas as questões que surgiram durante o mestrado, com excelência e prontidão.

Aos colegas e amigos de mestrado, que compartilharam momentos de troca de conhecimento e também de descontração, tornando os diversos trabalhos em grupo proveitosos, mesmo sendo realizados de maneira remota. Agradeço especialmente à Bárbara Nogueira, Natália Storck, Luis Yamashita e Eduardo Sabatine.

Aos meus amigos, pelo apoio, compreensão, por conversarem comigo sobre o mestrado e pelos momentos de alegria compartilhados nesse período. Agradeço especialmente à Bruna Momm, Diego Galdino França, Isabela Nagano, Priscila Takahashi, Erika Wakida, Juliane Barros e Leonardo Martins.

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo aporte financeiro.

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. O artigo descreve a avaliação da atividade e do mecanismo de ação de um composto sintético frente ao protozoário *Leishmania amazonensis*. O artigo científico será submetido na revista *PLOS Neglected Tropical Diseases* do grupo editorial *Public Library of Science* (Qualis CBI – A2).

RESUMO GERAL

Leishmaniose é uma doença endêmica em diversos países do mundo e que afeta milhões de pessoas, principalmente as populações de baixa renda. É considerada uma doença tropical negligenciada, com investimentos reduzidos em pesquisas e programas de controle da doença. Os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são limitados e de difícil administração, além de apresentarem alto custo e efeitos colaterais tóxicos no paciente. Sendo assim, a busca por novos compostos que possuem atividade antileishmania é necessária, almejando um tratamento mais eficaz e menos tóxico para pacientes com leishmaniose. Nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade do isoxazol **35-a** contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiproliferativa do composto **35-a** em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, bem como analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o isoxazol **35-a**. Ademais, os mecanismos de ação deste composto foram investigados, caracterizando as vias de morte celular induzidas por ele sobre *L. amazonensis*. O composto apresentou atividade seletiva contra amastigotas intracelulares. Análises de microscopia eletrônica e técnicas bioquímicas demonstraram que **35-a** provocou estresse oxidativo nos parasitos, refletido principalmente pelo aumento de espécies oxidantes nas células, despolarização mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos, aumento de vacúolos autofágicos, além de alterações na ultraestrutura e morfologia dos parasitos. Sendo assim, os resultados indicam que o isoxazol **35-a** perturba a homeostase redox em *L. amazonensis*, provocando no protozoário características de morte celular semelhante a apoptose e autofagia.

Palavras-chave: Leishmaniose; atividade antileishmania; estresse oxidativo; apoptose; morte celular.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease in several countries of the world and affects millions of people, mainly low-income populations. It is considered a neglected tropical disease, with reduced investments in research and disease control programs. The drugs available for the treatment of leishmaniasis are limited and difficult to administer, in addition to their high cost and toxic side effects on the patient. Therefore, the search for new compounds with antileishmanial activity is necessary, aiming for a more effective and less toxic treatment for patients with leishmaniasis. Our research group has demonstrated the activity of isoxazole **35-a** against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. In this context, the aim of this study was to evaluate the antiproliferative activity of the compound **35-a** in intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, as well as to analyze the morphological and ultrastructural changes in promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* treated with the isoxazole **35-a**. Furthermore, the mechanisms of action of this compound were investigated, characterizing the cell death pathways induced by it on *L. amazonensis*. The compound showed selective activity against intracellular amastigotes. Electron microscopy and biochemical analyzes demonstrated that **35-a** caused oxidative stress in parasites, mainly reflected by the increase of oxidant species in the cells, mitochondrial depolarization, lipid bodies accumulation, increase of autophagic vacuoles, besides alterations in the ultrastructure and morphology of the parasites. Therefore, the results indicate that isoxazole **35-a** disturbs the redox homeostasis in *L. amazonensis*, causing characteristics of apoptosis-like cell death and autophagy in the protozoan.

Keywords: Leishmaniasis; antileishmanial activity; oxidative stress; apoptosis; cell death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do composto 4-(((4-fluorfenil)amino)metil)-5-(4-nitrofenil)-3-[N'-(piridin-2-ilmetilene)hidrazinocarbonil]-isoxazol (**35-a**). 18
- Figura 2.** Microscopia óptica de macrófagos J774A.1 infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com **35-a** por 48 h. 28
- Figura 3.** Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura. Alterações morfológicas em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ 30
- Figura 4.** Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ 31
- Figura 5.** Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura. Alterações morfológicas em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 48 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ 32
- Figura 6.** Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Alterações ultraestruturais em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 48 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ 33
- Figura 7.** Espécies reativas de oxigênio em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando a sonda não fluorescente H_2DCFDA 34
- Figura 8.** Óxido nítrico em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando a sonda DAF-FM DA. 35
- Figura 9.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando marcação com Rh123. 36

Figura 10. Avaliação dos níveis de ATP intracelular em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$	37
Figura 11. Corpos lipídicos em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$, utilizando o corante vermelho do Nilo.	38
Figura 12. Volume celular de parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$	38
Figura 13. Avaliação da exposição de fosfatidilserina em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$, utilizando marcação com Anexina V-FITC e IP.	40
Figura 14. Avaliação da integridade de membrana celular em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$, utilizando marcação com IP.	41
Figura 15. Vacúolos autofágicos em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$, utilizando marcação com MDC.	43
Figura 16. Avaliação da vacúolos ácidos em parasitos de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 35-a por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times CI_{50}$, utilizando marcação com laranja de acridina.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade <i>in vitro</i> do isoxazol 35-a frente a <i>Leishmania amazonensis</i>	28
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCCP	Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitos
CO ₂	Dióxido de carbono
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DCF	2', 7'-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
H ₂ DCFDA	2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP	Iodeto de propídio
K ₄ [Fe (CN) ₆]	Ferrocianeto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
M	Molar
MDC	Monodansilcadaverina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NO	Óxido nítrico
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato-salino

pH	Potencial hidrogeniônico
Rh123	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute, 1640
SFB	Soro fetal bovino
U.A.	Unidades arbitrárias
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1	Reagentes.....	20
2.2	Cultivo de células	20
2.3	Substância	21
2.4	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do isoxazol 35-a em formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	21
2.5	Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
2.6	Avaliação das alterações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	22
2.7	Isolamento de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	22
2.8	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais.....	23
2.9	Detecção de óxido nítrico (NO).....	23
2.10	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	23
2.11	Avaliação dos níveis de ATP intracelular.....	24
2.12	Avaliação de corpos lipídicos.....	24
2.13	Avaliação do volume celular	24
2.14	Avaliação da exposição de fosfatidilserina	25
2.15	Avaliação da integridade de membrana celular	25
2.16	Avaliação de vacúolos autofágicos	25
2.17	Avaliação de compartimentos ácidos.....	26
2.18	Análise estatística.....	26
3	RESULTADOS	28

3.1	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do isoxazol 35-a em formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	28
3.2	Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29
3.3	Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
3.4	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais.....	34
3.5	Detecção de óxido nítrico (NO).....	35
3.6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	35
3.7	Avaliação dos níveis de ATP intracelular.....	36
3.8	Avaliação de corpos lipídicos.....	37
3.9	Avaliação do volume celular	38
3.10	Avaliação da exposição de fosfatidilserina	39
3.11	Avaliação da integridade de membrana celular	40
3.12	Avaliação de vacúolos autofágicos	41
3.13	Avaliação de compartimentos ácidos.....	44
4	DISCUSSÃO	46
5	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença que constitui um importante problema de saúde pública, sendo endêmica em mais de 98 países, com 12 a 15 milhões de casos de infecção e mais de 350 milhões de pessoas em risco de adquirir a doença. Estima-se ainda que ocorram 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, causando 70.000 mortes anualmente (REVEIZ *et al.*, 2013; SERENO *et al.*, 2007; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). O agente causador da doença é o protozoário do gênero *Leishmania*, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (GONTIJO; CARVALHO, 2003; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Em humanos, as formas clínicas da leishmaniose são amplamente categorizadas em: (1) leishmaniose visceral, a forma mais grave, na qual os parasitos deixam o local de inoculação e se proliferam no fígado, baço e medula óssea, resultando na imunossupressão e até a morte do hospedeiro, quando não tratada; e (2) leishmaniose tegumentar, em que os parasitos permanecem no local de infecção e causam úlceras localizadas, sendo que as formas variam de cutânea localizada (que causa lesões ulceradas na pele no local da picada do flebotomíneo), cutânea difusa (que causa múltiplas lesões não-ulceradas) e mucocutânea (a qual se desenvolve a partir da cutânea e causa inflamação destrutiva do tecido da mucosa) (PEACOCK *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; STOCKDALE; NEWTON, 2013).

As populações mais afetadas pela leishmaniose estão presentes em países da África, Ásia e da América Latina, sendo que a doença prevalece principalmente em regiões mais pobres, com falta de recursos, moradias precárias, sendo também relacionada à desnutrição e sistema imunológico enfraquecido (WHO, 2022). É considerada uma das doenças mais negligenciadas (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021), o que leva ao baixo interesse por parte de autoridades de saúde pública e profissionais que realizem pesquisas e programas voltados à prevenção e controle da doença (CAMARGO, 2008; REITHINGER *et al.*, 2007). Cerca de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 casos de leishmaniose cutânea são notificados anualmente; no entanto, baseando-se em avaliações de subnotificações, estima-se que há 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral a cada ano, que ocorrem principalmente na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, e 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea, com os principais casos encontrados no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2005; STOCKDALE; NEWTON, 2013). A leishmaniose cutânea é, portanto, a forma mais comum da doença, sendo a

L. amazonensis uma das espécies causadoras no Novo Mundo (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Os vetores da leishmaniose são flebotomíneos, insetos dípteros da família Psychodidae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo: países das Américas), e ao gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo: países da Europa, África e Ásia) (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Aproximadamente 30 espécies ou subespécies de flebotomíneos são vetores comprovados da doença, e mais de 20 espécies de *Leishmania* conhecidas por infectar humanos são transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (BATES, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007). Sendo assim, a transmissão da leishmaniose ocorre com o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado, podendo também ocorrer através de agulhas e seringas contaminadas, transfusão, disseminação transplacentária e transplante de órgãos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; MURRAY *et al.*, 2005).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em insetos vetores e hospedeiros vertebrados, que compreendem os seres humanos e outros mamíferos, como roedores, marsupiais e canídeos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GONTIJO; CARVALHO, 2003). As duas formas evolutivas no ciclo de vida do protozoário são: a promastigota, forma alongada, extracelular e flagelada, encontrada no inseto vetor, e a amastigota, forma arredondada, intracelular, com um flagelo que praticamente não se estende além do corpo celular, presente em células fagocitárias do hospedeiro vertebrado (SANTOS *et al.*, 2008; SUNTER, *et al.*, 2019).

O ciclo de transmissão ocorre quando a fêmea do flebotomíneo ingere formas amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado. As condições presentes no intestino do inseto, onde há uma diminuição da temperatura e aumento no pH, desencadeiam o desenvolvimento do parasito no vetor, e as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, passando pela metaciclogênese, alterando-se para a forma metacíclica infectante. Com um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo transfere estes parasitos ao hospedeiro, e assim as formas promastigotas são fagocitadas por células fagocitárias como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, se diferenciando em formas amastigotas. O ciclo continua quando há uma nova ingestão de amastigotas por flebotomíneo fêmea (BATES, 2007; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; MUSKUS; MARÍN, 2002).

O tratamento de pacientes acometidos com a leishmaniose é baseado nos antimoniais pentavalentes antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, conhecidos como fármacos de primeira linha, e também nos medicamentos de segunda linha, anfotericina B,

pentamidina e miltefosina. No entanto, esses fármacos são considerados limitados, além de apresentarem alta toxicidade, eficácia variável, alto custo, sendo ainda um tratamento invasivo, com longos períodos de administração intramuscular ou intravenosa, levando muitas vezes à desistência do tratamento pelos pacientes; portanto, a busca por novas alternativas ao tratamento atual se faz necessária (CROFT; COOMBS, 2003; MURRAY *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008).

Isoxazóis são compostos heterocíclicos que contêm átomos de oxigênio e nitrogênio nas posições 1 e 2. São compostos amplamente utilizados na área farmacêutica, uma vez que possuem propriedades inseticidas, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (KUMAR; JAYAROOPA, 2013). Além disso, a atividade antileishmania dessa classe de compostos já foi relatada (DA ROSA *et al.*, 2017; SURYAWANSHI *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa realizou um *screening* de diversos compostos contendo núcleo isoxazol com potencial atividade antileishmania, e os resultados demonstraram que o composto sintético 4-[(4-fluorfenil)amino]metil]-5-(4-nitrofenil)-3-[N'-(piridin-2-ilmetilene)hidrazinecarbonil]-isoxazol (**35-a**) (Figura 1) é eficaz contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando um valor de concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) de 12,7 µM. Além disso, o isoxazol **35-a** apresentou baixa citotoxicidade frente a macrófagos J774A.1 e fibroblasto L929, com valores de concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) de 196,1 e 232,1 µM, respectivamente.. Desta forma, estes resultados demonstram que o composto **35-a** é mais seletivo para o parasito do que para as células de mamíferos.

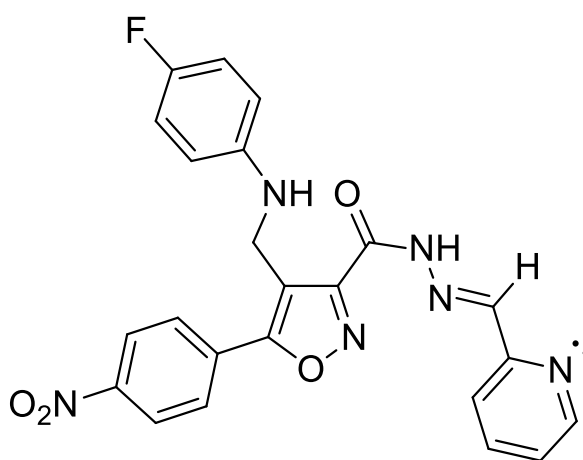


Figura 1. Estrutura química do composto 4-[(4-fluorfenil)amino]metil]-5-(4-nitrofenil)-3-[N'-(piridin-2-ilmetilene)hidrazinecarbonil]-isoxazol (**35-a**).

Considerando, então, que a leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e que o tratamento disponível é limitado e insatisfatório, a necessidade de se buscar novos compostos que possuem atividade antileishmania é claramente justificada, a fim de melhorar a eficácia do tratamento. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar as principais alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o isoxazol **35-a**, bem como avaliar os mecanismos de ação de **35-a** de modo a identificar as vias de morte celular induzidas pelo composto sobre *L. amazonensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Ácido fólico, carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP), cianeto de potássio (KCN), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), hemina, miltefosina, monodansilcadaverina (MDC), rodamina 123 (Rh123), wortmanina e 9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona (vermelho do Nilo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anexina V-FITC, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) e iodeto de propídio (IP) foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (NY, EUA). Acetato de uranila, cacodilato de sódio, citrato de chumbo, ferrocianeto de potássio, glutaraldeído, resina Polybed® 812 e tetróxido de ósmio foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (EMS - Hatfield, EUA). Kit de viabilidade celular luminescente CellTiter-GLO foi obtido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Cultivo de células

Foi utilizada a cepa de *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). Formas promastigotas foram mantidas em garrafas para cultura de células de 25 cm² contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco”, acrescido de hemina e ácido fólico – 50 mg mL⁻¹) pH 7,4, suplementado com 10% de SFB (inativado a 56 °C, pH 7,4), e incubadas a 25 °C. Para os experimentos com formas promastigotas, estas foram utilizadas na concentração de (1×10⁶ parasitos mL⁻¹), na fase exponencial de crescimento (48 h).

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⁻¹ de penicilina e 5 mg mL⁻¹ de estreptomicina a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e tensão de 5% de dióxido de carbono (CO₂). Amastigotas intracelulares foram obtidas de macrófagos J774A.1 infectados com promastigotas e cultivados nas mesmas condições que foram estabelecidas para macrófagos, mas a 34 °C.

2.3 Substância

A síntese do isoxazol **35-a** foi realizado pela equipe da Prof.^a Dr.^a Fernanda Andreia Rosa, do Grupo de pesquisa em Estereoquímica de Compostos Orgânicos e Docking Molecular (ECO-DM) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

As soluções estoques de **35-a** foram preparadas assepticamente em DMSO e diluídas em meio de cultura, de forma que a concentração de DMSO não excedesse 1% (v/v) nos experimentos.

2.4 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do isoxazol 35-a em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Para avaliação da eficácia de **35-a** sobre formas amastigotas intracelulares, promastigotas metacíclicas (5×10^6 parasitos mL⁻¹) e macrófagos J774A.1 (5×10^5 células mL⁻¹) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram dispensados em lamínulas de vidro redondas, dispostas em cada poço da placa de 24 poços por um período de 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 34 °C. Após a interação entre macrófagos e parasitos, o composto **35-a** foi adicionado em diferentes concentrações (0,1, 1, 5, 10, 50, 100 µM) e incubados em estufa de 5% CO₂ a 34 °C por 48 h. Após o tratamento, as lamínulas foram fixadas com metanol por 20 min, coradas com solução de Giemsa 10% e montadas sobre lâmina de vidro com meio de montagem Permount®. A visualização de pelo menos 100 células foi realizada em microscópio óptico comum e o índice de sobrevivência estabelecido multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófago (MIRANDA *et al.*, 2017). O valor de CI₅₀ foi determinado por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos.

2.5 Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise das alterações morfológicas por MEV, promastigotas (1×10^6 parasitos mL⁻¹) foram tratadas com concentrações correspondentes ao CI₅₀ e $2 \times$ CI₅₀ do composto **35-a** por 72 h a 25 °C. Para visualização de amastigotas intracelulares, macrófagos J774A.1 (5×10^5 células mL⁻¹) infectados com promastigotas (5×10^6 parasitos mL⁻¹) foram tratados com CI₅₀ e

2×CI₅₀ de **35-a** por 48 h a 34 °C. Após, as células foram lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) e fixadas por imersão em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 24 h. Em seguida, os parasitos foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e, no caso das promastigotas, aderidas em suporte (lamínula) com poli-L-lisina por 1 h. Depois, os parasitos foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e desidratados em concentrações crescentes de etanol (30-100%). Os parasitos foram então submetidos ao ponto crítico por meio da substituição de etanol por CO₂, metalizados com ouro e visualizados em microscópio eletrônico de duplo-feixe FEI Scios (SCARIOT *et al.*, 2019).

2.6 Avaliação das alterações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise das alterações ultraestruturais por MET, promastigotas (1×10⁶ parasitos mL⁻¹) foram tratadas com concentrações correspondentes ao CI₅₀ e 2×CI₅₀ do composto **35-a** por 72 h a 25 °C. Para visualização de amastigotas intracelulares, macrófagos J774A.1 (5×10⁵ células mL⁻¹) infectados com promastigotas (5×10⁶ parasitos mL⁻¹) foram tratados com CI₅₀ e 2×CI₅₀ de **35-a** por 48 h a 34 °C. Depois, as células foram fixadas por imersão em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 24 h. Em seguida, os parasitos foram pós-fixados uma solução de 1% de OsO₄, 0,8% de K₄[Fe(CN)₆] e 10 mM CaCl₂ em 0,1 M de tampão cacodilato, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30-100%), incluídos em resina epóxi (Polybed® 812) e polimerizados em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo, inseridos em grade de cobre, contrastados com acetato de uranila durante 20 min e citrato de chumbo por 10 min, e por fim visualizados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (PAULA *et al.*, 2020).

2.7 Isolamento de amastigotas de *L. amazonensis*

Inicialmente, macrófagos J774A.1 foram infectados com promastigotas (10 parasitos por célula hospedeira) e incubados a 34 °C por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos infectados foram tratados com **35-a** e incubados por 24 h. Após o período de tratamento, com o auxílio de um *cell-scrafer*, os macrófagos infectados foram removidos, aspirados com uma seringa e dispensados sob pressão através de uma agulha de calibre 30 para lisar as células. Macrófagos e amastigotas foram separados por centrifugação diferencial

(1.000 rpm por 1 min; 5000 rpm por 5 min), o sobrenadante foi coletado e lavado em PBS e as amastigotas foram submetidas a diferentes ensaios para avaliação do mecanismo de ação de **35-a** (RODRIGUES *et al.*, 2019).

2.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com o marcador H_2DCFDA (10 μM) por 45 min. H_2DCFDA é permeável à célula, e com a clivagem por esterases intracelulares e oxidação por ERO, a sonda não fluorescente H_2DCFDA é convertida ao produto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a $\lambda_{ex} = 488$ nm e $\lambda_{em} = 530$ nm (GARCIA *et al.*, 2013). Adicionalmente, o aumento de ERO foi observado em microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus®), e as imagens foram capturadas em uma câmera UC30 (Olympus®). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 50 μM foi utilizado como controle positivo.

2.9 Detecção de óxido nítrico (NO)

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com o marcador DAF-FM DA (1 μM) por 30 min. DAF-FM DA é permeável à célula e é hidrolisado à DAF-FM por esterases intracelulares, reage com NO e forma um composto triazol que emite fluorescência (KOJIMA *et al.*, 1999). Depois, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS, e incubados por 15 min. A fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a $\lambda_{ex} = 495$ nm e $\lambda_{em} = 515$ nm (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016). H_2O_2 (50 μM) foi utilizado como controle positivo.

2.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com a sonda fluorescente que se acumula na mitocôndria, Rh123 (5 $\mu g mL^{-1}$) por 15 min a 37 °C. Os parasitos foram lavados

duas vezes e ressuspensos em solução salina 0,9%, e incubados por mais 30 min a 37 °C. A aquisição de dados e análises foram realizadas 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 foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. O desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial CCCP (100 µM) foi utilizado como controle positivo (PAULA *et al.*, 2020).

2.11 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram lavadas e ressuspensas em PBS. Em placas brancas de 96 poços, foram adicionados 50 µL de amostra e 50 µL do kit CellTiter-Glo e incubados no escuro por 10 min (GARCIA *et al.*, 2013). A luminescência foi determinada utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® L; Molecular Devices, EUA). KCN (200 µM) foi utilizado como controle positivo.

2.12 Avaliação de corpos lipídicos

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com vermelho do Nilo ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), um marcador lipofílico que se associa a moléculas lipídicas neutras, por 30 min. A fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ (VOLPATO *et al.*, 2015). H_2O_2 (50 µM) foi utilizado como controle positivo.

2.13 Avaliação do volume celular

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram lavadas e ressuspensas em PBS. A aquisição de dados e análises foram realizadas em 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. Miltefosina (40 μM) foi utilizada como controle positivo (VOLPATO *et al.*, 2018).

2.14 Avaliação da exposição de fosfatidilserina

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com 5 μL de Anexina V- FITC em 100 μL de tampão de ligação (NaCl 140 mM, CaCl_2 5 mM, HEPES-Na 10 mM, pH 7,4) por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação e IP (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A aquisição de dados e análises foram realizadas imediatamente após a marcação 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 foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Células marcadas com anexina-V (IP positivo ou negativo) foram consideradas apoptóticas, e células positivas somente para IP foram consideradas necróticas. Miltefosina (40 μM) foi utilizada como controle positivo (JIMENEZ *et al.*, 2008; STEFANELLO *et al.*, 2014).

2.15 Avaliação da integridade de membrana celular

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas no escuro com IP (2 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) por 5 min. A ruptura da membrana da célula permite a entrada de IP e sua ligação com os ácidos nucleicos. A aquisição de dados e análises foram realizadas 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 foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Digitonina (40 μM) foi utilizada como controle positivo (SCARIOT *et al.*, 2017).

2.16 Avaliação de vacúolos autofágicos

Promastigotas e amastigotas intracelulares foram tratadas com CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente. Após o período de tratamento, as células foram

incubadas no escuro com o marcador fluorescente MDC (0,05 mM) por 1 h a 37 °C. MDC se acumula em vacúolos autofágicos por aprisionamento de íons e interação com os lipídios da membrana destes vacúolos (NIEMANN; TAKATSUKI; ELSÄSSER, 2000). Todos os tratamentos também foram avaliados com wortmanina (1 µM), um potente inibidor da fosfatidilinositol 3-kinase (PI3-K), uma família de enzimas que são reguladoras da autofagia (GUIMARÃES; LINDEN, 2004; MENNA-BARRETO, 2019). Após o período de incubação, os parasitos foram lavados em PBS e a fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 525$ nm. Adicionalmente, o acúmulo de vacúolos autofágicos foi observado em microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus®), e as imagens foram capturadas em uma câmera UC30 (Olympus®). Para o controle positivo, os parasitos foram submetidos a estresse por escassez nutricional, diluindo o meio de cultura em PBS (SCARIOT *et al.*, 2019).

2.17 Avaliação de compartimentos ácidos

Promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a** por 24 h a 25 e 34 °C, respectivamente, foram incubadas com laranja de acridina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS. Laranja de acridina na forma de monômero emite fluorescência verde, mas quando acumulado em vesículas ácidas - ambientes de baixo pH - as moléculas de laranja de acridina são protonadas, e a carga elétrica dificulta a saída do marcador para o citoplasma, formando dímeros emitindo fluorescência vermelha (PIERZYNSKA-MACH; JANOWSKI; DOBRUCKI, 2014). A aquisição de dados e análises foram realizadas 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 foi adquirido 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 (THOMÉ *et al.*, 2016). H_2O_2 (50 µM) foi utilizado como controle positivo.

2.18 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas pelo software Prism 8.0.1

(GraphPad, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do isoxazol 35-a em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

O isoxazol **35-a** exibiu forte atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, com valor de CI_{50} de $0,96 \mu\text{M}$ (Tabela 1, Fig. 2). O *screening* de compostos contendo núcleo isoxazol realizado previamente mostrou valores de CC_{50} de $196,1 \mu\text{M}$ frente a macrófagos J774A.1 e de $232,1 \mu\text{M}$ frente a fibroblastos L929 quando tratados com **35-a**. Desta forma, comparou-se os efeitos citotóxicos sobre estas células e a atividade contra amastigotas por meio do índice de seletividade (IS), que foi calculado pela razão CC_{50}/CI_{50} ; os valores obtidos foram de 204,27 para macrófagos e de 241,77 para fibroblastos, o que indica que o composto **35-a** é mais seletivo contra amastigotas intracelulares do que contra células de mamífero.

Tabela 1. Atividade *in vitro* do isoxazol **35-a** frente a *Leishmania amazonensis*.

	Amastigotas $CI_{50}/48 \text{ h}$	Citotoxicidade Macrófagos J774A.1 $CC_{50}/48 \text{ h}$	IS	Citotoxicidade Fibroblastos L929 $CC_{50}/48 \text{ h}$	IS
35-a	$0,96 \pm 0,028$	$196,1 \pm 8,3$	204,27	$232,1 \pm 6,2$	241,77

Os resultados foram expressos em μM , média \pm desvio padrão. O índice de seletividade (IS) foi obtido pela equação: $IS=CC_{50}/CI_{50}$.

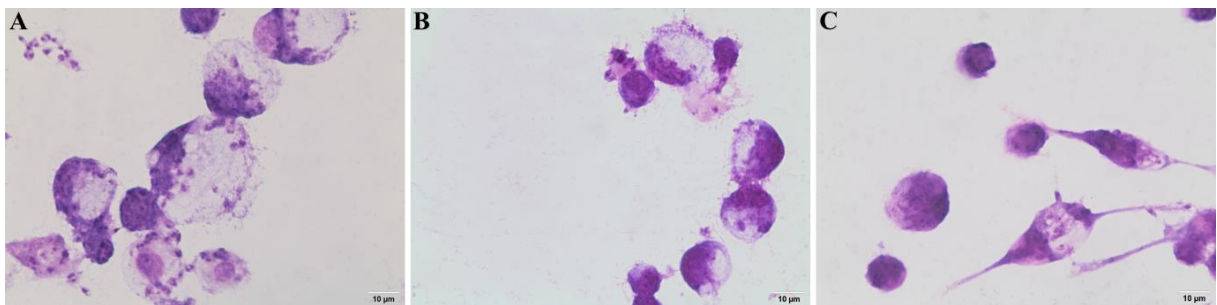


Figura 2. Microscopia óptica de macrófagos J774A.1 infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com **35-a** por 48 h. Células não tratadas (A). Células tratadas com $1 \mu\text{M}$ (B) e $0,1 \mu\text{M}$ (C) de **35-a**. Barras: $10 \mu\text{m}$.

3.2 Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Após avaliar a atividade do composto **35-a** em *L. amazonensis*, foram investigadas as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pelo tratamento. A Figura 3 mostra a morfologia de promastigotas de *L. amazonensis* na presença ou ausência de **35-a**. As fotomicrografias obtidas por MEV mostram promastigotas não tratadas com características celulares típicas, como corpo alongado e flagelo terminal (Fig. 3A-B). Estas características morfológicas foram alteradas em promastigotas tratadas, as quais apresentaram redução e arredondamento do corpo celular, perda de conteúdo celular na região do flagelo e alterações na superfície celular (Fig. 3C- F). A Figura 4 mostra a ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis* na presença ou ausência do composto **35-a**. As fotomicrografias obtidas por MET mostraram promastigotas não tratadas com ultraestrutura normal (Fig. 4A-B). Em contraste, o composto causou alterações ultraestruturais significantes em promastigotas, que apresentaram inchaço mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos e alterações no núcleo, como desorganização e rompimento da membrana nuclear (Fig. 4C- F).

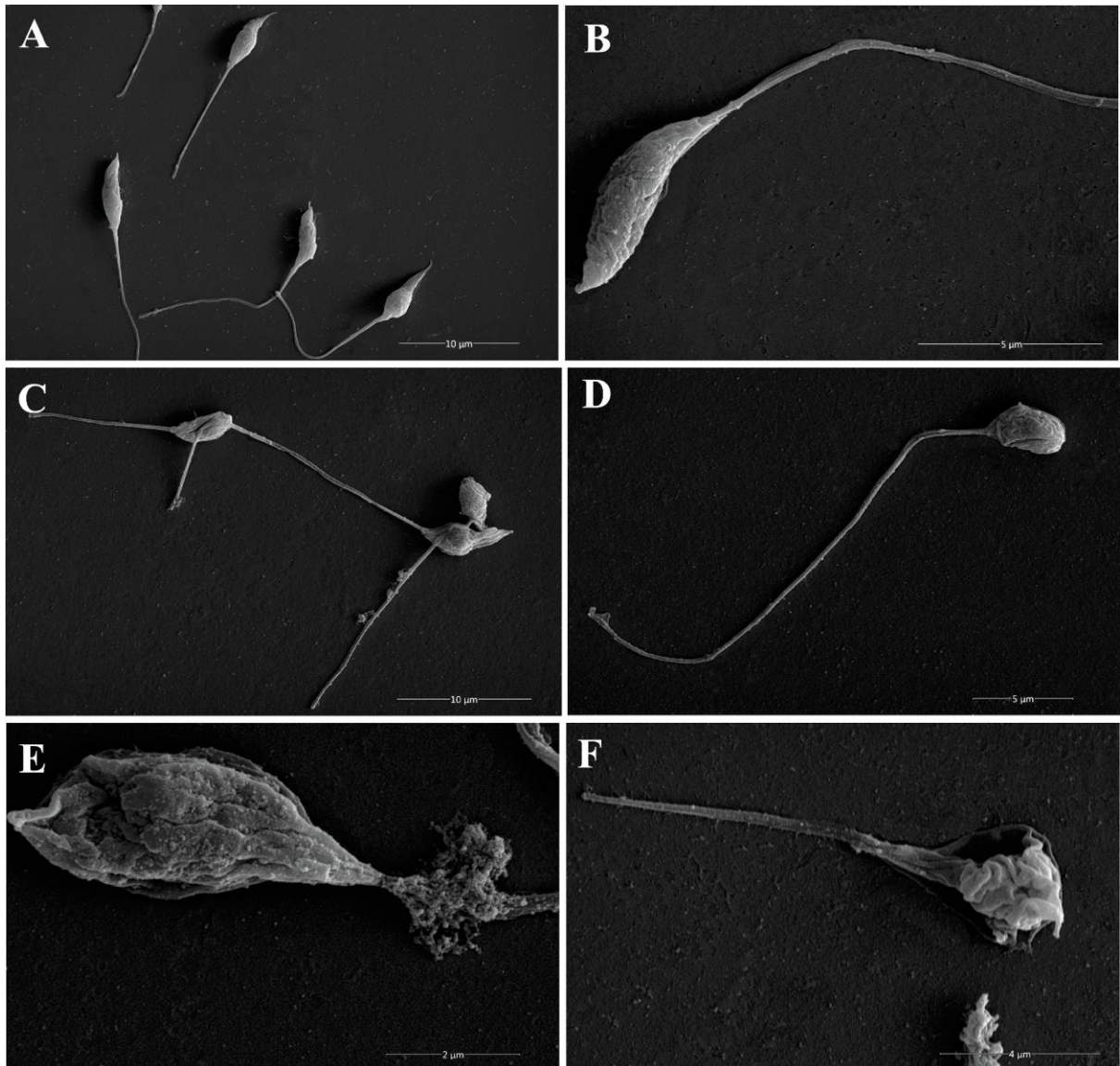


Figura 3. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura. Alterações morfológicas em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. Promastigotas não tratadas mostrando morfologia normal (A, B). Promastigotas tratadas com $12,7 \mu M$ de **35-a**, mostrando redução e arredondamento do corpo celular, extravasamento de conteúdo celular na região do flagelo e alterações na superfície celular (C-E). Promastigotas tratadas com $25,4 \mu M$ de **35-a**, mostrando redução e arredondamento do corpo celular, perda de conteúdo celular e alterações na superfície celular (F). Barras: $10 \mu m$ (A, C), $5 \mu m$ (B, D), $2 \mu m$ (E), $4 \mu m$ (F).

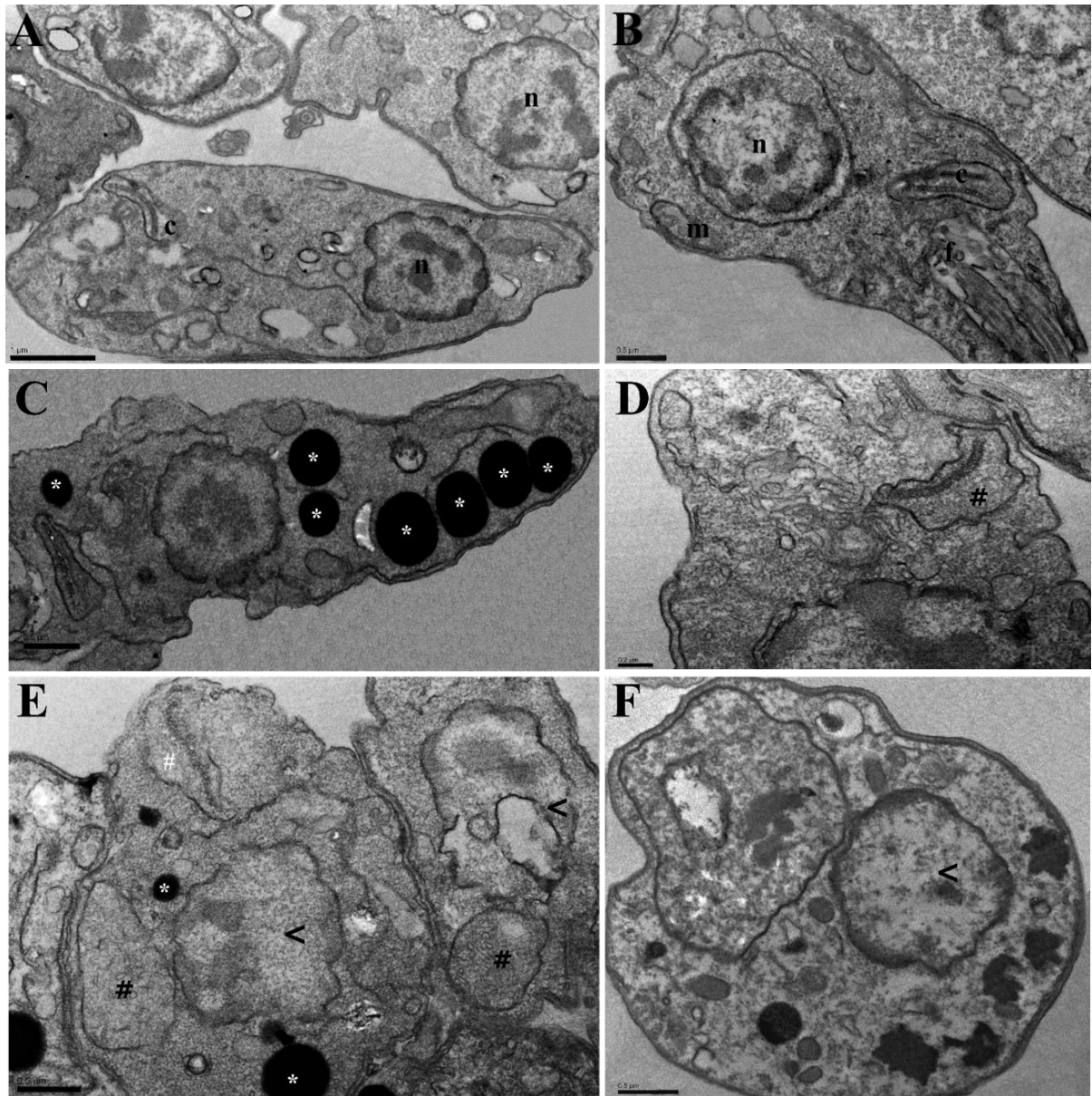


Figura 4. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 72 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. Promastigotas não tratadas com estruturas celulares típicas (c: Cinetoplasto; f: Flagelo; n: Núcleo; m: Mitocôndria) (A, B). Promastigotas tratadas com $12,7 \mu M$ de **35-a**, mostrando acúmulo de corpos lipídicos (*), inchaço mitocondrial (#) e alterações no núcleo (<) (C-E). Promastigotas tratadas com $25,4 \mu M$ de **35-a**, mostrando alterações no núcleo (F). Barras: $1 \mu m$ (A), $0,5 \mu m$ (B, C, E, F), $0,2 \mu m$ (D).

3.3 Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas de *L. amazonensis*

Por meio das fotomicrografias obtidas por MEV, foi possível observar amastigotas com morfologia típica, e que o tratamento com **35-a** provocou redução no número de

amastigotas intracelulares (Fig. 5). Por MET, observou-se amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo dos macrófagos, e verificou-se que, após o tratamento com **35-a**, ocorreram alterações como aumento de vacúolos autofágicos e acúmulo de corpos lipídicos nos parasitos (Fig. 6).

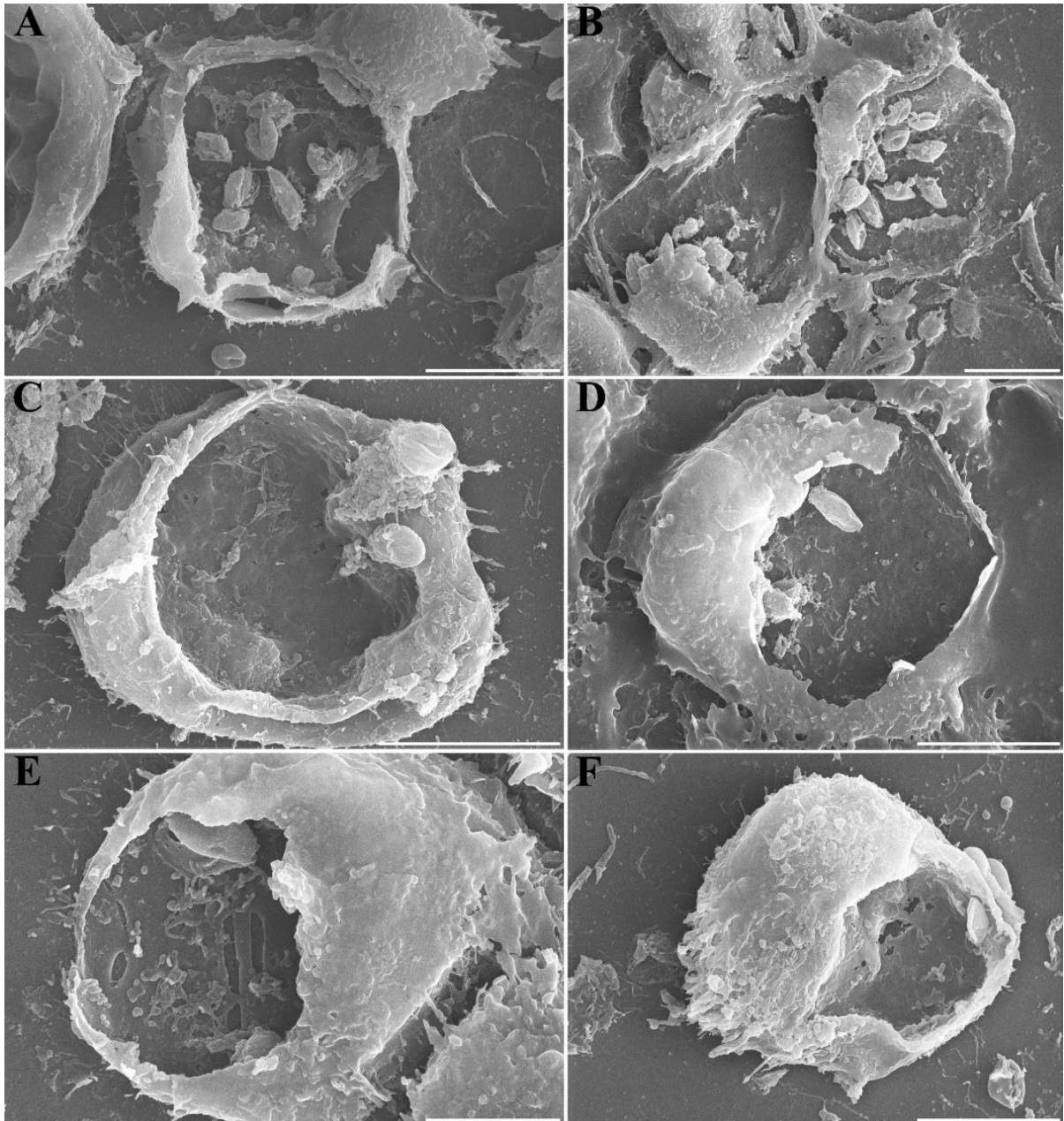


Figura 5. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura. Alterações morfológicas em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 48 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. Amastigotas não tratadas mostrando morfologia normal (A, B). Amastigotas tratadas com $0,96 \mu\text{M}$ de **35-a** (C-E). Amastigotas tratadas com $1,92 \mu\text{M}$ de **35-a** (F). Barras: $10 \mu\text{m}$ (A-D, F), $5 \mu\text{m}$ (E).

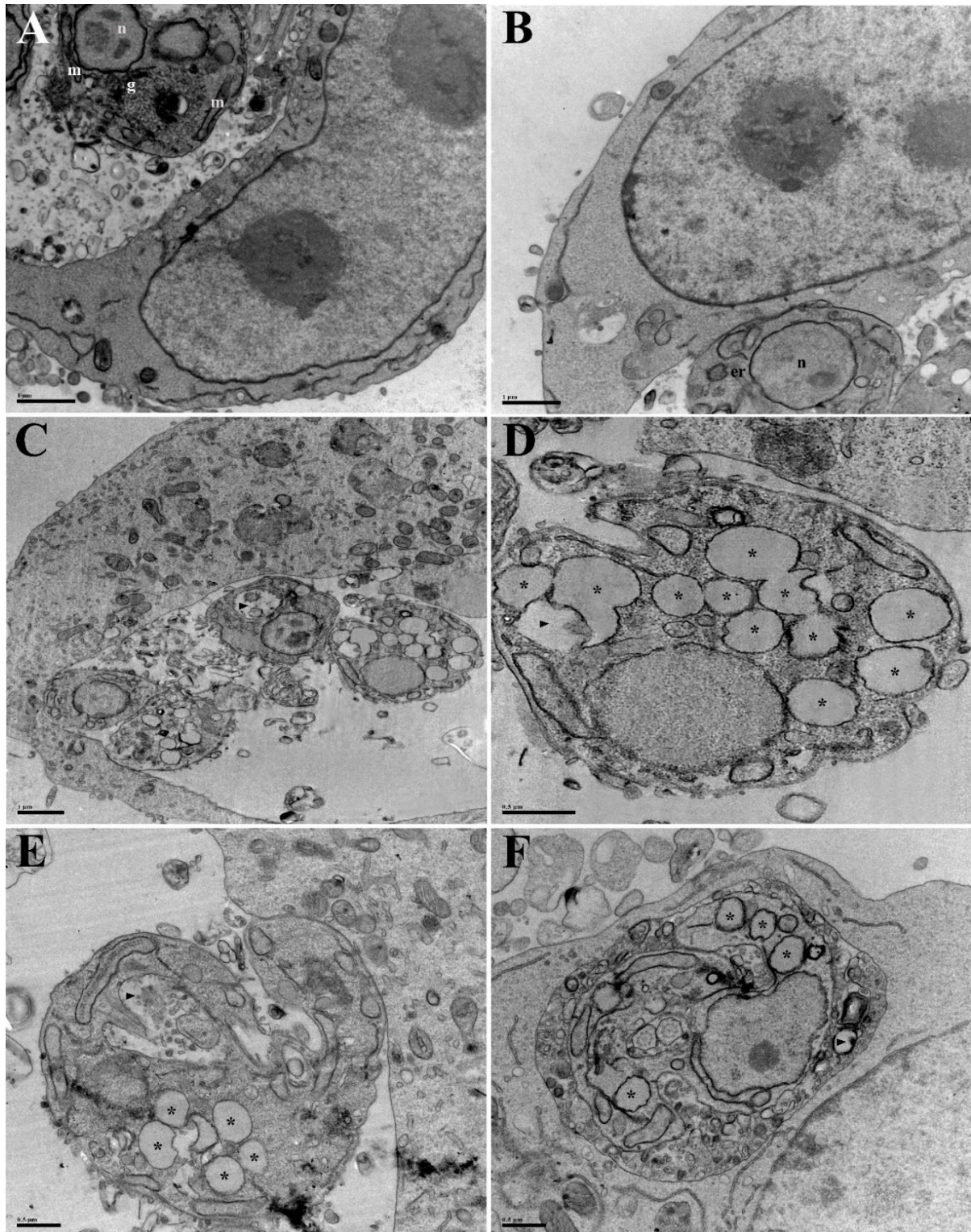


Figura 6. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Alterações ultraestruturais em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* tratadas com **35-a** por 48 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. Amastigotas não tratadas com estruturas celulares típicas (er: Retículo endoplasmático; g: Complexo de Golgi; n: Núcleo; m: Mitocôndria) (A, B). Amastigotas tratadas com $0,96 \mu M$ de **35-a**, mostrando acúmulo de corpos lipídicos (*) e aumento de vacúolos autofágicos (▴) (C-E). Amastigotas tratadas com $1,92 \mu M$ de **35-a**, mostrando acúmulo de corpos lipídicos (*) e aumento de vacúolos autofágicos (▴) (F). Barras: $1 \mu m$ (A-C), $0,5 \mu m$ (D- F).

3.4 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

O conteúdo de ERO foi avaliado por microscopia de fluorescência e fluorimetria, utilizando o marcador não fluorescente H₂DCFDA. O tratamento com **35-a** levou a um aumento significativo de ERO totais em promastigotas (Fig. 7A) e amastigotas (Fig. 7A') em comparação com o grupo controle. Em promastigotas, esse aumento foi de 168% quando tratadas com CI₅₀ e 319% quando tratadas com 2×CI₅₀ de **35-a** (Fig. 7B). Em amastigotas, o aumento foi de 402% e 475% quando tratadas com CI₅₀ e 2×CI₅₀ de **35-a**, respectivamente (Fig. 7B'). H₂O₂ também causou aumento de ERO totais nas células em 220% e 180%, em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

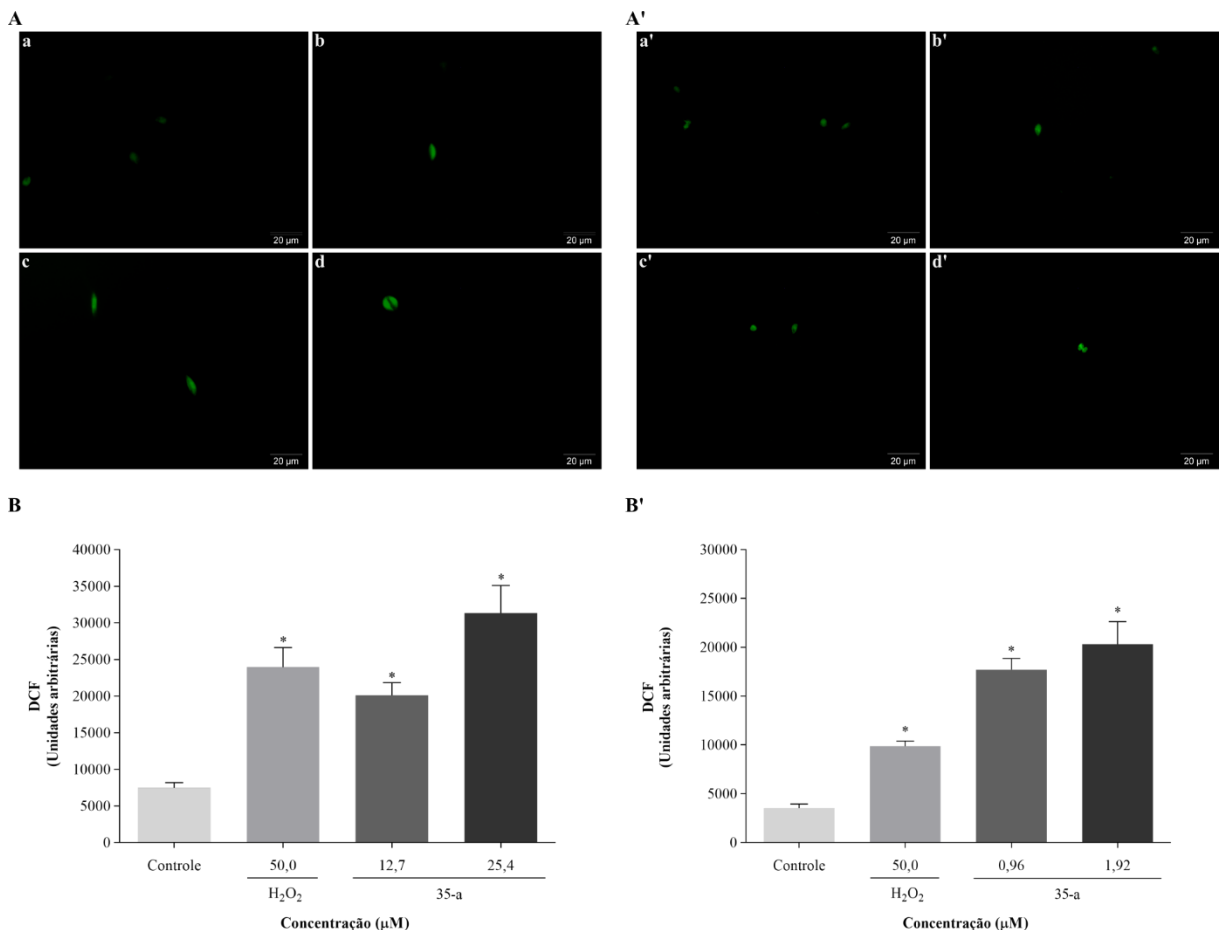


Figura 7. Espécies reativas de oxigênio em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI₅₀ e 2×CI₅₀, utilizando a sonda não fluorescente H₂DCFDA. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Imagens de microscopia de fluorescência: (a, a') parasitos não tratados, (b, b') parasitos tratados com 50 μM de H₂O₂, (c, c') parasitos tratados com CI₅₀ de **35-a**, (d, d') parasitos tratados com 2×CI₅₀ de **35-a**. Barras: 20 μm. (B, B') Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria. **P* < 0,05 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.5 Detecção de óxido nítrico (NO)

Como foi observado um aumento de ERO totais nos parasitos após o tratamento com **35-a**, foi avaliado o conteúdo de NO por meio do marcador DAF-FM DA, a fim de investigar se o composto também causaria aumento de espécies reativas de nitrogênio (ERN). O tratamento com **35-a** promoveu um aumento expressivo nos níveis de NO em promastigotas, de 4,5 vezes quando tratadas com CI_{50} e de 4,8 vezes quando tratadas com $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, comparado ao grupo controle (Fig. 8A). O aumento de NO ocorreu também em amastigotas tratadas, o qual foi de 1,4 vez e 1,5 vez com o tratamento com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, respectivamente (Fig. 8B). Do mesmo modo, H_2O_2 desencadeou aumento dos níveis de NO nas células de 7,1 vezes e 1,5 vez em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

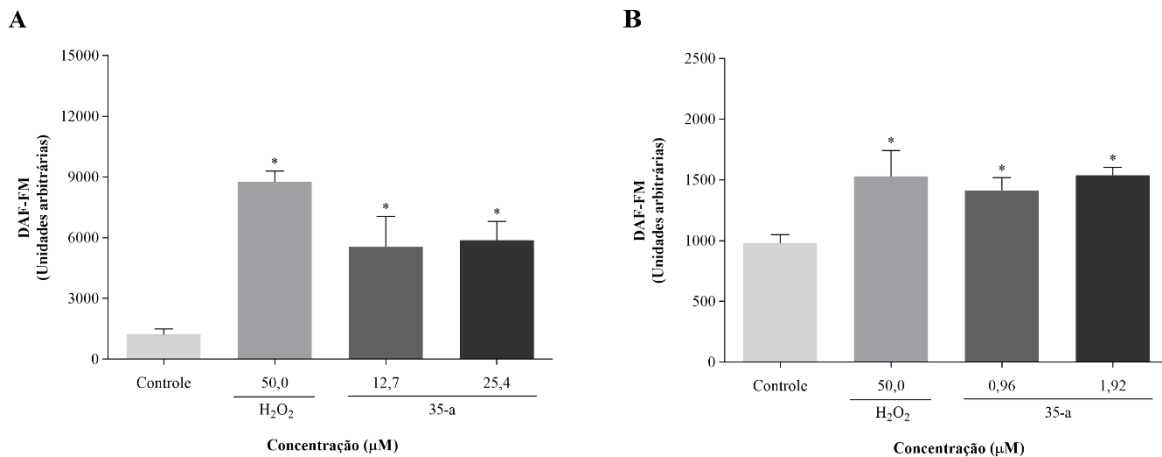


Figura 8. Óxido nítrico em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando a sonda DAF-FM DA. (A) promastigotas; (B) amastigotas. H_2O_2 (50 μM) foi utilizado como controle positivo. $*P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O $\Delta\Psi_m$ foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o marcador Rh123. Os histogramas mostram que os tratamentos provocaram uma diminuição na intensidade de fluorescência total de Rh123, tanto em promastigotas (Fig. 9A), quanto em amastigotas (Fig. 9A), indicando despolarização mitocondrial. Essa diminuição foi de 30% e 41% para promastigotas tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, respectivamente (Fig. 9B). Já em amastigotas, a redução do $\Delta\Psi_m$ foi de 71% e 70% quando tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a**,

respectivamente (Fig. 9B'). CCCP também causou despolarização mitocondrial, induzindo uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ de 52% em promastigotas e 63% em amastigotas.

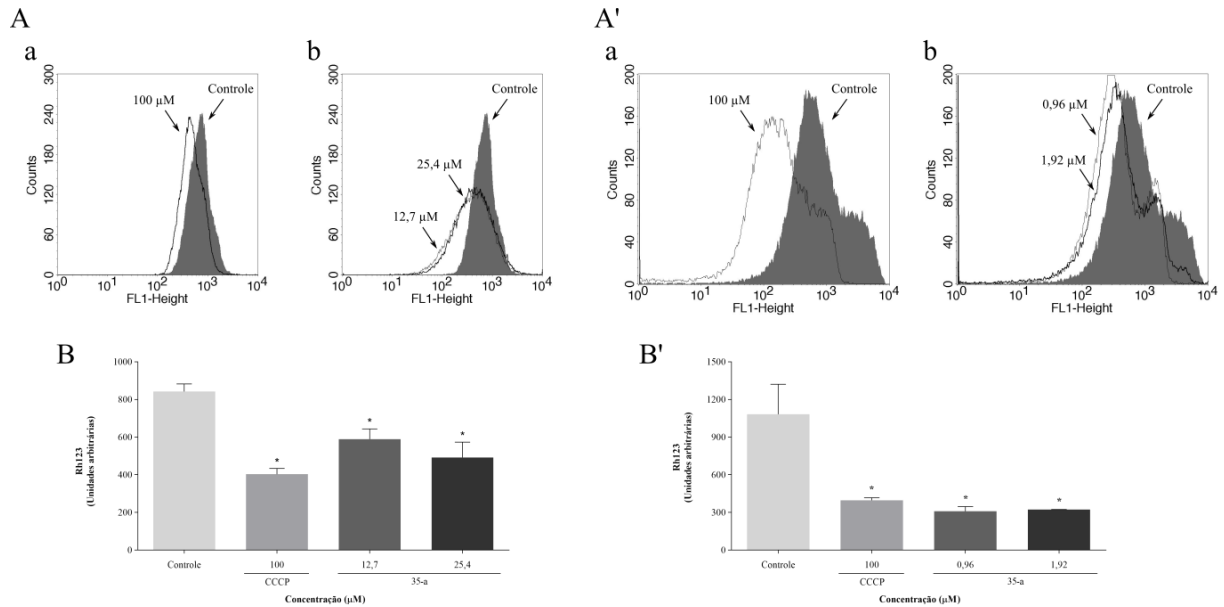


Figura 9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$, utilizando marcação com Rh123. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Histogramas: (a) parasitos tratados com 100 μM de CCCP, (b) parasitos tratados com CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ de **35-a**. (B, B') Intensidade da fluorescência. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.7 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

O kit CellTiter-Glo foi utilizado para quantificar ATP. Promastigotas tratadas com CI_{50} de **35-a** apresentaram um aumento significativo de ATP intracelular de 35%, mas uma diminuição de 40% quando tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ (Fig. 10A). Já em amastigotas, o tratamento com **35-a** causou uma diminuição nos níveis de ATP intracelular de 83% e 86% com CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$, respectivamente, em relação ao controle negativo (Fig. 10B). KCN, inibidor do complexo citocromo-oxidase da cadeia respiratória de elétrons, levou à diminuição de 24% e 80% dos níveis de ATP em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

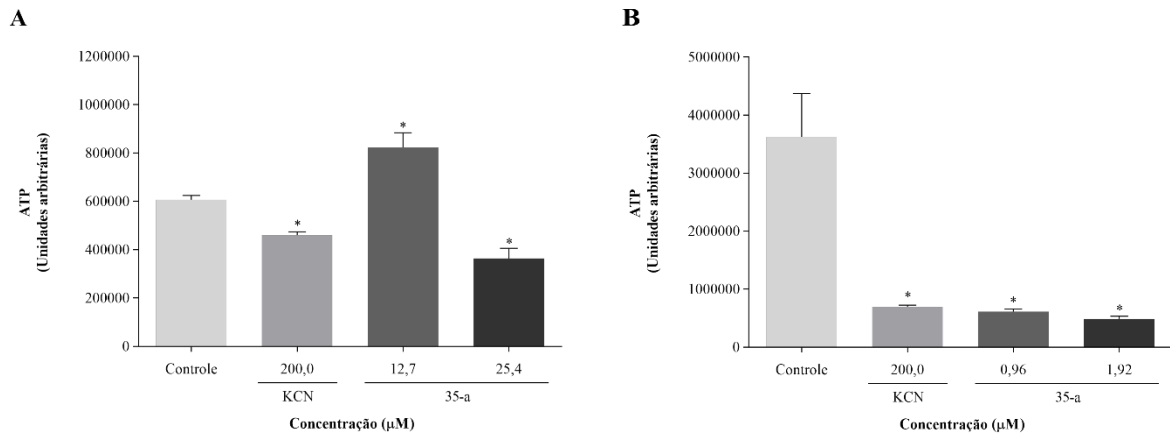


Figura 10. Avaliação dos níveis de ATP intracelular em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$. (A) promastigotas; (B) amastigotas. KCN (200 μ M) foi utilizado como controle positivo. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.8 Avaliação de corpos lipídicos

O corante vermelho do Nilo foi usado para detectar o acúmulo de corpos lipídicos. Os resultados revelam um aumento significativo de corpos lipídicos em promastigotas e amastigotas tratadas com o composto **35-a**, em comparação com células não tratadas. O aumento foi de 4,9 vezes e de 7,0 vezes em promastigotas tratadas com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, respectivamente (Fig. 11A). Já em amastigotas, esse aumento foi de 2,2 vezes e 3,8 vezes após o tratamento com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, respectivamente (Fig. 11B). Da mesma forma, H_2O_2 promoveu acúmulo de corpos lipídicos nos parasitos, exibindo aumento da fluorescência de 4,8 vezes em promastigotas e 2,8 vezes em amastigotas.

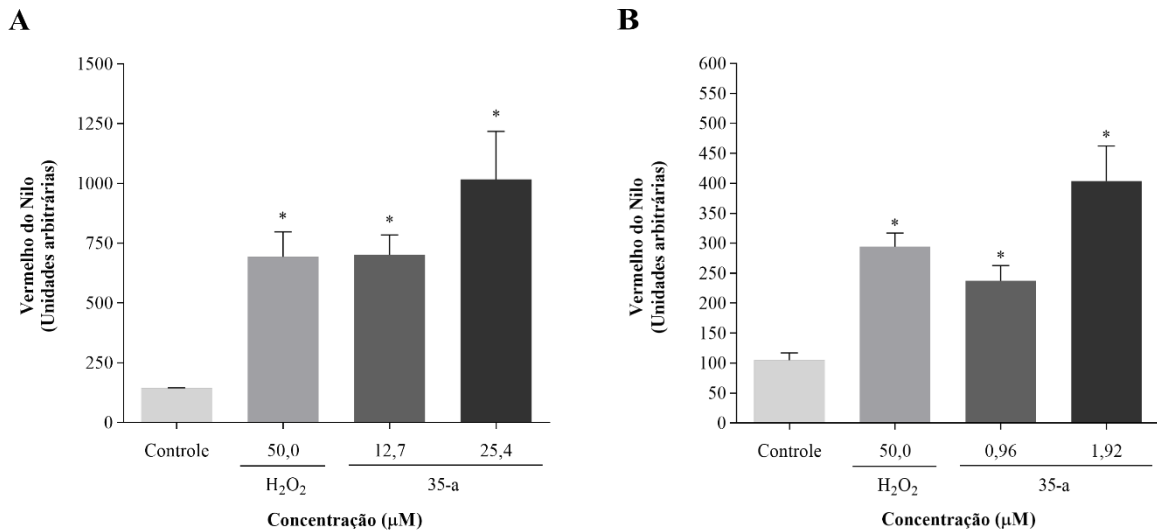


Figura 11. Corpos lipídicos em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI₅₀ e 2×CI₅₀, utilizando o corante vermelho do Nilo. (A) promastigotas; (B) amastigotas. H₂O₂ (50 μM) foi utilizado como controle positivo. **P* < 0,05 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.9 Avaliação do volume celular

O volume das células foi avaliado por citometria de fluxo. Ocorreu uma diminuição significativa no volume celular, de 57% e de 66%, de promastigotas tratados com CI₅₀ e 2×CI₅₀ de **35-a**, respectivamente, comparado ao grupo controle (Fig. 12A). O mesmo foi observado em amastigotas, que apresentaram redução no volume celular em 50% e 49% quando tratadas com CI₅₀ e 2×CI₅₀ de **35-a**, respectivamente (Fig. 12B). O tratamento com miltefosina também levou à diminuição do volume celular, de 69% e 74% em promastigotas e amastigotas, respectivamente.

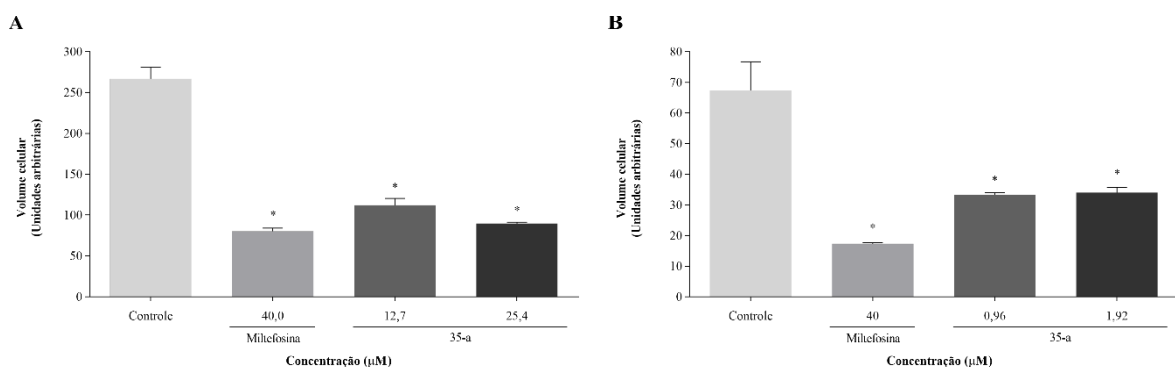


Figura 12. Volume celular de parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI₅₀ e 2×CI₅₀. (A) promastigotas; (B) amastigotas.

Miltefosina (40 μ M) foi utilizada como controle positivo. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.10 Avaliação da exposição de fosfatidilserina

Anexina V-FITC foi utilizada para avaliar a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido que se expõe na superfície das células que sofrem apoptose (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2009). Pelo gráfico de pontos, é possível verificar que promastigotas apresentaram um aumento na porcentagem de células anexina-V positivas (representadas nos quadrantes superiores e inferiores direitos) de 11,0 e 10,8 vezes com o tratamento com CI_{50} (Fig. 13Ac) e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 13Ad) de **35-a**, respectivamente, sugerindo que o isoxazol **35-a** induziu um processo semelhante a apoptose em promastigotas. Já em amastigotas, o aumento da porcentagem das células anexina-V positivas não foi significativo (Fig. 13A'c e Fig. 13A'd). O tratamento com miltefosina levou a um aumento de 16,4 e 2,0 vezes na porcentagem de células anexina-V positivas em relação ao controle não tratado, em promastigotas (Fig. 13Ab) e amastigotas (Fig. 13A'b), respectivamente.

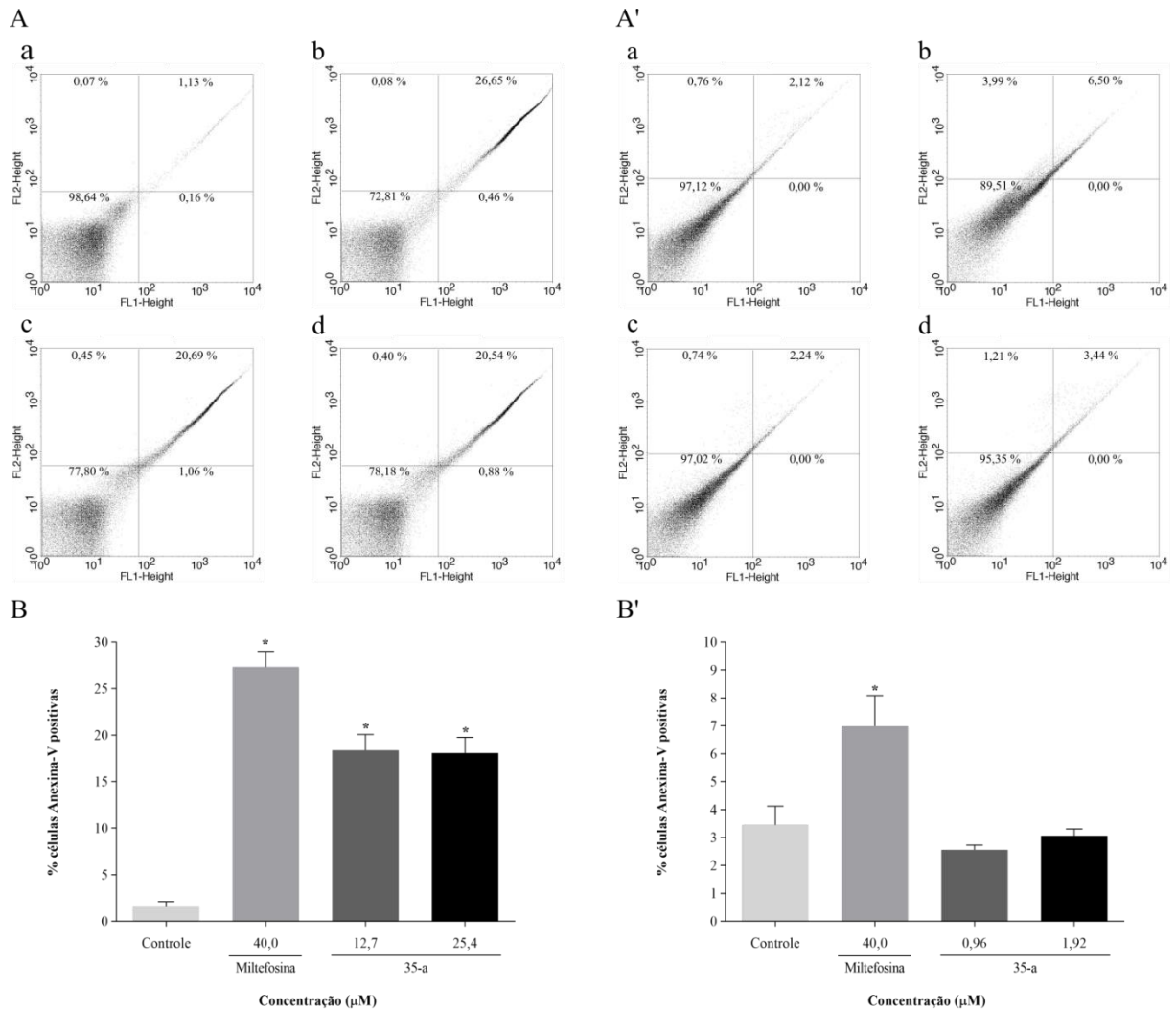


Figura 13. Avaliação da exposição de fosfatidilserina em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando marcação com Anexina V-FITC e IP. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Gráficos de pontos: (a) parasitos não tratados, (b) parasitos tratados com 40 μ M de miltefosina, (c) parasitos tratados com CI_{50} de **35-a**, (d) parasitos tratados com $2 \times CI_{50}$ de **35-a**. (B, B') Porcentagem de células Anexina-V positivas. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.11 Avaliação da integridade de membrana celular

A integridade da membrana das células foi avaliada utilizando marcação com IP. Os gráficos de pontos mostram um aumento na porcentagem de células IP-positivas (representada pelos quadrantes superiores esquerdo e direito) quando tratadas com **35-a** em comparação com o grupo controle, indicando ruptura da membrana celular. Em promastigotas, a intensidade de fluorescência de IP aumentou em 13,3 vezes e 39,9 vezes com o tratamento com CI_{50} (Fig. 14Ac) e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 14Ad) de **35-a**, respectivamente. Em amastigotas, esse

aumento foi de 3,4 vezes para o tratamento com CI_{50} (Fig. 14A'c) e de 3,9 vezes para o tratamento com $2 \times CI_{50}$ (Fig. 14A'd) de **35-a**. Da mesma forma, o controle positivo (digitonina) induziu o aumento na fluorescência, de 62,9 vezes e 11,9 vezes em promastigotas (Fig. 14Ab) e amastigotas (Fig. 14A'b), respectivamente.

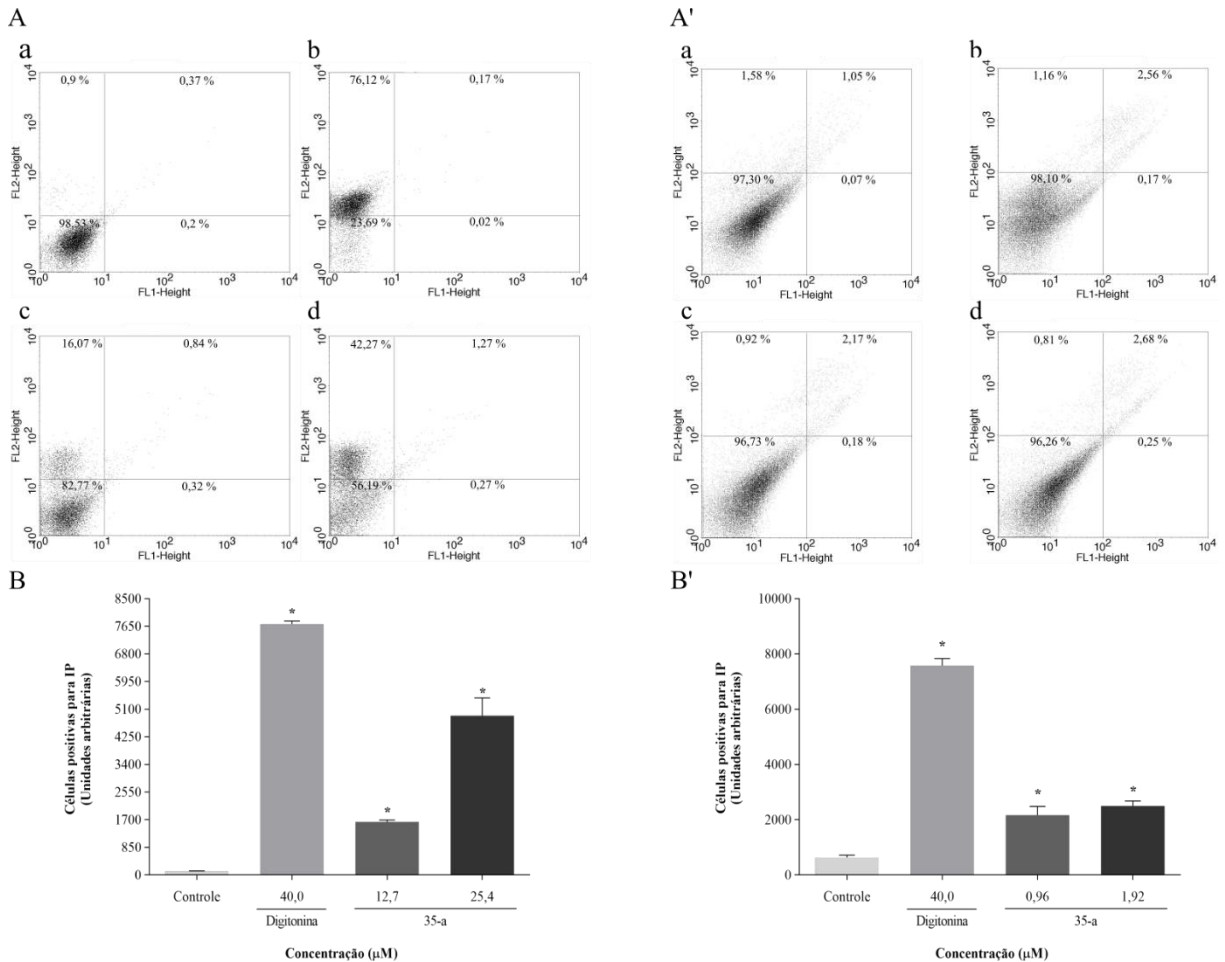


Figura 14. Avaliação da integridade de membrana celular em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando marcação com IP. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Gráficos de pontos: (a) parasitos não tratados, (b) parasitos tratados com 40 μ M de digitonina, (c) parasitos tratados com CI_{50} de **35-a**, (d) parasitos tratados com $2 \times CI_{50}$ de **35-a**. (B, B') Porcentagem de células IP positivas. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

3.12 Avaliação de vacúolos autofágicos

A avaliação de vacúolos autofágicos foi realizada por microscopia de fluorescência e fluorimetria, utilizando o marcador fluorescente MDC. Observa-se que houve um aumento

significativo de vacúolos autofágicos em promastigotas (Fig. 15A) e amastigotas (Fig. 15A') tratadas com **35-a**, em comparação com o grupo controle. Em promastigotas, esse aumento foi de 4,2 vezes quando tratadas com CI_{50} (Fig. 15Ac) e 10,6 vezes quando tratadas com $2 \times CI_{50}$ de **35-a** (Fig. 15Ad), além de que o controle positivo promoveu um aumento de 4,5 vezes na formação de vacúolos autofágicos (Fig. 15Ab). Este efeito foi prevenido com o inibidor da autofagia, wortmanina, que inibiu a formação de vacúolos autofágicos em 66, 50 e 80% nas promastigotas tratadas com controle positivo (Fig. 15Ab'), CI_{50} (Fig. 15Ac') e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 15Ad'). Em amastigotas, o tratamento com o isoxazol **35-a** provocou aumento de vacúolos autofágicos de 2,0 vezes e 2,2 vezes com CI_{50} (Fig. 15A'c) e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 15A'd); do mesmo modo, o controle positivo levou a um aumento de 1,8 vez (Fig. 15A'b). Wortmanina preveniu a formação de vacúolos autofágicos em 18, 34 e 49% nas amastigotas tratadas com controle positivo (Fig. 15A'b'), CI_{50} (Fig. 15A'c') e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 15A'd').

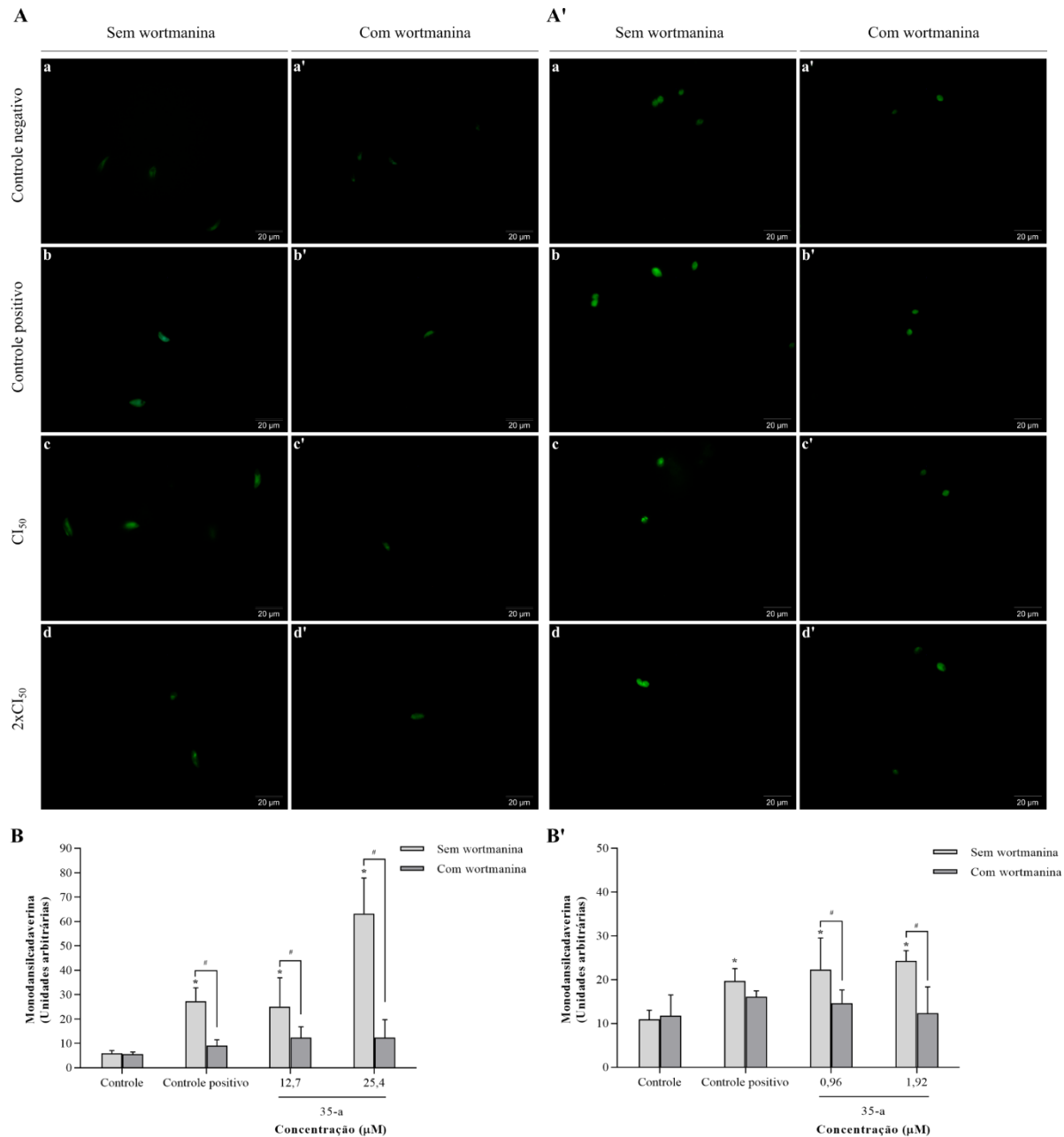


Figura 15. Vacúolos autofágicos em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando marcação com MDC. Parasitos incubados com PBS e na ausência de soro foram utilizados como controle positivo. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Imagens de microscopia de fluorescência: (a) parasitos não tratados, (a') parasitos não tratados mais wortmanina, (b) controle positivo, (b') controle positivo mais wortmanina, (c) parasitos tratados com CI_{50} de **35-a**, (c') parasitos tratados com CI_{50} de **35-a** mais wortmanina, (d) parasitos tratados com $2 \times CI_{50}$ de **35-a**, (d') parasitos tratados com $2 \times CI_{50}$ de **35-a** mais wortmanina. Barras: 20 µm. (B, B') Intensidade da fluorescência obtida por fluorimetria. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle. # $P < 0,05$ indica diferenças significativas entre os grupos com e sem wortmanina.

3.13 Avaliação de compartimentos ácidos

A presença de vacúolos ácidos foi avaliada utilizando o marcador laranja de acridina. Nota-se pelos gráficos de pontos que a população de células está concentrada no quadrante inferior direito, já que o marcador intercala com DNA, emitindo fluorescência verde. Esse perfil é alterado após o tratamento com **35-a**, sendo possível observar um aumento de células no quadrante superior direito, indicando aumento na emissão da fluorescência vermelha, em consequência ao aumento de compartimentos ácidos nas células. Em promastigotas, a razão da fluorescência vermelha/verde aumentou 6,1 vezes com o tratamento com CI_{50} (Fig. 17Ac) e 8,4 vezes com o tratamento com $2 \times CI_{50}$ (Fig. 17Ad) de **35-a**. Em amastigotas, esse aumento foi de 1,6 vezes e 1,9 vezes com o tratamento com CI_{50} (Fig. 17A'c) e $2 \times CI_{50}$ (Fig. 17A'd) de **35-a**, respectivamente, indicando aumento de vacúolos ácidos nas células tratadas com o composto.

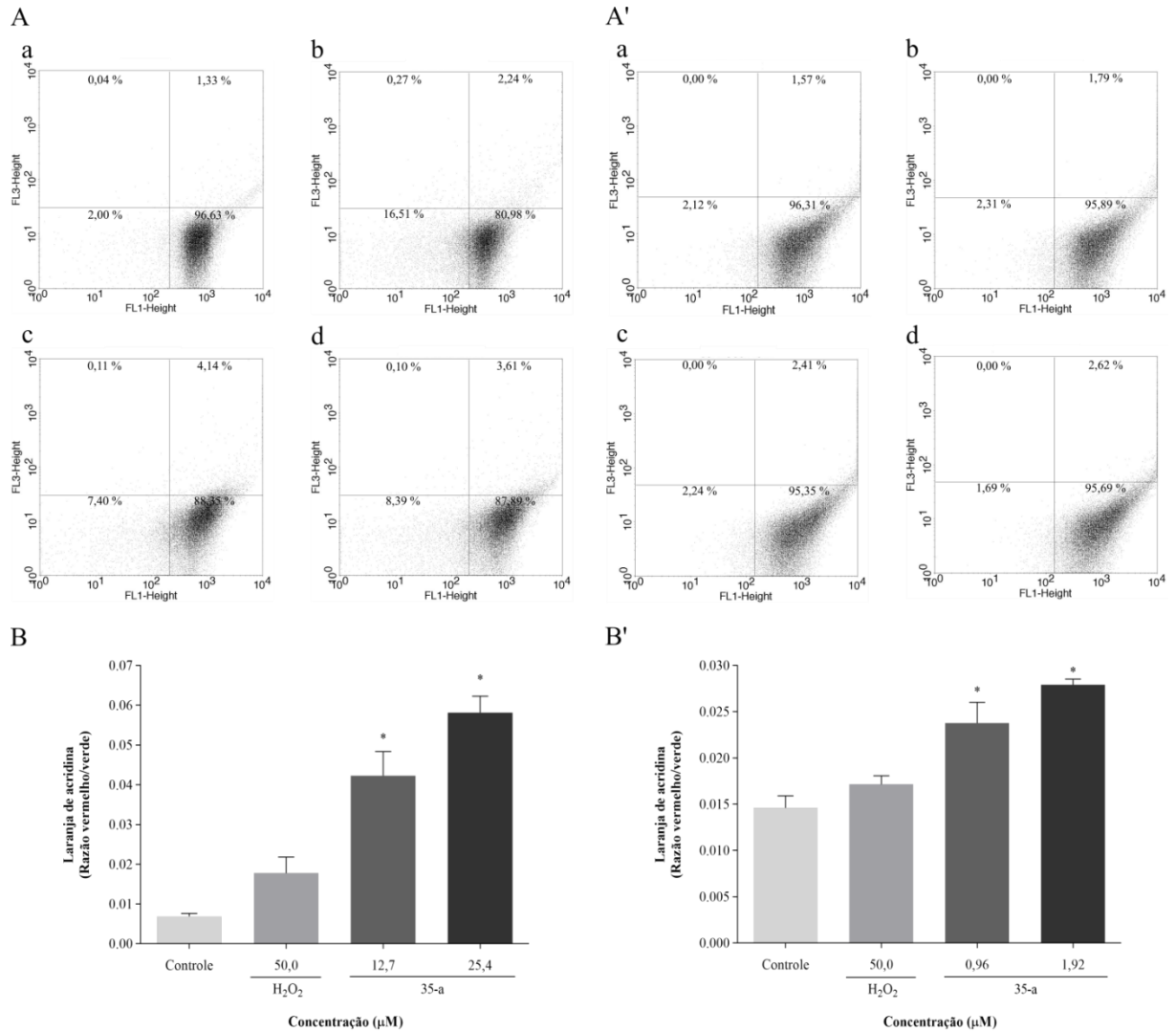


Figura 16. Avaliação de vacúolos ácidos em parasitos de *Leishmania amazonensis* tratados com **35-a** por 24 h em concentrações correspondentes ao CI_{50} e $2 \times CI_{50}$, utilizando marcação com laranja de acridina. (A, B) promastigotas; (A', B') amastigotas. (A, A') Gráficos de pontos: (a) parasitos não tratados, (b) parasitos tratados com $50 \mu M$ de H_2O_2 , (c) parasitos tratados com CI_{50} de **35-a**, (d) parasitos tratados com $2 \times CI_{50}$ de **35-a**. (B, B') Razão da fluorescência vermelho/verde nas células. * $P < 0,05$ indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

4 DISCUSSÃO

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas buscando o desenvolvimento de novos fármacos e novas estratégias para o tratamento de pacientes com leishmaniose (CARLOTO *et al.*, 2022; FERNANDES *et al.*, 2021; MENDONÇA *et al.*, 2019; VOLPATO *et al.*, 2013). No entanto, a alta toxicidade, efeitos colaterais graves, dificuldade de administração e resistência aos fármacos utilizados no tratamento dos pacientes (ROATT *et al.*, 2020; TIUMAN *et al.*, 2011) evidenciam a necessidade da busca por novos compostos mais eficazes e seguros. Tendo em vista que a toxicidade elevada é um grande problema associado ao tratamento de pacientes com a doença, a investigação da toxicidade dos compostos com atividade antileishmania em células do hospedeiro é importante (NUNES *et al.*, 2021). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a eficácia do isoxazol **35-a** em promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados obtidos mostraram que **35-a** apresentou baixa citotoxicidade frente a macrófagos J774A.1 e a fibroblastos L929. Por esse motivo, o presente estudo buscou investigar o mecanismo de ação de **35-a** em *L. amazonensis* e identificar as vias de morte celular induzidas pelo composto frente as duas formas morfológicas do protozoário.

Embora parasitos de *Leishmania* possam interagir e infectar diversos tipos de células do hospedeiro vertebrado, macrófagos se destacam por serem importantes células hospedeiras nas quais os parasitos se proliferam (HANDMAN; BULLEN, 2002; LIU; UZONNA, 2012). Além das formas promastigotas, outra principal forma morfológica é a amastigota, encontrada em células fagocíticas, principalmente macrófagos (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018). Sendo assim, inicialmente foi realizada a avaliação da atividade antiproliferativa do composto **35-a** em formas amastigotas de *L. amazonensis* presentes no ambiente intracelular de macrófagos J774A.1. Os resultados mostraram que o composto é altamente seletivo contra amastigotas intracelulares, além de que a atividade de **35-a** em amastigotas foi ainda maior do que contra formas promastigotas. A diferença na suscetibilidade a substâncias leishmanicidas entre formas promastigotas e amastigotas já foi observada em outros estudos (AMARAL *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2017). Ademais, é um resultado interessante, visto que as amastigotas são as formas clínicas mais relevantes. Baseado nisso, foram investigadas as vias de morte celular induzidas pelo composto sobre *L. amazonensis*.

Avaliou-se o efeito do isoxazol **35-a** na morfologia e ultraestrutura dos parasitos através da MEV e MET. As análises de MEV evidenciaram a diminuição no número de amastigotas intracelulares nos macrófagos; já promastigotas tratadas apresentaram diminuição

do volume celular, extravasamento de conteúdo intracelular e alterações em sua superfície. Por MET, foram verificadas alterações estruturais como aumento de corpos lipídicos, alterações no núcleo e inchaço mitocondrial em promastigotas tratadas. O acúmulo de corpos lipídicos também foi uma consequência do tratamento com **35-a** em amastigotas, sendo que nestas formas também foi ressaltado o aumento de vacúolos autofágicos. Alterações semelhantes já foram visualizadas em outros estudos (BORTOLETI *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2017; PAULA *et al.*, 2021).

A atividade de compostos nitroaromáticos em tripanossomatídeos já foi relatada previamente (MENDONÇA *et al.*, 2019; NOCENTINI *et al.*, 2019; DIN *et al.*, 2014). Um composto nitroaromático é aquele que contém um ou mais grupos nitro diretamente ligados a um anel aromático, sendo que um modo de ação de tais compostos é por meio da produção de ERO (KOVACIC; SOMANATHAN, 2014; PATTERSON; WYLLIE, 2014). Sendo assim, o isoxazol **35-a** é um composto nitroaromático, e o conteúdo de ERO nos parasitos tratados com o composto foi então avaliado por fluorimetria.

As ERO são geradas por todas as células aeróbias como subprodutos de processos fisiológicos normais, de reações do metabolismo e em resposta a diversos estímulos, sendo a cadeia respiratória mitocondrial a principal fonte de ERO. Essas moléculas, em níveis fisiológicos, possuem um papel importante no metabolismo celular e sinalização; por outro lado, quando produzidas em excesso, ou quando as defesas celulares não conseguem metabolizá-las, ocorrem danos celulares por meio do estresse oxidativo (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002; JUAN *et al.*, 2021; STARKOV, 2008; VENDITTI; STEFANO; MEO, 2013). ERN são compostos derivados do NO que também estão relacionados à regulação fisiológica das células, porém altos níveis de ERN podem induzir o estresse nitrosativo (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009). A análise do conteúdo de ERO totais e NO mostraram que o isoxazol **35-a** promoveu aumento significativo dessas moléculas em promastigotas e amastigotas tratadas. Um radical livre contém um ou mais elétrons desemparelhados, podendo reagir com outras moléculas, doando seu elétron desemparelhado, ou retirando-o da outra molécula de modo a aumentar sua estabilidade. Sendo assim, ERO e ERN podem ser nocivas a diversas macromoléculas biológicas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (CZARNA; JARMUSZKIEWICZ, 2006; MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009), provocando danos diretamente na mitocôndria e na célula (KOWALTOWSKI, 2000).

Enquanto centenas de mitocôndrias podem ser encontradas em células de mamíferos, em tripanossomatídeos esta organela é uma estrutura única, de forma tubular que se estende

pelo corpo da célula. Na matriz mitocondrial, e perpendicular ao eixo do flagelo, encontra-se o cinetoplasto, estrutura em formato de disco que contém o DNA do cinetoplasto (kDNA), composto por uma rede de moléculas circulares - maxicírculos e minicírculos - sendo a estrutura mais incomum da organela (FIDALGO; GILLE, 2011; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014; TOMÁS; CASTRO, 2013). Em organismos que possuem uma única mitocôndria, sua sobrevivência depende do funcionamento adequado da mesma, e a manutenção do $\Delta\Psi_m$ é essencial para a sobrevivência das células; além disso, as características da mitocôndria dos tripanossomatídeos a torna um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra parasitos de *Leishmania* (FIDALGO; GILLE, 2011). De fato, trabalhos que utilizaram análise por microscopia eletrônica e avaliação do $\Delta\Psi_m$ mostraram que substâncias com atividade em *L. amazonensis* afetaram a mitocôndria dos parasitos (BRITTA *et al.*, 2014; FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2019). A avaliação do $\Delta\Psi_m$ indicou que **35-a** causou despolarização mitocondrial em parasitos de *L. amazonensis*, e imagens de MET mostraram inchaço mitocondrial em promastigotas. A perda do $\Delta\Psi_m$ é uma característica de morte tipo apoptose em tripanossomatídeos patogênicos (MENNA-BARRETO, 2019).

Mitocôndrias geram ATP pela F_0F_1 -ATP sintase utilizando a força próton-motriz, composta pelo gradiente de pH mitocondrial e pelo $\Delta\Psi_m$ (PERRY *et al.*, 2011), sendo então o $\Delta\Psi_m$ um componente importante para a síntese de ATP. Além disso, quando o $\Delta\Psi_m$ não retorna ao valor normal, nas mitocôndrias despolarizadas a ATP sintase exibe atividade de ATPase, hidrolisando ATP (CHINOPOULOS, 2011; ZOROVA *et al.*, 2018), o que explicaria a diminuição nos níveis de ATP observados nos parasitos tratados com **35-a**. No entanto, um estudo de Zamaraeva e colaboradores (2005) sugeriu que a elevação do nível de ATP citosólico é um pré-requisito para o processo de morte celular por apoptose, o que poderia explicar o aumento nos níveis de ATP que foi verificado em promastigotas tratadas com CI_{50} de **35-a** (ZAMARAEVA *et al.*, 2005). Normalmente, as células mantêm níveis estáveis de ATP/ADP intracelular e $\Delta\Psi_m$ para o funcionamento normal da célula; uma perturbação prolongada desses fatores poderia então comprometer a viabilidade celular, causando sérias consequências (ZOROVA *et al.*, 2018).

A relação entre mitocôndrias e espécies oxidantes pode ser recíproca: a disfunção mitocondrial pode resultar na ruptura na homeostase de ERO e ERN, mas o conteúdo elevado de ERO e ERN também pode acarretar na disfunção mitocondrial (VAMECQ *et al.*, 2012). O DNA mitocondrial é um alvo crítico de danos oxidativos, podendo inclusive amplificar o

estresse oxidativo levando a um ciclo de produção de ERO e desregulação de organelas que eventualmente desencadeia a apoptose (GUO *et al.*, 2013).

Pode-se dizer que as duas principais formas de conjuntos lipídicos macromoleculares associados a sistemas biológicos são as bicamadas lipídicas das membranas celulares e os corpos lipídicos (MURPHY, 2001). Corpos lipídicos são organelas dinâmicas que consistem em um núcleo de lipídeos neutros circundados por uma monocamada de fosfolipídeos e proteínas integrais e periféricas, e possuem um papel importante na homeostase lipídica e energética (OLOFSSON *et al.*, 2009; OLZMANN; CARVALHO, 2019). No entanto, em condições de estresse celular, uma das adaptações da célula é aumentar a produção de corpos lipídicos: sua biogênese pode ser induzida em resposta ao excesso de lipídeos na célula, ao estresse oxidativo e nutricional e outras situações de desequilíbrio energético e redox; em resposta ao estresse oxidativo na célula, corpos lipídicos podem se acumular de modo a proteger membranas de reações de peroxidação e promover um suprimento de lipídeos a longo prazo para obtenção de energia e sobrevivência celular (HENNE; REESE; GOODMAN, 2018; JARC; PETAN, 2019). O acúmulo destas organelas foi revelado por meio de marcação com vermelho do Nilo em promastigotas e amastigotas tratadas com **35-a**, que pode ter sido causada em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo composto. Ademais, o rápido acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma é uma característica de apoptose (BOREN; BRINDLE, 2012).

Redução e arredondamento celular são aspectos morfológicos associados à apoptose (SHAHA, 2006). Estas alterações foram observadas em promastigotas tratadas com **35-a** por meio de análise de MEV. A diminuição do volume das células foi confirmada por citometria de fluxo em promastigotas e amastigotas tratadas com o composto. Outra característica de morte celular por apoptose é a externalização da fosfatidilserina, que é translocada do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo da bicamada lipídica (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2009; MENNA-BARRETO, 2019; SHAHA, 2006). Este efeito foi observado após tratamento com o isoxazol **35-a** em promastigotas.

A ruptura da membrana plasmática foi observada nos parasitos tratados com **35-a** por marcação com IP, sendo uma característica de morte celular por necrose; o estresse oxidativo em tripanossomatídeos pode estar relacionado também à necrose: dependendo dos níveis de ERO produzidas, pode ocorrer lise do protozoário e consequente morte por necrose (MENNA-BARRETO, 2019). Elevado conteúdo de ERO e danos na membrana celular foram observados em estudos anteriores (BORTOLETI *et al.*, 2022; LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016).

Autofagia é um processo de degradação celular regulado para degradar organelas disfuncionais e grandes moléculas citosólicas por meio de vesículas de dupla membrana, os autofagossomos, que direcionam a carga para degradação lisossomal, sendo que a geração de ERO pode estimular também a autofagia (DUNN *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2017). A análise ultraestrutural é uma ferramenta importante para a caracterização de fenótipos autofágicos, e a observação da presença de grandes vacúolos e organelas danificadas em tripanossomatídeos podem indicar que um processo semelhante à autofagia esteja ocorrendo nessas células (MENNA-BARRETO, 2019; SOUZA; RODRIGUES, 2009). De fato, tripanossomatídeos também possuem um sistema autofágico funcional que parece ser essencial para a diferenciação e sobrevivência do parasito (SMIRLIS *et al.*, 2010). No entanto, no caso de extensa atividade autofágica que destrói grande parte do citosol e das organelas, pode haver um colapso total das funções celulares (GOZUACIK; KIMCHI, 2007). O aumento de vacúolos autofágicos em *L. amazonensis* induzido por **35-a** foi revelado por marcação com MDC. Wortmanina inibiu a fluorescência parcialmente, indicando que o aumento da fluorescência de MDC foi pela formação de vacúolos autofágicos. Esse efeito pode ter sido causado em resposta ao aumento do conteúdo de ERO, como já observado em outros estudos (BORTOLETI *et al.*, 2022; LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016).

Além do aumento de vacúolos autofágicos, o tratamento com **35-a** induziu o aumento de outros compartimentos ácidos, como os acidocalcissomos. Estas organelas em geral possuem estrutura esférica e se encontram distribuídas pelas células, mas preferencialmente perto da porção central ou do vacúolo contrátil; acidocalcissomos estão envolvidos no armazenamento de cálcio, ferro, sódio, magnésio, zinco, compostos fosfatados, além de serem importantes na manutenção da homeostase do pH intracelular e na osmorregulação frente ao estresse osmótico (DOCAMPO *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2004; RODRIGUES; GODINHO; SOUZA, 2014). O aumento dessas organelas pode ser devido à perturbação da homeostase da célula provocada pelo composto.

Diante do exposto, foi possível concluir que o isoxazol **35-a** possui forte atividade seletiva contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. O mecanismo de ação de **35-a** foi investigado por meio de análises ultraestruturais, morfológicas e bioquímicas, e os resultados sugerem que o composto desregula a homeostase do sistema redox do protozoário, culminando na morte dos parasitos por eventos semelhante a apoptose e processos autofágicos. Sendo assim, os resultados obtidos foram promissores e apoiam o uso do isoxazol **35-a** em novos estudos pré-clínicos como um potencial candidato ao tratamento de pacientes acometidos com a leishmaniose.

5 REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, e0004349, 2016.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- AMARAL, M. *et al.* A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell death & differentiation**, v. 19, n. 9, p. 1561-1570, 2012.
- BORTOLETI, B. T. S. *et al.* Investigation of the antileishmanial activity and mechanisms of action of acetyl-thiohydantoins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, n. 109690, 2022.
- BOUCHIER-HAYES, L. *et al.* Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 222-228, 2009.
- BRINDHA, J.; BALAMURALI M.; CHANDA, K. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n. 622286, 2021.
- BRITTA, E. A. *et al.* Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from *S*-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 236, 2014.
- CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 95-110, 2008.
- CARLOTO, A. C. M. *et al.* Botryosphaeran, [(1 → 3)(1 → 6)-β-D-glucan], induces apoptosis-like death in promastigotes of *Leishmania amazonensis*, and exerts a leishmanicidal effect on infected macrophages by activating NF-κB and producing pro-inflammatory molecules. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, n. 109713, 2022.
- CHINOPOULOS, C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. **FEBS Letters**, v. 585, n. 9, p. 1255-1259, 2011.

- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.
- CRUZ, A. L. S. *et al.* Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 105, 2020.
- CZARNA, M.; JARMUSZKIEWICZ, W. Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death. **Postepy Biochemii**, v., 52, n., 2, p. 145-156, 2006.
- DA ROSA, R. *et al.* Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 25-35, 2017.
- DIN, Z. U. *et al.* Unsymmetrical 1,5-diaryl-3-oxo-1,4-pentadienyls and their evaluation as antiparasitic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 1121-1127, 2014.
- DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.
- DUNN, J. D. *et al.* Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, v. 6, p. 472-485, 2015.
- FERNANDES, N. S. *et al.* Styrylpyrone, isolated from an Amazon plant, induces cell cycle arrest and autophagy in *Leishmania amazonensis*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4729-4733, 2021.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.
- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84, p. 131-141, 2002.
- FONSECA-SILVA, F. *et al.* Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, e14666, 2011.
- GARCIA, F. P. *et al.* A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, n. 1, p. 57-71, 2017.
- GARCIA F. P. *et al.* Eupomatenoïd-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, e940531, 2013.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy and cell death. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 78, p. 217-245, 2007.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1638-1650, 2004.

GUO, C. *et. al.* Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 21, p. 2003-2014, 2013.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.

HE, L. *et. al.* Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.

HENNE, W. M.; REESE, M. L.; GOODMAN, J. M. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 12, e98947, 2018.

JARC, E.; PETAN, T. Lipid droplets and the management of cellular stress. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 435-452, 2019.

JIMENEZ, V. *et. al.* Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 688-698, 2008.

JUAN, C. A. *et. al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 4642, 2021.

KOJIMA, H. *et. al.* Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 21, p. 3209-3212, 1999.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 810-824, 2014.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 241-250, 2000.

KUMAR, K. A.; JAYAROOPA, P. Isoxazoles: molecules with potential medicinal properties. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 294-304, 2013.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et. al.* Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 890-903, 2016.

LEE, S. *et. al.* Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 327167, 2013.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 83, 2012.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MASPI, N.; ABDOLI, A; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MENDONÇA, D. V. C. *et al.* *In vivo* antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 779-787, 2019a.

MENDONÇA, D. B. D. *et al.* Nitro-Heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019b.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 93, 2019.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 614014, 2014.

MIRANDA, N. *et al.* The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 174, p. 342-354, 2017.

MIRANDA, K. *et al.* Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 395-405, 2004.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309–322, 2010.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MUSKUS, C. E.; MARÍN, V. M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 22, n. 2, p. 167-177, 2002.

- NIEMANN, A.; TAKATSUKI, A.; ELSÄSSER, H. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 2, p. 251-258, 2000.
- NOCENTINI, A. *et al.* Appraisal of anti-protozoan activity of nitroaromatic benzenesulfonamides inhibiting carbonic anhydrases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1164-1171, 2019.
- NUNES, T. A. L. *et al.* Curzerene antileishmania activity: effects on *Leishmania amazonensis* and possible action mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 100, n. 108130, 2021.
- OLOFSSON, S. *et al.* Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 448-458, 2009.
- OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 137-155, 2019.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.
- PAULA, J. C. *et al.* Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 211, n. 105653, 2020.
- PAULA, J. C. *et al.* β -carbolines RCC and C5 induce death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Future Microbiology**, v. 17, p. 99-110, 2021.
- PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 839–847, jun. 2007.
- PERRY, S. W. *et al.* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **BioTechniques**, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.
- PIERZYNSKA-MACH, A.; JANOWSKI, P. A.; DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, lysotracker red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. **Cytometry. Part A: Journal of the International Society for Advancement of Cytometry**, v. 85, n. 8, p. 729-737, 2014.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- REVEIZ, L. *et al.* Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PloS ONE**, v. 8, n. 4, e61843, 2013.
- ROATT, B. M. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

- RODRIGUES, J. H. S. *et al.* The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway. **Parasitology Research**, v. 118, n. 3, p. 977-989, 2019.
- RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Subcellular Biochemistry**, v. 74, 2014.
- SANTOS, D.O. *et al.* Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitological Research**, v. 103, p.1-10, abr. 2008.
- SCARIOT, D. B. *et al.* Activity and cell-death pathway in *Leishmania infantum* induced by sugiol: vectorization using yeast cell wall particles obtained from *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 208, 2019.
- SCARIOT, D. B. *et al.* Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 255, 2017.
- SERENO, D. *et al.* Advances and perspectives in *Leishmania* cell-based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233-244, 2006.
- SMIRLIS, D. *et al.* Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 107, 2010.
- SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, n. 642502, 2009.
- STARKOV, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 37-52, 2008.
- STEFANELLO, T. F. *et al.* *N*-butyl-[1-(4-methoxy)phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.
- STOCKDALE, L. NEWTON, R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, e2278, 2013.
- SUNTER, J. D. *et al.* *Leishmania* flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sand fly, and pathogenicity in the host. **PNAS**, v. 116, n. 13, p. 6351-6360, 2019.
- SURYAWANSHI, S. N. *et al.* Chemotherapy of leishmaniasis. Part XI: Synthesis and bioevaluation of novel isoxazole containing heteroretinoid and its amide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p. 6559-6562, 2012.

- THOMÉ, M. P. *et al.* Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 24, p. 4622-4632, 2016.
- TIUMAN, T. S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.
- TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 696-707, 2013.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al.* Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2529, 2018.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. 750, maio 2017.
- VAMECQ, J. *et al.* Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n.10, p. 1388-1400, 2012.
- VENDITTI, P.; STEFANO, L.; MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 71-82, 2013.
- VOLPATO, H. *et al.* *In vitro* anti-*Leishmania* activity of T6 synthetic compound encapsulated in yeast-derived β -(1,3)-D-glucan particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1264-1275, 2018.
- VOLPATO, H. *et al.* Mitochondrial dysfunction induced by *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide is required for cell death of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, e0130652, 2015.
- VOLPATO, H. *et al.* The effects of *N*-Butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* are mediated by mitochondrial dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 874367, 2013.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020b. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- ZAMARAEVA, M. V. *et al.* Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1390–1397, 2005.
- ZOROVA, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50-59, 2018.