35º Encontro Anual de Iniciação Científica
15º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
35ºEAIC 15ºEAIC JR
09 e 10 de novembro de 2026

AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO DE BETA-CARBOLÍNICO EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Livia Aile Miyata Sugavara (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Luíza Dias Piassa (Coorientadora),Celso Vataru Nakamura (Orientador). E-mail: cvnakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências da Saúde/ Microbiologia/ Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Leishmanioses; Composto sintético; Atividade anti-*leishmania.*

RESUMO

A leishmaniose faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, e seu tratamento ainda depende principalmente dos antimoniais pentavalentes. Esses fármacos, no entanto, apresentam várias limitações como sua toxicidade, o que motivam a busca por novas opções terapêuticas mais seguras. Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar o modo de ação do derivado beta-carbolínico CF11 em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis.* As análises morfológicas revelaram que o tratamento provocou danos nos componentes celulares, e análises bioquímicas sugerem que o composto está relacionado à um processo de estresse oxidativo, devido ao acúmulo de ERO, corpos lipídicos e lipoperoxidação, além da despolarização mitocondrial observada. Desta forma, os resultados obtidos revelaram que o CF11 é um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos contra a leishmaniose.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com suas principais manifestações clínicas, são classificadas em: visceral, cutânea e mucocutânea. As leishmanioses são endêmicas em 99 países, incluindo o Brasil, e estima-se que ocorram de 700 mil a 1 milhão de novos casos anualmente (WHO, 2026). Atualmente, o tratamento depende principalmente dos fármacos injetáveis como os antimoniais pentavalentes e de miltefosina, sendo este o único administrado via oral. Entretanto, os fármacos se mostram insuficientes ao levar em consideração sua toxicidade, efeitos adversos graves, além da forma e o tempo de administração do tratamento, fator este relacionado à desistência por parte dos pacientes. Desta forma, surge a necessidade de estudos que contribuam para o desenvolvimento de fármacos anti-*leishmania*. Com base em estudos anteriores, no qual derivados beta-carbolínicos apresentaram interessante atividade inibitória em tripanosomatídeos (PAULA *et al.*, 2022), o objetivo do trabalho foi identificar o modo de ação de um novo derivado híbrido de beta-carbolínico **CF11** que apresenta atividade inibitória em 50% dos parasitos (CI□□) na concentração de 9,56 µM, que quando comparado à sua atividade citotóxica em macrófagos J774A.1 (165,34 µM), resulta em um índice de seletividade de 17 vezes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células e padronização para estudo do modo de ação
Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) mantidas à 25 °C em meio de cultura Warren e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para estudo do modo de ação, as promastigotas foram tratadas com concentrações referentes de CI□□ e 2×CI□□ de **CF11**, e após 24 h de incubação em estufa, foram lavadas em PBS e processadas de acordo com o ensaio avaliado.

Microscopia eletrônica de varredura
Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com o CI□□ e 2×CI□□. Após a centrifugação e lavagem com PBS, as células foram fixadas por imersão com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidas em lamínulas cobertas com poli-L-lisina. Depois, foram lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol e submetidas a secagem ao ponto crítico. Por fim, foram metalizadas e visualizadas em microscópio Quanta 250 (FEI).

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)
As células foram incubadas com o marcador H_2DCFDA por 45 min a 25 °C no escuro. Após incubação, a produção de ERO foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer). H_2O_2 (100 µM) foi utilizado como controle positivo.

Avaliação do acúmulo de corpos lipídicos
As promastigotas foram incubadas no escuro por 30 min com o marcador Vermelho do Nilo. A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur. H_2O_2 a (100 µM) foi utilizado como controle positivo.

Avaliação da peroxidação lipídica
Após o tempo de incubação, as células foram incubadas com o marcador DPPP e sua fluorescência foi quantificada em um espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer). H_2O_2 a 100 µM foi utilizado como controle positivo.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm)
As promastigotas foram incubadas com Rodamina 123 (Rh123) por 15 min a 37 ºC, lavadas em salina 0,9% e incubadas em estufa por mais 30 min, para então análise em citômetro de fluxo FACSCalibur. CCCP (100 µM) foi utilizado como controle positivo.

Determinação da integridade da membrana plasmática
Para análise, as amostras foram incubadas com iodeto de propídio (IP) por 10 minutos e então analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Para controle do ensaio foi utilizada digitonina (40 µM).

Determinação do tamanho celular
Após tratamento, as promastigotas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Actinomicina D (20 µM) foi usado como controle positivo do ensaio.

Avaliação de vacúolos autofágicos

Promastigotas foram tratadas por 24 h com CI□□ e 2×CI□□ de **CF11**, e pré-tratadas com wortmannin, um inibidor de autofagia. Em seguida, as células foram suspensas em PBS e incubadas com MDC por 1 h no escuro à 37ºC. Posteriormente, a fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer).

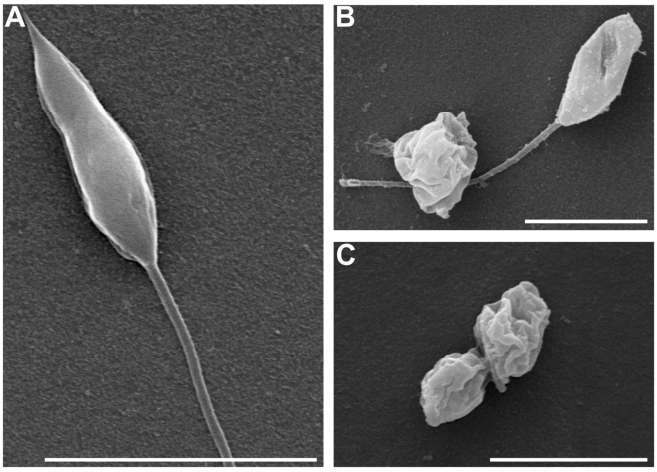


Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (A) Controle negativo; (B) Promastigotas tratadas com CI□□ e (C) 2×CI□□ de **CF11**.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com o composto **CF11** nas concentrações de CI□□ e 2×CI□□ promoveu alterações morfológicas e bioquímicas que, quando analisadas em conjunto, sugerem que o composto interfere em diferentes processos celulares. A microscopia eletrônica de varredura (**Figura 1**) revelou o encurtamento do flagelo, diminuição do tamanho celular e irregularidades na membrana dos parasitas tratados em comparação ao controle negativo. Essas alterações morfológicas indicam que o **CF11** provoca perturbações na estrutura celular do parasito. A avaliação de espécies reativas de oxigênio demonstrou um aumento significativo de ERO em relação ao grupo não tratado, sugerindo uma possível indução de estresse oxidativo. Na detecção de corpos lipídicos, houve um aumento nos grupos tratados com diferenças significantes em comparação ao grupo controle, o que sugere alterações no metabolismo lipídico. A detecção de lipoperoxidação apresentou um aumento nos grupos tratados em relação ao grupo controle e também em comparação com o H_2O_2, esse aumento indica que existem danos oxidativos nas células tratadas. A avaliação do $\Delta\Psi m$ também apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle indicando um comprometimento da função mitocondrial das células tratadas devido a despolarização mitocondrial. Esses resultados reforçam a hipótese de estresse oxidativo, uma vez que a mitocôndria é fundamental para manutenção do metabolismo celular e equilíbrio oxidativo. Ao avaliar a integridade da membrana, os tratamentos apresentaram aumento de IP em comparação ao grupo controle, indicando uma leve alteração na integridade da membrana. Para a determinação do tamanho celular, nos dois grupos tratados houve uma redução significativa em relação ao grupo controle. A detecção de vacúolos autofágicos apresentou um aumento nos grupos tratados em menor magnitude que o grupo com PBS e nos

grupos tratados com **CF11**+Wortmannin a fluorescência foi reduzida, indicando o envolvimento de processos relacionados à autofagia. Assim, o aumento da produção de ERO, associada a despolarização mitocondrial, as alterações nos corpos lipídicos e aumento da lipoperoxidação, reforçam a hipótese de que o **CF11** promove um quadro de estresse oxidativo nos parasitos, semelhante ao observado por Majhi *et al.* (2024). De acordo com Jiménez-Ruiz *et al.* (2010), a redução do volume celular e as alterações mitocondriais são características frequentemente associadas a fenótipos apoptóticos em protozoários, porém, os resultados obtidos são apenas indicativos e a confirmação do tipo de morte celular necessita de mais avaliações.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que o composto **CF11** promove alterações na morfologia do parasito, e alterações bioquímicas que sugerem um quadro de estresse oxidativo e comprometimento da função mitocondrial. Essas alterações associadas à redução do tamanho células e as modificações observadas, sugerem que o **CF11** possa induzir morte celular por apoptose. Embora também tenham sido observadas alterações relacionadas a autofagia e a integridade da membrana plasmática, os resultados encontrados ainda não permitem estabelecer o principal processo de morte celular que o composto causa. Dessa forma, são necessários estudos adicionais em formas amastigotas do parasita, que é a forma encontrada no hospedeiro vertebrado, para confirmar o mecanismo de morte celular envolvido e esclarecer as relações entre as alterações observadas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 3, n. 104, 2010. DOI: https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-104.

MAJHI, S. et al. Buparvaquone induces ultrastructural and physiological alterations leading to mitochondrial dysfunction and caspase-independent apoptotic cell death in *Leishmania donovani*. **Microscopy and Microanalysis**, [S.l.], v. 30, p. 521-538, 2024. DOI: https://doi.org/10.1093/mam/ozae034.

PAULA, J. C. de; et al. β-carbolines RCC and C5 induce the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Future Microbiology**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 99-110, fev. 2022. DOI: https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0263.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva: WHO, jan. 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_3.