

VICTOR HUGO FERRAZ DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA *Leishmania Infantum* VERMELHA
FLUORESCENTE E SUA APLICAÇÃO NA BUSCA POR INIBIDORES DA
rLICNTPDASE2**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586d
2022
Silva, Victor Hugo Ferraz da, 1993-
Desenvolvimento de uma *Leishmania infantum* vermelha
fluorescente e sua aplicação na busca por inibidores da rLicNTPDase2 /
Victor Hugo Ferraz da Silva. - Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (63 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.369>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leishmaniose visceral. 2. Enzimas. 3. Inibidores enzimáticos.
4. NTPDase - Inibidores. 5. *Leishmania infantum*. I. Fietto, Juliana
Lopes Rangel, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

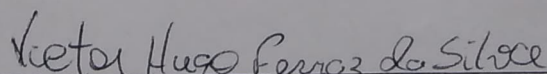
VICTOR HUGO FERRAZ DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA *Leishmania Infantum* VERMELHA
FLUORESCENTE E SUA APLICAÇÃO NA BUSCA POR INIBIDORES DA
rLICNTPDASE2**

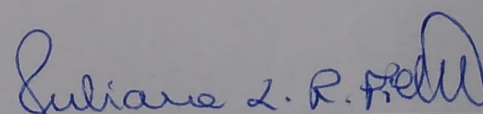
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de abril de 2022.

Assentimento:



Victor Hugo Ferraz da Silva
Autor



Juliana Lopes Rangel Fietto
Orientadora

A minha madrinha Eliane Ferraz

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

SILVA, Victor Hugo Ferraz da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Estudo das NTPDases de *Leishmania infantum*. Análise como alvos farmacológicos e triagem de novos inibidores.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniose é o nome dado as enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são capazes de gerar diversos quadros de doenças em seres humanos, dependendo da espécie envolvida na infecção podem ocorrer desde lesões cutâneas localizadas a lesões disseminadas e infecção visceral. No Brasil a leishmaniose visceral (LV) é causada principalmente por *Leishmania infantum chagasi* (syn *Leishmania infantum*). A LV tem os cães e o homem como principais espécies afetadas, é uma doença endêmica ocorrendo principalmente em regiões rurais, mas que vem apresentando tendência a urbanização. Segundo o ministério da saúde entre 1990 e 2016 foram relatados mais de 75000 casos desta doença no Brasil. As ectonucleotidases da família E-NTPDase são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e/ou trifostato e atuam em diversos processos relacionados a infeciosidade deste parasito, além de terem potencial para uso em diagnóstico de LV em cães. Duas isoformas são conhecidas em *L. infantum chagasi*, LiNTPDase1 e LiNTPDase2. Nosso objetivo foi estudar possíveis inibidores dessas enzimas. Nesse trabalho foram realizadas diferentes abordagens: atividade enzimática, docking, ensaio de adesão e avaliação *in vitro* da capacidade desses compostos de eliminar formas amastigotas de *L. infantum*. Constatamos que os compostos quercetina, IL-05 e IL-09 foram capazes de inibir a atividade da LiNTPDase2 e matar os parasitos. Análises bioquímicas demonstraram que os compostos IL-09 e o IL-05 atuam como inibidores competitivos da LicNTPDase2 e eliminam em até 50% as formas amastigotas quando administrados na concentração de 50 μ M. Estes dados podem reforçar a participação destas enzimas no desenvolvimento e infeciosidade do parasito e indicam a possibilidade de atuarem como novos fármacos para o tratamento da Leishmaniose Visceral no futuro.

Palavras-chave: Leishmaniose. NTPDase. *Leishmania*

ABSTRACT

SILVA, Victor Hugo Ferraz da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Study of NTPDases from *Leishmania infantum*. Analysis as pharmacological targets and screening of new inhibitors.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniasis is the name given to diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* that are capable of generating several disease states in humans, depending on the *Leishmania* species involved in the infection, can occur from localized skin lesions to disseminated lesions and visceral infection. In Brazil the visceral leishmaniasis (VL) is caused by the species *Leishmania infantum* *chagasi* and its transmission occurs by the bite of females of the insect *Lutzomyia longipalpis*. VL has dogs and man as main species affected, is an endemic disease occurring mainly in rural regions, but that has been showing a strong tendency to urbanization. According to the Health Ministry between 1990 and 201, more than 75,000 cases of this disease have been reported in Brazil. The Ecto-nucleotidases from the E-NTPDase family are enzymes capable of hydrolyzing di- and / or triphosphate nucleotides and act in several processes related to the infectivity of this parasite, besides being potential for use in the diagnosis of VL in dogs. Two isoforms of these enzymes are known in *L. infantum*, LiNTPDase1 and LiNTPDase2. Our aim was to study possible inhibitors of these enzymes. In this work, different approaches were carried out: enzymatic activity, docking, adhesion assay and in vitro evaluation of the ability of these compounds to eliminate amastigote forms of *L. infantum*. We found that the compounds quercetin, IL-05 and IL-09 were able to inhibit LiNTPDase2 activity and eliminate these parasites. Biochemical analyzes showed that IL-09 and IL-05 act as competitive inhibitors of LiNTPDase2 and eliminate up to 50% of the amastigote forms when administered at a concentration of 50 μ M. These data may reinforce the participation of these enzymes in the development and infectivity of the parasite and indicate the possibility of work as possible pharmacological targets for the treatment of Visceral Leishmaniasis in the future.

Keywords: Leishmaniasis. NTPDases. *Leishmania*

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	8
Desenvolvimento de uma <i>Leishmania Infantum</i> vermelha fluorescente e sua aplicação na busca por inibidores da rLicNTPDase2	
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA.....	13
3. RESULTADOS.....	17
4. DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	28
2. CAPÍTULO II.....	32
Triagem de compostos inibidores da rLicNTPDase2 e seus efeitos sobre a infecção de Macrófagos por <i>Leishmania infatum in vitro</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. METODOLOGIA.....	36
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS.....	56
7. ANEXOS.....	61

Capítulo I

Development of Red fluorescent *Leishmania infantum chagasi* and its application *in vitro* antileishmanial drug assay in single or mixed infection with green fluorescent *Leishmania braziliensis*

Development of Red fluorescent *Leishmania infantum chagasi* and its application *in vitro* antileishmanial drug assay in single or mixed infection with green fluorescent *Leishmania braziliensis*

Authors: Victor Hugo Ferraz da Silva^{1,2}, Luciana Ângelo de Souza^{1,2}, Joice de Melo Agripino¹, Walmir da Silva¹, Nancy da Rocha Torres^{1,2} Leandro Licursi de Oliveira², Isadora Cunha Ribeiro¹, Matheus Silva e Bastos^{1,a}, Gustavo Costa Bressan¹, Abelardo Silva Junior³, Raphael de Souza Vasconcellos¹ and Juliana Lopes Rangel Fietto¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

³Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

Corresponding author: Juliana Lopes Rangel Fietto- Phone (+55) 31 3612 2464. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais, CEP 36570-900, Brazil. E-mail: jufietto@ufv.br (alternative email: jufietto@gmail.com)

Present/permanent address.

^aDepartment of Pharmacology & Toxicology, Indiana University School of Medicine, 635 Barnhill Drive, MS A405, Indianapolis, IN, 46202, USA.

E-mail addresses:

Victor Hugo Ferraz da Silva- victor.ferraz@ufv.br

Authors' contributions: Victor Hugo Ferraz da Silva: Conceptualization, Methodology, Investigation, Original draft preparation, Formal analysis, Writing- Reviewing and Editing. Luciana Ângelo de Souza: Methodology, Investigation, Writing- Reviewing and Editing. Joice de Melo Agripino: Methodology, Investigation, Writing- Reviewing and Editing. Walmir da Silva: Methodology, Investigation. Nancy da Rocha Torres: Methodology, Investigation. Leandro Licursi de Oliveira: Methodology, Investigation, Writing- Reviewing and Editing. Isadora Cunha Ribeiro: Methodology, Investigation. Gustavo Costa Bressan: Supervision, Resources, Writing- Reviewing and Editing. Abelardo Silva Junior: Resources, Writing- Reviewing and Editing. Raphael de Souza Vasconcellos Supervision, Resources, Writing- Reviewing and Editing. Juliana Lopes Rangel Fietto: Resources, Project administration, Supervision, Writing- Reviewing and Editing.

HIGHLIGHTS

- Development and standardization of *in vitro* drug assay with Red fluorescent *Leishmania infantum chagasi*
- *L. infantum chagasi* -RFP can be applied in *in vitro* drug screening by Plate assay and Flow cytometry assay.
- Mixed infection with fluorescent *L. infantum chagasi*-RFP and *Leishmania braziliensis*-GFP evidenced concomitant macrophage infection
- *L. infantum chagasi*-RFP could be beneficiated by mixed infection with another *Leishmania* species

Abstract

Considering the New World, *Leishmania infantum chagasi* is the primary causative agent of visceral leishmaniasis. Also, *Leishmania braziliensis* is the most prevalent species implicated in cutaneous leishmaniasis. The development of new therapies is still necessary due to a restricted arsenal of drugs, significant toxicity, increasing levels of drug resistance, and treatment failure. In addition, there are areas with mixed infections where two or more species overlap, and their chemotherapy is still poorly understood and investigated. In this work, we used a previously developed green fluorescent *L. braziliensis*-GFP and we drafted a new red fluorescent *L. infantum chagasi*-RFP. The *L. infantum chagasi*-RFP strain had normal morphology and growth and retained the ability to infect macrophages. The drug trial was in 96-well plate assay with 50,000 macrophages/well; 1/20 ratio of macrophage/Leishmania, 24 h of infection, and 48 h of treatment with Amphotericin B as Leishmanicidal agent. Using this condition, the IC₅₀ by Plate assay was 0.69 µM, and by Flow cytometry was 1.27 µM. These assays had a high correlation with an R-value of 0.83. The comparison of IC₅₀ of single infection with *L. infantum chagasi*-RFP (1.27 µM) or with GFP-*L. braziliensis* (0.02 µM) evidenced higher resistance of *L. infantum chagasi* to AmphB. Upon mixed infection, our data showed that the fluorescent Leishmania infects the same host cell. Also, in general, the *L. infantum chagasi*-RFP seems to benefit from the mixed infection. These findings highlight the potential applicability of the new *L. infantum chagasi*-RFP assay in drug screening and may assist in developing new treatments for leishmaniasis.

Keywords: Fluorescent *Leishmania*, *Leishmania infantum chagasi*-RFP, *Leishmania braziliensis*-GFP, mixed infection, phenotypic screening.

1. Introduction:

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. These parasites can generate a spectrum of diseases in humans, ranging from tegumentary forms to localized, mucocutaneous or disseminated skin lesions and visceral forms of infection. The visceral form can be lethal if left untreated and *Leishmania infantum chagasi* is the main species responsible for the visceral Leishmaniasis (VL) and zoonotic leishmaniasis in various countries within the Americas. (Marcili et al., 2014; World Health Organization, 2019). *Leishmania braziliensis* is the most prevalent species implicated in the epidemiological cycle of tegumentary leishmaniasis (TL) in the New World (Falqueto et al., 2003; Feitosa et al., 2012). Visceral Leishmaniasis (VL) and tegumentary leishmaniasis (TL) are zoonoses of great importance for public health. The control of leishmaniasis is a relatively complex task, particularly in areas where both the tegumentary and visceral forms of the disease coexist (Madeira et al., 2006; Neto, Marzochi, & Grimaldi, 1986; Pires, Madeira, Bittencourt, & Pacheco, 2014). Leishmaniasis treatments use a limited arsenal of chemotherapy medications (pentavalent antimonial, miltefosine, amphotericin B deoxycholate, amphotericin B, liposomal amphotericin B, and paromomycin). However, these drugs present problems, such as high toxicity, high cost, administration by intravenous infusion (except for miltefosine), need for long-term treatments, which often leads patients to abandon the treatment and parasites to develop drug resistance (Aronson et al., 2017; Kumar & Engwerda, 2014; Uliana, Trinconi, & Coelho, 2018). In general, antimonial pentavalent has been used as a primary treatment and amphotericin B is the second drug used to treat leishmaniasis. However, drug resistance and treatment failure in leishmaniasis is considered a 21st-century challenge due to increasing problems with multifactorial causes. (Ponte-Sucre et al., 2017). In this context, the need for the development of new drugs and treatments with special efforts to achieve interventions that could be oral, safe, effective, have low cost, and can apply for short-time treatment is urgent (Burza, Croft, & Boelaert, 2018; Ponte-Sucre et al., 2017).

It is important to be aware that there are natural mixed infections with more than one species of *Leishmania*. The overlapping transmission of TL caused by *L. braziliensis* and VL caused by *L. infantum chagasi* has been observed in various regions of Brazil and mixed cases of infection have been reported in dogs, rodents, horses, and even humans (Alves Souza et al., 2019; Madeira et al., 2006; Neto et al., 1986; Pires et al.,

2014; Soares et al., 2013). Leishmania/HIV co-infection has been notified in over 34 countries worldwide. A mixed leishmania infection was also described in an immunosuppressed patient with HIV/AIDS in a recent case report, who was not responding to anti-Leishmania treatment (Badirzadeh et al., 2018; Lauletta, Cunha, & Queiroz, 2016). In this context, it is significant to consider Leishmania mixed infection since it demonstrates the potential to influence the epidemiology of the associated diseases, clinical outcomes, causes of drug resistance, and even the success or failure of treatments.

The development of new interventions usually includes *in vitro* trials (phenotypic assays) for new potential compounds. The application of Leishmania fluorescent is a solid alternative that has been used by various species of Leishmania and on multiple platforms (Bolhassani et al., 2011; Calvo-Álvarez et al., 2012; Pulido et al., 2012). The fluorescent *Leishmania in vitro* assays stands out among other techniques, mainly due to their lower cost, higher sensibility, low toxicity, fast assay with no need of substrate for revelation, and other manipulations that could affect the assays.

Recently, our research group developed a strain of *L. braziliensis* expressing the Green Fluorescent Protein (GFP-*L. braziliensis*) using a transfection cassette from the *Leishmania tarentolae* heterologous expression system (LEXSY - Jena Bioscience) (da Silva et al., 2020)(Bastos et al., 2017). The LEXSY system has several plasmids utilized to transfect and integrate the genes of interest in the 18S subunit locus of *Leishmania* ribosomal DNA, which leads to constitutive or inducible expression of the recombinant cassette (genes/proteins) (Breitling et al., 2002; de Oliveira et al., 2019). Although we managed to obtain and use GFP-*L. braziliensis* in an *in vitro* drug trial, we observed that for the fluorometric plate test, the GFP channel was affected by the intrinsic green fluorescence of the macrophage, which required us to measure GFP fluorescence after recovering promastigotes derived from intracellular amastigotes. (Bastos et al., 2017). To avoid this problem we developed a red fluorescent strain. *L. infantum* (*L. infantum*-RFP) and standardized a simple alternative method of *in vitro* drug testing, using a 96-well plate spectrofluorometer and amphotericin B, also known as antileishmanial drug. Additionally, we used the GFP-*L. braziliensis* (Bastos, 2017) and *L. infantum chagasi*-RFP to analyze mixed infection of macrophages (MØ) by Flow Cytometry (FC) method.

2. Materials and Methods:

2.1. Parasites strains and mammalian host cell

promastigotes of *L. infantum chagasi* reference strain MHOM/BR/1974/M2682 (called here as *L. infantum* WT), MHOM/BR/1974/M2682-RFP (*L. infantum*- RFP) and *L. braziliensis* MHOM/BR/1975/M2904-GFP (*L. braziliensis*- GFP-) were kept at 25°C in Grace's medium supplemented by 20% inactivated fetal bovine serum(FBS) (LGC Biotecnologia, SP, Brazil), L-glutamine (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) and penicillin (100 µg/mL) (USB Corporation, OH, USA). The 264.7 raw murine macrophage cells were at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI medium (RPMI1640, Sigma, MO, USA) supplemented by 10% inactivated FBS (LGC Biotecnologia, SP, Brazil), L-glutamine (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) and penicillin (100 µg/ml) (USB Corporation, OH, USA).

2.2. Transfection and growth

The total of 1×10^7 cells of *L. infantum* WT were transfected with 5 µg of *Swa* I digested vector using the integrative constitutive pLEXSY-cherry-sat2 that carries the red fluorescent protein mCherry (Jena Bioscience, Thuringia, Germany) following the manufacturer's recommendations. The transfected cells were selected using 100 µg/mL nourseothricin in a liquid medium (Grace's supplement, as cited above). The cells stayed incubated for ten days at 25°C. The recovery of cells was checked daily by evaluating the RFP fluorescence under an EVOS fluorescence microscope (Life Technologies, CA, USA). For the selection of single clones, we did a limiting dilution assay in a 96-well plate using the transfected polyclonal cells previously selected with an antibiotic.

2.3. Growth curve

For the growth curve, 1×10^5 /mL from logarithmic phase WT-promastigotes M2682 and isolated M2682-RFP clone of *L. infantum* grown in three independent bottles with 10 mL of Grace's medium. The bottles stayed at 25°C in a BOD chamber. All samples were diluted 40 times in 4% v/v formalin and counted daily, using the Neubauer chamber, for a period of eight consecutive days.

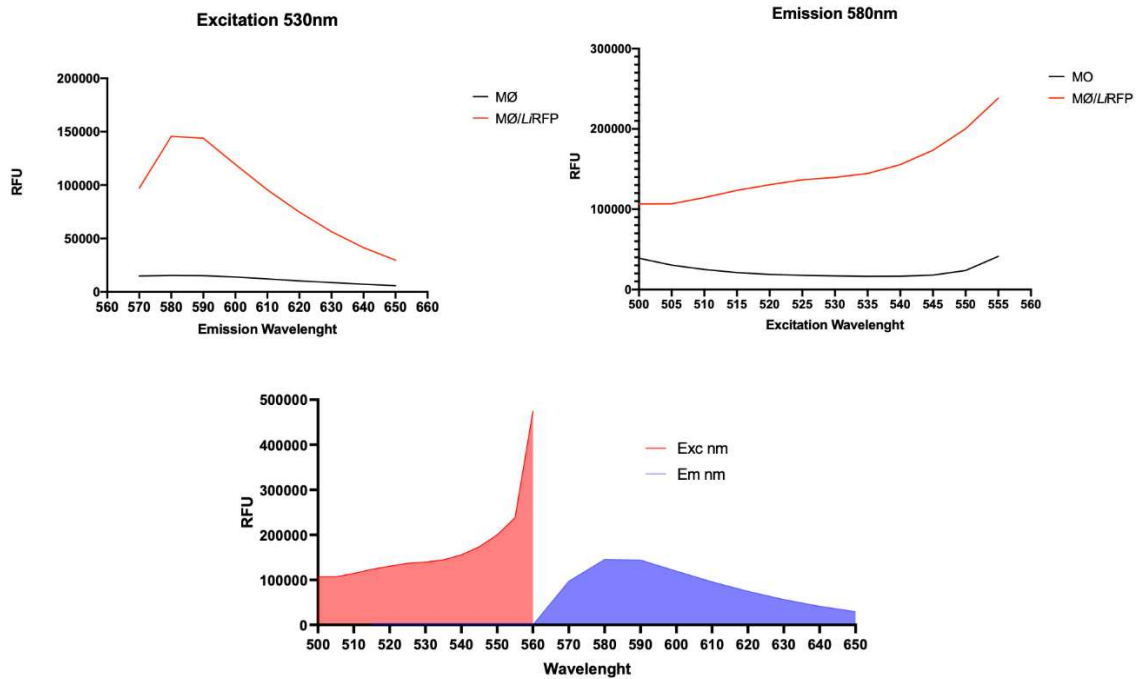
2.4. Macrophage Toxicity assay

For this trial, we used Amphotericin B (AmphB) as a leishmanicidal compound, and the resazurin method, seen in Bastos (2017), determined its cytotoxicity. The amount of 5×10^4 MØ/well was seeded in a 96-well plate. Different concentrations of AmphB (A2942 - Sigma, MO, USA) were tested in uninfected MØ 13.35 µg/mL (14.5 µM); 6.67 µg/mL (7.25 µM); 3.33 µg/mL (3.63 µM); 1.67 µg/mL (1.81 µM); 0.67 µg/mL (0.72 µM); 0.33 µg/mL (0.36 µM); 0.17 µg/mL (0.18 µM); 0.07 µg/mL (0.07 µM); 66,70 ng/mL (0.007 µM); and 0.67 ng/mL (0.71 nM). We did the readings using the Molecular Devices Spectramax M5, at 570 nm (excitation) and 600 nm (emission), with an hour interval, and the measurements ended within three hours. These experiments took place in three independent specimens. Each replicate had three internal replicates (three wells per concentration).

2.5 Standardization of *in vitro* MØ infection and drug testing method

Initially, we standardized the optimal number of MØ and *L. infantum chagasi*-RFP promastigote ratios for the onset of infection. MØ cultivated as described above and kept in 50 mL bottles for two days and *L. infantum chagasi*-RFP was cultured, as will be described below. The infections were performed in 96-well plates. We used *L. infantum chagasi*-RFP promastigotes in the stationary phase (seven days of growth). We tested different ratios of *Leishmania*/MØ (2/1, 5/1, 10/1, 15/1, 20/1 and 30/1). We also tested the best macrophage concentration/well (2.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5). In each well, with 200 µL of RPMI, we added 10% of SFB medium and assembled the plates with one of these three MØ concentrations. The cells stayed incubated for five hours, under 37 °C, and 5% CO₂ for adhesion to the plate. We replaced the RPMI medium with a new one and used the infection of MØ with *L. infantum*-RFP promastigotes at different ratios. Plates were incubated at 37 °C/24 h and 5% CO₂. Next, the plates were washed three times with RPMI. Then we analyzed the 24-hour and 48-hour samples. Later, the treatment took place during one of the following times: 24 h, 48 h, 72 h. The procedures were accorded using 0.72 µM Amph B (A2942 - Sigma, MO, USA) diluted in sterile deionized water. Internal controls were performed using uninfected MØ and infected MØ, both without any treatment. The results showed a fluorescence intensity of the control samples (non-infected and infected MØ with no Amph B). For the measurements, we used a microplate reader (Spectramax M5) at 530 nm (excitation) and 580 nm (emission). The best excitation/emission wavelengths were obtained, as

described above, by spectrum scan analyses (Supplementary Figure 1). These trials were independent triplicates with internal triplicates of each sample. In the end, we calculated the statistics by applying the ANOVA two-way test using GraphPad Prism Version.



Supplementary Figure 1. Wavelength spectra analysis of uninfected macrophages (MØ) and infected macrophages with fluorescent parasite *L. infantum chagasi*-RFP (MØ/LiRFP)

The cells were put on 96-well plates and used to measure A) the emission spectra at 530 nm of excitation and B) the Excitation spectra at 580 nm of emission. The C) results from the combination of excitation and emission data. We used the data to select a suitable pair of λ excitation/emission to detect the *L. infantum chagasi*-RFP intracellular parasites with the lowest interference of macrophage basal emission of fluorescence. For the λ excitation/emission we chose the 530/580, which is the lowest point of excitation of macrophages and the highest emission plateau of *L. infantum chagasi*-RFP.

2.6. IC50 and IC90 of Amphotericin B (AmphB)

We performed an assay to determine the AmphB (A2942 - Sigma, MO, USA) IC50 and IC90 (the concentration to inhibit parasite infection by 50% and 90%, respectively). To detect the contamination, we used the protocol described above. Amph B was diluted

from the stock solution of 250 µg/mL and tested at the same concentrations described in the MØ toxicity assay. The positive control was the absence of Amph B. For these experiments, we utilized an independent triplicate with the internal triplicate of each sample. To collect the statistics, we applied the ANOVA two-way test using GraphPad Prism Version 8.1 as IC50 and IC90.

2.7. Flow Cytometry analyses of In vitro infection of MØ with *L. infantum chagasi*-RFP and *L. braziliensis*-GFP

We elaborated the individual and mixed infections with a 96-well plate. The amount of 1×10^5 MØ/well in 200 µL per well of RPMI 10% SFB medium we seeded and incubated for 5 hours/37°C and 5% CO₂ for adhesion in the plate. Next, we replaced the RPMI medium with a fresh one, and for the infections, we used *L. infantum chagasi*-RFP and *L. braziliensis*-GFP promastigotes in the stationary phase (seven days of growth). For each species, we added 10/1 Leishmania/MØ ratio per well in a total amount of 20 Leishmanias/MØ. The time of infection was 48 h, and the treatments continued using 0.725 µM Amph B for 48 h. To perform a control for the individuals' infections, we used *L. infantum chagasi*-RFP or *L. braziliensis*-GFP with or without treatment, and for the negative control, we used the uninfected MØ. In addition, we determined the IC50 of Amph B to be the individual infections with *L. infantum chagasi*-RFP amastigotes and *L. braziliensis*-GFP using Flow cytometry (FC). Above there is information about how we executed the infections. The Amph B concentrations were the same as item 2.6. Cells were detached from the surface of the wells as described below and analyzed by FC. We performed each of these experiments in an independent triplicate with the internal triplicate of each sample. For FC, we detached the MØ from the plate using 0.1% of trypsin for 10 min. Next, we transferred the cells to 1.5 mL microtubes, making a pool of each triplicate and centrifuged them for 10 min, at 1500g, and resuspended them in a fresh 10%SFB-RPMI medium. Ten thousand events were obtained for each group, using Flow cytometer BD FCVerse™. The data were analyzed using the FlowJo software system, v10.6.1 (Tree Star, Ashland, OR, USA), and we calculated the IC50 using GraphPad Prism Version 8.1.

3. Results

3.1. Obtention of *L. infantum chagasi*-RFP and comparison of growth curve with the wild type *L. infantum chagasi*.

Aiming to obtain the lineage of *L. infantum chagasi* constitutively expressing the red fluorescent protein (RFP), we used the wild-type strain M2682 and transfected it with the linearized plasmid pLEXSY-mcherry-sat2 that carries the RFP and the gene of resistance to the antibiotic nourseothricin. We selected the transfected cells by limiting dilution in 96-well plates, using selective media, and visualization was done by fluorescence microscopy using the red channel. After the transfection, we isolated five clones of *L. infantum chagasi*-RFP. One of these clones was selected to do all the assays described in this work. To ensure that the transfection did not affect the growth of its clone, we compared it both with the development of the wild-type *L. infantum chagasi*-WT (Figure 1). We can observe in Figure 1 that the insertion of the RFP expression cassette did not affect the *in vitro* growth of *L. infantum chagasi*-RFP promastigotes (Figure 1).

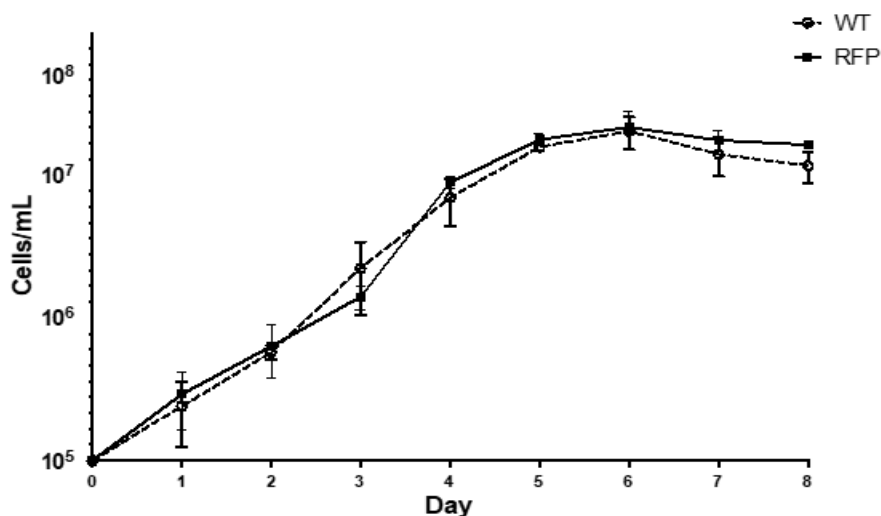


Figure 1. Comparison between the growth curve of promastigotes *L. infantum chagasi*-RFP (RFP) and *L. infantum chagasi* wild type (WT). We cultivated the promastigotes in Grace's medium supplemented with 10% FBS and, the number of parasites per mL of culture was evaluated day by day, during eight consecutive days. The data refer to the Median and Standard Deviation of three independent assays.

3.2. Standardization of the infection and the anti-Leishmanial assay

For the next step, we finish the standardization of the fluorescent in vitro infection anti-Leishmania assay using the new *L. infantum chagasi*-RFP. We obtained the following data during the standardization.

3.2.1 Evaluation of cytotoxicity of AmphB to MØ

We evaluated the cytotoxicity of AmphB to MØ to select one nontoxic concentration that was capable of beginning the standardization of the infection/treatment assay using AmphB as a leishmanicidal compound against *L. infantum chagasi*-RFP. For such a purpose, we used the Resazurin method and tested the range of 0.71 nM to 14.5 µM of AmphB. Figure 2A reveals that AmphB tolerated the MØ in all tested concentrations leading to less than 10% decrement in the resazurin reduction. The concentration of 0.72 µM was chosen to start the standardization of the anti-intracellular amastigote phenotypic assay.

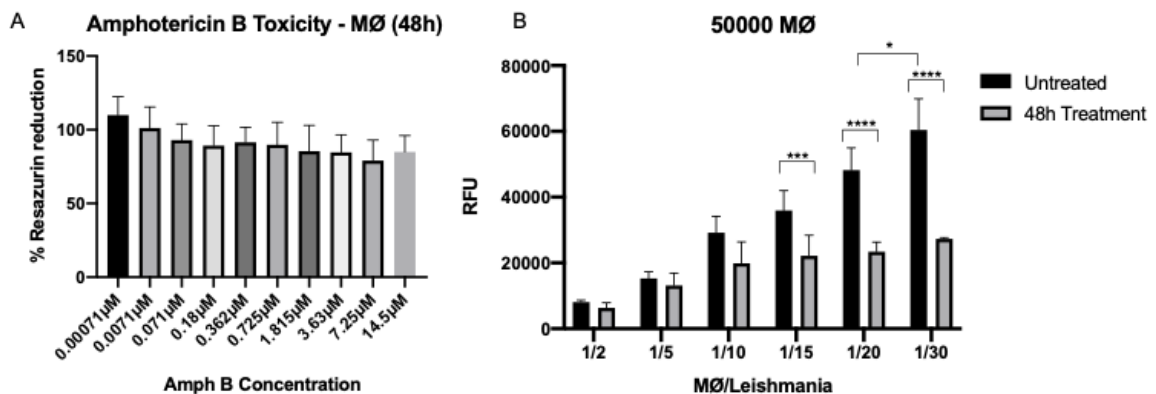
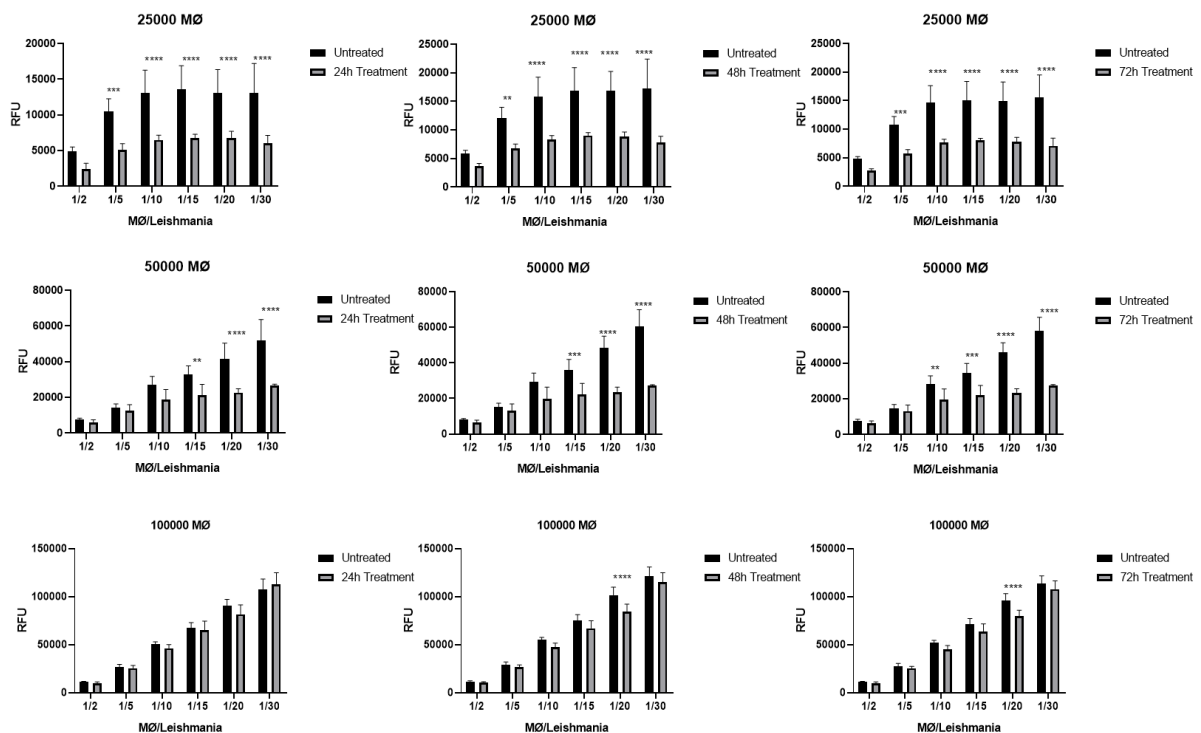


Figure 2. Evaluation of the toxicity of AmphB to MØ and the main assay of the standardization of the in vitro infection assay with *L. infantum chagasi*-RFP. (A) We tested different concentrations of AmphB in uninfected MØ treated for 48h. We used 5×10^4 MØ/well seeded in 96- well plates. We did the readings using the Molecular Devices Spectramax M5 at 570 nm (excitation) and 600 nm (emission) for the resazurin method. (B) Evaluation of RFP fluorescence using distinct proportions of *L. infantum chagasi*-RFP to MØ, in a background of 50,000 MØ and after 24h of infection and 48h treatment with AmphB 0.725 µM. We detected fluorescence of RFP at excitation/emission of 530/580 nm by Molecular Devices Spectramax M5. The data refer to the mean of three individual experiments, each of one with an internal duplicate.

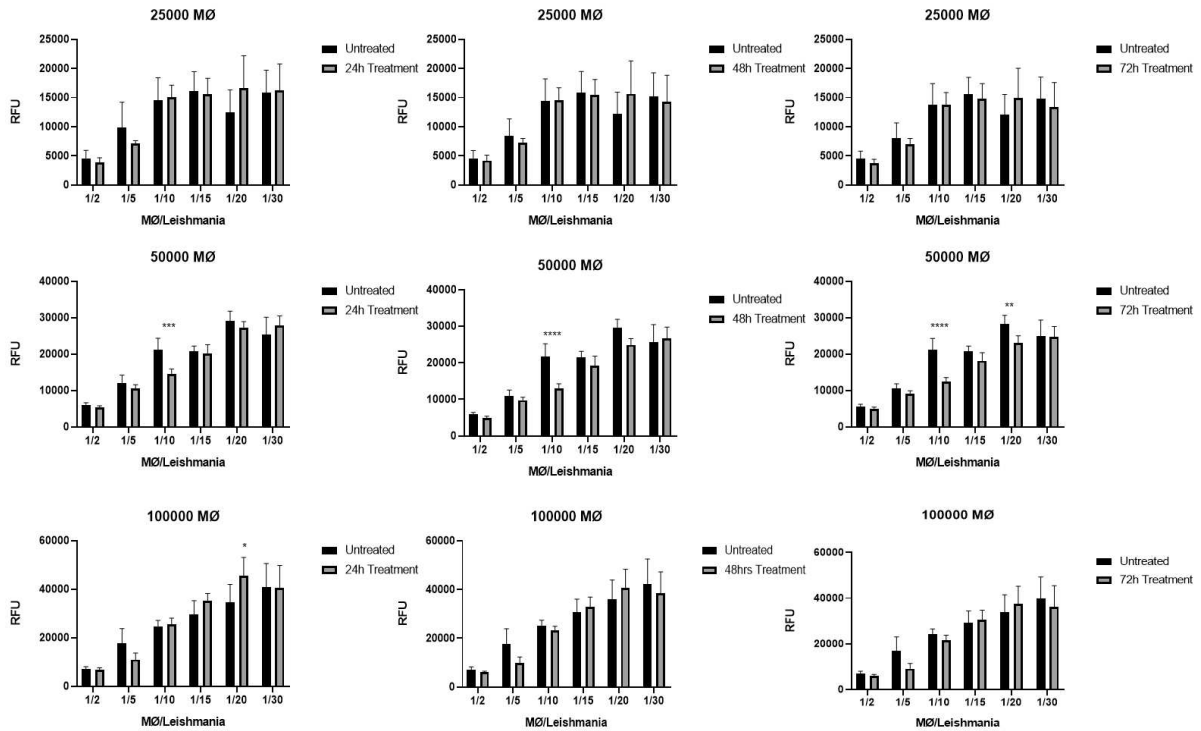
3.2.2 Standardization of the ratio of parasites per MØ, the time of infection and treatment.

The standardization of the *L. infantum chagasi*-RFP drug screening method included evaluating the best proportions of the parasite, the MØ, the time of infection, and the time of treatment. During this process, the aim was to obtain the best infection rate and optimal differences in the fluorescence ratio between the treated and the control samples. Three distinct MØ concentrations per well (25,000; 50,000 and 100,000) and six distinct MØ/Leishmania proportions (1/2, 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30) were tested. We analyzed the combinations after 24h or 48h of infection. The analyses of these assays showed higher differences between the control (untreated) and the treated specimens after 24 h of infection and 48 h of infection using the 1/20 ratio of MØ/Leish (50,000 MØ and 1,000,000 Leishmania) (Figure 2B). We chose the ratio of 1/20 because it demands lesser amounts of cells and lower volumes of a culture of the parasite than 1/30. We observed that fluorescence increases in a dependent manner as the infection proportion increases (Figure 2B). That reveals a direct relation between RFU and the qualitative parasitic load inside the host cell.



Supplementary Figure 2. Standardization of the infection assay for 24h of infection: evaluation of the amount of macrophage and time of treatment. Evaluation of RFP fluorescence using different proportions of *L. infantum chagasi*-RFP and MØ and after 24h of infection and 24h, 48h, or 72h treatment. We used AmphB

0.667 μ g/mL in the treatment. We detected fluorescence of RFP at excitation/emission of 530/580 nm by Molecular Devices Spectramax M5. The data refer to the mean of two individual experiments, each with internal triplicate.



Supplementary Figure 3. Standardization of the infection assay for 48h of infection: evaluation of the amount of macrophage and the time treatment.

Evaluation of RFP fluorescence using different proportions of *L. infantum chagasi*-RFP and MØ and after 48h of infection and 24h, 48h, and 72h treatment. We used AmphB 0.667 μ g/mL in the treatment. We detected fluorescence of RFP at excitation/emission of 530/580 nm by Molecular Devices Spectramax M5. The data refer to the mean of two individual experiments, each with internal triplicate.

3.3 Determination of IC50 and IC90 to the Leishmanicidal reference compound Amph B by 96- wells fluorescence plate infection assay

To better characterize the Plate assay, we did the determination of IC50 and IC90 of Amph B. To do this in the best condition of infection assay described above (after 24 h and 48h of infection using the 1/20 ratio of MØ/Leish) was used to perform the dose-response curves of Amph B in the *L. infantum chagasi*-RFP infection assay (Figure 3A). The calculated IC50 and IC90 of Amph B were 0.69 μ M and 6.24 μ M, respectively. In addition, we applied the same *L. infantum chagasi*-RFP in FC analyses and, the comparison between both methods shows a high correlation with an r-value of 0.83

(as close to 1 stronger is the correlation) (Figure 3C). This data evidences that our method is accurate for drug screening and can apply in both formats, a plate assay or an FC assay.

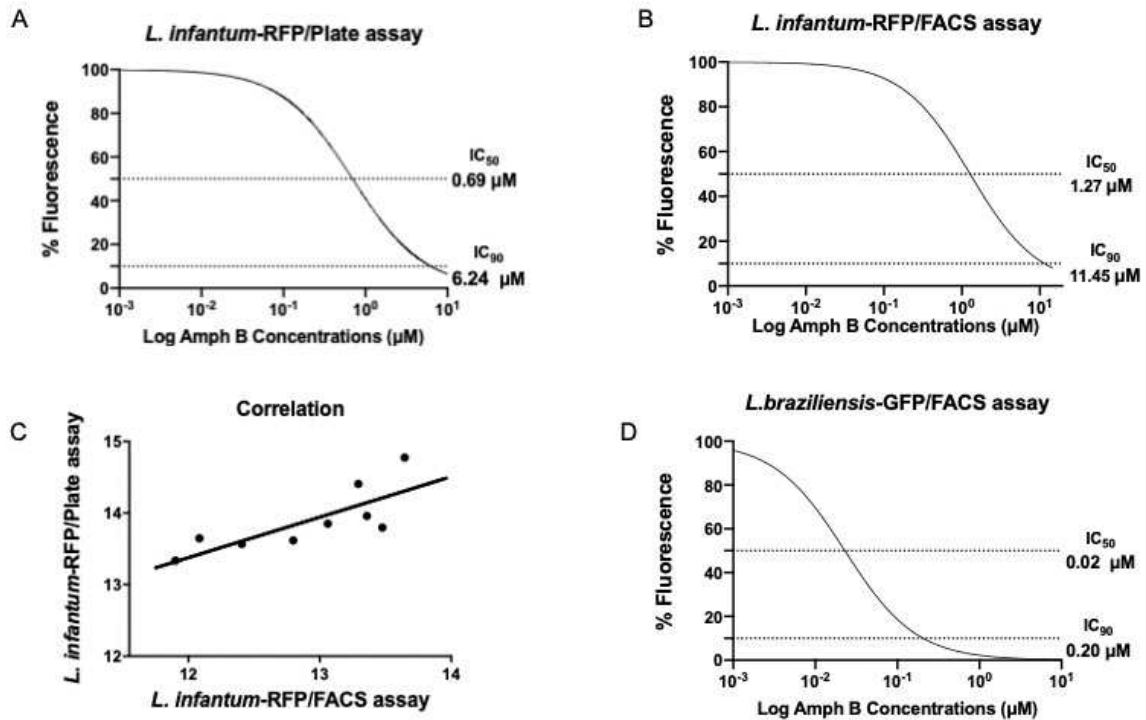


Figure 3. Dose response curve of Amph B in *L. infantum chagasi*-RFP and *L. braziliensis*-GFP during MØ infection. Dose-response curve using different concentrations of Amph B for plate assay and FC assay. (A) *L. infantum chagasi*-RFP-plate assay; (B) *L. infantum chagasi*-RFP/FC; (C) Correlation coefficient analysis between plate assay and FC assay using *L. infantum chagasi*-RFP and (D) *L. braziliensis*-GFP/FC assay. We detected fluorescence of RFP at excitation/emission of 530/580 nm by Molecular Devices Spectramax M5. FC carried out in Flow cytometer BD FCVerse™. We obtained ten thousand events for each preparation, and the data were analyzed using the FlowJo software system, v10.6.1 (Tree Star, Ashland, OR, USA). For calculating the dose-response curves, we used GraphPad Prism Version 8.1 as well as the correlation coefficient.

Next, we did a qualitative analysis of the images of the plate wells using fluorescence microscopy (Figure 4). As expected, several red fluorescent dots were corresponding to *L. infantum chagasi*-RFP amastigotes inside the MØ in the infected and untreated control group (Figure 4B). It is possible to observe that these dots practically disappear

after the treatment with a high concentration (14.5 μM) of AmphB (Figure 4D). In addition, the dots decreased significantly, and the fluorescence seemed to spread when we used an intermediate concentration of AmphB (0.72 nM) (Figure 4C). This data suggests that the intracellular amastigotes are dying, and as a result, the red dots are decreased-0]. On the other hand, when using a limited AmphB concentration (0.71 μM) there is no visual decrease in the RFP spots, compared to the control infected and untreated sample (Figure 4E compared with 4B, respectively).

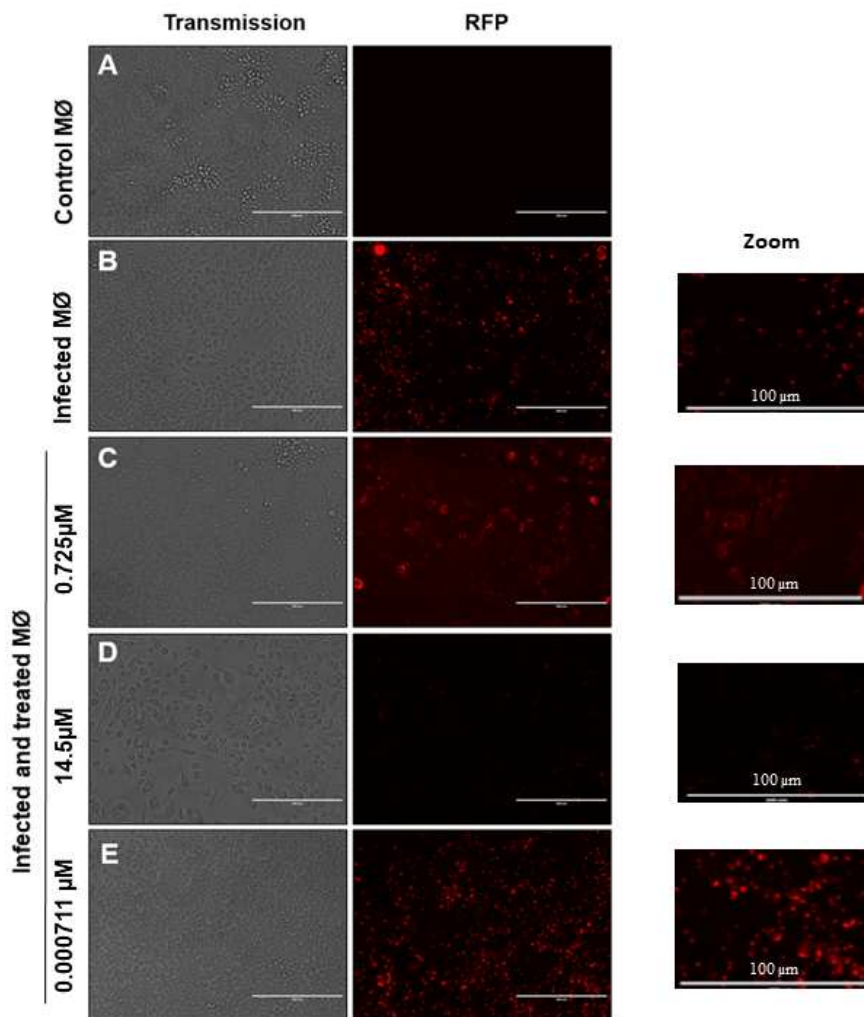


Figure 4. Qualitative analyses of RFP fluorescence during the MØ infection by *L. infantum chagasi*-RFP and after treatment with AmphB. The figure shows the light microscopy images of visualization of MØ and RFP fluorescence from *L. infantum chagasi*-RFP intracellular amastigotes. (A): uninfected MØ ; (B): infected MØ showing the visualization of intracellular fluorescent of amastigotes in the untreated sample; (C): infected and the treated sample showing fluorescence decrease after treatment

with 0.725 μ M of AmphB; (D) very low fluorescence in infected macrophages treated with 14.5 μ M of AmphB and (E) no visible effect of fluorescence when infected macrophages when treated with 0.000711 μ M of AmphB. Scale bar: 100 μ m.

3.4 In vitro mixed infection of MØ by *L. infantum chagasi*-RFP and *L. braziliensis*-GFP.

The in vitro mixed infection is a reality evidenced in natural infection of different hosts and includes several species and strains of Leishmania. To have an alternative assay to evaluate the concomitant treatment with new drugs, we tested the mixed infection and the treatment with AmphB in mixed infection. We did the mixed infections of MØ with *L. infantum chagasi*-RFP (developed in this work) and *L. braziliensis*-GFP (from previous studies of Bastos, 2017). We analyzed these assays using FC instead of fluorescence plate assay because of the interference of MØ natural green fluorescence in the same channel of GFP (Rocha et al., 2013; Bastos, 2017). The FC assay is suitable to evaluate both fluorescences simultaneously because the analyses are done cell by cell, minimizing the interference of macrophage natural green fluorescence. The in vitro mixed infection with Leishmania fluorescent species was successfully done and lead to a total of 20.6% of contagion being 10.37% of *L. braziliensis*-GFP, 7.47% of *L. infantum chagasi*-RFP, and 2.76% of mixed infection (Figure 5E). After the treatment with 0.725 μ M of Amph B in the mixed infected sample, the total infection rate decreased to 9.44% (0.14% from *L. braziliensis*-GFP only, 8.71% from *L. infantum chagasi*-RFP only, and 0.14% from both parasites) (Figure 5F). After treatment, the percentage of MØ positives for *L. braziliensis*-GFP (amount of infected and co-infected) decreases from 13.13% to 0.73% (Figure 5D), a significant difference. However, the percentage of *L. infantum chagasi*-RFP infected MØ decreased in comparison (10.23% to 8.85) (Figure 5D). To better understand what could be happening, we performed the infection and treatment of specific contagion in the same concentration of Amph B used in the mixed infection. The particular treatment showed different sensibility to Amph B at 0.725 μ M is different for each species, killing ~93% of *L. braziliensis*-GFP and ~35% of *L. infantum*-RFP (Figure 5B and 5D). To deeply investigate this difference, we did the IC50 and IC90 determinations by FC. The IC50 value determined from FC for *L. infantum chagasi*-RFP specific infection was 1.27 μ M and 0.02 μ M for *L. braziliensis*-GFP (Figure 3B and 3D). This data reinforces that *L. infantum chagasi*-RFP is lesser sensitive to Amph B. In addition, the behavior of the

fluorescent species concerning the infection ratio changed in mixed infection suggesting, that they are less effective to taint the macrophage when together (compare Figure 5A with 5E and 5B with 5E).

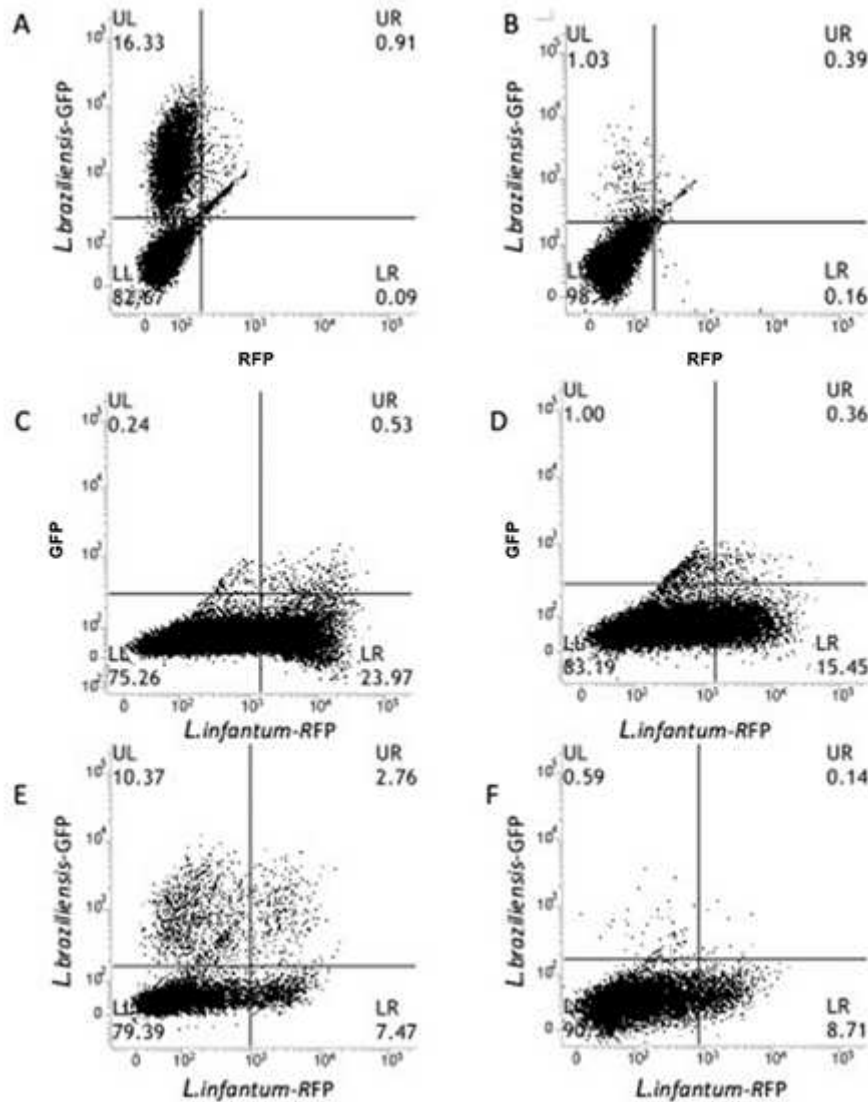


Figure 5. Infection analysis by FC. Macrophages were infected with *L. infantum chagasi*-RFP and/or *L. braziliensis*-GFP and analyzed by FC. (A) MØ infected with *L. braziliensis*-GFP without treatment, (B) MØ infected with *L. braziliensis*-GFP treated with AmphB, (C) MØ infected with *L. infantum chagasi*-RFP without treatment, (D) MØ infected with *L. infantum chagasi*-RFP treated with AmphB during 48 h, (E) Co-infection with both Leishmania species untreated and (F) Co-infection after treatment with AmphB. The quadrants show UL - Macrophages infected with *L. braziliensis*-GFP, UR- Macrophages infected with both species, LR- Infected macrophages with *L. infantum*-

RFP, LL - Uninfected macrophages. We collected a total of 10,000 events for each group.

Discussion:

The chemotherapy of VL and TL are challenges that demand urgent development of new drugs. The treatment depends on a very restricted chemotherapy arsenal, which presents concerns like toxicity, parasite resistance, and the necessity of hospitalization for intravenous administration. In addition, there are no available vaccines for human use (Balaña-Fouce, Pérez Pertejo, Domínguez-Asenjo, Gutiérrez-Corbo, & Reguera, 2019). These factors demonstrate the importance of the continuous search for new treatment alternatives. The search for new drugs might accelerate by using faster and simpler methods. Our group previously developed a strain of *L. braziliensis* expressing GFP as a compound screening (BASTOS et al., 2017). However, we noted that we still needed a filter to test compounds against VL. Thus, we sought to develop a filter of *L. infantum* expressing a fluorescent protein, and we choose the RFP instead of GFP since the MØ have high basal natural green fluorescence, which impairs the measurements of the infection directly to the infected MØ culture in the plate assay (BASTOS et al., 2017; ROCHA, 2013). In this work, we demonstrated that the transfection with the RFP reporter gene did not affect parasite growth (Figure 1), which is very important because this result evidenced that the general behavior of the transfected *L. infantum chagasi*-RFP is the same as the wild type and its use saves time in the screening process. Using Amph B as a drug/compound, we standardized an easy direct in-house 96-well Plate assay method (Figure 2). The production of fluorescent *L. infantum* per se is not a novelty as the constitutive fluorescent protein expression we used LEXSY cassette to transfect different species of *Leishmania*, but the use of RFP instead of GFP is a novelty that could improve in vitro infection screening assays avoiding the interference of the natural fluorescence of macrophages previously demonstrated (Balanã-Force et al., 2012; Bastos et al., 2017; Bolhassani et al., 2011).

As we comprehend, phenotypic screening based on intracellular parasite infections is considered the first tool of antileishmanial drug discovery (Balaña-Force et al., 2019). In this study, we went through the standardization of the fluorescent phenotypic plate assay method, which may assist other groups to replicate phenotypic assays to other compounds or parasites (Figures 2 and 3 and Supplementary figures 2 and 3).

Regarding the quality of the phenotypic assay, we tested it by Plate assay, and FC showed a high correlation between them (Figure 3) reinforcing the potential to be reproduced.

The FC analysis of infection allowed us to study the mixed infection. In the tested conditions, *L. infantum chagasi*-RFP showed to be more resistant to Amph B than *L. braziliensis*-GFP. We confirmed this hypothesis by IC50 determination by FC (Figure 3B and 3D). Both species have distinct biological properties and epidemiologic features, also both are mentioned as etiologic agents of Leishmaniasis (WHO, 2019). Natural infection with more than one Leishmania species seems to be more prevalent than reported where the two species overlap their endemicity (Alves Souza et al., 2019a; Babiker et al., 2014; Ibrahim, Smyth, Ali, Barker, & Kharazmi, 1994; Madeira et al., 2006; Martinez, Mollinedo, Torrez, Muñoz, & Bañuls, 2002; Neto et al., 1986; Pires et al., 2014). Here, we show that, at least in vitro conditions, mixed infections, described by the presence of MØ infected by only one of the species and by concomitant infection by the two species in the same cell (Figure 5E). As far as we know, there is no previous report of the presence of both species (*L. infantum* and *L. braziliensis*) infecting simultaneous the same host cell maybe this is due to the difficulty to differentiates the species of Leishmania with the conventional screening techniques (direct observation at light microscopy, cell staining, etc.). In addition, in the mixed infection treated with Amph B, we observed that *L. infantum chagasi*-RFP positive MØ decreased less the specific infection rate than that from *L. braziliensis*-GFP that was almost 0% after treatment. This data indicates that *L. braziliensis*-GFP is more sensible to Amph B. Using FC, *L. braziliensis*-GFP showed a lower IC50 value (0.02 µM) than *L. infantum chagasi*-RFP (1.27 µM). There is scarce information in the literature about mixed infection by more than one Leishmania species, but as demonstrated in simultaneous cultivation of more than one Leishmania species, the dominant species tend to inhibit the growth of the other (Pacheco, Grimaldi Júnior, & Morel, 1987). Our data evidenced that when alone both species seem to be more effective than in mixed infection (Figure 5A, 5C, and 5E). However, in both cases, the MØ infection rate stayed near 20% Statistics suggest that when jointly, the different species could compete by the same receptor at the host cell. In addition, we observed that when the infection is a mixed one, the *L. infantum chagasi*-RFP changes its sensibility to Amph B as in Figures 5C-5F the treatment in mixed infection killed only 13.5% of these parasites, about half of when alone. These results provide evidence that, at least in vitro assay

using fluorescent Leishmania, the sensibility to Amph B could be different for the species when it is alone or in mixed infection. The IC50 value was highly different between Leishmania species (*L. braziliensis*-GFP was 50 times more sensitive to Amph B than *L. infantum*-RFP). In blended contamination, it appears that Amph B acts initially in the most sensitive species. De Lima Celeste (2017) showed that hamsters with mixed infections by *L. infantum* and *L. amazonensis* developed a more severe clinical disease when compared with single contamination. Martinez (2002) observed several Leishmania species (*L. amazonensis* and *L. infantum*/*L. chagasi*) in the same lesion. Our data support the idea that *L. infantum* could be benefited by mixed infection. These findings show a possible implication for treating natural mixed infection, at least concerning alternative the most appropriate doses of the drug used in therapy and considering the possibility that the parasites could develop resistance to the drugs in sublethal measure to one of the species. Despite that, as we worked with transfected fluorescent strains and in vitro assays, it was necessary to investigate the natural strains and infections.

Conclusion: We developed a new red fluorescent strain of *L. infantum chagasi* and demonstrated its use in a 96 well-plate phenotypic assay. The method is an easy, direct, and fast technique for in vitro screening of drugs with the potential application against visceral leishmaniasis. In addition, we evaluate mixed infection by two fluorescent *Leishmania* (GFP-*L. braziliensis* and RFP-*L. infantum*). The mixed infection showed that the different Leishmania species can co-infect the same host cell and that *L. infantum chagasi* is less susceptible to Amph B. In addition, we evidenced that *L. infantum chagasi* was benefited by the mixed infection. These findings can have implications for the treatment of natural mixed infection.

Competing Interests: The authors declare that there is no conflict of interests.

Sponsorships: The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Núcleo de Microscopia e Microanálises from Universidade Federal de Viçosa. This study was sponsored in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Grant Code 001.

Competing Interests: The authors declare that there is no conflict of interests.

References

- Alves Souza, N., Souza Leite, R., de Oliveira Silva, S., Groenner Penna, M., Figueiredo Felicori Vilela, L., Melo, M. N., & de Andrade, A. S. R. (2019b). Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Tropica*, 193, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., ... Magill, A. (2017). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Babiker, A. M., Ravagnan, S., Fusaro, A., Hassan, M. M., Bakheit, S. M., Mukhtar, M. M., ... Capelli, G. (2014). Concomitant infection with leishmania donovani and L. major in single ulcers of cutaneous leishmaniasis patients from sudan. *Journal of Tropical Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/170859>
- Badirzadeh, A., Mohebbali, M., Sabzevari, S., Ghafoori, M., Arzamani, K., Seyyedini, M., & Hashemi, S. A. (2018). Case Report: First coinfection report of mixed leishmania infantum/leishmania major and human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome: Report of a case of disseminated cutaneous Leishmaniasis in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 122–125. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0490>
- Balaña-Fouce, R., Pérez Pertejo, M. Y., Domínguez-Asenjo, B., Gutiérrez-Corbo, C., & Reguera, R. M. (2019). Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, 24(5), 1209–1216. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.007>
- Balanã-Fouce, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Cushman, M., Pommier, Y., Álvarez-Velilla, R., ... Reguera, R. M. (2012). Indotecan (LMP400) and AM13-55: Two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5264–5270. <https://doi.org/10.1128/AAC.00499-12>
- Bastos, M. S., de Souza, L. Â., Onofre, T. S., Silva-Júnior, A., de Almeida, M. R., Bressan, G. C., & Fietto, J. L. R. (2017). Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp leishmania Braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(2), 155–159. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160237>

- Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., ... Rafati, S. (2011). Fluorescent Leishmania species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology*, 127(3), 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.12.006>
- Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Contreras, R., Geyer, A., ... Alexandrov, K. (2002). *Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production*. 25, 209–218. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00001-3](https://doi.org/doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00001-3)
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Calvo-Álvarez, E., Guerrero, N. A., Álvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Punzón, C., ... Reguera, R. M. (2012). Appraisal of a Leishmania major Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both In Vitro and In Vivo Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001927>
- da Silva, W., da Rocha Torres, N., de Melo Agripino, J., da Silva, V. H. F., de Souza, A. C. A., Ribeiro, I. C., ... Fietto, J. L. R. (2020). ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(3), 213–226. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201005125146>
- DE LIMA CELESTE, J. L., VENUTO MOURA, A. P., FRANÇA-SILVA, J. C., MATOS DE SOUSA, G., OLIVEIRA SILVA, S., NORMA MELO, M., ... MONTEIRO DE ANDRADE, H. (2017). Experimental mixed infection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (L .) infantum in hamsters (Mesocricetus auratus). *Parasitology*, 144(9), 1191–1202. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000464>
- de Oliveira, T. A., Silva, W. da, da Rocha Torres, N., Badaró de Moraes, J. V., Senra, R. L., de Oliveira Mendes, T. A., ... Fietto, J. L. R. (2019). Application of the LEXSY Leishmania tarentolae system as a recombinant protein expression platform: A review. *Process Biochemistry*, 87(November 2018), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.019>
- Falqueto, A., Sessa, P. A., Ferreira, A. L., Vieira, V. P., Santos, C. B., Varejão, J. B. M., ... Grimaldi, G. (2003). Epidemiological and Clinical Features of Leishmania (Viannia) braziliensis American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the

- State of Espírito Santo, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(8), 1003–1010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000800004>
- Feitosa, F. L. F., Leal, J., Mendes, L. C. N., Peiró, J. R., Perri, S. H. V., de Lima, V. M. F., & Marcondes, M. (2012). Estudo soroepidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 49(6), 500–502. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v49i6p500-502>
- Ibrahim, M. E., Smyth, A. J., Ali, M. H., Barker, D. C., & Kharazmi, A. (1994). The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Tropica*, 57(4), 327–332. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90078-7)
- Kumar, R., & Engwerda, C. (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, 3(3), e13. <https://doi.org/10.1038/cti.2014.4>
- Lauletta, J. A., Cunha, M. A., & Queiroz, I. T. (2016). *Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges*. 147–156.
- Madeira, M. F., Schubach, A., Schubach, T. M. P., Pacheco, R. S., Oliveira, F. S., Pereira, S. A., ... Marzochi, M. C. A. (2006). Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(5), 442–445. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.011>
- Marcili, A., Sperança, M. A., da Costa, A. P., Madeira, M. de F., Soares, H. S., Sanches, C. de O. C. C., ... Gennari, S. M. (2014). Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.001>
- Martinez, E., Mollinedo, S., Torrez, M., Muñoz, M., & Bañuls, A. L. (2002). Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 529–532. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90428-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90428-1)
- Neto, M. P. O., Marzochi, M. C. A., & Grimaldi, G. (1986). Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 80(6), 587–592. <https://doi.org/10.1080/00034983.1986.11812072>

- Pacheco, R. S., Grimaldi Júnior, G., & Morel, C. M. (1987). Inhibition of growth of *Leishmania mexicana mexicana* by *Leishmania mexicana amazonensis* during “in vitro” co-cultivation. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 82, pp. 537–542. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761987000400011>
- Pires, M. Q., Madeira, M. de F., Bittencourt, V. R. E. P., & Pacheco, R. da S. (2014). Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: Evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), 243–246. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2013>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., ... Papadopoulos, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Pulido, S. A., Muñoz, D. L., Restrepo, A. M., Mesa, C. V., Alzate, J. F., Vélez, I. D., & Robledo, S. M. (2012). Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. *Acta Tropica*, 122(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.015>
- Rocha, M. N., Corrêa, C. M., Melo, M. N., Beverley, S. M., Martins-Filho, O. A., Madureira, A. P., & Soares, R. P. (2013). An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.018>
- Soares, I. R., Silva, S. O., Moreira, F. M., Prado, L. G., Fantini, P., Maranhão, R. de P. A., ... Palhares, M. S. (2013). First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4), 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.014>
- Uliana, S. R. B., Trinconi, C. T., & Coelho, A. C. (2018). Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. *Parasitology*, 145(4), 464–480. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002523>
- World Health Organization. (2019). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Retrieved from http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Capítulo II

Triagem de compostos inibidores da rLiNTPDase2 e seus efeitos sobre a infecção de Macrófagos por *Leishmania infatum* *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades de caráter zoonótico causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e geram um espectro de doenças em seres humanos variando de lesões cutâneas localizadas a lesões disseminadas e infecção visceral que pode ser letal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

A forma visceral é a mais grave sendo uma doença sistêmica, podendo ser assintomática, apresentar sintomas moderados ou até mesmo levar a óbito. Os principais sintomas são: febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal, edemas e ascite. O principal agente etiológico da leishmaniose visceral no novo mundo é *Leishmania infantum* enquanto no velho mundo este papel cabe à espécie *L. donovani* (DANTAS-TORRES et al., 2010; MARZOCHI et al., 2009)

O protozoário é transmitido através da picada de insetos do gênero *Lutzomyia*. Os cães são considerados os principais reservatórios do parasito em grandes centros urbanos, contribuindo para a disseminação da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Existem poucas drogas atualmente disponíveis para tratamento de Leishmanioses, sendo assim, para evitar que cepas de parasitos resistentes a esses medicamentos surjam, estas poucas drogas atualmente disponíveis no Brasil têm seu uso vetado para tratamento animal. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O tratamento da leishmaniose visceral faz uso de um arsenal limitado de quimioterápicos, as drogas mais utilizadas são os antimoniais pentavalentes, miltefosina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e paramomicina. Porém estas drogas possuem problemas de sua utilização como: alta toxicidade, alto custo, via de administração por infusão intravenosa e tempo longo de tratamento que muitas vezes leva ao abandono do mesmo por parte do paciente e desenvolvimento de resistência do parasito ao fármaco (DNDI, 2020)

O surgimento de novas alternativas de tratamento, diagnóstico e prevenção partem da compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção como o estudo de moléculas alvo importantes para o estabelecimento da infecção, e do uso de tecnologias modernas para a busca de novas drogas como o uso de linhagens fluorescentes de *Leishmania* que podem facilitar a busca por novas drogas.

Dentre as potenciais moléculas alvos em parasitos do gênero leishmania, podemos citar as ecto-nucleotidasas da família das Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDase EC 3.6.1.5) (figura 1), também chamadas de NTPDases ou apyrases da família do CD39. Estas nucleotidasas são enzimas dependentes de cátions divalentes, capazes de hidrolisar nucleosídeos di e trifosfatados em nucleosídeos monofosfatados. Em mamíferos estão presentes em todos os tecidos, além de serem encontradas em invertebrados, plantas leveduras, protozoários e ao menos em uma bactéria (SANSOM et al., 2007; ZIMMERMANN, 2000).

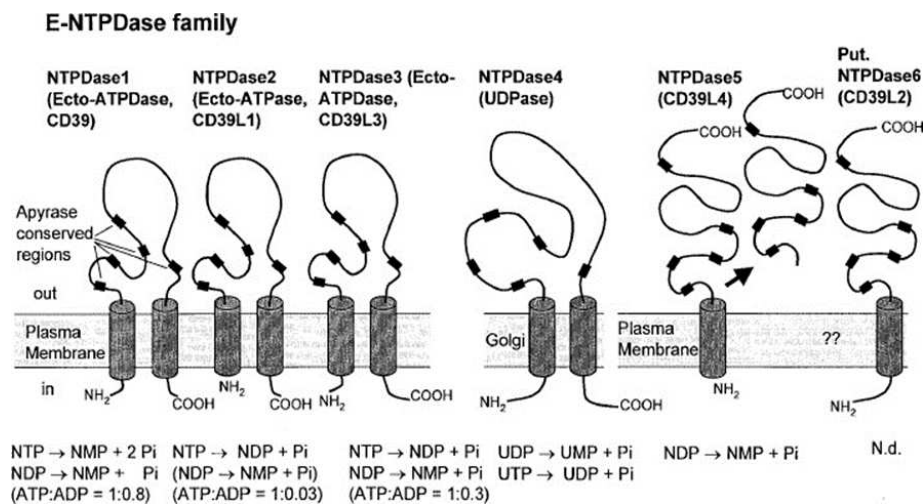


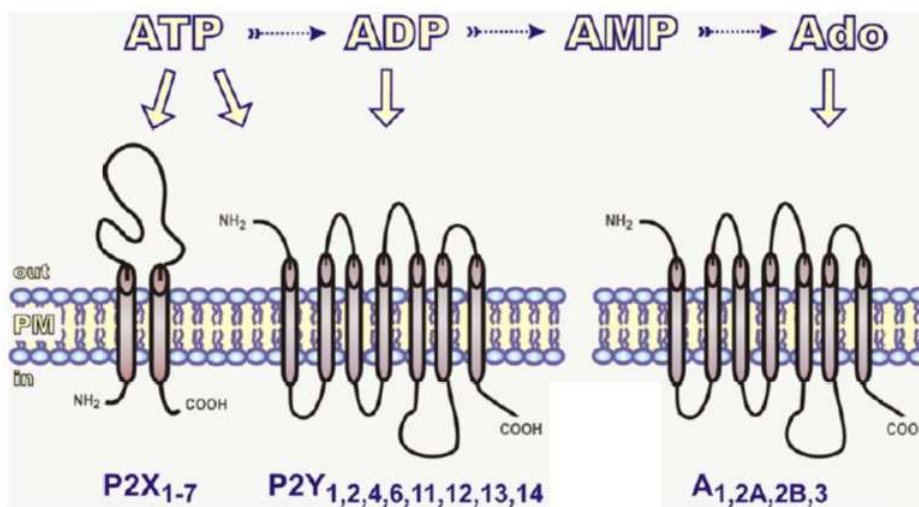
Figura 1: Membros da família E-NTPDase, a figura demonstra a localização na membrana predita e as propriedades catalíticas das NTPDases de mamíferos. Estas enzimas podem ocorrer em única ou dupla passagem pela membrana ou na forma solúvel (seta indica sítio de proteólise). Nomes previamente usados estão em parênteses. Fonte: Zimmermann, 2000.

Entre as funções das NTPDases está a regulação da concentração de nucleotídeos extracelulares participando na sinalização purinérgica, adesão celular, reciclagem de purinas e regulação da homeostase vascular (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

Hoje sabe-se da participação das NTPDases em associação com a enzima 5' ectonucleotidase. As NTPDases atuam convertendo nucleotídeos ATP em ADP e ADP em AMP que irá servir como substrato para geração de adenosina pela 5' ectonucleotidase. (DEAGLIO et al., 2007).

Diversos trabalhos vêm demonstrando o papel das ectonucleotidases e nucleotídeos extracelulares na promoção de respostas celulares, por exemplo: células linfocitárias expressam uma série de ligantes de ATP e outros nucleotídeos, denominados purinoreceptores que são necessários para a secreção de algumas citocinas inflamatórias como IL-2 e INF γ . Além disso, a migração de neutrófilos induzida por IL-8 é potencializada na presença de ATP (CEKIC; LINDEN, 2016). Por outro lado, a adenosina ao interagir com receptores purinérgicos do tipo P1, contribui para a anergia de células T regulatórias e na supressão da resposta imune em outros tipos de linfócitos T (DEAGLIO et al., 2007).

Os purinoreceptores são proteínas integrais de membrana que ao reconhecerem seu ligante desencadeiam uma série de sinais para o interior da célula culminando em diferentes respostas celulares (figura 2). Destes receptores quatro são receptores acoplados a proteína G ligantes de adenosina e denominados receptores P1 e são subdivididos em A1, A2A, A2B e A3, enquanto os receptores P2 são divididos em dois grupos: os tipo canal (P2X) e os acoplados a proteína G (P2Y) (LAZAROWSKI, 2003;



ROBSON; SÉVIGNY

Figura 2: Receptores purinérgicos e seus ligantes (Yegutkin, 2008). A imagem mostra os tipos de receptores purinérgicos e suas moléculas ativadoras principais.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo inibidores para a NTPDase1 de *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase1), agente causador da Doença de Chagas. A partir de um screening de moléculas naturais e compostos sintéticos foi selecionado um composto com atividade inibitória de praticamente 100% sobre a TcNTPDase1, este

inibidor foi denominado à época composto CIII-L que é a forma L da quercetina. Porém o composto, por ter sido extraído de extrato de planta não era disponível em quantidades suficientes para continuidade de testes biológicos e além disto apresentou instabilidade após solubilização, precipitando. Assim, em parceria com o grupo do Professor Gaspar Diaz Muñoz (UFMG) foi feita a síntese do composto CIII-L a partir do composto comercial Quercetina e este e os intermediários de síntese foram testados como possíveis inibidores da TcNTPDase1. Os resultados apontaram 4 compostos como inibidores desta enzima (IL-05, 09, 18 e 24). Além disso, alguns desses compostos conseguiram diminuir significativamente a mobilidade do parasito (MARIOTINI-MOURA, 2014; RIBEIRO, 2018).

Assim, nosso grupo resolveu testar a capacidade destes compostos de inibir ENTPDases de outros tripanossomatídeos. Considerando que *L. infantum* é um tripanosomatídeo, que possui duas ENTPDases (LiNTPDase1 e LiNTPDase2) e que a LiNTPDase2 se mostrou importante para a adesão e infecção em macrófagos (VASCONCELLOS, 2014) neste trabalho avaliamos a ação dos inibidores da TcNTPDase1 na LiNTPDase2 recombinante (rLiNTPDase2). Esta parte deste trabalho visa a triagem destes compostos em ensaios de infecção por *Leishmania infantum*-RFP utilizando macrófagos RAW 264.7 *in vitro* e avaliação como potenciais inibidores da rLiNTPDase2.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura dos parasitos de *L. infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum* cepa (M2682) foram cultivadas partindo de cultura com densidade celular de 1×10^5 células/mL em meio *Grace's Insect Medium* suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (previamente inativado a $56^\circ\text{C}/30$ min), 2 mM L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G potássica, pH 6,8, a 25°C .

2.2 Cultivo de macrófagos

Macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultivo utilizado foi o RPMI-1640 (Sigma), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), 2mM de L-glutamina (Serva), 2 g/L de bicarbonato de sódio, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (USB Corporation).

2.3 Triagem *in vitro* de compostos Leishmanicidas utilizando Macrófagos infectados por *Leishmania infatum*-RFP

A infecção ocorreu conforme explicado no capítulo 1. Foram utilizados 5x10⁴ MØ/poço e 20 Leishmanias /MØ. Todos compostos foram testados utilizando concentração inicial de 10µM, todos compostos foram diluídos em DMSO 100% e aplicados na placa na concentração de 0,1% de DMSO, como grupos controles foram utilizados DMSO 0,1%, Anfotericina B (Sigma ®) (0,5µM) como controle positivo, além disso foi utilizado um grupo infectado sem nenhum tratamento. A infecção foi acompanhada através da leitura da fluorescência dos parasitos em aparelho Spectramax M5 (Molecular Devices LLC), a taxa de infecção foi medida em Unidades de Fluorescência (RFU) e o resultado analisado utilizando o programa GraphPad Prism Versão 8.1.

2.4 Obtenção de LiNTPDase2 recombinante

Para obtenção da LiNTPDase2 recombinante (rLiNTPDase2) foi utilizada construção para expressão do ecto-domínio em vetor de expressão pET21b já produzida por Vasconcellos (2010). A indução ocorreu nas melhores condições de concentração de indutor e tempo, seguido dos passos de lise conforme já padronizados por De Souza (2013). O volume final obtido foi purificado por cromatografia de afinidade em resina de níquel, utilizando o sistema FPLC-AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography). A fração eluída foi renaturada por diluição em 1:10 de tampão 100 mM de Tris pH 8,0, 600 mM de NaCl, 1mM de Glutathione oxidada (GSSG), 2mM de Glutathione reduzida (GSH) e 33% de glicerol (Vasconcellos, 2012) e em seguida armazenada à 4 °C por 24 h antes de ser utilizada.

2.5 Determinação da concentração de rLiNTPDase2 purificada

Para determinar a concentração de proteína foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) para microplaca, conforme as instruções do fabricante (Biorad®). As concentrações padrão foram determinadas com soroalbumina bovina, BSA (Sigma®).

2.6 Atividade Enzimática e IC₅₀

Para os ensaios de inibição com a proteína recombinante, foi utilizado o método do Verde de Malaquita (TAUSSKY e SHORR, 1953; EKMAN e JAGER, 1993) para medir a atividade enzimática através da dosagem de ortofosfato livre. A reação de atividade enzimática foi feita em tampão de atividade contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 3 mM de MgCl₂; 116 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl e 2,5 mM ou 100µM de nucleotídeo, num total de 80 µL de reação, incluindo a proteína. A reação foi disparada com 0,5 µg de proteína e ocorreu por 30 minutos a 37 °C, até que fosse interrompida com 80 µL de HCl 0,2 M. Logo após, foram adicionados 40 µL de reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspensos em HCl 4M). A atividade foi calculada da seguinte forma: [% atividade inibitória = (nmol Pi x µg⁻¹ x 30 min do composto) / nmol Pi x µg⁻¹ x 30 min do controle) x 100]. Uma unidade (1U) de atividade enzimática foi definida como 1 nMol Pi/µg.min⁻¹.

Para o IC₅₀ foram utilizadas as seguintes concentrações de Quercetina (500µM, 200µM, 100µM, 50µM, 25µM, 10µM, 0,1µM e 0,01µM) a concentração de substrato foi fixada em 100µM de ADP e o teste realizado em duplicata (duas amostras de rLiNTPDase2 renaturadas individualmente).

As leituras foram realizadas a 610 nm em uma leitora de microplacas (BioTek). Nos brancos da reação havia todos os reagentes, exceto a proteína que foi adicionada após a parada da reação por adição de ácido clorídrico. Para todos os ensaios foram feitos dois controles, um controle de atividade ADPásica, contendo apenas ADP 100 µM ou 2,5 mM, e um controle que seria usado nos cálculos estatísticos, contendo todos os componentes do tampão e DMSO na mesma concentração usada nos compostos. O resultado foi analisado e o IC₅₀ calculado utilizando GraphPadPrism versão 8.1.

2.7 Docking Molecular

Esta parte do trabalho foi realizada pelo mestrando Marcel Arruda Diogo e pelo posdoc Marcelo Depolo Poletto e por ser importante para o contexto de continuidade do trabalho foi colocada neste trabalho como complemento do mesmo (tendo em vista que entrará na publicação que será escrita a partir de todos os dados deste projeto). Tendo em vista a ausência de estruturas tridimensionais da LiNTPDase2 obtidas experimentalmente por cristalografia ou de RMN até o desenvolvimento deste trabalho, técnicas de modelagem molecular comparativa foram empregadas para a construção do modelo tridimensional da LiNTPDase2. Para isso, a sequência da LiNTPDase2 (JX075891.1) foi utilizada para efetuar uma busca por moldes no *Protein Data Bank* (PDB). O molde selecionado, PDB ID 3CJA (NTPDase2 de *Rattus norvegicus*), apresentou 29,30% de identidade com a sequência requerida e cobertura de 86%, valores obtidos através da plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

O software MODELLER 9.24 (WEBB; SALI, 2016) foi utilizado pra gerar 200 modelos estruturais pra LiNTPDase2, dos quais o melhor modelo foi selecionado com o melhor DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) score e submetido a uma minimização de energia pelo programa YASARA (LAND; HUMBLE, 2018). Seguido estes procedimentos, o modelo foi avaliado quanto sua qualidade pelos programas RAMPAGE (LOVELL et al., 2003), VERIFY3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997) e ERRAT. A raiz do desvio médio quadrático (RMSD) obtido entre o alinhamento estrutural do modelo final de LiNTPDase2 e a estrutura 3CJA foi de 0.833 Å. As coordenadas tridimensionais dos cofatores metálicos presentes no sítio ativo de 3CJA foram transpostos para o modelo final da enzima.

Os cálculos de ancoragem molecular foram preparados utilizando o software Autodock Tools (TROTT,O., OLSON, 2019). A determinação do tamanho e localização do grid de busca, bem como quais resíduos deveriam ser considerados flexíveis para o cálculo, foi realizado através do redocking do ligante cocrystalizado ANP na estrutura 3CJA. Uma vez determinados estes parâmetros, os cálculos de ancoragem molecular da quercetina e IL-09 foram realizados no modelo estrutural da LiNTPDas2 utilizando o software Autodock Vina (TROTT,O., OLSON, 2019) e considerando os resíduos Asp58, Ser61, Thr62, Arg65, Thr132, Glu171, Asp198, Met199, Ser203, Thr204, Gln205, Phe331, Ser332, Tyr333, Tyr335, Asp336, Trp412 e Ser413 como flexíveis, bem como todos os graus de

liberdade torcionais dos ligantes. A estrutura de quercetina e IL-09 foram construídas no software Avogadro (HANWELL et al., 2012). Os resultados obtidos foram avaliados pelo visualizador de estruturas tridimensionais PyMOL.

2.8 Determinação do K_M e V_{MAX}

Para cada ensaio foi feita uma curva controle, sem inibidor, contendo a mesma concentração de DMSO presente na suspensão de inibidores. Foi utilizada a concentração de 100 μM de cada inibidor. A quantidade de substrato variou de 0,05 mM a 2 mM. Uma unidade (1U) de atividade enzimática foi definida como nMol Pi/ μg / min. Os ensaios foram realizados conforme o item 2.6.

2.9 Ensaio de Adesão

Para o ensaio de adesão os promastigotas de *L. infantum* e os macrófagos foram cultivados conforme itens 2.1 e 2.2. Foram utilizados 5×10^4 MØ/poço e 20 Leishmanias/MØ. De início, os promastigotas foram contados e transferidos para microtubos, onde foram lavados 3 vezes com meio RPMI. Em seguida, foram adicionados os compostos e esperou-se o tempo de 10 min, após esse período foram novamente realizadas 3 lavagens com RPMI, por fim os parasitos foram adicionados na mesma placa que os macrófagos e a infecção ocorreu conforme descrito no capítulo 1. O composto IL-09 foi testado nas concentrações de 10 μM , 100 μM e 200 μM , todos compostos foram diluídos em DMSO 0,1% (concentração final utilizada na placa), como grupos controles foram utilizados DMSO 0,1% e Anfotericina B (0,5 μM) como controle positivo. A infecção foi acompanhada através da leitura da fluorescência dos parasitos em aparelho Spectramax M5 após 24 horas.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida dos compostos na infecção de macrófagos por *L infantum*-RFP

Inicialmente optamos por triar diversos compostos buscando o que apresentasse efeito Leishmanicida *in vitro*, para isso utilizamos *Leishmania infantum*-RFP (expressando a proteína vermelha fluorescente) e macrófagos RAW 267.4. Assim, para triagem utilizamos uma concentração fixa de 10 μ M para todos os compostos.

Os compostos testados (Tabela 1) são flavonoides derivados da quercetina que já haviam demonstrado resultados promissores frente a rTcNTPDase1 conforme sumarizado anteriormente e descrito na tese de doutorado de Mariotini-Moura (2014) e na dissertação de mestrado de Ribeiro (2018). Foram então testados os compostos IL-05, IL-09, IL-18, IL-24 e o composto original de partida Quercetina (comercial) usado para iniciar a síntese dos compostos IL.

Tabela 1: Quercetina e compostos derivados

Nome	Fórmula	Massa Molar (g/mol)	Origem
IL-05	$C_{57}H_{52}O_{16}$	992,3255	Sintético
IL-09	$C_{49}H_{44}O_{12}$	824,86	Sintético
IL-18	$C_{33}H_{36}O_{16}$	688,2	Sintético
IL-24	$C_{25}H_{28}O_{12}$	520,16	Sintético
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	302,236	Comercial

*A Quercetina, composto de partida comercial foi adquirida da Sigma. Os compostos sintéticos foram produzidos pelo Professor Gaspar Diaz Muñoz (UFMG) A estrutura desses compostos encontra-se disponível em anexo ao final desse capítulo.

Os compostos da Tabela 1 foram testados como possíveis agentes leishmanicidas sobre amastigotas intracelulares em ensaio de infecção de macrófagos (Figura 3). Na Figura 3A é possível observar que na concentração de 10 μ M apenas a Quercetina e o IL-09 apresentaram capacidade leishmanicida significativa, sendo a quercetina capaz de eliminar cerca de 40% dos parasitos enquanto o IL-09 foi capaz de eliminar cerca de 15% dos parasitos nas condições testadas. Os demais compostos não foram capazes de eliminar as formas amastigotas intracelulares na concentração de 10 μ M. Entretanto, ao aumentar a concentração dos compostos para 50 μ M (Figura 3B), os compostos IL-05 e IL-35F apresentaram capacidade leishmanicida significativa, enquanto a quercetina e o IL-09 mataram mais parasitos quando comparados com a menor concentração.

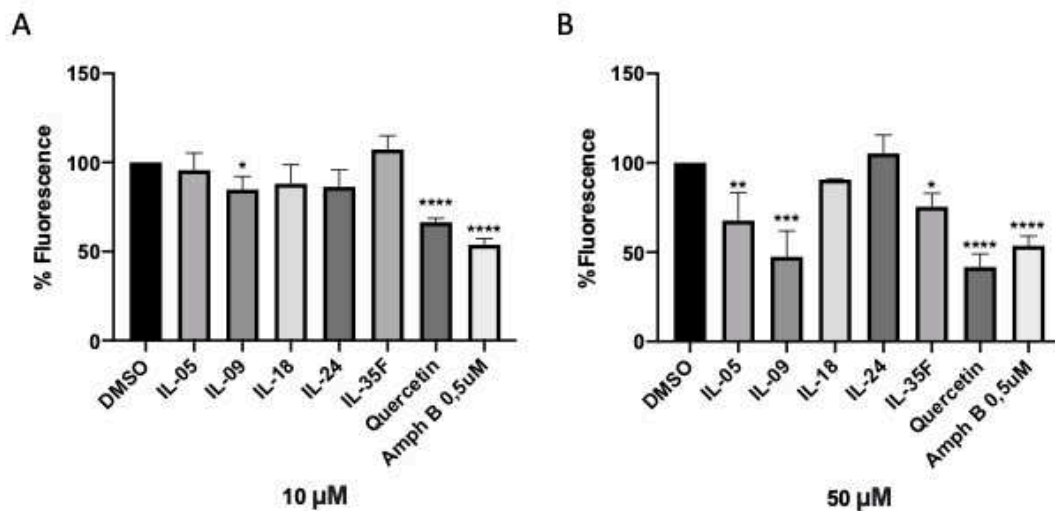


Figura 3: Teste de compostos na infecção de M ϕ por *L. infantum*-RFP. Resultado de % de fluorescência em relação ao grupo controle (DMSO) após tratamento com 10 μ M (A) ou 50 μ M (B) de composto por 48hrs. Como controle positivo utilizamos Anfotericina B na concentração de 0,5 μ M conforme determinado pelo IC₅₀ obtido no capítulo 1 deste trabalho. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços em triplicata biológica e triplicata interna.

3.2. Avaliação do efeito inibitório dos compostos em ensaio de atividade enzimática usando rLicNTPDase2

Em seguida resolvemos testar a capacidade inibitória da quercetina e seu composto derivado (IL-09) sobre a atividade enzimática da rLicNTPDase2, uma vez que foram os únicos que demonstraram na concentração de 10 μ M capacidade leishmanicida, para averiguar se estes compostos atuavam inibindo a enzima utilizamos 100 μ M de ambos os compostos e utilizamos duas concentrações de substratos distintas (100 μ M e 2,5mM). O resultado pode ser visto na Figura 4.

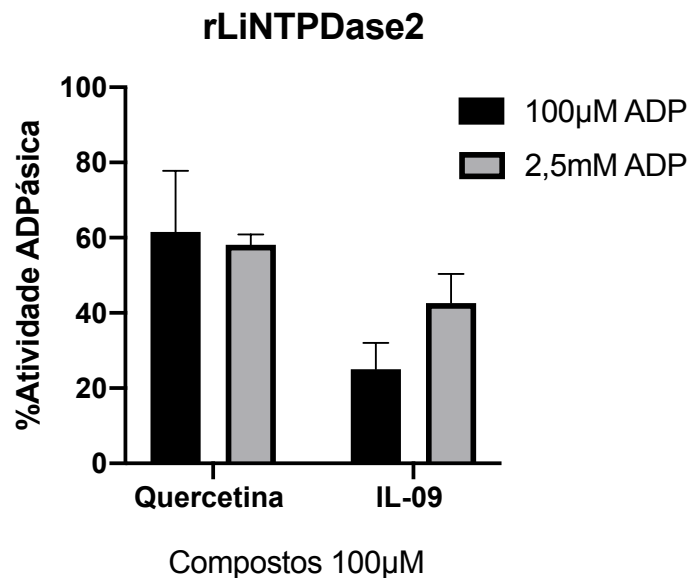


Figura 4: Efeito da quercetina e do IL-09 na atividade de rLicNTPDase2 *in vitro*. Foram utilizados 100 μ M de ADP e 2,5 mM de ADP; as concentrações dos compostos foram 100 μ M. Os ensaios foram feitos em duplicatas biológicas independentes. O gráfico foi construído com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (DMSO) e submetidos a 1 way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 8.2.1.

A quercetina foi capaz de inibir a atividade *in vitro* da rLiNTPDase2 em ~40% em ambas concentrações de substrato. O IL-09 apresentou uma maior capacidade inibitória que a quercetina, enquanto a inibição promovida pela quercetina foi a mesma em ambas concentrações de substrato. Foi possível observar que o IL-09 apresenta maior inibição quando na presença de 100 μ M de ADP ~75% e ~58% de inibição quando utilizamos 2,5mM de substrato. Por apresentar uma maior capacidade inibitória em menor concentração de substrato o IL-09 aparenta possuir uma inibição de natureza competitiva, já a quercetina pode apresentar uma inibição de natureza

mista ou não competitiva, porém mais ensaios são necessários para que possamos afirmar isto.

Como a quercetina e o IL-09 foram os compostos que melhor apresentaram capacidade tanto de matar o parasito intracelular quanto de inibir a atividade da rLiNTPDase2 decidimos por hora focar nestes flavonóides. Nosso próximo passo foi realizar o IC_{50} da quercetina onde obtivemos um valor de 161,6 μM (Figura 5) em seguida perfomamos o docking do IL-09 e da Quercetina no sítio catalítico da LiNTPDase2.

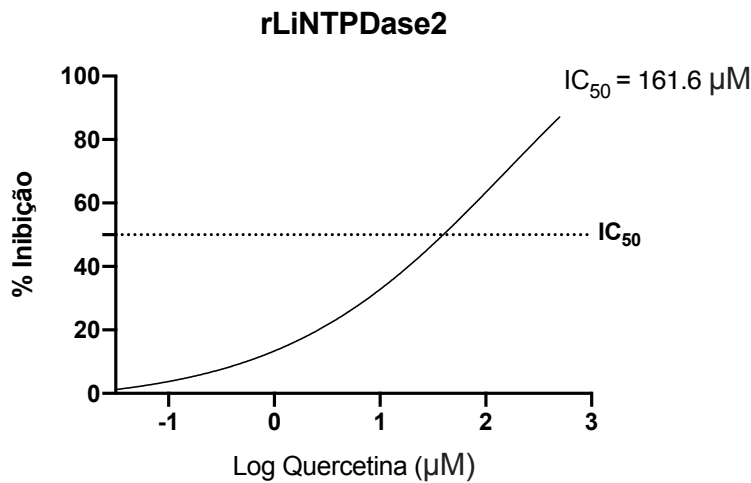


Figura 5: Curva dose resposta da inibição da Quercetina sobre rLiNTPDase. Foram utilizadas 8 concentrações de Quercetina (500 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 0,1 μM e 0,01 μM) a concentração de substrato foi fixada em 100 μM de ADP e o teste realizado em duplicata. O IC_{50} (161,6 μM) foi calculado utilizando o software GraphPad Prisma versão 8.2.1.

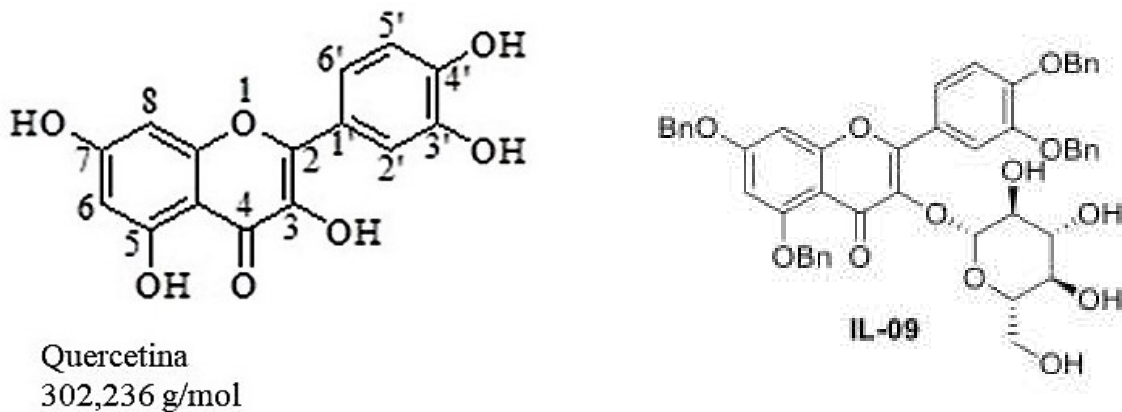


Figura 6: Estrutura Química. Estrutura da quercetina e do IL-09 composto derivado a partir da quercetina e sintetizado pela equipe do prof. Gaspar Munhoz da UFMG.

3.3. Docking Molecular dos compostos IL-09 e Quercetina utilizando modelo de LiNTPDase2

Visando compreender o mecanismo de atuação desses compostos frente a LiNTPDase2 optamos por analisar a interação destes compostos com a LiNTPDase, para isto realizamos a modelagem desta enzima e performamos o docking destes compostos na sua estrutura.

Os resultados obtidos a partir das análises dos cálculos de ancoragem molecular sugerem que a maioria dos mecanismos de interação formados entre IL-09 e quercetina ligados à LiNTPDase2 se dão em regiões formadas pelas ACRs (sítio ativo) assim como seus arredores.

Os resultados do docking trouxeram detalhes importantes sobre o encaixe dos inibidores no sítio ativo (contendo as ACRs) no modelo estrutural proposto (figuras 7 e 8).

Como observado na figura 7a e 7b, a melhor pose adotada pela quercetina durante os cálculos de ancoragem molecular nos mostra o alojamento do ligante no interior do bolsão catalítico da LiNTPDase2. As principais interações formadas entre o ligante e a enzima são predominantemente ligações de hidrogênio, além de interagir também com o co-fator enzimático Ca^{2+} (figura 7c e 7d).

O hidrogênio da hidroxila localizada no carbono em posição 5' do anel B do flavonoide interage à uma distância de 2.4 Å com o oxigênio acceptor da cadeia lateral do resíduo de aminoácido Asp333, o qual não faz parte das ACRs mas está próximo da ACR5. Em contrapartida, o oxigênio da carbonila ligada ao carbono na posição 4 do anel C da quercetina age como um doador de elétrons para o hidrogênio localizado na hidroxila da cadeia lateral da Ser332 da enzima à uma distância de 2.2 Å. Assim como Asp333, este resíduo de aminoácido também não faz parte das ACRs mas está aproximado estruturalmente da ACR5. Devido a proximidade entre o hidrogênio da cadeia lateral da Ser332 e o oxigênio da hidroxila localizada no carbono em posição 5 do anel A, estes também podem interagir a uma distância de 2.4 Å. Neste mesmo anel, a hidroxila no carbono 7 interage à uma distância de 2.2 Å com o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral da Ser61, resíduo que faz parte da ACR1. Em algumas

conformações adotadas pela quercetina, houve também interação entre o ligante e o co-fator enzimático (dado não mostrado).

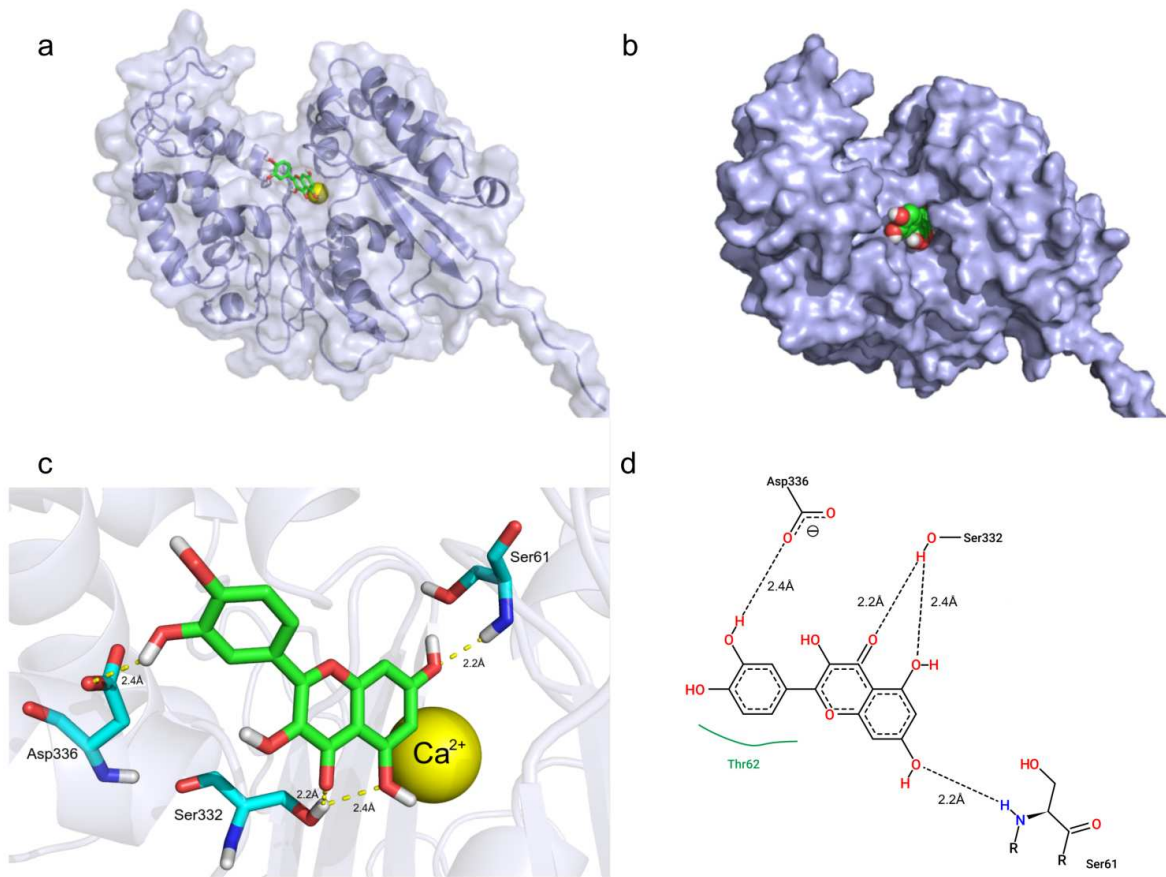


Figura 7: Avaliação da pose observada para a quercetina em modelo de LiNTPDase2 obtida por modelagem comparativa. (a) Representação estrutural do ligante no sítio ativo enzimático, a esfera em amarelo simboliza o co-fator Ca^{2+} . **(b)** Representação espacial da ocupação do sítio ativo pela quercetina. **(c)** Estrutura em 3D representando as interações formadas entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo catalítico e a estrutura da quercetina. **(d)** Representação em 2D sobre o mecanismo de aceção e doação de elétrons entre a enzima e o ligante. **Fonte:** Marcel Arruda Diogo

Já os resultados observados para IL-09 revelam uma maior ocupação do bolsão catalítico da LiNTPDase2 pelo ligante (figura 8a e 8b). Devido as modificações estruturais produzidas no esqueleto do flavonoide, como a adição de um grupamento de blindagem nas hidroxilas ligadas ao carbono em posição 4' e 5' do anel B e nas duas em posição 5 e 7 do anel A, além da glicosilação da hidroxila do carbono 3 do anel C, levando esta molécula a uma maior dificuldade em ocupar o interior do sítio

catalítico da LiNTPDase2, promovendo ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácido da região mais externa do bolsão catalítico, como também originadas de interações hidrofóbicas decorrentes das benzilas de proteção.

A figura 8c e 8d nos apresenta a natureza de interação entre os resíduos da LiNTPDase2 e o ligante IL-09. O oxigênio da hidroxila do carbono C2 do glicosídeo adicionado a estrutura do ligante parece interagir com o hidrogênio da cadeia lateral do resíduo de Lys86 através de uma ligação de hidrogênio a uma distância de 2.9 Å. Este mesmo átomo também pode interagir com a carbonila localizada na posição 4 do anel C do flavonoide a 2.7 Å de distância. O resíduo de Lys86 não é observado como pertencente as ACRs, porém se encontra em conformação beta junto a outros resíduos localizados na ACR1 da LiNTPDase2. A presença de um grupamento guanidino na cadeia lateral do resíduo de Arg65 leva ao deslocamento de elétrons entre os átomos de nitrogênio da estrutura, facilitando a interação entre os átomos de hidrogênio deste resíduo com o oxigênio aceptor localizado na hidroxila do carbono C3 do glicosídeo nas distâncias correspondentes a 2.4 Å e 2.5 Å para cada hidrogênio. A análise estrutural dos resíduos componentes das 5 ACRs revelou que o resíduo Arg65 se encontra localizado na ACR1 da LiNTPDase2, fazendo parte do motivo conformacional em beta formado neste local. O resíduo Thr62 localizado em uma alça na região da ACR1 da enzima promove interação hidrofóbica com o ligante a 3.8 Å de distância através de uma metila contida no grupamento R deste resíduo e do C2 da benzila adicionada a hidroxila em posição 5 do anel A do flavonoide. Por outro lado, o resíduo Phe331 também promove uma interação hidrofóbica com o IL-09 a uma distância de 3.7 Å entre seu radical aromático e o carbono localizado na posição 5' do anel B do flavonoide. Este resíduo não pertence as ACRs, porém, como esperado, se encontra próximo ao sítio catalítico da enzima. O resíduo Ile405 é o que se encontra mais externamente região de catálise da LiNTPDase2, porém promove duas interações de caráter hidrofóbico com o ligante. A primeira interação apresenta 3.4 Å de distância e ocorre através da metila do radical deste resíduo com o C2 da benzila blindando a hidroxila na posição 3' do anel B do ligante, para a segunda, a interação formada também ocorre entre uma metila do radical do resíduo de aminoácido com o C2 da benzila adicionada a hidroxila 4, também do anel B do flavonoide a uma distância de 3.6 Å. Destaca-se que de acordo com os dados de inibição obtidos o IL09 é mais eficiente que a Quercetina sugerindo que mesmo não estando totalmente

inserido no sítio catalítico este composto é capaz de bloquear mais significativamente o uso do substrato pela enzima.

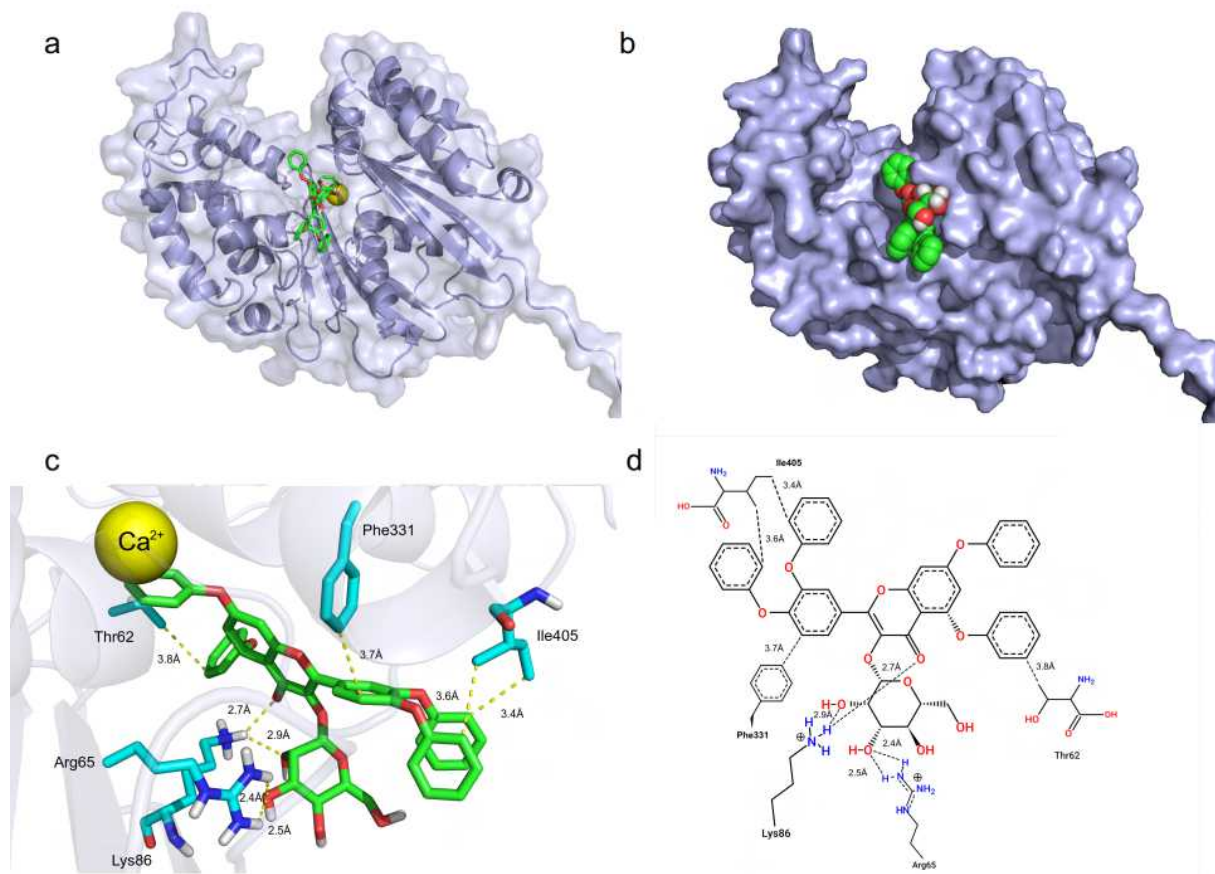


Figura 8: Avaliação da pose observada para a IL-09 em modelo de LiNTPDase2 obtida por modelagem comparativa, (a) Representação estrutural do ligante no sítio ativo enzimático, a esfera em amarelo simboliza o co-fator Ca^{2+} . (b) Representação espacial da ocupação do sítio ativo pelo IL-09 (c) Estrutura em 3D representando as interações formadas entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo catalítico e a estrutura do IL-09. (d) Representação em 2D sobre o mecanismo de aceção e doação de elétrons entre a enzima e o ligante. Fonte: Marcel Arruda Diogo

3.5 Determinação do K_M e V_{MAX}

Para determinar o efeito desses compostos sobre a cinética da LiNTPDase-2 foram feitos ensaios de atividade enzimática, onde variou-se a concentração de substrato e manteve-se fixa a concentração de inibidor em cada curva (100 μM). Os valores de velocidade da enzima sem adição de compostos, contendo apenas DMSO foram plotados em cada gráfico e gerou a curva controle. Os gráficos (Figura 9) e os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M) e Velocidade máxima (V_{max}) foram calculados pelo GraphPad Prism versão 8.01 através de regressão não linear.

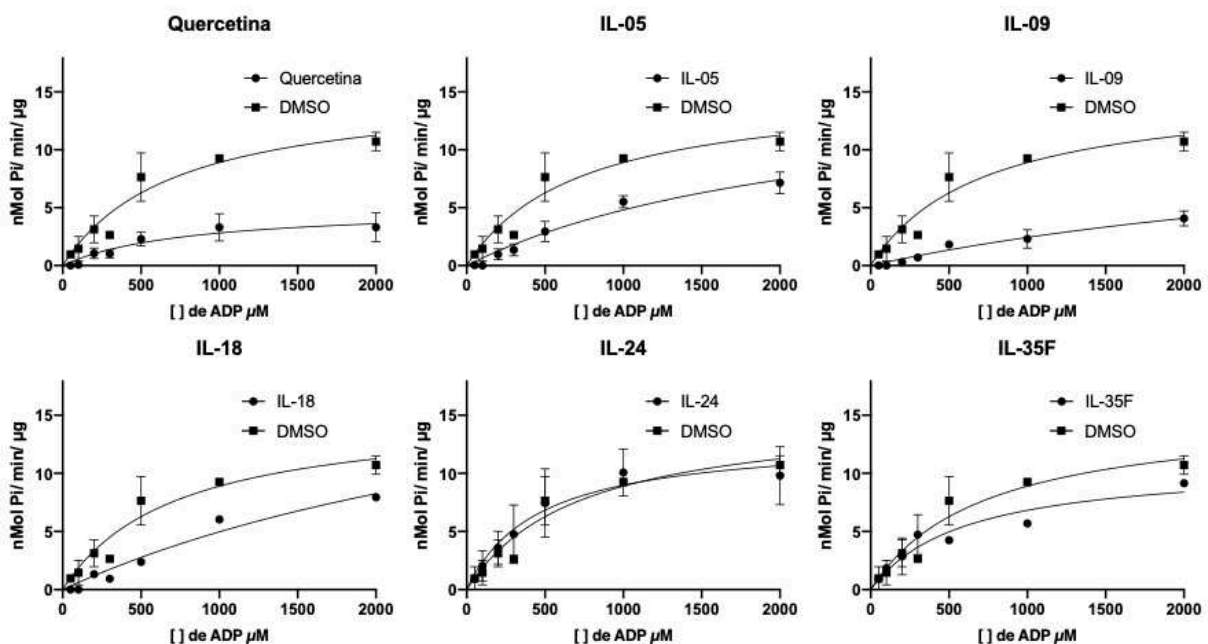


Figura 9: Curva de Michaelis-Menten da LiNTPDase na presença dos compostos e do grupo controle (DMSO). Cada inibidor foi utilizado na concentração 100 μM . A quantidade de substrato variou de 50 μM a 2000 μM . Uma unidade (1U) de atividade enzimática foi definida como nMol Pi/ μg / min. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços em triplicata biológica e triplicata interna.

A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 8.01, utilizando teste F e comparando os valores de K_M e V_{max} obtidos no grupo controle em relação aos demais compostos. Os valores obtidos para o K_M e a Velocidade máxima podem ser vistos na Tabela 2 e indicam um possível perfil de atividade para cada composto. Considerando as análises estatísticas o IL-24 e IL-35F não são inibidores significativos da enzima. Já IL-05, IL-09 e IL18, atuam como inibidores alterando o K_M somente, o

que seria compatível com uma inibição competitiva. Já a quercetina atua como inibidora alterando somente o V_{max} o que indicaria uma inibição do tipo não-competitiva.

Tabela 2: Valores de V_{max} e K_m dos compostos testados

Composto	V_{max}	Significante?	K_m	Significante?	R^2
DMSO (Controle)	15,3	-	719,6	-	0,9386
IL-05	16,27	Não	2386	Sim	0,9702
IL-09	12,65	Não	4196	Sim	0,9660
IL-18	24,25	Não	3880	Sim	0,9566
IL-24	13,09	Não	457,7	Não	0,9650
IL-35F	10,89	Não	596,7	Não	0,9194
Quercetina	5,225	Sim	919	Não	0,9219

3.6 Avaliação da capacidade do IL-09 interferir na adesão dos promastigotas à célula hospedeira

Uma vez que o papel da LiNTPDase2 de atuar no processo de adesão do promastigota à célula hospedeira já foi descrito (VASCONCELLOS et al., 2014), resolvemos avaliar se a adição de um inibidor interferiria no processo de adesão *in vitro*. Para isso utilizamos 3 concentrações do composto IL-09 (10 μ M, 100 μ M e 200 μ M), que até o momento apresentou ser o mais eficiente em inibir a enzima recombinante. Caso um composto interfira no processo de adesão nos momentos iniciais da infecção espera-se uma menor carga parasitária intracelular, ao observar a Figura 10 notamos que as concentrações de 10 μ M e 200 μ M foram as únicas que

apresentaram diminuição significativa da carga parasitária intracelular, portanto, interferindo no processo de adesão ao macrófago. Ademais, o fato da concentração de 100 μ M não ter apresentado efeito significativo pode indicar que o processo não seja dose-dependente, ou ainda que mesmo sendo estatisticamente significativo em termos matemáticos estas diferenças não são significativas em termos biológicos pois o efeito na diminuição da adesão foi muito pequeno de fato.

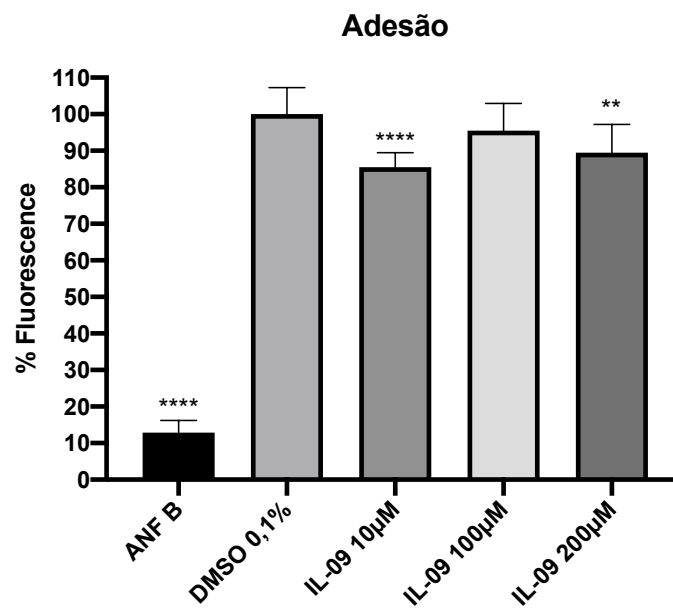


Figura 10: Ensaio de adesão. Os compostos foram administrados nas concentrações descritas na figura durante 10min em formas promastigotas de *L.infantum*, que em seguida foram lavados com meio RPMI e adicionados junto aos macrófagos onde ficaram por 3 horas, em seguida foram feitas 3 lavagens para retirar os parasitos que não aderiram à célula hospedeira. A leitura da fluorescência ocorreu após 24horas de infecção em aparelho SpectraMax M5. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços em triplicata biológica e triplicata interna.

4. DISCUSSÃO

A quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxichromen-4-ona) é um metabólito secundário pertencente a classe dos flavonoides, frequentemente encontrado em espécies vegetais (PARASURAMAN; DAVID; ARULMOLI, 2016).

Nas condições aqui testadas ficou demonstrado que 10 μ M de quercetina é capaz de eliminar ~40% dos amastigotas intracelulares quando comparada com o grupo controle (Figura 3A), ao aumentarmos a concentração para 50 μ M essa taxa aumenta para ~60%.

Além de seus efeitos comumente conhecidos (anti-inflamatório, cardioprotetor e antiulcerogênico), já foi relatada na literatura atividade leishmanicida atribuída a presença da quercetina nos extratos de partes aéreas de plantas da espécie *Kalanchoe pinnata* Lam, conhecida na medicina popular como “folha-da-fortuna” (MUZITANO *et al.*, 2006a,b; TASDEMIR *et al.*, 2006; PATTEWAR, 2012; PARASURAMAN; DAVID; ARULMOLI, 2016). Em outro trabalho realizado por Mittra *et al.*, (2000), a quercetina foi capaz de eliminar ~70% das formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* quando testada na concentração de 70 μ M. A quercetina também foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, sendo que macrófagos não infectados não tiveram sua produção de EROs aumentada, o que leva a crer que este aumento na produção seja devido a ação direta da quercetina sobre os amastigotas intracelulares. (FONSECA-SILVA *et al.*, 2013). Sabemos que EROs são geradas por macrófagos como uma forma de combater um patógeno intracelular sendo importantes para o combate de doenças como a Leishmaniose Visceral (AFZAL *et al.*, 2014; CHAKRABORTI *et al.*, 2019).

Ao testarmos a capacidade da quercetina em inibir *in vitro* a rLiNTPDase2 pudemos observar que a porcentagem de inibição deste composto foi de ~40% em ambas concentrações de substrato (100 μ M e 2,5mM ADP) (Figura 4) o que pode nos indicar uma capacidade inibitória de natureza mista. Entretanto, os resultados da cinética mostram que a quercetina atua diminuindo o Vmax da enzima e em nada altera seu K_M (Figura 9) sendo, portanto, um inibidor não competitivo. Desse modo, ainda não podemos concluir a natureza do mecanismo de inibição da quercetina sob a LiNTPDase2. Por hora, independente do mecanismo de inibição, pudemos demonstrar que 23,45 μ M de quercetina foram capazes de inibir em 50% a atividade

da rLiNTPDase2 (Figura 5), indicando uma boa afinidade deste composto para com a enzima.

Sabe-se o papel do ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos de adenina na modulação da resposta celular dependente do sistema purinérgico (Burnstock e cols., 1972; Burnstock e cols., 2006). Em situações de injúria, dano celular, apoptose, entre outros, a molécula de ATP é direcionada para o meio extracelular onde age como uma molécula sinalizadora de perigo. (ZIMMERMMEN, 2000; YEGUTKIN, 2008), ativando diversos imunomediadores em células do sistema imune, entre eles a produção de EROs (BOURS et al., 2006) e óxido nítrico (SPERLAGH e cols., 1998) por macrófagos.

Diversos autores já demonstraram o papel das NTPDases de *Leishmania* em conjunto com a 5' nucleotidase na hidrólise de ATP gerando como subproduto a adenosina e o conseqüente efeito disso na sinalização purinérgica e modulação da resposta imune do hospedeiro (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GOMES et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014).

Com base no que foi exposto, é possível estimar que um dos mecanismos que contribuem para o efeito leishmanicida da quercetina e os outros compostos derivados desse flavonóide esteja relacionado com inibição da atividade fosfolitolítica da LiNTPDase2, deste modo podendo limitar a modulação da resposta imune dependente de nucleotídeos do hospedeiro pelo parasito, ou ainda limitar a produção de purinas para o sistema de captação de purinas pelo parasito que é dependente da via de salvação.

Por outro lado, a atividade promissora da quercetina como agente leishmanicida pode ser também ser atribuída a sua capacidade de inibir diferentes enzimas do parasito, como a arginase (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012), ribonucleotideo redutase (Sen et al., 2008), topoisomerase II (MITTRA et al., 2000) e por fim a LiNTPDase2 mostrada no presente trabalho. Não podemos descartar por hora que os compostos aqui testados, todos derivados da quercetina atuem também nessas enzimas.

O IL-09 foi capaz de apresentar alta atividade inibitória sobre a enzima recombinante em ensaios *in vitro* especialmente em menor concentração de substrato (100 μ M de ADP) onde conseguiu inibir a enzima em ~80%, valor de inibição superior ao encontrado quando aumentamos a concentração de substrato para 2,5mM (60% de inibição) (Figura 4) o que sugere uma competição entre o IL-09 e o substrato pelo

sítio catalítico da enzima. De fato, ao observarmos a cinética do IL-09 (Figura 9) e a Tabela 2, notamos que o IL-09 foi capaz de aumentar significativamente o K_M da enzima sem afetar o V_{max} , o que indica um tipo de inibição do tipo competitiva (Lehninger, 2014), corroborando com os dados do docking que demonstraram a afinidade do composto em se ligar ao sítio catalítico da enzima.

Apesar de o IL-09 ter apresentado uma menor atividade leishmanicida quando comparado à quercetina (Figura 3), é possível que as adições de grupamento benzeno protegendo as hidroxilas da quercetina tenham diminuído a solubilidade do IL-09 em relação a quercetina (Figura 6) tornando este composto menos biodisponível no vacúolo parasitóforo onde reside a forma amastigota e conseqüentemente sua molécula alvo. Outra possibilidade é que este seja mais seletivo do que a quercetina necessitando, portanto, de maiores concentrações nos ensaios *in vitro*, conforme demonstrado na Figura 3. Ademais, o IL-09 apresentou uma pequena capacidade de inibir a adesão das formas promastigotas de *L. infantum* à célula hospedeira, indicando que também possa atuar inibindo os processos iniciais de infecção. Além do IL-09, o IL-05 também apresentou capacidade de aumentar o K_M da enzima e uma menor capacidade leishmanicida, portanto, apresentam capacidade inibitória e deve ser considerado futuramente para novos estudos. O composto IL-35f, apesar de apresentar uma pequena capacidade leishmanicida na maior concentração aqui testada, não apresentou alterações significantes sob o K_M e o V_{max} da enzima, indicando que não atua como inibidor da rLiNTPDase2, podendo ter algum alvo alternativo pelo qual esteja ocasionando a morte desses parasitos. Por outro lado, o IL-18 apresentou capacidade inibitória sob a enzima recombinante, entretanto, não foi capaz de eliminar os amastigotas em nenhuma das concentrações aqui testadas, a razão disto precisa ser melhor investigada.

Os cálculos de ancoragem molecular realizados indicam que a quercetina tem volume adequado para se encaixar competitivamente no sítio ativo da enzima, inclusive interagindo diretamente com o cofator metálico (Figuras 7A; 7C). Porém os dados de cinética mostrando uma inibição não competitiva são contrários aos dados de ancoragem, indicando que esse composto pode se ligar à outra região da enzima diferente do sítio ativo. Em contrapartida, o volume molecular de IL-09 se mostra muito maior e, portanto, as melhores poses encontradas pelo algoritmo de ancoragem não indicam uma ligação direta ao sítio-ativo, mas sim numa região proximal que pode competir/impedir a ligação com o substrato (Figuras 8A; 8C). Esses dados são

compatíveis com os achados bioquímicos que mostram inibição competitiva para este composto.

É necessário dizer que o modelo estrutural da LiNTPDase2 utilizada para os cálculos de ancoragem molecular baseia-se na estrutura cristalográfica de NTPDase2 de *Rattus norvegicus* (PDB ID 3CJA) e, portanto, pode não estar estruturalmente apta a interagir com um inibidor tão volumoso como IL-09. Para avaliar como a flexibilidade molecular da LiNTPDase2 impacta em sua disponibilidade estrutural para interagir com IL-09, simulações de dinâmica molecular poderão ser utilizadas para extrair diferentes conformações da LiNTPDase-2 e, assim, aprofundar o estudo na relação estrutura-atividade do IL-09.

Com base nas informações aqui apresentadas tanto a quercetina como os outros flavonoides aqui apresentados como o IL-05 e o IL-09 podem ser considerados como potenciais compostos para o desenvolvimento racional de novos fármacos contra a LV tendo como base sua capacidade de inibir LiNTPDase2.

5. CONCLUSÃO

- A quercetina é capaz de inibir a LiNTPDase2 aumentando seu V_{max} e apresenta potencial leishmanicida.
- Os compostos IL-05 e IL-09 apresentam capacidade de inibir a LiNTPDase2, aumentando seu K_M , o que indica uma inibição do tipo competitiva, corroborando com os dados de docking.
- IL-05 e IL-09 apresentaram capacidade leishmanicida *in vitro*.
- O IL-09 inibe parcialmente a adesão das formas promastigotas à célula hospedeira

6. REFERÊNCIAS

- AFZAL, F. et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. **Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling**, p. 397–424, 2014.
- ALVES SOUZA, N. et al. Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 193, n. May 2018, p. 12–17, 2019.
- ARONSON, N. et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 24–45, 2017.
- BABIKER, A. M. et al. Concomitant infection with leishmania donovani and L. major in single ulcers of cutaneous leishmaniasis patients from sudan. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, 2014.
- BALAÑA-FOUCE, R. et al. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1209–1216, maio 2019.
- BASTOS, M. S. et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp leishmania Braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.
- BASTOS, M. S. E. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da NTPDase1 de Leishmania infantum chagasi**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- BERMAN, J. D.; LEE, L. S. Activity of Antileishmanial Agents against Amastigotes in Human Monocyte-Derived Macrophages and in Mouse Peritoneal Macrophages. **The Journal of Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 220, 2006.
- BOELAERT, M. et al. Socio-economic aspects of neglected diseases: Sleeping sickness and visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, n. 7, p. 535–542, 2010.
- BOLHASSANI, A. et al. Fluorescent Leishmania species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 637–645, 2011.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**,

v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BREITLING, R. et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. v. 25, p. 209–218, 2002.

CHAKRABORTI, S. et al. Oxidative stress in microbial diseases. **Oxidative Stress in Microbial Diseases**, n. October 2019, p. 1–566, 2019.

CRUTHERS, L. R. Protozoa. In: **Parasiticide Screening, Volume 1**. [s.l.] Elsevier, 2019. v. 1p. 379–540.

DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, 2010.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

DE LIMA CELESTE, J. L. et al. Experimental mixed infection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (L .) infantum in hamsters (Mesocricetus auratus). **Parasitology**, v. 144, n. 9, p. 1191–1202, 10 ago. 2017.

DOS SANTOS COSTA, S. et al. Use of in vivo and in vitro systems to select leishmania amazonensis expressing green fluorescent protein. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 4, p. 357–364, 2011.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, n. April, p. 396–404, 1997.

FALQUETO, A. et al. Epidemiological and Clinical Features of Leishmania (Viannia) braziliensis American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1003–1010, 2003.

FEITOSA, F. L. F. et al. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 500–502, 2012.

FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.

- FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of leishmania amazonensis intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1505–1508, 2013.
- GAO, C. H. et al. Survey of wild and domestic mammals for infection with leishmania infantum following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–9, 2015.
- GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of Leishmania amazonensis inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.
- GUPTA, S.; NISHI. **Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery** *Indian Journal of Medical Research*, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3100143/>>
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.
- IBRAHIM, M. E. et al. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with Leishmania parasites. **Acta Tropica**, v. 57, n. 4, p. 327–332, 1994.
- JÚLIA ALVES MENEZES. **Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.
- LAND, H.; HUMBLE, M. S. YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1685p. 43–67.
- LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C alpha geomF. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., W. Myers, E., & J. Lipman, D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*.etry: phi,psi and C beta deviation. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 50, n. August 2002, p. 437–450, 2003.
- MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442–445, 2006.

- MARIOTINI-MOURA, C. **ESTUDO BIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS NTPDASES de Trypanosoma cruzi E Leishmania infantum chagasi E BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- MARTINEZ, E. et al. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 529–532, 2002.
- MARZOCHI, M. C. D. A. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 570–580, 2009.
- MEHTA, S. R. et al. Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 617–620, dez. 2010.
- MICHEL, G. et al. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p. 1–7, 2011.
- MUYLDER, G. DE et al. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes : Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes : Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a . n. June 2014, 2011.
- NETO, M. P. O.; MARZOCHI, M. C. A.; GRIMALDI, G. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 80, n. 6, p. 587–592, 1986.
- NÜHS, A. et al. Development and Validation of a Novel *Leishmania donovani* Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–17, 2015.
- PACHECO, R. S.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOREL, C. M. **Inhibition of growth of *Leishmania mexicana mexicana* by *Leishmania mexicana amazonensis* during “in vitro” co-cultivation.** **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1987.
- PIRES, M. Q. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: Evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 243–246, 2014.
- RIBEIRO, I. C. **AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS INIBIDORES DA NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi* E CLONAGEM DAS NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum***

chagasi EM SISTEMA LEXSY. [s.l: s.n.].

ROCHA, M. N. et al. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 3, p. 282–291, 2013.

ROHOUSOVA, I. et al. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 3–7, 2007.

SILVA, J. D. et al. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292–1298, 2017.

SINGH, N. et al. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 370–374, 2009.

TROTT, O., OLSON, A. J. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2019.

VARELA M, R. E. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*: An in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 134–139, jun. 2009.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

VIOTI, G. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. In cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 28, n. 2, p. 303–305, 2019.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 139–148, 20 jun. 2016.

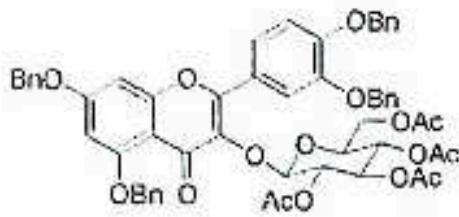
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas.** [s.l: s.n.].

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

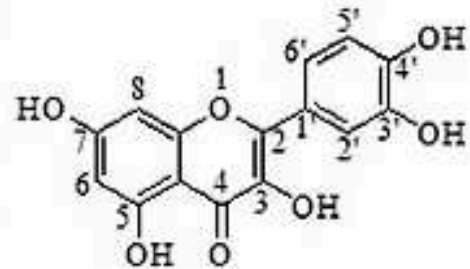
ANEXO I

Estrutura dos compostos utilizados

IL05-A

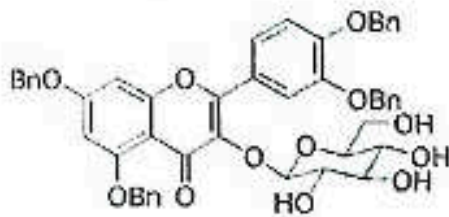


$C_{57}H_{52}O_{16}$
Exact Mass: 992.3255



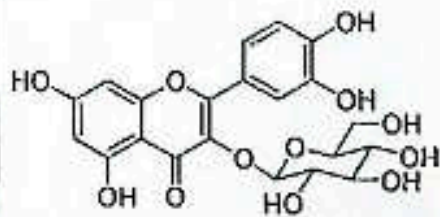
Quercetina
302,236 g/mol

IL09-overnight



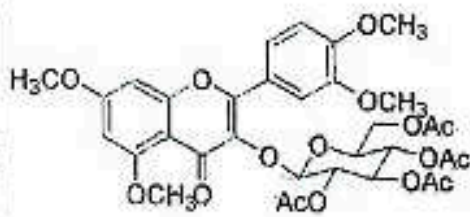
$C_{19}H_{14}O_{12}$
Exact Mass: 824.86

IL35-F1-Sephadex



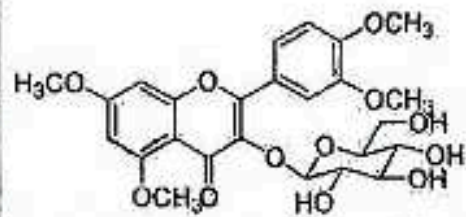
$C_{21}H_{20}O_{12}$
Exact Mass: 464.0955

IL18



$C_{31}H_{36}O_{16}$
Exact Mass: 688.20
 $m_{\text{teor\u00e9tica}} = 11,9 \text{ mg}$

IL24-overnight



$C_{25}H_{28}O_{12}$
Exact Mass: 520.16
 $m_{\text{teor\u00e9tica}} = 12,5 \text{ mg}$

ANEXO II

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2020, 20, 1-14

1

REVIEW ARTICLE

ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications

Walmir da Silva¹, Nancy da Rocha Torres², Joice de Melo Agripino¹, Victor Hugo Ferraz da Silva², Anna Cláudia Alves de Souza¹, Isadora Cunha Ribeiro¹, Tatiana Aparecida de Oliveira¹, Luciana Angelo de Souza², Leticia Kelly Ramos Andrade¹, João Victor Badaró de Moraes², Marcel Arruda Diogo¹, Raíssa Barbosa de Castro¹, Marcelo Depolo Polêto², Luis Carlos Crocco Afonso³ and Juliana Lopes Rangel Fietto^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; ³Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: May 21, 2020
Revised: July 27, 2020
Accepted: August 24, 2020

DOI:
10.2174/1568026620666201005125146

Abstract: ENTPDases are enzymes known for hydrolyzing extracellular nucleotides and playing an essential role in controlling the nucleotide signaling via nucleotide/purinergic receptors P2. Moreover, ENTPDases, together with Ecto-5'-nucleotidase activity, affect the adenosine signaling via P1 receptors. These signals control many biological processes, including the immune system. In this context, ATP is considered as a trigger to inflammatory signaling, while adenosine (Ado) induces anti-inflammatory response. The trypanosomatids *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, pathogenic agents of Leishmaniasis and Chagas Disease, respectively, have their own ENTPDases named "TpENTPDases," which can affect the nucleotide signaling, adhesion and infection, in order to favor the parasite. Besides, TpENTPDases are essential for the parasite nutrition, since the Purine *De Novo* synthesis pathway is absent in them, which makes these pathogens dependent on the intake of purines and nucleopurines for the Salvage Pathway, in which TpENTPDases also take place. Here, we review information regarding TpENTPDases, including their known biological roles and their effect on the purinergic signaling. We also highlight the roles of these enzymes in parasite infection and their biotechnological applications, while pointing to future developments.

Keywords: ENTPDases, Purinergic signaling, Leishmaniasis, Chagas Disease, Parasites, Biotechnology.

ANEXO III

Journal Pre-proofs

Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of New World Tegumentary Leishmaniasis

Luciana Ângelo de Souza, Matheus Silva e Bastos, Joice de Melo Agripino, Thiago Souza Onofre, Lourdes Fanny Apaza Calla, Tino Heimbürg, Ehab Ghazy, Theresa Bayer, Victor Hugo Ferraz da Silva, Paula Dutra Ribeiro, Leandro Licursi de Oliveira, Gustavo Costa Bressan, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Abelardo Silva-Júnior, Raphael de Souza Vasconcellos, Ana Márcia Suarez-Fontes, Juliana Almeida-Silva, Marcos André Vannier-Santos, Raymond Pierce, Wolfgang Sippl, Juliana Lopes Rangel Fietto

PII: S0006-2952(20)30427-5
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114191>
 Reference: BCP 114191

To appear in: *Biochemical Pharmacology*

Received Date: 15 May 2020
 Revised Date: 1 August 2020
 Accepted Date: 3 August 2020

