

JULIANA RODRIGUES LEOPOLDO

**AS SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES DE *Leishmania braziliensis*
(LbSRPK'S) COMO NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

L587s
2022

Leopoldo, Juliana Rodrigues, 1990-
*As Serine/Arginine Protein Kinases de Leishmania
braziliensis (LbSRPK) como novo alvo terapêutico para
tratamento da leishmaniose tegumentar / Juliana Rodrigues
Leopoldo. – Viçosa, MG, 2022.*

1 tese eletrônica (96 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 81-96.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.720>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas serina-arginina quinases. 2. Leishmaniose.
3. Inibidores de proteínas quinases. I. Vasconcellos, Raphael de
Souza, 1982-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.68

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

JULIANA RODRIGUES LEOPOLDO

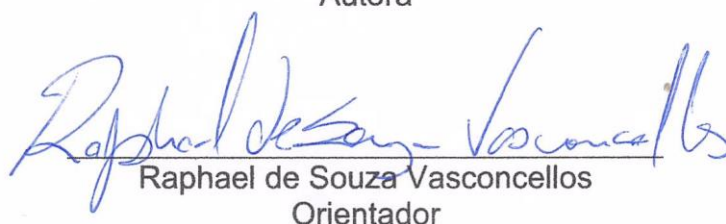
**AS SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES DE *Leishmania braziliensis*
(LbSRPK'S) COMO NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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

APROVADA: 30 de agosto de 2022.

Assentimento:


Juliana Rodrigues Leopoldo
Autora


Raphael de Souza Vasconcellos
Orientador

À minha prima Laiza Lorena Vicente Tibúrcio, com amor e saudades.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço à Deus pela alegria da vida.

Aos meus pais, Eliane e Ildemar, que são meu fôlego e esperança.

Ao meu companheiro na vida, Richard, que me apoia, suporta, alegra e conquista.

Às minhas amigas de casa, Isabel e Mariana, que dividem as contas, as risadas, as angústias, as alegrias, as pizzas e os salgadinhos. Vou sentir saudades.

Às minhas demais amigas, Paula Monteiro, Bárbara Leal, Thais Celles e Bruna, pela força despretensiosa que me cedem todas as vezes.

Aos amigos do Laboratório, Luana, Larissa, Letícia, Ginnie, Amanda, Janine, Flavinha, Jú Ribeiro, Samuel, Laís, Elói e Éverton, que rendem sempre uma bora conversa e boas risadas. Vocês são os melhores que eu poderia ter.

À minha querida Dayse, pelas histórias hilárias de suas filhas e pelas conversas sem fim nos dias de experimentos. Todo sucesso do mundo a você e sua família.

Ao meu amigo, Marcel Arruda, que fez com que eu tivesse mais confiança em mim mesma e pelo seu ânimo em começar experimentos depois das 18h. Pelas conversas, pelos rolês aleatórios, pelos experimentos em bioinformática, por tudo. Torço e oro por você sempre!

À minha linda IC, Sara Machado, que me ajudou MUITO nas análises de bioinformática na reta final. Que Deus te abençoe por ouvir meus áudios de 5 minutos.

Às minhas outras lindas IC's (para não ter ciúmes rs), Isabelly Messias e Carla Cristina, por todas as trocas, disposição de ir no laboratório aos domingos, me acompanhar e ajudar.

Ao meu orientador, professor, Raphael Vasconcelos por toda fé depositada em mim, todos os ensinamentos e pela tranquilidade em lidar comigo.

Ao Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB), do Professor Robson Ricardo Teixeira, pelos compostos sintetizados e parceria crescente. Assim como também ao próprio prof. Robson que sempre me atende com muita simpatia e alegria ao ouvir os resultados alcançados.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBs), Leilane, Nancy, Anna Cláudia, Luciana, Victor Ferraz, Victor Gonçalves, Joice,

Juliana Alves, Adriana, Gabriela, Mônica Caetano, Marcelo e Raoni, que me auxiliaram nos experimentos e nas dúvidas do dia a dia.

Ao Grupo de Estudos (GEBQI), Rayanne, Fernanda, Gislaine, Raissa, Lucas, Mayra e Tarsiane, muito obrigada por me convidarem para esse grupo maravilhoso e empenhado que só me trouxe experiências incríveis e novas amizades!!!

À UFV, por ser a mais linda de todas, sem dúvidas disso!

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela estrutura.

Aos professores com quem pude aprender conteúdo acadêmico e de vida.

As agências de fomento pelo apoio financeiro, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

*“Por isso, não seja excessivamente justo nem sábio;
Por que frustrar a si mesmo?
No entanto, não seja demasiadamente ímpio e não seja tolo;
Por que morrer antes da hora?
Não retenha apenas uma dessas regras;
Tome posse das duas,
Pois quem teme a Deus, viverá por ambas.”*

Eclesiastes 7:16

RESUMO

LEOPOLDO, Juliana Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **As *Serine/Arginine Protein Kinases* De *Leishmania braziliensis* (LbSRPK's) como novo alvo terapêutico para tratamento da Leishmaniose Tegumentar.** Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.

A Leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários da espécie *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses são endêmicas em 98 países ao redor do mundo, que atinge principalmente países emergentes e em desenvolvimento localizada entre os trópicos. As leishmanioses são classificadas de acordo com os sintomas apresentados e podem se dividir em dois grandes grupos: as Leishmanioses Cutâneas e a Leishmaniose Visceral, a depender da espécie de leishmania que infecta o hospedeiro. No Brasil, os tratamentos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes e os de segunda escolha a anfotericina B em sua formulação lipossomal e quando esses medicamentos não podem ser prescritos, são usadas as pentamidinas. Todos esses medicamentos são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. O tratamento muitas vezes necessita de vigilância hospitalar para monitoramento do paciente enquanto o recebe por ser muito tóxico e poder causar danos ao paciente. Isso gera efeitos citotóxicos muito graves e podem fazer com que o tratamento seja abandonado por parte do paciente que, na maioria das vezes, ou reside em local distante do estabelecimento de saúde, ou apresenta quadros de toxicidade aguda devido ao tratamento. Devido a isso, novas terapias leishmanicidas são necessárias de modo urgente, tanto no Brasil quanto no mundo. Já foi descrito por muitos estudos que as Serine Arginine Protein Kinases, as SRPKs, estão desreguladas em processos infecciosos como o HPV, HIV e doenças crônicas como o Alzheimer e o câncer. Além disso, um grupo de pesquisadores desenvolveu um inibidor de SRPK em humanos, o SRPIN340, que quando testado para leishmanioses, não apresentou nenhuma eficácia. Assim, com o presente trabalho, testamos compostos análogos sintéticos do SRPIN340 para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania braziliensis*. No total 91 compostos, de três séries foram testados e no ensaio de infecção observamos que todas as séries tiveram resultados promissores quanto a potencial atividade leishmanicida. Novos estudos devem ser

realizados a fim de que se obtenham maiores informações quanto ao potencial leishmanicida desses compostos.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. Alvo farmacológico. *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPK's).

ABSTRACT

LEOPOLDO, Juliana Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **The *Serine/Arginine Protein Kinases of Leishmania braziliensis* (LbSRPK's) as a therapeutic target for the treatment of tegumentar leishmaniasis.** Adviser: Raphael de Souza Vasconcellos.

Leishmaniasis is an infectious-parasitic disease caused by protozoa of the species *Leishmania*. According to the World Health Organization, leishmaniasis is endemic in 98 countries around the world, which mainly affects emerging and developing countries located among the tropics. Leishmaniasis is classified according to the symptoms presented and can be divided into two major groups: Cutaneous Leishmaniasis and Visceral Leishmaniasis, depending on the species of *leishmania* that infects the host. In Brazil, the treatments of choice are pentavalent antimonials and second-choice anti-ammonia to amphotericin B in their liposomal formulation and when these drugs cannot be prescribed, pentamidins are used. All these drugs are made available by the Unified Health System (SUS) in Brazil. Treatment often requires hospital surveillance to monitor the patient while receiving it because it is too toxic and can cause harm to the patient. This generates very serious cytotoxic effects and can cause treatment to be abandoned by the patient who, most of the time, either resides in a place far from the health facility, or presents with acute toxicity due to treatment. Because of this, new leishmanicide therapies are urgently needed, both in Brazil and worldwide. It has been described by many studies that Serine Arginine Protein Kinases, SRPKs, are deregulated in infectious processes such as HPV, HIV and chronic diseases such as Alzheimer's and cancer. In addition, a group of researchers developed a SRPK inhibitor in humans, SRPIN340, which when tested for leishmaniasis, showed no efficacy. Thus, with the present work, we tested synthetic analogue compounds of SRPIN340 for the treatment of American Tegumentary Leishmaniasis, caused by *Leishmania braziliensis*. In total, 91 compounds, from three series were tested and in the infection assay we observed that all series had promising results regarding potential leishmanicide activity. Further studies should be carried out in order to obtain more information on the leishmanicide potential of these compounds.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Pharmacological target. *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPK's).

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 Epidemiologia da Leishmaniose | 15 |
| 2.2 Ciclo de Vida Parasitário | 20 |
| 2.3 Relação Parasita-Hospedeiro | 22 |
| 2.4 Tratamentos Disponíveis no Brasil | 25 |
| 2.5 As cinases como alvos terapêuticos | 28 |
| 2.6 As <i>Serine/Arginine Protein Kinases</i> como alvo terapêutico | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 Compostos testados..... | 32 |
| 4.2 Manutenção dos Macrófagos RAW264.7 | 37 |
| 4.3 Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos RAW264.7 | 37 |
| 4.4 Cálculo da Viabilidade Celular | 38 |
| 4.5 Manutenção de <i>Leishmania braziliensis</i> M2904 | 38 |
| 4.6 Ensaio de Toxicidade em <i>Leishmania braziliensis</i> M2904 | 39 |
| 4.7 Ensaio de Infecção <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.8 Análises Estatísticas | 41 |
| 4.9 Ancoragem Molecular dos Compostos Seleccionados | 41 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| 5.1. Citotoxicidade em Macrófagos RAW264.7 | 43 |
| 5.1.1. Citotoxicidade dos Compostos da Série MR | 43 |
| 5.1.2. Citotoxicidade dos Compostos da Série SM | 45 |
| 5.1.3. Citotoxicidade dos Compostos da Série MVAB | 47 |
| 5.2. Ensaio de Toxicidade em <i>Leishmania braziliensis</i> M2904..... | 50 |
| 5.2.1. Toxicidade dos Compostos da Série MR | 51 |
| 5.2.2. Toxicidade dos Compostos da Série SM | 52 |
| 5.2.3. Toxicidade dos Compostos da Série MVAB | 53 |
| 5.3. Atividade Leishmanicida dos compostos <i>in vitro</i> | 58 |
| 5.3.1. Atividade Leishmanicida da Série MR | 58 |
| 5.3.2. Atividade Leishmanicida da Série SM | 60 |

| | |
|--|----|
| 5.3.3. Atividade Leishmanicida da Série MVAB | 61 |
| 5.4. IC50 e EC50 dos Compostos Seleccionados | 62 |
| 5.5. Ancoragem Molecular..... | 65 |
| 5.5.1. Compostos da Série MR | 66 |
| 5.5.2. Compostos da Série SM | 73 |
| 5.5.3. Compostos da Série MVAB | 74 |
| 6. CONCLUSÕES | 78 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são classificadas como doenças infecto-parasitárias de distribuição geográfica mundial assim como a Doença de Chagas, que é causada por protozoários da família *Tripanossomatidae*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016) são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas, DTN (do inglês, *NTD: Neglected Tropical Diseases*), uma vez que acometem pessoas de países de extrema pobreza ou subdesenvolvidos e/ou que sofram por conflitos políticos e sociais, localizados entre os trópicos (ALVAR *et al.*, 2012). É uma antropozoonose que se caracteriza clinicamente de forma muito diversa, dependendo da espécie que acomete o hospedeiro vertebrado e de seu estado imunológico (ASHUTOSH *et al.*, 2007). As leishmanioses podem ser classificadas em duas grandes categorias: Leishmaniose Cutânea (LC), que agride geralmente o local onde ocorreu a inoculação do parasito e/ou mucosas adjacentes, podendo haver subclassificações dependendo do local acometido e da gravidade das lesões; e Leishmaniose Visceral (LV), mais severa, que acomete órgãos como baço, fígado, rins, linfonodos e medula óssea do indivíduo e pode levar a morte se não tratada corretamente. A transmissão dessa doença acontece pela picada de insetos flebotomíneos dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (KAYE & SCOTT, 2011).

Estima-se que no mundo todo cerca de 2 milhões de casos ocorram anualmente, sendo 75% de Leishmaniose Cutânea e 25% dos casos sejam de Leishmaniose Visceral (TABBABI *et al.*, 2019). De todos os casos registrados na América Latina, 90% acontecem no Brasil. Segundo órgão responsável pelas notificações dos casos no Brasil (SINAN, 2017), a letalidade de ambas as formas da doença vem aumentando gradativamente de 3,1% no ano 2000 para 7,1% em 2017.

O tratamento da leishmaniose, tanto cutânea quanto visceral, é atribuído ao uso de medicamentos antimoniais pentavalentes (como o Antimoniato de Meglumina), pentamidinas e a Anfotericina B lipossomal. Esses medicamentos necessitam de certa vigilância profissional especializada (internação) quanto a sua administração pelo fato de serem altamente tóxicos e poderem causar reações adversas aos usuários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Além disso, pelo fato de os pacientes geralmente morarem em zonas rurais e afastadas dos centros de saúde

dificultando o transporte diário desses pacientes para o tratamento, pode haver uma desistência por parte do paciente e/ ou a uma resistência do parasito ao tratamento e/ou causando recidivas (OPAS, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Portanto é de extrema importância e urgência que novos medicamentos sejam disponibilizados para o tratamento das leishmanioses, a fim de que se minimizem os casos de intolerância e resistência ao medicamento e sua toxicidade e aumentem as chances de cura ou remissão da doença (LAMOTTE *et al.*, 2017; ESPADA *et al.*, 2019).

O estudo de cinases vem se tornando cada vez mais importante por serem enzimas que atuam na sinalização celular para eventos fundamentais como, sobrevivência celular, transporte, morte programada (apoptose) e divisão celular, e que estão desreguladas na maioria das doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, metabólicas e doenças infecciosas, como a leishmaniose (NO *et al.*, 2016; FERGUSON & GRAY, 2018).

Dentro dos estudos com cinases destaca-se a atuação das *Serine/Arginine Proteines Kinases* (SRPKs), que são cinases envolvidas na fosforilação específica de resíduos de serinas e argininas de algumas proteínas ricas nesses resíduos em *tandem*. As SRPK atuam principalmente na maturação do mRNA em proteínas responsáveis pelo controle de *splicing* e *splicing alternativo* (fatores de *splicing*) (AUBOL & ADAMS, 2014).

Tendo em vista essas proteínas e sua participação no ciclo celular e no controle da produção de proteínas, as SRPKs têm mostrado um papel importantíssimo durante o estabelecimento de doenças infecciosas e do câncer, mostrando ser um alvo em potencial para tratamento dessas doenças quando inibidas (MOREIRA, 2018). Sendo assim, este trabalho tem por objetivo buscar novas terapias farmacológicas, mais eficazes para leishmaniose, tendo como alvo, a inibição das SRPKs de *Leishmania braziliensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que acometem o homem e pode ser fatal se não tratada. A taxonomia de *Leishmanias* é descrita como pertencente ao reino Protista com sub-reino: Protozoa, filo Sarcomastigophora e sub-filo Mastigophora, pertencente a classe Zoomastigophorea a ordem de Kinetoplastida e de sub-ordem: Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* (LAINSON, 2010). São parasitos intracelulares obrigatórios de formas de vida digenético desenvolvendo uma parte da sua vida no vetor invertebrado artrópode e sendo completada no hospedeiro vertebrado mamífero (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica as leishmanioses como pertencente do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) que são doenças que mais afligem pessoas em situação de vulnerabilidade social que pertencem a países subdesenvolvidos e que sofram com conflitos políticos e econômicos que geram altos índices de desigualdade, como acesso à educação (PINTO *et al.*, 2020), saneamento básico e nutrição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Nos países da África, a LC é a doença mais frequente entre as demais leishmanioses. A transmissão é antrozoonótica tendo animais mamíferos silvestres como os principais reservatórios. No Meio Leste e Norte da África (*Middle East and North of Africa – MENA*) existem duas formas de transmissão da leishmaniose cutânea que foram reportadas: a primeira, antrozoonótica, em que o homem não é o reservatório e sim pequenos mamíferos, como os roedores; e a segunda que é chamada de antroponótica, em que o ser humano é o único reservatório e hospedeiro, onde as leishmanias migram das células rompidas, tornando-se flageladas novamente e infectando novas células e podendo ser transmitida para outros hospedeiros mamíferos (SUNYOTO *et al.*, 2018).

As espécies que foram reportadas como capazes de transmissão antroponóticas são as *L. tropica* e *L. donovani*. As espécies de flebotomos mais envolvidos na transmissão da leishmaniose no *MENA* são *Phlebotomus papatasi*

(antropozoonótico) e *Phlebotomus sergenti* (antroponótico), este circulando exclusivamente por áreas periurbanas e urbanas com comportamento endofílico e consegue sobreviver em locais semiáridos (Síria, Irã, Marrocos, Iêmen e Algéria) (TABBABI, 2019; SUNYOTO *et al.*, 2018).

Nos países asiáticos, os casos clássicos de leishmaniose cutânea também são atribuídos, em sua grande maioria, a *L. tropica* e de leishmaniose visceral à *L. donovani*. No caso específico da Índia, também são observados casos atípicos, porém raros, em que espécies que no conhecimento clássico causariam leishmaniose cutânea, causam manifestações viscerais graves e vice-versa. Os autores relataram que essas condições atípicas são complexas por exibirem variações peculiares nas manifestações clínicas e no tempo de duração e que medidas de segurança e novos estudos precisam ser realizados para melhor compreensão da biologia envolvida na leishmaniose tanto clássica, quanto na atípica (THAKUR *et al.*, 2018). No Figura 1, está representada a distribuição geográfica mundial das leishmanioses cutânea, mucosa e visceral, de acordo com a OMS, 2020.

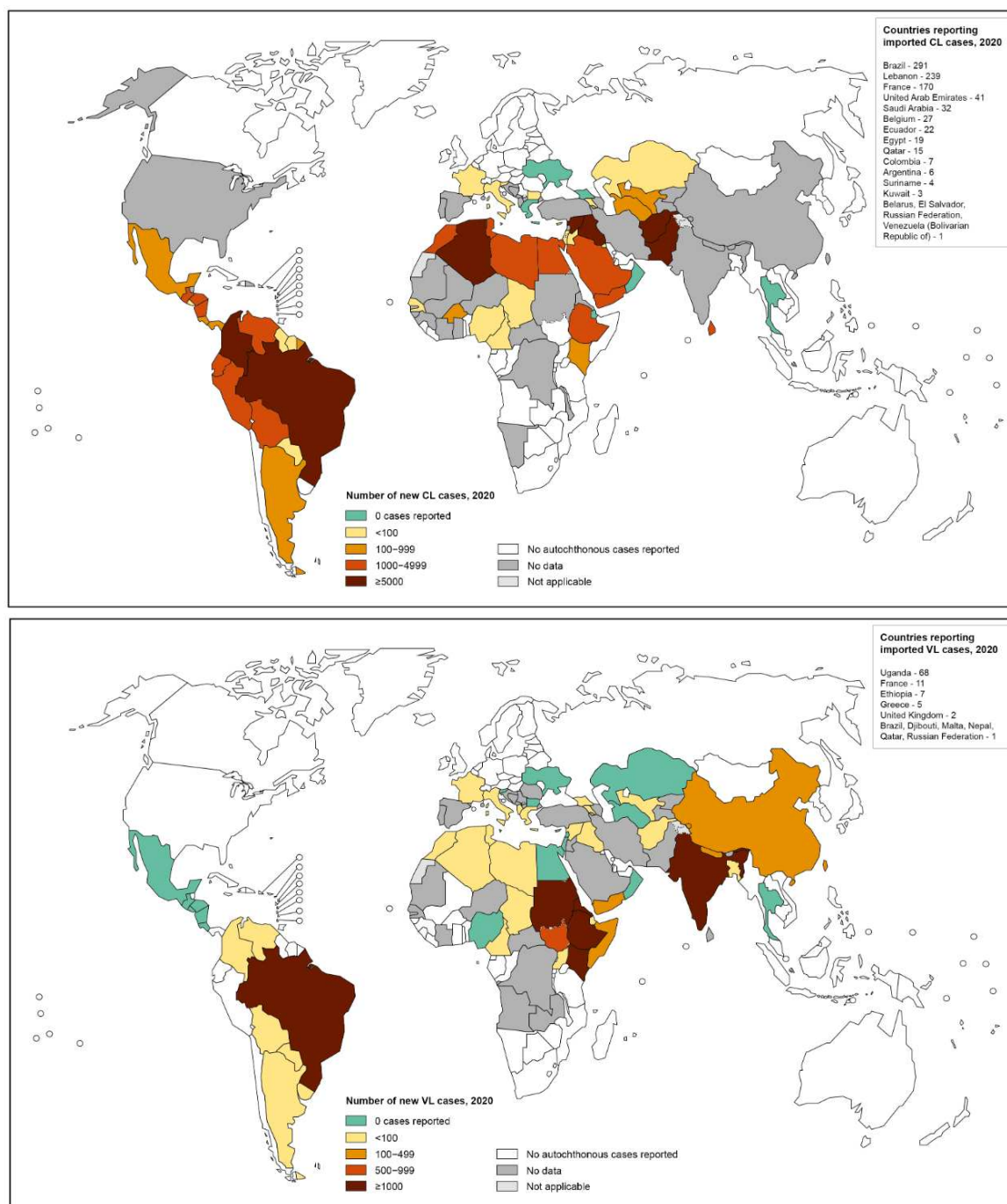


Figura 1: Distribuição geográfica de Leishmaniose no mundo. Gráfico superior: Status da endemicidade de leishmaniose cutânea no mundo em 2020. Gráfico inferior: Gráfico superior: Status da endemicidade de leishmaniose visceral no mundo (OMS, 2020).

Nas Américas, as LC são causadas por espécies dos subgêneros (forma de classificar os gêneros de leishmania baseada em perfil enzimático, bioquímica e formas de evolução dentro do flebotomíneo (LAINSON, 2010)), de *Leishmania* (ROSS, 1903) e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987). Nas primeiras estão incluídas as espécies *Leishmania (L) mexicana*, *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (L) venezuelensis* e *Leishmania (L) garnhami*. Nas do subgênero *Viannia* estão incluídas as *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) panamensis*, *Leishmania (V) peruviana*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) lainsoni* e *Leishmania (V) colombiensis* (REITHINGER *et al.*, 2007). Recentemente foi descoberto mais um subgênero que foi introduzido na taxonomia de subgêneros da leishmania, baseando-se em análises moleculares de proteínas altamente conservadas como a HSP70, gGAPDH e a SSU sRNA (subunidade menor de rRNA), o *Mundinia*, que possui como seu representante a *Leishmania Mundinia martiniquensis*, (ESPINOSA *et al.*, 2016).

Na América Latina os casos de leishmaniose cutânea são mais atribuídos às espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonenses*, *L. colombiensis* e *L. mexicana*, também recebendo o nome de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Nessa classificação entram subclassificações de acordo com as manifestações clínicas apresentadas e dessa forma ficam assim divididas: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucosa (LM). Todas essas classificações foram assim estabelecidas de acordo com as manifestações clínicas apresentadas e de acordo com o tipo perfil de resposta imune que o hospedeiro humano apresenta durante a progressão da doença (ANVERSA *et al.*, 2018). Os casos de Leishmaniose Visceral nas Américas, são atribuídos principalmente a espécie *L. infantum chagasi* (ROMERO & BOELAERT, 2010).

Os países da América Latina, então, criaram um programa de comunicação e de desenvolvimento de medidas protetivas e epidemiológicas para os casos de leishmaniose nos seguintes países: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, El Salvador e Venezuela, denominada Organização Pan Americana de Saúde - OPAS (*Pan American Health Organization – PAHO*) ligada diretamente às diretrizes preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*). A OPAS emite a cada triênio, informes epidemiológicos dos casos

registrados de leishmaniose tegumentar e visceral de cada um dos 18 países endêmicos para leishmaniose da América Latina, (tanto cutânea quanto visceral) a fim de informar sobre os atuais estados epidemiológicos que se encontram os países, para em conjunto adotarem melhores medidas políticas de intervenção e controle da doença a serem adotados pelo triênio seguinte. Dentro dessa organização, o Sistema de Informação Regional de Leishmaniose nas Américas (SisLeish) é a plataforma utilizada para o registro das informações coletadas (incidência, números absolutos de casos reportados, número de pacientes curados e medicamentos disponíveis em cada país) e são traçadas estratégias para o Plano de Ação. Em dezembro de 2019, o último informe foi lançado e alguns problemas foram pontuados como prejudicadores de recolhimento dos dados, sendo eles citados conflitos políticos e socioeconômicos e o atraso na alimentação do programa (OPAS, 2019). No Brasil, a atualização de 2018 emitida pela OPAS trouxe os seguintes dados, a incidência no ano de 2018 foi de 15,8/100.000 habitantes, com um índice de transmissão classificado como “muito intenso”. No mesmo ano, foram registrados 15.632 novos casos, onde 95,1% correspondem a leishmaniose cutânea e os demais em leishmaniose mucosa. Na última atualização emitida pela OPAS no final de 2019, mostrou que a incidência da leishmaniose cutânea/ mucosa diminuiu para 14,4/100.000 habitantes, diminuição essa atribuída principalmente a diminuição de número de casos em crianças menores de 10 anos, uma meta do plano de ação estipulada em 2018 (OPAS, 2019).

Estima-se que 49,8% da população esteja em área de transmissão intensa o que aumenta o risco de infecção. E quando comparado com os dados de 2017, notou-se uma melhora significativa nas áreas de vigilância e controle da transmissão, que foi uma meta do Plano de Ação do triênio 2016/2018 (OPAS, 2019). Além disso, no Brasil, a *Leishmania braziliensis* ocupa o segundo lugar de maior taxa de infecção entre as espécies de leishmania encontradas no Brasil, perdendo apenas para *L. amazonenses* (OPAS, 2019). Mais uma vez, ressaltando a importância de desenvolver novas terapias farmacológicas para essa doença.

2.2 Ciclo de Vida Parasitário

A leishmaniose é uma doença parasitária causada pela transmissão de protozoários de espécies de *Leishmania sp.* que são inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo), sendo popularmente conhecidos como mosquito-palha e birigui no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Porém, outras espécies já foram confirmadas como vetores de transmissão de leishmanioses no Brasil como a *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* e *Lu. evansi* (BELO *et al.*, 2013; VIANNA *et al.*, 2016; HANDMAN, 1999; LESTINOVA *et al.*, 2017).

De forma geral para leishmanioses o ciclo de vida do parasito é heteroxênico (Figura 3), em que o parasito possui o ciclo de vida completo dependente de um hospedeiro intermediário invertebrado (flebotomíneo) e um hospedeiro vertebrado definitivo (mais comumente, os mamíferos) (SCOTT & NOVAIS, 2016; ROSSI & FASEL, 2017).

O vetor invertebrado adquire o parasito tanto em sua forma promastigota, quanto em sua forma amastigota (Figura 2A e 2B), circulantes na corrente sanguínea ou em células de tecidos, a partir de animais silvestres reservatórios (gambás, raposas e roedores), durante a picada para o repasto sanguíneo (RATH *et al.*, 2003). No estômago do flebotomíneo, devido a alterações do ambiente estomacal como o aumento do pH e diminuição da temperatura (25°C) comparado ao hospedeiro vertebrado, tem início algumas transformações morfológicas e bioquímicas e que irão promover o desenvolvimento inicial do parasito. Além disso o lipofosfoligano (LPG) e a glicoproteína de membrana 63 (gp63) o ajuda a sobreviver ao ambiente hostil de enzimas hidrolíticas do estômago para que alcance a porção do intestino do flebótomo (ALVAREZ-RUEDA *et al.*, 2009; ANVERSA *et al.*, 2018).

Somente na porção intestinal o parasito alcançará sua forma de promastigota procíclica, onde ele dá início ao seu ciclo proliferativo (crescimento em fase logarítmica). Depois de algumas horas, o parasito, ainda no intestino do vetor, dá início ao processo de metaciclogênese, em que promastigostas adquirem perfil infectante a partir do momento em que sofrem alterações bioquímicas e

morfológicas e migram para o aparato bucal do inseto vetor, que em algum momento irá novamente picar um vertebrado para se alimentar (ANVERSA *et al.*, 2018).

Considerando o homem como o hospedeiro vertebrado, as formas promastigostas metacíclicas são injetadas através da picada, junto com a saliva, do inseto vetor, na corrente sanguínea, onde serão reconhecidas pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), dando início a resposta imunológica (RI) e alcançando porventura os macrófagos teciduais. Uma vez fagocitadas, as condições de temperaturas mais elevadas (36,5°C) e o pH ácido encontrado dentro do fagolisossomo do macrófago, favorecem a transformação das promastigotas em amastigotas que se multiplicam incansavelmente, estabelecendo a infecção, evadindo todas as respostas do Sistema Imune, até que o macrófago sofra lise e sejam liberadas e infectem outras células de outros tecidos alvos em que haja grande função de células fagocíticas, como no caso do baço, rins, fígado, medula óssea, linfonodos, pele e mucosas (PEREIRA *et al.*, 2017; LAMOTTE *et al.*, 2017; NIETO *et al.*, 2011).

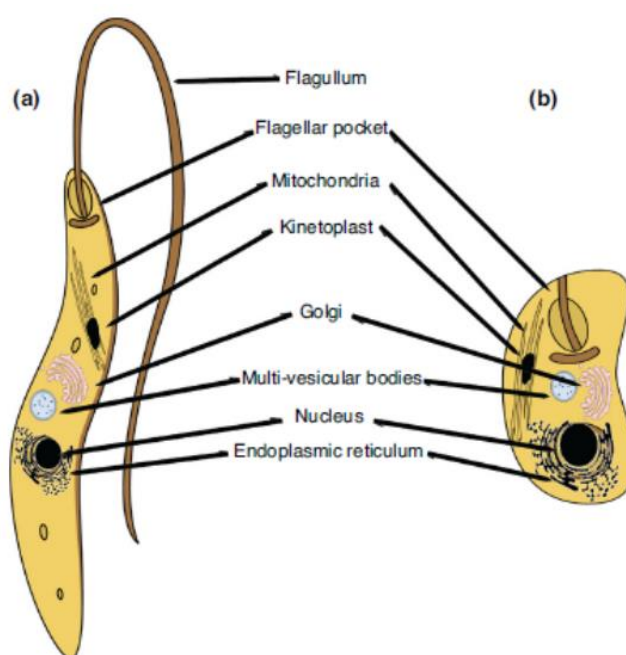


Figura 3: Ilustração morfológica da *Leishmania*. (a) Forma promastigota da *Leishmania* em geral. (b) Forma amastigota intracelular da *Leishmania* em geral (Adaptado de : Zulfiqar, Shelper e Avery, 2017)

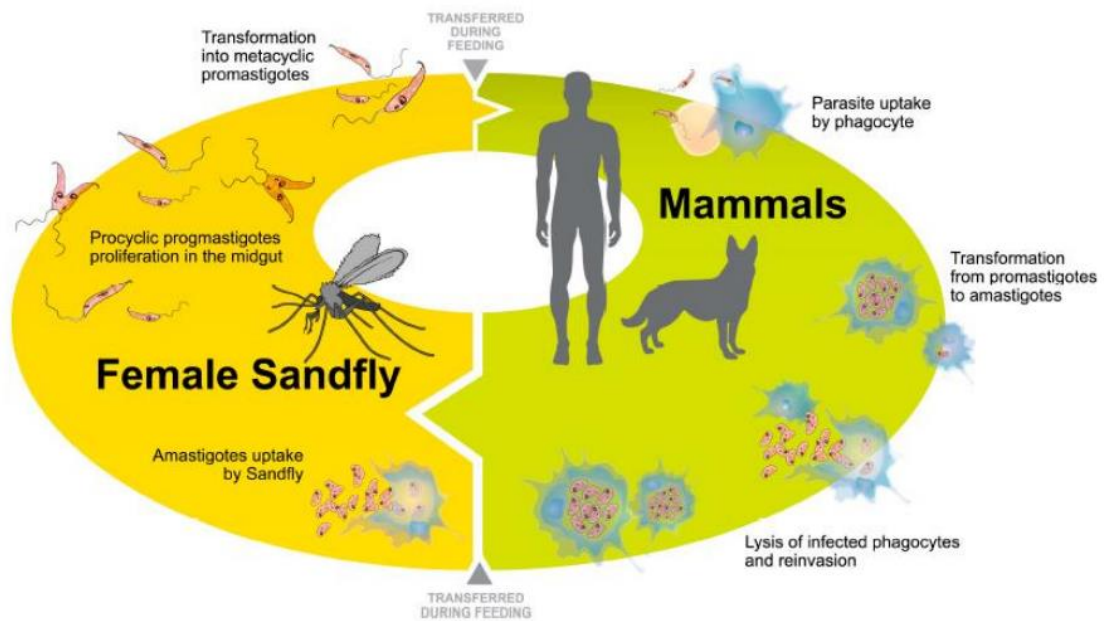


Figura 2: Esquema do ciclo de vida do parasito. O ciclo de vida e as formas de apresentação dos parasitos do gênero *Leishmania*. A partir do momento do repasto sanguíneo realizado pelo flebótomo, formas promastigotas infectantes entram na corrente sanguínea e são fagocitadas por macrófagos. Adquirem então sua forma infectiva intracelulares, amastigotas, que dão início à infecção causando sintomas. Em um segundo repasto sanguíneo, o flebótomo adquire formas promastigotas livres do parasito e células infectadas, que se transformam em seu intestino, dando início ao ciclo novamente (VERAS *et al.*, 2016).

2.3 Relação parasita-hospedeiro

A relação com o hospedeiro tem início quando o vetor artrópode inicia o repasto sanguíneo com uma picada. Então, formas promastigotas, alongadas e flageladas são inseridas no sangue capilar e se locomovem pela corrente sanguínea. Logo no início da interação com o hospedeiro, a primeira barreira encontrada pelo parasito é o sistema complemento. Moléculas aderidas na membrana do parasito, LPG e gp63, possuem papel fundamental na evasão ao sistema imune do hospedeiro e de serem reconhecidos pelo complemento e ainda o usam como acessório para invasão no macrófago (ANVERSA *et al.*, 2018).

Em seguida, neutrófilos são recrutados para o local da infecção e iniciam respostas citotóxicas e humorais variáveis dependentes da espécie em que infectou e do sistema imune do hospedeiro. As células que desempenham fundamental papel

no início da infecção, são os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (SCOTT & NOVAIS, 2018).

Os neutrófilos podem adotar um perfil citotóxico que trabalha para a eliminação do parasito pelas *NETs* (*neutrophil extracellular traps*) que se aderem aos parasitos e causam a sua morte. Também podem agir por fagocitose e degranulação, ativando vias de morte celular junto ao sistema complemento (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2014). As *NETs* são redes de fibras de cromatina associados a proteínas microbicidas como histonas, elastase e grânulos tóxicos (ROSI & FACEL, 2017). A *Leishmania*, ao longo dos anos de evolução, desenvolveu mecanismos de evadir a resposta imune inata, mediada por neutrófilos. Existem duas formas principais de evadir a *NETosi* e uma delas é a secreção de endonucleases (como a 3' Nucleotidase/ Nuclease (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2014)) como também a liberação de proteases presentes na saliva do inseto flebótomo durante o repasto sanguíneo, ambas agindo na destruição das fibrilas das *NETs* (SILVA *et al.*, 2016).

Os neutrófilos também realizam a ativação dos macrófagos, pela produção de INF γ , que ativa a via da óxido-nítrico sintase (iNOS) e a liberação de óxido nítrico (NO) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) matando o parasito. Os neutrófilos, quando infectados, aumentam a liberação de CC-quimiocina ligante 3 (CCL-3) para o recrutamento de células dendríticas (CD) que ativam a fagocitose diferenciada do neutrófilo. Porém, macrófagos e CD sofrem uma supressão com os neutrófilos mortos o que favorece a expansão e a infecção de *Leishmania* (SCOTT & NOVAIS, 2016).

Os macrófagos são células fagocíticas especializadas em destruir patógenos intracelulares, como bactérias, vírus e parasitas. Quando ativados são capazes de fagocitar o patógeno que se funde com lisossomos, formando o fagolisossomo, que possui um pH muito baixo e muitas enzimas líticas. Os macrófagos são as células que *Leishmanias* instauram a infecção de modo mais efetivo. A partir do macrófago é que elas conseguem modular o sistema imune do hospedeiro mais elaborado e de fato, manter a infecção em curso. Nas primeiras horas de infecção os macrófagos perfazem a ativação de vias catalíticas (principalmente a de NO) para a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) que permitem combater qualquer tipo de patógenos sem causar grande dano ao hospedeiro (ROSSI & FACEL, 2017).

Porém, no caso da infecção por *Leishmania*, elas possuem diversas formas de evadir o sistema imune e estabelecer a infecção de forma muito eficaz. A metaloprotease GP63 é a glicoproteína mais abundante da superfície das promastigotas e é a principal responsável por evadir o Sistema Imune por meio, principalmente, da subversão da transcrição e tradução (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015). O lipofosfoliglicano (LPG), também de superfície, é capaz de retardar a formação do fagolisossomo para que as formas promastigotas possam se diferenciar em amastigotas (PANDEY *et al.*, 2016; ROSSI & FACEL, 2017).

Uma vez dentro do fagolisossomo, as amastigotas começam a controlar o metabolismo celular para obter vantagens de estabelecer a infecção no ambiente. Uma delas é o controle do efluxo de ferro advinda dos eritrócitos. Os parasitas fazem o bloqueio de ferroportina (transportador de membrana de íons Fe^{+2}) que faz com que haja um acúmulo de íon ferroso que favorece a replicação do parasito, promovendo o sucesso da infecção (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Os macrófagos desempenham um papel muito importante não só na resistência e combate ao parasito, mas também interfere na imunomodulação do hospedeiro contra ele. Parasitos de diferentes espécies, podem acionar respostas inflamatórias diversas, que ativam perfis de macrófagos em concentrações distintas, que proporcionam diferentes manifestações clínicas. Durante o progresso da infecção, os macrófagos podem adquirir dois fenótipos principais da Resposta Imune, polarizadas, o M1 (pró-inflamatório) e o M2 (anti-inflamatório) (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018).

As formas de apresentação da doença dependem muito da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro. As leishmanioses que agridem a pele e/ou mucosas, são chamadas de Leishmaniose Cutânea (LC) e/ ou Mucocutânea (LMC) respectivamente e tem diversas apresentações clínicas, mas atingem principalmente o rosto e mucosas adjacentes. A Leishmaniose Visceral, como o nome diz, atingem órgãos internos como fígado, baço, rins e medula óssea, podendo ser letal se não tratada corretamente. Geralmente agridem o local de modo a poder causar deformidade e/ ou perda de função do tecido acometido. Em graus mais avançados da doença, infecções secundárias causadas por bactérias ou fungos podem estar associadas, dificultando o tratamento e podendo levar a óbito (CARNEIRO *et al.*, 2018; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; RATH *et al.*, 2003).

Os linfócitos T auxiliares serão, quando ativados, os principais efetores e controladores da resposta imune na tentativa de eliminar o parasito sem causar muitos danos ao hospedeiro. Para isso, com a liberação de citocinas e mediadores químicos por macrófagos, neutrófilos e CD, os linfócitos T poderão adquirir perfis de ação de acordo com o estímulo que recebem e desempenhar um tipo de resposta específico. O primeiro perfil, chamado de resposta Th1, ou resposta de resistência ao parasito e atividade microbicida, estimulado pela liberação de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-12, TNF α e INF γ . O perfil Th2 direciona a uma resposta de regulação e é mais voltada para a produção de mediadores anti-inflamatório, como IL-4, IL-10, IL-13. Isso não significa propriamente que ambos os perfis sejam específicos em situações distintas do processo infeccioso. Elas atuam concomitantemente no decorrer da infecção e o balanço da atuação entre esses dois perfis é que vai definir a progressão da doença e as manifestações clínicas que o paciente poderá desenvolver ao longo dela (MENDONÇA *et al.*, 2020; GURUNG *et al.*, 2015).

A resposta Th1 é mediada principalmente pela produção de INF γ , IL-12 e TNF α , que está associado a um bom prognóstico da doença, eliminando e resistindo ao parasito, que recrutam e ativam mais macrófagos ao local da infecção. Já a resposta Th2, é mediada pelas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, onde estarão mais associadas a susceptibilidade ao parasito e persistência da doença. Elas assim atuam para manter o equilíbrio e não haver uma resposta exacerbada de ambos os perfis, porém, quando algum deles se sobrepõe ao outro, os sinais e manifestações clínicas mais severas começam a aparecer e o tratamento pode começar a não surtir efeito (GURUNG *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2018; MENDONÇA *et al.*, 2020).

2.4 Tratamentos disponíveis para Leishmaniose no Brasil

As leishmanioses vêm sendo tratadas com o uso de agentes quimioterápicos, das quais incluem os antimônios pentavalentes, a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paramomidina, que geram metabólitos tóxicos ao organismo e que podem proporcionar a resistência do parasito diminuindo sua eficácia em recidivas da doença (BARRETT *et al.*, 2019) Mecanismos genéticos que envolvam a

resistência dos parasitos às drogas mais utilizadas no tratamento têm buscado novos alvos para genes superexpressos no parasito que conseguem driblar sua eficácia além de ferramentas para monitoramento terapêutico das drogas (RASTROJO *et al.*, 2018).

No Brasil, os tratamentos que estão disponíveis para a leishmaniose são o uso de antimônios pentavalentes (Sb^{+5}), sendo esse o de primeira linha de tratamento, e o mais indicado para casos de leishmaniose tegumentar e mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A anfotericina B é o medicamento de primeira linha para gestantes e de segunda linha de tratamento caso haja falha terapêutica com os antimônios; porém é contraindicada em casos de pacientes cardiopatas, hepatopatas e principalmente, nefropatas; também é disponibilizado em sua forma lipossomais que aumenta seus níveis plasmáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Por fim, tem ainda a pentamidina, que também são fármacos de segunda escolha, principalmente quando o paciente apresenta alguma condição patológica sistêmica que o impeça de utilizar a anfotericina B. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Os tratamentos que estão disponíveis para a leishmaniose possuem diversos efeitos colaterais para o hospedeiro, uma vez que, em uso prolongado, esses medicamentos têm alta probabilidade de causar efeito nefrotóxico e hematotóxico. Além disso podem também causar danos hepáticos e resistência do parasito ao tratamento (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

A Anfotericina B é um potente fármaco antifúngico e antiparasitário. Sabe-se que seu principal mecanismo de ação está coligado à formação de poro na membrana do parasito, levando-o a morte, devido a presença do ergosterol na membrana de *Leishmania*, mas não na de mamíferos (BARRETT *et al.*, 2019). Porém, o uso prolongado desse medicamento tem grave efeito nefrotóxico e hematotóxico no hospedeiro. Atualmente a anfotericina B é administrada em sua forma lipossomal, para assim tentar diminuir os riscos adversos que esta pode causar ao organismo (MEHEUS *et al.*, 2010, MENDONÇA, 2018). Além disso é o único medicamento que pode ser usado em gestantes e em crianças com menos de 5 anos de idade, o que gera uma restrição em casos de resistência do parasito ao tratamento ou hipersensibilidade por parte do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A desvantagem do uso de Anfotericina B também está no fato de ser

nefrotóxico e necessitar de condições de resfriamento específicos, não podendo ser ministrado e mantido em residência (LAMOTE *et al.*, 2017).

A miltefosina atua sobre o metabolismo de fosfolipídios e prejudica a função mitocondrial no parasito que morre por apoptose. Contudo ensaios de toxicidade revelaram seu efeito teratogênico e portanto, contraindicados para gestantes. A pentamidina e a paramomicina também possuem ação na função mitocondrial do parasito, onde a paramomicina tem ação sobre a síntese proteica e aquela aumenta o influxo de cálcio intracelular, que ativa a morte da célula por apoptose (NO, 2016). Porém a paramomicina necessita de internação e monitoramento hospitalizado para a administração do medicamento que é via parenteral (LAMOTTE *et al.*, 2017).

No Brasil, os medicamentos para o tratamento das leishmanioses são custeados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), garantido pelo Estado e são disponibilizados o Antimoniato de Meglumine, Anfotericina B Desoxicolato, Anfotericina B Lipossomal e Isetionato de Pentamidina, de acordo com o tipo de leishmaniose e o grau de acometimento do paciente (OPAS, 2019).

A leishmanioses possuem tratamento longo e dispendioso em logística dos pacientes, o que agrava o risco de abandono do tratamento e pode causar resistência do parasito e recidivas da doença (SANTOS *et al.*, 2008). Além disso, exames laboratoriais e de eletrocardiográficos devem ser realizados periodicamente para acompanhamento da possível toxicidade que esses medicamentos causam. Mesmo que o SUS garanta a realização desses exames, geralmente eles demoram muito tempo para serem liberados, o que pode comprometer o tratamento e pode fazer com que o paciente abandone e venha a piorar o quadro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Pelo fato dessas drogas serem altamente tóxicas ao organismo e devido ao fato de que existe um aumento de estudos mostrando a resistência do parasito aos tratamentos disponíveis, torna-se evidente e urgente a pesquisa de novos alvos farmacológicos e o desenvolvimento de novas drogas ou vacinas que ajudem a combater ou minimizar os danos que a leishmaniose tem causado na sociedade (ALMEIDA *et al.*, 2011).

2.5 As Cinases como alvos de pesquisa

As proteínas cinases são enzimas que tem função de fosforilar outras proteínas em resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser), em que ativam vias de comunicação da célula culminando em uma ou mais respostas bioquímicas para determinado efeito biológico. As cinases estão amplamente distribuídas nos processos fisiológicos e metabólicos do indivíduo, participando ativamente das diversas funções celulares como, proliferação celular, resposta imune, expressão gênica, motilidade pilórica e intestinal, diferenciação celular embrionária e adulta e na morte celular (SILVA *et al.*, 2009).

A fosforilação proteica é um sistema complexo de regulação de extrema importância para a vida da célula. Existem 518 genes que codificam cinases no genoma humano (FERGUSON & GRAY, 2018) e 90% das proteínas são passíveis de serem fosforiladas (WATSON *et al.*, 2020).

Atualmente as cinases vem encontrando grande destaque nas pesquisas contra o câncer e o HIV, uma vez que elas interferem em todo ciclo metabólico celular e estão altamente desreguladas que podem favorecer o agravamento do quadro clínico aumentando assim a importância da pesquisa de alvos farmacológicos dessas condições, a fim de possibilitar o desenvolvimento de novos medicamentos que retardem ou eliminem a morbidade (CECCARELLI *et al.*, 2018; SHEPARD & HERTEL, 2009).

Nos últimos 30 anos de investigação de cinases como alvos farmacológicos, 38 medicamentos que as controlam foram aprovados no mundo para tratamento de doenças como o câncer e doenças infecciosas (FERGUSON & GRAY, 2018).

Sanderson e colaboradores, 2014, relatam em seus trabalhos que o estudo de proteínas cinases em *Leishmania* sugerem que a inibição química e genética (*knockout*) de enzimas como a CDK (*Ciclin-Dependent kinase*) e a MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) podem interferir na viabilidade e diminuir a proliferação de formas amastigotas de *Leishmania* durante a infecção em macrófagos (SANDERSON *et al.*, 2014).

Vários estudos com alvo em cinases de *Leishmanias* vem sendo testadas para elucidar os mecanismos de infectividade e proliferação do parasito e a importância dessas enzimas para um possível alvo farmacológico (ALVAREZ-

RUEDA *et al.*, 2009; DAN-GOOR *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

2.6 As *Serine/Arginine Protein Kinases* como alvo terapêutico

Dentro das várias classes de enzimas cinases, as SRPK's (*Serine/ Arginine Specific-Protein Kinases*) despertam o interesse dos pesquisadores em diversas doenças e elas já foram relacionadas com doenças neurodegenerativas (o Alzheimer), doenças infecciosas virais parasitárias como HPV, HIV, HBV, HCV e Epstein Barr Vírus, uma vez que elas estão ativas e superexpressas que promovem no desenvolvimento de processos infecciosos de grande importância ao parasito, como a montagem do capsídeo para reinfecções locais (ENDICOTT, NOBLE & JOHNSON, 2012; PRESCOTT *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2005; FUKUHARA *et al.*, 2006; KARAKAMA *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2013).

As SRPK's são cinases de proteínas específicas que fosforilam porções proteicas que sejam ricas em sequencias de serina e arginina ao longo de sua cadeia polipeptídica, como as proteínas SR. As proteínas SR (*serine/arginine rich*) são proteínas que foram relacionadas a diversas funções celulares que incluem a montagem o spliceossomo, recrutamento de fatores de *splicing* (U1 e U2) como também no recrutamento e inclusão de *éxons* no *splicing* alternativo (VANHAMME & PAYS, 1995).

As SRPKs estão envolvidas em processos fisiológicos de crescimento e replicação celular, diferenciação celular e na formação do spliceossomo (para o processo de *splicing* direto e alternativo na edição de mRNA) (JANG *et al.*, 2008). Uma vez que as proteínas SR são fosforiladas pelas SRPKs elas se translocam para o núcleo e delimitam as porções específicas de introns e *éxons* no pré-mRNA que vão determinar a sequência do mRNA maduro, portanto, participam de modo efetivo da maquinaria de *splicing*, tanto o convencional, quando o alternativo (MOREIRA, 2018). O genoma de tripanossomatídeos é organizado em regiões policistrônicas que contém repetições de sequências de uma mesma ou muito similar região gênica separadas por curtas regiões entre elas. O controle da regulação gênica é

principalmente pós transcricional, seja por maturação do mRNA (incluindo o *splicing*), seja na estabilidade ou na tradução da proteína (MILLER & WIRTH, 1988).

Uma desregulação das SRPKs pode causar um sobrecarregamento de sua função levando a um descontrole na maquinaria de *splicing*, produzindo diversas isoformas proteicas com funções muitas vezes antagônicas (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Morooka e colaboradores, 2015, mostraram a inibição da SRPK1 com o uso do SRPIN340 como potente inibidor onde ele diminui a angiogênese na degeneração macular em camundongos (MOROOKA *et al.*, 2015).

As SRPKs estão altamente desreguladas em doenças como o câncer. Siqueira e colaboradores testaram o SRPIN340 em linhagens tumorais e obtiveram resultados animadores quanto a importância dessa enzima no processo de progressão do câncer de mama (SIQUEIRA *et al.*, 2015). Além disso foi comprovado por Moreira e colaboradores o efeito anti-metastático na inibição de SRPK pelo SRPIN340 (MOREIRA, 2018).

O SRPIN340 é um inibidor ATP competitivo seletivo para as SRPK 1 e 2 de células de humanos. Esse inibidor já mostrou efeito contra a replicação viral, atividade antiangiogênica e antitumoral de diversos tipos de câncer (SIQUEIRA *et al.*, 2015, MOROOKA *et al.*, 2015).

Segundo Onofre, 2017, o SRPIN340 não possui nenhuma atividade inibitória sobre células murinas da linhagem RAW264.7 e nem apresentou atividade leishmanicida contra *Leishmania braziliensis* M2904, como esperado.

A partir disso, foram sintetizados os primeiros 22 compostos análogos ao SRPIN340, chamados de SRVIC, a fim de que se investigassem seu potencial leishmanicida contra *L. braziliensis* M2904, onde possuem diferenças estruturais estratégicas direcionadas por análises de bioinformática (TEIXEIRA, 2018). Desses testes, apenas dois análogos (SRVIC22 e SRVIC32), obtiveram resultados promissores.

Esses fatos despertaram o interesse no estudo das SRPK's como possível alvo para controle da proliferação de diversas doenças com o interesse de que a partir deles, possam ser descobertos tratamentos mais eficazes e seguros para a LTA no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida de novos análogos baseados na estrutura do SRPIN340 e sua inibição sobre a LbSRPK *in vitro* de *Leishmania braziliensis* M2904.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de 91 compostos análogos ao SRPIN340 em macrófagos da linhagem RAW264.7.

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de 91 compostos análogos do SRPIN340 em promastigotas de *Leishmania braziliensis* M2904.

- Avaliar atividade leishmanicida *in vitro* de 91 compostos análogos do SRPIN340 em ensaio de infecção de Macrófagos RAW264.7 por *Leishmania braziliensis* M2904.

- Determinar o IC₅₀, EC₅₀ e Índice de Seletividade dos melhores candidatos.

- Modelar a LbSRPK e avaliar *in silico*, os possíveis modelos de ligação nos análogos candidatos na enzima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos Testados

Foram testados 91 compostos, sintetizados pelo grupo do Professor Dr. Robson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Os compostos foram sintetizados a partir da estrutura do SRPIN340 (Figura 3). As séries obtidas foram as MR, SM e MVAB, descritas a seguir.

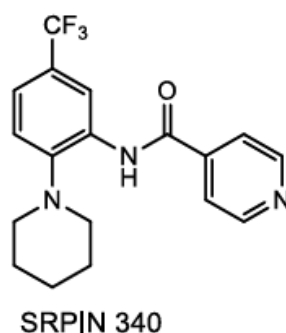


Figura 4: Fórmula Estrutural do SRPIN340. Estrutura química do SRPIN340 em que os compostos foram inspirados e sintetizados (RODRIGUES, 2019).

Os compostos da série MR, são diamidas inspirados na estrutura química do SRPIN340, já descrito anteriormente.

Os compostos SM possuem uma porção 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituída também inspirados na estrutura do SRPIN340. As estruturas dos compostos das séries testadas (MR, SM e MVAB) são apresentadas nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

Todos os compostos tiveram sua estrutura confirmada por espectroscopia por infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – dados não mostrados – os testes foram realizados pelo grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, liderados pelo Professor Dr. Robson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa – UFV.

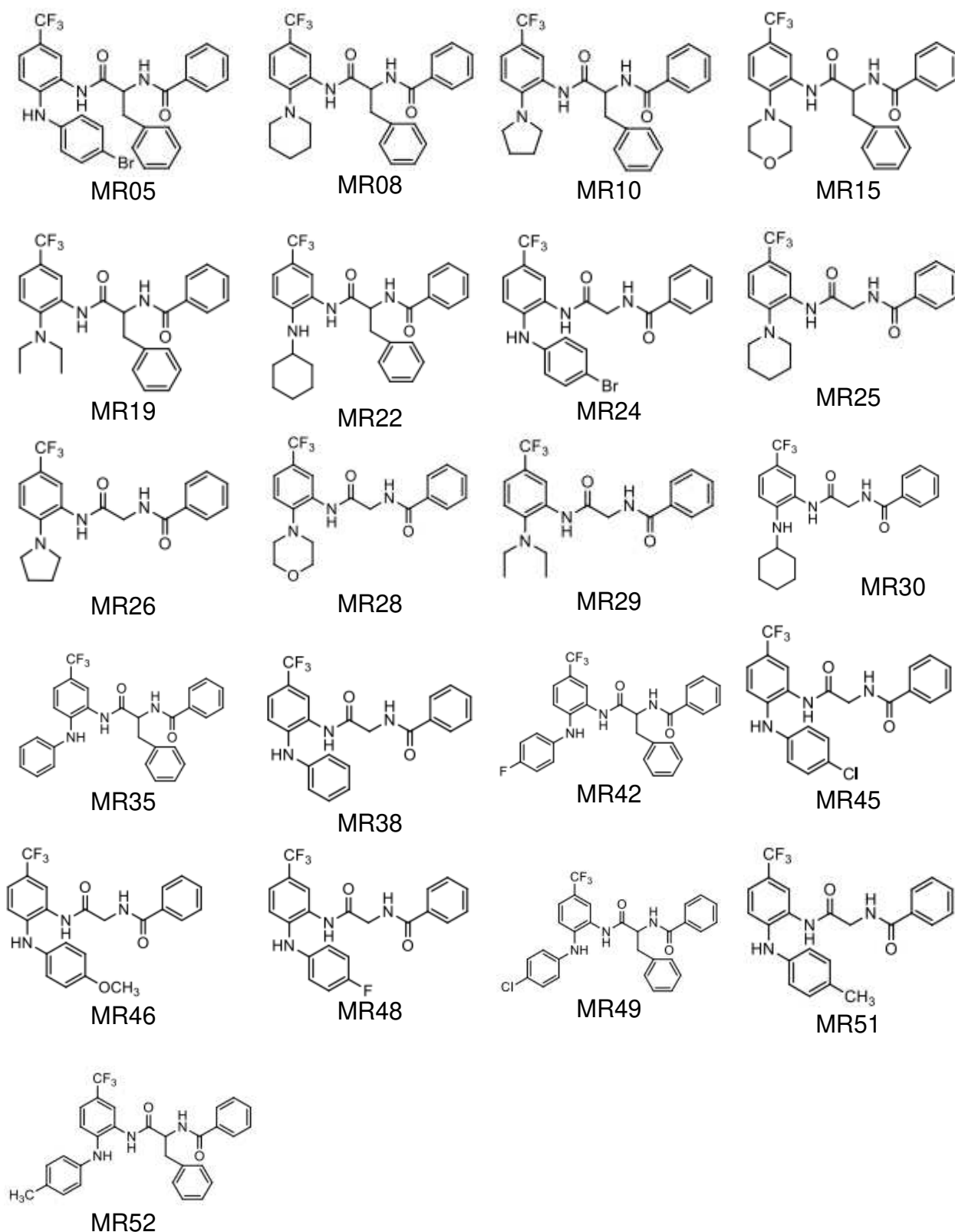


Figura 5: Fórmulas Estruturais dos Compostos da Série MR. Estruturas químicas dos compostos sintetizados inspirados no SRPIN340 da Série MR, testados nesse estudo (RODRIGUES, 2019).

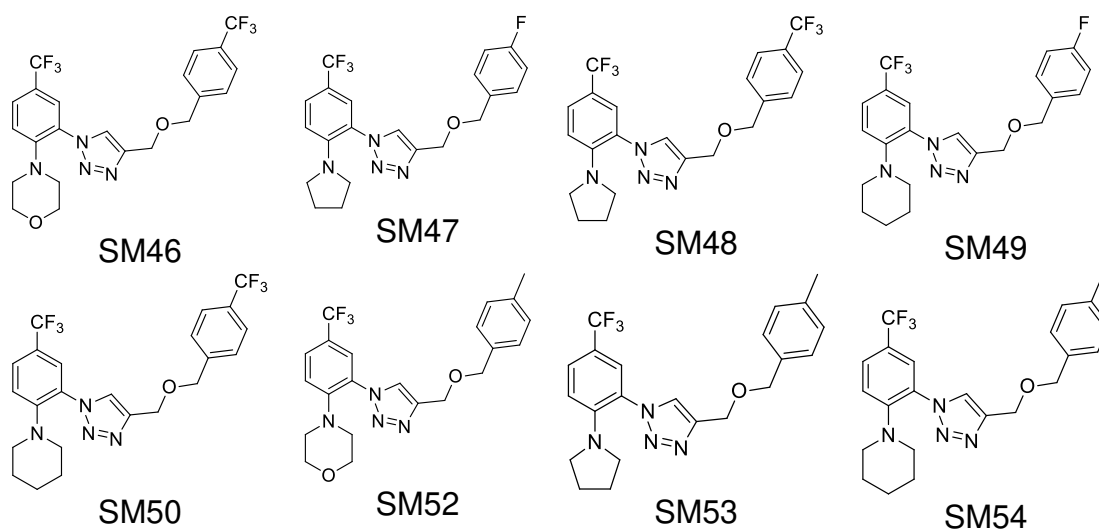


Figura 6 (Continuação): Fórmulas Estruturais dos Compostos da Série SM. Estruturas químicas dos compostos sintetizados inspirados no SRPIN340 da Série SM, testados nesse estudo (SOUSA, 2020).

4.2 Manutenção dos Macrófagos RAW 264.7

A linhagem de Macrófagos murinos RAW 264.7 utilizados nesse estudo foi mantida em garrafas de cultivo estéreis de 100 mL em 15mL meio RPMI-1640 Medium (@Sigma-Aldrich, USA) suplementado com L- glutamina (3 mM), Penicilina (2 μ M), HEPES (25mM) e Bicarbonato de Sódio (2M), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (@Gibco USA). As garrafas com as células foram mantidas em estufas de B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 5% CO₂ e 37°C. De modo que, apenas quando atingiam o estado de confluência eram utilizadas nos experimentos.

4.3 Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos RAW 264.7

Em placas de 96 poços foram semeadas 1x10⁵ ou 5x10⁴ células por poço, para ensaios de 24 e 48 horas, respectivamente. As células foram suspendidas com o auxílio de um raspador de células estéril (@KASVI, USA), transferidos para um Falcon de 50mL estéreis e contadas em Câmara de Neubauer, diluídas em PBS 1X e Azul de Tripán (na diluição de 1:1:50), a fim de descobrir a concentração de células por mL de cultura. Após semear as células, as placas foram mantidas em estufa de B.O.D a 37°C e 5% de CO₂ por, no mínimo, 24 horas, para completa aderência das células ao fundo dos poços. Os 91 compostos foram testados para uma triagem antes que se seguissem para outros experimentos. Os compostos foram diluídos de forma que, em cada poço, apresentasse uma concentração máxima final de 10 μ M. O Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente dos compostos, foi usado como controle negativo, na mesma concentração máxima dos compostos. A Anfotericina B (ANF B), usado como medicamento no tratamento contra a leishmaniose, foi utilizado como controle positivo nos testes de viabilidade celular na concentração de 3,125 μ M, como recomendado. Além disso, em quatro poços foram deixadas somente as células, sem receber qualquer tipo de tratamento, nomeados como Células Sem Tratamento (CST) para cálculo de viabilidade. Também foram separados quatro poços que continham somente meio para servir como branco nas leituras. Todos os testes e controles foram realizados com

quadruplicata interna e em duplicata biológica em dias diferentes. Após o tempo de incubação de cada tratamento de 23 e 41 horas, foi adicionado em cada poço 20µL de Resazurina a 0,1M, e as placas retornaram para a estufa por mais uma hora. Completos os tempos dos tratamentos, as placas foram levadas a leitura em espectrofotômetro de luz UV, nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm, para realização dos cálculos de viabilidade celular. As placas foram lidas durante três horas em intervalos regulares de 1 hora. Foram considerados aptos, os compostos que apresentarem o mínimo de 80% de células viáveis nos resultados.

4.4 Cálculos de Viabilidade Celular

Para os cálculos de viabilidade celular, pela redução da Resazurina, utiliza-se a fórmula a seguir:

$$\text{Redução} = [A_{570} - (A_{600} \times R0)],$$

Sendo que A_{570} é a Absorbância a 570 nm, A_{600} absorvância a 600nm e R0 significa um fator de correção (branco), calculado pela seguinte fórmula:

$$R0 = A_{MEIO570} / A_{MEIO 600}$$

Onde são calculados com as absorvâncias dos poços que só continham meio de cultura. A redução da resazurina está diretamente relacionada com a quantidade de células vivas no teste. Em seguida, realiza-se o cálculo a seguir:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \text{Redução} \times 100 / \text{Média da Redução das CST}$$

4.5 Manutenção de *Leishmania braziliensis* M2904

A linhagem de células de *Leishmania braziliensis* M2904 GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi mantida em garrafas de cultivo estéreis de 50 mL contendo 10 mL de meio Grace's (MARCA), suplementado com L-glutamina (mM) e penicilina (mM), acrescido de Soro Fetal Bovino (Gibco, USA) para concentração de 10% do

volume total. As leishmanias possuem uma taxa de crescimento regular e para que sejam mantidas adequadamente é necessário que se realize o repasse de 1×10^5 células para novas garrafas a fim de se manter as células viáveis para os experimentos. As garrafas foram mantidas em estufa de B.O.D. a 25°C e 5% de CO_2 .

4.6 Ensaio de Toxicidade em *Leishmania braziliensis* M2904

Os testes de toxicidade foram realizados em placas de 96 poços. Foram semeados 4×10^6 leishmanias por poço para os ensaios de 24 e 48 horas. As leishmanias em fase logarítmica de crescimento (promastigotas de 4 dias de cultivo) foram transferidas para falcons de 50mL e centrifugados a 1200g (3000 rpm) por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o botão formado foi ressuspensionado em 5mL de meio Grace's Completo 10% de Soro Fetal Bovino. A concentração foi determinada através de contagem em Câmara de Neubauer diluindo-se as células em Formalina 4% na concentração de 1:50. Os tratamentos com os 77 compostos foram adicionados logo em seguida de modo que a concentração final de cada composto fosse de $10\mu\text{M}$ por poço para um volume final de $200\mu\text{L}$. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle negativo na concentração máxima igual ao dos compostos diluídos. A Anfotericina B (ANF B) foi utilizada como controle positivo na concentração de $10\mu\text{M}$. Quatro poços foram mantidos sem tratamento, para comparação no cálculo de viabilidade e quatro poços continham somente o meio de cultura. As placas então foram mantidas em estufa de BOD a 25°C e 5% de CO_2 . Passadas 23 e 47 horas de tratamento, foi adicionado $20\mu\text{L}$ de Resazurina $0,1\text{M}$ em cada poço e as placas retornaram para estufa de BOD. Ao término das horas de tratamento (24 e 48 horas), as placas foram lidas em espectrofotômetro de luz UV nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm para avaliação da viabilidade celular. As placas foram lidas durante três horas em intervalos regulares de 1 hora. Os cálculos de viabilidade celular foram realizados segundo explicado no item 4.4. Foram considerados aptos, os compostos que obtiveram o valor de viabilidade celular menor que 20%.

4.7 Ensaio de Infecção *in vitro*

O ensaio de infecção *in vitro* foi realizado para avaliar a capacidade de ação dos 91 compostos na forma amastigota infectiva da *Leishmania braziliensis*. Em placas de 96 poços foram semeados 1×10^5 macrófagos/ poço em meio RPMI completo com 10% de SFB e mantidos em estufa de BOD a 37°C e 5% de CO₂ durante no mínimo 4 horas para aderência no fundo do poço. Em seguida, uma cultura de 7 dias de leishmanias em fase estacionária de crescimento (melhor dia de infecção) foi transferida para falcon de 50mL e centrifugada a 1200g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL de meio RPMI completo com 10% de SFB. Em seguida foram diluídas em formalina 4% (na proporção de 1:50) contado em Câmera de Neubauer em duplicata e calculada a concentração de leishmania/mL de meio. Foram então semeadas 15×10^5 leishmanias/macrófagos em cada poço da placa e mantidas em estufa de BOD a 37°C a 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada com RPMI Base (sem SFB e sem glutamina) para a retirada de células que não infectaram, não aderiram ou morreram durante a infecção. Foi então adicionado meio RPMI completo a 10% de SFB e novamente mantidas em estufa de BOD a 37°C e 5% de CO₂ por mais 24 horas. Após esse tempo, a placa novamente foi lavada com RPMI Base por três vezes e foram adicionados o tratamento com os 91 compostos na concentração máxima de 10µM, em meio RPMI Completo. A Dimetilsufóxido (DMSO) foi utilizado como controle negativo pois os compostos foram nele diluídos. A Anfotericina B (ANF B) foi utilizada como controle positivo, uma vez que também é usada no tratamento das leishmanioses. Quatro poços foram mantidos sem tratamento (CST) e quatro poços foram mantidos apenas com meio de cultura RPMI Completo, tanto para leitura de branco, quanto para verificação de contaminação interna. A placa então foi mantida em estufa de BOD a 37°C e 5% de CO₂ por mais 48 horas de tratamento. Após esse tempo, a placa novamente foi lavada em RPMI Base para a retirada das células não aderidas. Em seguida, foi adicionado 50µL de Meio de Lise (meio RPMI Completo com SDS 0,01%) em cada poço e deixado agir até que 90% das células fossem lisadas, de acordo com os poços de controle somente com macrófagos, observados em microscópios. A reação de lise foi interrompida com a adição de 150µL de Meio Grace's Completo a 15% de SFB. Em

seguida a placa foi levada a estufa de BOD a 25°C e 5% de CO₂ e a recuperação de células de leishmania foi acompanhada pelos 5 dias seguintes. Assim que os poços contendo somente as células infectadas sem tratamento recuperassem formas promastigotas das leishmanias, foi adicionado 20µL por poços de Resazurina a 0,1M. As placas foram lidas em espectrofotômetro de luz UV nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm para avaliação da viabilidade celular, por três horas, em intervalos de uma hora. Os cálculos de viabilidade celular foram realizados como explicado no item 4.4.

4.8 Análises Estatísticas

Todos os resultados obtidos das leituras de viabilidade celular foram processados no programa GraphPad Prism versão 6.1© e as estatísticas comparativas usadas foram o One way ANOVA para amostras pareadas, com significância de $p < 0,001$

4.9 Ancoragem Molecular dos Compostos Seleccionados

A sequência de LbSRPK previamente obtida pelo nosso grupo (PIMENTEL, 2020) foi alinhada com sequências homólogas de SRPK de outras espécies de *Leishmanias* e de outros organismos (*Homo sapiens*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* e *brucei*) inseridas no banco de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e do TritrypDB (*The Kinetoplastid Genomics Resource*). O modelo construído, apresenta-se de forma em que foram removidas as regiões N- e C-terminal e a região espaçadora, por apresentarem grande desordem estrutural o que pode dificultar a interação com ligantes em testes *in silico*.

De acordo com os dados dos alinhamentos obtidos foi possível prever a estrutura tridimensional da proteína do alvo biológico (LbSRPK) para que ensaios *in silico* de ancoragem molecular (*Docking* molecular) fossem realizados frente aos

análogos moleculares inspirados a partir de um conhecido inibidor de SRPK de humanos, o SRPIN340.

Para a predição das estruturas proteicas tridimensionais foi utilizado o serviço online *Modeller* (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/>), para criar um modelo robusto, uma vez que, é gerado a partir da combinação de muitos modelos por restrição espacial molecular, pela comparação de todos os modelos depositados nos bancos de dados. A partir disso, o modelo é validado com parâmetros de identidade (até 40% de identidade) com probabilidade de acerto ajustado para 95% e desvio de realinhamento em 0,01, menor valor de RMSD obtido (raiz do desvio médio quadrático), e minimização de energia pelo programa *YASSARA* (*Yet Another Scientific Artificial Reality Application*) (KRIEGER *et al.*, 2009).

Tanto a LbSRPK predita quanto os análogos candidatos foram preparados com a utilização do Autodock e a performance da ancoragem molecular foi realizada pelo AutoDock Vina. Para a visualização das estruturas e análises pertinentes das interações e ligações realizadas foi utilizado o PyMOL *Molecular Graphics System Version 2.0* Schrödinger, LLC (TROTT *et al.*, 2010; SEELIGER *et al.*, 2010). Nas análises realizadas pelo AutoDock Vina, são geradas nove poses de possíveis encaixes do ligante na proteína alvo, mostrando todas as possíveis interações que elas possam realizar, calculando a distância entre elas. As melhores poses serão selecionadas de acordo com aquelas mostradas durante a interação do SRPIN340 com seu alvo molecular, a SRPK de humano (HsSRPK).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Citotoxicidade em Macrófagos RAW 264.7

A triagem dos 91 compostos para o teste de Citotoxicidade em Macrófagos RAW 264.7 (MØ 264.7) está apresentada a seguir de forma separada para melhor discussão dos resultados.

5.1.1. Citotoxicidade dos Compostos da Série MR

As diamidas são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica para tratamento de diversas doenças como aterosclerose e câncer. Também são encontradas em diversos outros produtos como componentes de agentes bioativos, no controle de pragas, como inseticidas. Sabendo disso é válido ressaltar que nossos compostos da série MR tem em sua estrutura as diamidas (RODRIGUES, 2019).

Nos resultados obtidos pelo ensaio de Citotoxicidade de 24 horas (Figura 8) podemos observar que de modo geral, os compostos MR19 ao MR35 e MR42 ao MR50 ($p < 0,05$) apresentaram citotoxicidade significativa quando comparados com o controle de DMSO. Os compostos MR38 e MR52 apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle, mostrando uma proliferação das células quando tratadas com esses compostos.

Já durante o tratamento de 48 horas (Figura 8), nenhum composto apresentou citotoxicidade significativa quando comparado com o controle DMSO. Compostos que mantenham a sobrevivência de células hospedeiras em torno dos 80% são as que podemos considerar para os experimentos in vitro de infecção para obtermos bons resultados de índice de seletividade desses compostos.

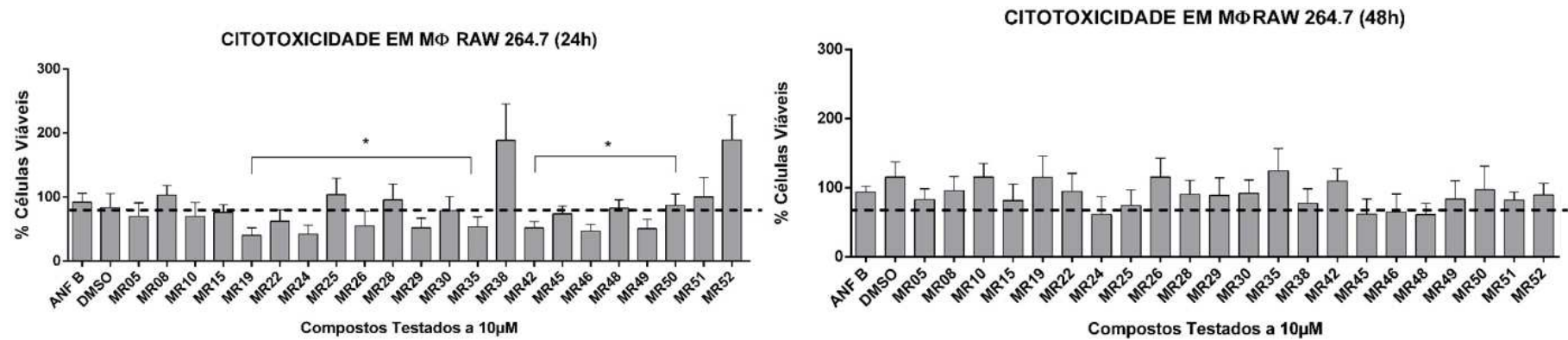


Figura 8: Citotoxicidade dos compostos análogos da Série MR 24 e 48 horas de tratamento. Os 22 compostos da Série MR nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 80% de viabilidade celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas. ANF B (Anfotericina B) e DMSO (Dimetilsulfóxido) foram usados como controles negativos na concentração final igual aos dos compostos testados.

5.1.2. Citotoxicidade dos Compostos da Série SM

De acordo com os testes realizados podemos observar que no tratamento de 24 horas (Figura 9) nenhum composto foi citotóxico para essa linhagem de macrófagos e inclusive, com a exceção do composto SM04, aumentaram significativamente a proliferação deles. Entretanto podemos observar que, com exceção dos compostos SM35 a SM38 e o SM45 os demais apresentaram citotoxicidade para essa linhagem de macrófagos.

Quando observamos os resultados obtidos com os tratamentos por 48 horas (Figura 9) podemos observar que, somente os compostos SM20, SM23a, SM23b, SM35 e SM47 não apresentaram citotoxicidade significativa, sendo estes, portanto, aptos para serem utilizados em futuros estudos de infecção com *Leishmania braziliensis* M2904.

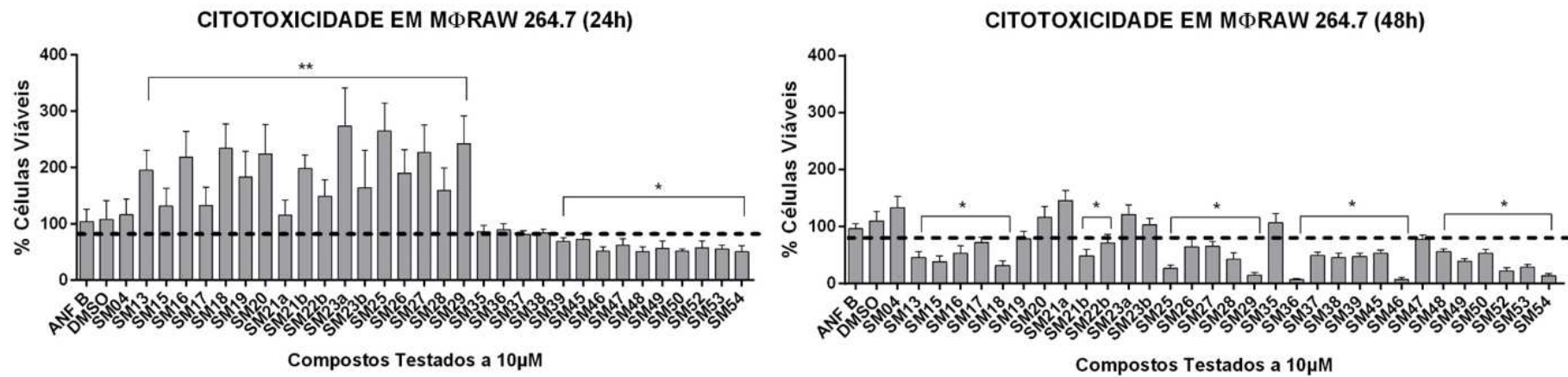


Figura 9: Citotoxicidade dos compostos análogos da Série SM 24 e 48 horas de tratamento. Os 32 compostos da Série SM nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 80% de viabilidade celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas. ANF B (Anfotericina B) e DMSO (Dimetilsulfóxido) foram usados como controles negativos na concentração final igual ao dos compostos testados.

5.1.3. Citotoxicidade dos Compostos da Série MVAB

De acordo com os resultados obtidos nas análises de citotoxicidade de 24 horas (Figura 10) pode-se observar que os compostos do MVAB02 ao MVAB20 foram citotóxicos para essa linhagem de macrófagos. Os demais compostos dessas séries não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle DMSO.

Ao analisar os resultados obtidos para o tratamento durante 48 horas (Figura 10), observa-se que nenhum dos compostos foram significativamente citotóxicos quando comparados ao controle DMSO. Esses resultados, tornam esses compostos promissores para o teste de infecção por *Leishmania braziliensis* M2904 que serão realizados.

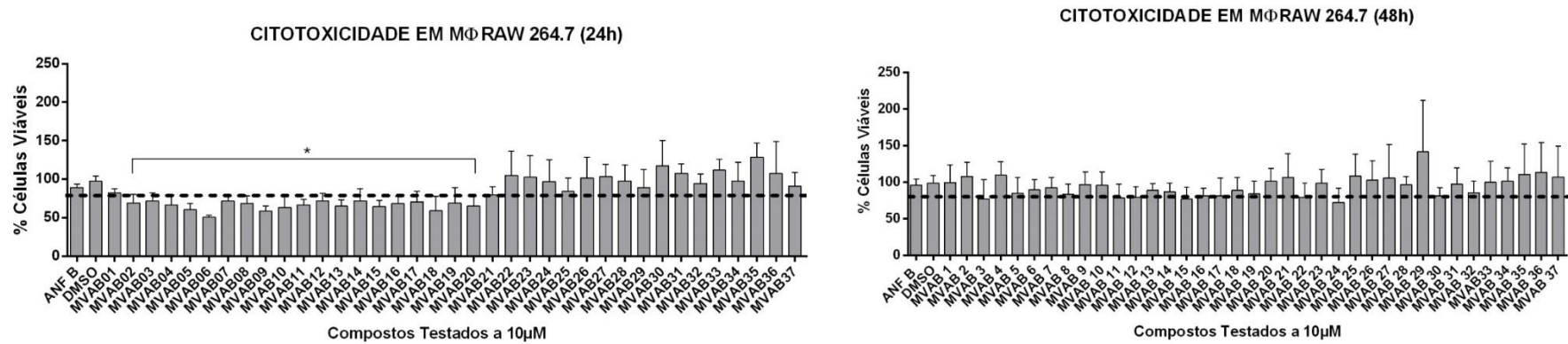


Figura 10: Citotoxicidade dos compostos análogos da Série MVAB 24 e 48 horas de tratamento. Os 37 compostos da Série MVAB nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 80% de viabilidade celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas. ANF B (Anfotericina B) e DMSO (Dimetilsulfóxido) foram usados como controles negativos na concentração final igual ao dos compostos testados.

As SRPKs são enzimas que fosforilam resíduos repetidos de aminoácidos de serinas e argininas em proteínas ricas desses resíduos, importantes para diversos processos fisiológicos nos parasitos. Já foram descritas em outros tripanossomatídeos como o *Plasmodium spp.* descrevendo sua interferência na produção de gametas do gênero (INVERGO *et al.*, 2017) e em *Trypanossoma cruzi* na participação de *cis splicing* nas diferentes formas evolutivas do parasito (PORTAL *et al.*, 2002).

Essa enzima também já foi relacionada com outros problemas infecciosos como o câncer e infecções fúngicas oportunistas como a candidíase, e até em infecções causadas por Herpes Vírus e o vírus do Ebola (ZHENG *et al.*, 2005; FUKUHARA *et al.*, 2006; KARAKAMA *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2010; MOROOKA *et al.*, 2015). Devido a essas relações com doenças tão graves e tão disseminadas, Teixeira e colaboradores 2018, do nosso grupo de pesquisa, avaliaram a existência de uma SRPK em *Leishmania braziliensis* (LbSRPK) que teria diferença de sua expressão nas diferentes formas de apresentação (promastigota e amastigota intracelular) do parasito. Assim, visto a importância e a significância dessa enzima em diversos processos infecciosos, acreditamos que ela também seja fundamental para a *Leishmania braziliensis*, assim como é para as formas de trofozoítos (assexuais) e gametócitos (sexuais) de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum*, para a transmissão da malária em humanos (KERN *et al.*, 2014). Assim como também para *Trypanossoma cruzi* onde essa proteína participa do *cis-splicing* do parasito (PORTAL *et al.*, 2003).

O Sistema Imune (SI) deve ser capaz de distinguir o que é do próprio organismo e o que não é, e quando ele reconhece células como invasoras, são acionados mecanismos para a eliminação desse invasor. Existem as células imediatamente efetoras, do SI Inato, que responderão de maneira inespecífica aos estímulos contra o patógeno invasor e dentre elas, o macrófago é aquele em que as leishmanias tem um interesse mais específico (LIN *et al.*, 2014).

Circulantes no sangue, se encontram os monócitos, que são células que não sofreram ativação para se tornarem especializadas. Quando são ativados, os monócitos, realizam a diapedese e se instalam no tecido adjacente e se transformam em células efetoras, os macrófagos. Estes são as células responsáveis pela defesa dos tecidos e podem receber diferentes nomes dependendo do tecido em que se encontram, como as células de *Kupffer*, no fígado. Tem a capacidade

fagocítica e citotóxica por lisossomos especializados na destruição de agentes infecciosos de origem viral, bacteriana e parasitária (SILVA *et al.*, 2016).

Tanto o estudo de Onofre, 2017, quanto o de Teixeira, 2018, mostram que esses compostos análogos do SRPIN340 possuem baixa, ou nenhuma atividade citotóxica para macrófagos, salvo compostos específicos já mencionados. Por isso, todos os compostos que não apresentaram citotoxicidade em macrófagos foram testados nos ensaios de infecção que foram realizados para sua avaliação da atividade leishmanicida.

Nenhum autor justifica o possível efeito citotóxico inicial (em 24 horas) relacionando-o com a triagem de compostos para tratamento de doenças. Eles apenas citam que se não houve efeito citotóxico nos macrófagos murinos utilizados, os experimentos são continuados, fato observado em alguns compostos testados neste estudo.

O SRPIN340 já foi amplamente descrito como tendo papel importante na inibição da proliferação de câncer e com alta atividade antiviral (MOREIRA, 2018; MOROOKA *et al.*, 2015). Recentemente tem mostrado seu papel como protetor de células cardíacas (cardiomiócitos) contra danos de estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2019). Um estudo de 2012 propôs o uso de alguns inibidores de cinases para doenças congênitas como Síndrome de Down e Distrofia Muscular de Duchenne e dentre esses inibidores, testaram e avaliaram o SRPIN340 como sendo promissor para a produção de novos medicamentos para essas doenças congênitas (OGAWA & HAGIWARA, 2012). Devido a isso, é interessante sabermos os efeitos de seus derivados frente aos resultados que obtivemos, como a avaliação da modulação de uma resposta inicial que proporcionou um grande efeito proliferativo nesses macrófagos e se esse efeito pode auxiliar na resposta contra a infecção por *L. braziliensis*.

5.2. Toxicidade em *Leishmania braziliensis* M2904

Assim como na triagem com os Macrófagos RAW264.7, os resultados dos testes de toxicidade em células promastigotas de *Leishmania braziliensis* (*Lb*)

M2904 foram separados pelas séries testadas a fim de facilitar a interpretação dos dados.

Também para a realização dos experimentos com a *Leishmania braziliensis* M2904, foi realizada a montagem da curva de crescimento, para que se pudesse determinar em que fase a *Leishmania* estava, através do dia do crescimento. A Figura 11 mostra a curva de crescimento usada nesse estudo.

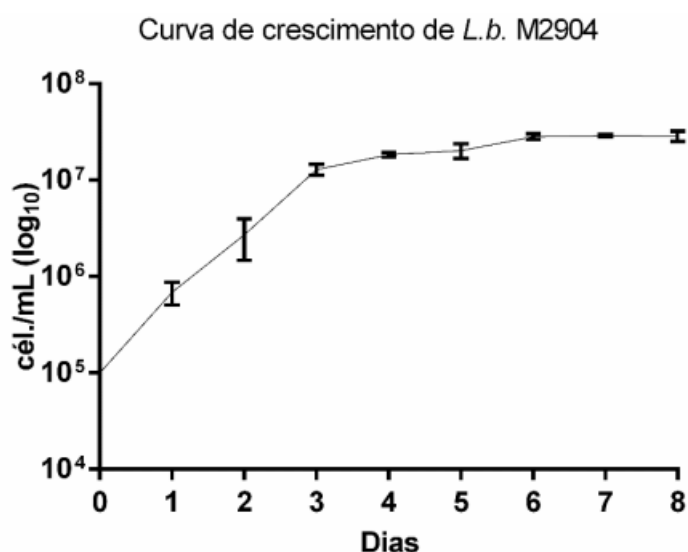


Figura 11: Curva de Crescimento de *Leishmania braziliensis* M2904. O número de células por mililitro de cultura durante 8 dias de crescimento.

Para os experimentos com a forma promastigota, células entre o 3º, 4º, 6º e 7º dias de crescimento eram manipuladas de acordo com o objetivo do experimento.

5.2.1 Toxicidade dos Compostos da série MR em *Leishmania braziliensis* M2904

Os resultados obtidos no teste de toxicidade em formas promastigotas procíclicas (em fase logarítmica de crescimento) de *L. braziliensis* M2904 para essa série está representado na Figura 12 para ao tratamento de 24 e 48 horas de tratamento respectivamente.

Os testes em promastigotas são realizados para que sejam estudadas vias importantes que vão ter papel fundamental no início da infecção do parasito e sua relação com o Sistema Imune do hospedeiro infectado, assim como também para a sua sobrevivência dentro do inseto vetor. Ou ainda possa ter algum indício de que o índice de seletividade seja maior que 10 (ONOFRE, 2017).

Pode-se observar que apenas os compostos MR45 e MR48 apresentaram toxicidade, estatisticamente relevante, próxima ao controle de Anfotericina B (controle positivo) de tratamento de leishmaniose, no tratamento de 24 horas. Quando observado os resultados de 48 horas, essa toxicidade já não é efetiva e nenhum composto, portanto, foi tóxico a essa forma da leishmania.

5.2.2 Toxicidade dos Compostos da Série SM em *Leishmania braziliensis* M2904

A seguir, na Figura 13, estão representados graficamente os resultados dos tratamentos de promastigotas de *L. braziliensis* durante 24 e 48 horas.

Pode-se observar que para nenhum composto análogo foi atingido o mínimo de 20% de sobrevivência, não sendo, portanto, esses compostos tóxicos para a forma promastigota procíclica de *L. braziliensis*.

Em 24 horas de tratamento, apenas os compostos entre SM04 e SM29 foram testados pois foram os que recebemos primeiro em nosso laboratório. Quando recebemos os SM35 ao SM54, já havíamos observado que em 24 horas nenhum efeito era visível e portanto, foi realizado somente a análise de 48 horas desses compostos análogos.

5.2.3. Toxicidade da Série MVAB em *Leishmania braziliensis* M2904

Pode-se observar que, no tratamento de 24 horas (Figura 14), os compostos MVAB1, MVAB2, MVAB3, MVAB6, MVAB7, MVAB8, MVAB8, MVAB9, MVAB10 e MVAB33 apresentaram níveis e toxicidade relevantes ($p < 0,0001$), porém, em 48

horas (Figura 14) de tratamento nenhum composto, nem mesmo os mencionados acima, apresentaram níveis tóxicos contra a *L. braziliensis*. Mostrando, portanto, que nenhum desses compostos é capaz de causar algum efeito tóxico em formas promastigotas do parasito.

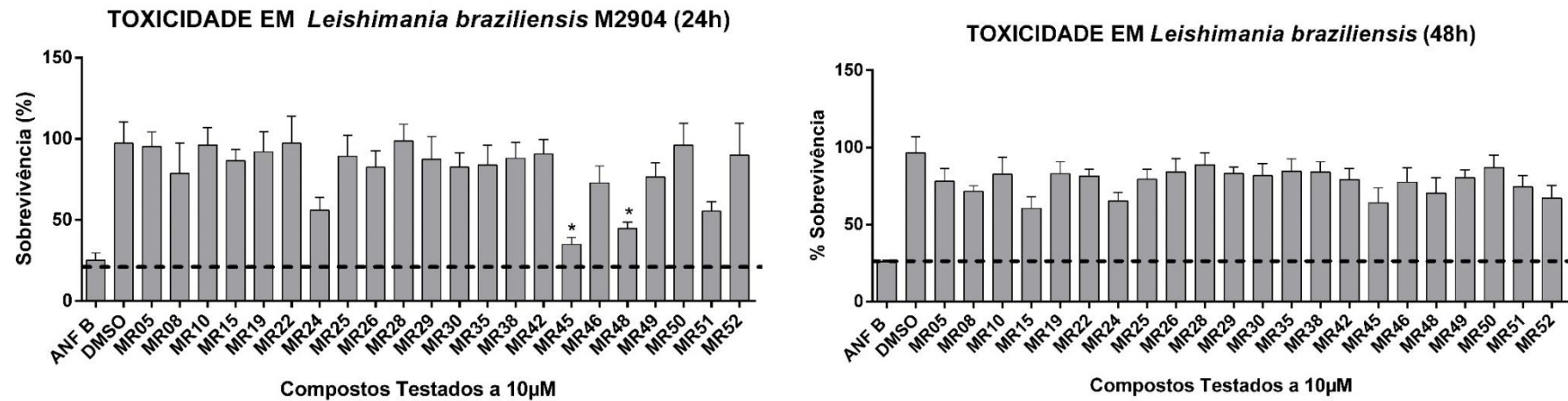


Figura 12: Toxicidade em Promastigotas de *Leishmania braziliensis* M2904 Série MR 24 e 48 horas de tratamento. Os 22 compostos da Série MR nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 20% de sobrevivência celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas

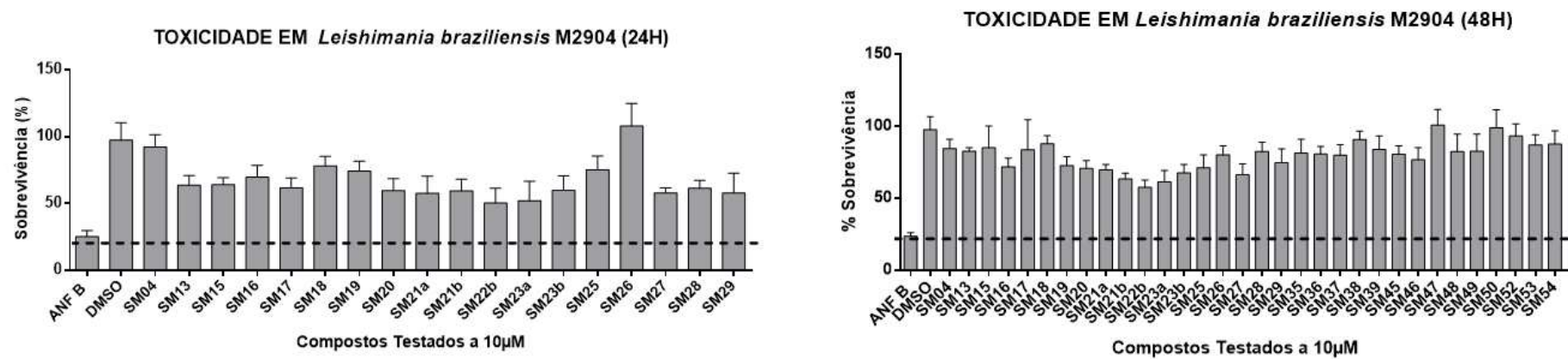


Figura 13: Toxicidade em Promastigotas de *Leishmania braziliensis* M2904 Série SM 24 e 48 horas de tratamento. Os 32 compostos da Série SM nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 20% de sobrevivência celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas

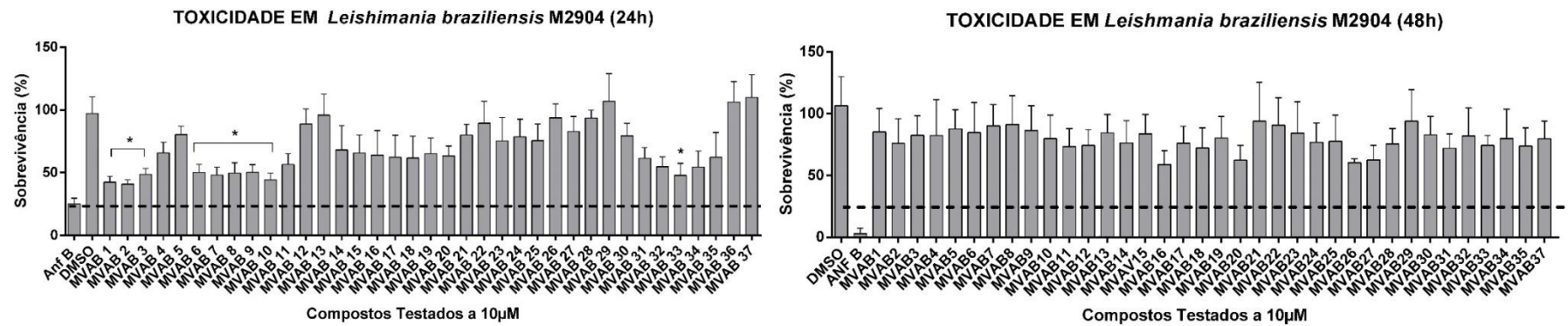


Figura 14: Toxicidade em Promastigotas de *Leishmania braziliensis* M2904 Série MVAB 24 e 48 horas de tratamento. Os 37 compostos da Série MVAB nas 24 e 48 horas de tratamento. A linha tracejada indica o mínimo desejado de 20% de sobrevivência celular esperado para os tratamentos. (*) Toxicidade significativa ($p < 0,0001$). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e quadruplicatas internas.

A importância da investigação de novos fármacos para o tratamento dessa doença no Brasil é fundamental para que a mazela possa vir a ser controlada e talvez erradicada, uma vez que ela atinge a população mais carente e mais vulnerável socioeconomicamente nos países subdesenvolvidos (THAKUR *et al.*, 2018; LAMOTTE *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 2018). Os estudos até aqui realizados nas formas promastigotas procíclicas (em fase log de crescimento) do parasito são igualmente importantes por poder revelar mecanismos que estejam envolvidos no processo inicial de infecção desse parasito nos macrófagos humanos e se eles se tornarão realmente fundamentais para a sobrevivência do parasito durante a infecção (ONOFRE, 2017; TEIXEIRA, 2018, SOUSA-ÂNGELO, 2021).

No geral, nenhum dos compostos testados para promastigotas de *L. braziliensis* apresentou toxicidade relevante que demonstre alguma ação leishmanicida inicial desses compostos. No entanto, isso não significa que eles não possam ter ação contra as formas amastigotas intracelulares, que será investigado por este grupo.

Além disso, se um composto reduz a sobrevivência do parasito em sua forma não infectante, muito provavelmente ela poderá ser muito efetiva contra a forma infectante intracelular em ensaios *in vitro* (ONOFRE, 2017). Além disso, a Anfotericina B, nosso controle positivo para o tratamento das leishmanioses, apresentou atividade leishmanicida no tratamento de promastigotas podendo ser pelo fato de que esse antifúngico atua na formação de poros do ergosterol da membrana do parasito, o que justifica também o teste em formas promastigotas do parasito com os nossos análogos.

. Porém, os análogos SRVIC22 e SRVIC32, testados por TEIXEIRA, 2018, obteve-se uma redução na carga parasitária de leishmanias intracelulares durante a infecção *in vitro*. Os compostos testados nesse projeto também são análogos do SRPIN340 e possuem regiões específicas conservadas tidas como importantes observadas nos experimentos *in vitro* tanto de Onofre, 2017 e Teixeira, 2018, como também em análises computacionais realizadas por Pimentel, 2020, todos do nosso grupo de pesquisa.

Além do exposto, no mesmo estudo realizado por Teixeira, 2018, ele mostra que a expressão de mRNA de SRPK de *Leishmanias* nas formas de promastigotas procíclicas é muito menor (dados não mostrados) do que quando expressa pelas amastigotas intracelulares, podendo ser um indício da explicação da baixa atividade

leishmanicida dos nossos compostos nessas formas de vida do parasito. Contudo, quando os dois análogos do SRPIN340, o SRVIC22 e SRVIC32, em ensaios de infecção *in vitro*, ambos apresentaram redução do número de amastigotas intracelulares em 48 horas de tratamento, mostrando assim que, os ensaios de infecção devem ser realizados mesmo que não apresentem interação com as formas promastigotas.

Observa-se também que em 24 horas de tratamento com os compostos derivados do SRPIN340, apresentam inconsistências quando comparados com os ensaios de 48 horas, mostrando uma taxa de sobrevivência celular, tanto de macrófagos, quanto de *Leishmania*, questionáveis, fazendo com que determinássemos nossos ensaios com, no mínimo, 48 horas de tratamento, para que fosse eliminado qualquer viés interpretativo equivocado.

5.3. Atividade Leishmanicida dos Compostos *in vitro*

5.3.1 Atividade Leishmanicida dos compostos da Série MR

Na Figura 15 encontram-se os resultados do ensaio de infecção intracelular de *Leishmania braziliensis* M2904 em macrófagos RAW264.7 por 48 horas de tratamento, dos compostos da série MR.

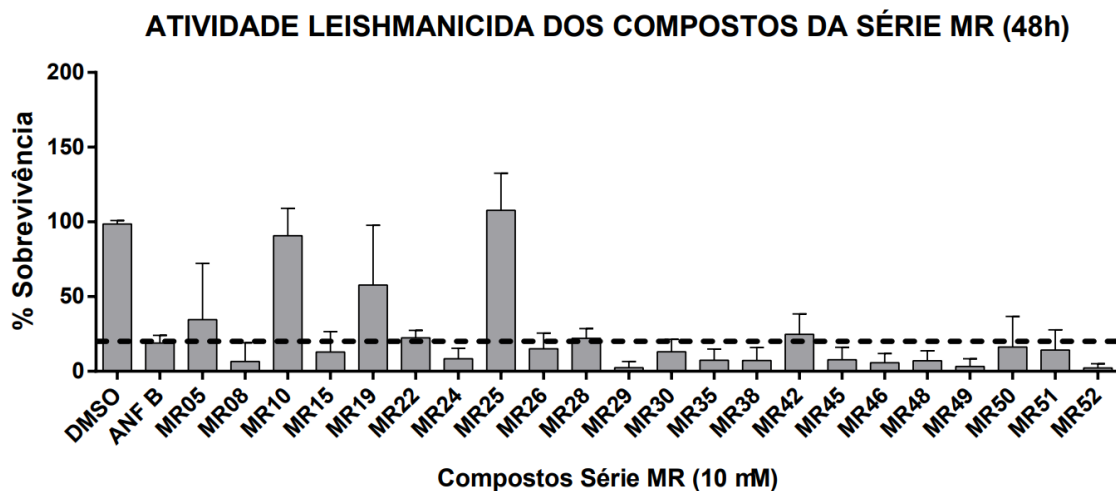


Figura 15: Atividade Leishmanicida dos compostos da série MR em ensaio de infecção. Os controles utilizados nesse ensaio foram Dimetilsulfóxido (DMSO) que é o veículo usado sendo controle negativo e Anfotericina B (ANF B) a 3,125 $\mu\text{g/mL}$ usado como controle positivo. A linha tracejada corresponde a 20% de sobrevivência e foi usado como limite máximo permitido para análise da atividade Leishmanicida, tendo como base, o efeito do controle positivo ANF B.

Podemos observar que para a série MR os resultados foram muito promissores quanto ao fato de atividade Leishmanicida. Porém, esses resultados devem ser contrapostos com os resultados de viabilidade celular (Figura 8) em macrófagos, para quase possa decidir se ele pode continuar na pesquisa de fármaco promissor contra a leishmaniose. Para isso, é necessário que os compostos não sejam tóxicos às células hospedeiras e tenham atividade contra a infecção, fazendo com que o Índice de Seletividade seja alto. Índice de Seletividade é a medida usada por cientistas para determinar o quanto um provável medicamento é mais seletivo para um parasito do que para a célula do hospedeiro em questão. Calcula-se o IS dividindo-se o valor de IC50 das células hospedeiras, pelo IC50 das mesmas células infectadas. Se esse valor for maior que 10, pode-se dizer que esse composto é no mínimo 10 vezes mais seletivos para uma espécie que infecta, do que a do hospedeiro. Assim, temos que os compostos MR08, MR15, MR22, MR24, MR26, MR28, MR29, MR30, MR35, MR38, MR42, MR45, MR46, MR48, MR49, MR50, MR51 e o MR52, são aqueles que apresentaram atividade leishmanicida menor ou igual a atividade da Anfotericina B. Destes compostos, foram selecionados os 6 compostos que apresentaram maiores atividades leishmanicidas, que foram os: MR26, MR29, MR45, MR48, MR49 e MR52 para as próximas análises. O MR48 também foi incluído no estudo devido ao fato de apresentar boa atividade contra

células de linhagem tumoral em experimentos do grupo do professor Dr. Gustavo Bressan (PAIVA, 2022).

5.3.2 Atividade Leishmanicida dos compostos da Série SM

Na Figura 16 estão apresentados os resultados do ensaio de atividade Leishmanicida dos compostos da Série SM com tratamento de 48 horas.

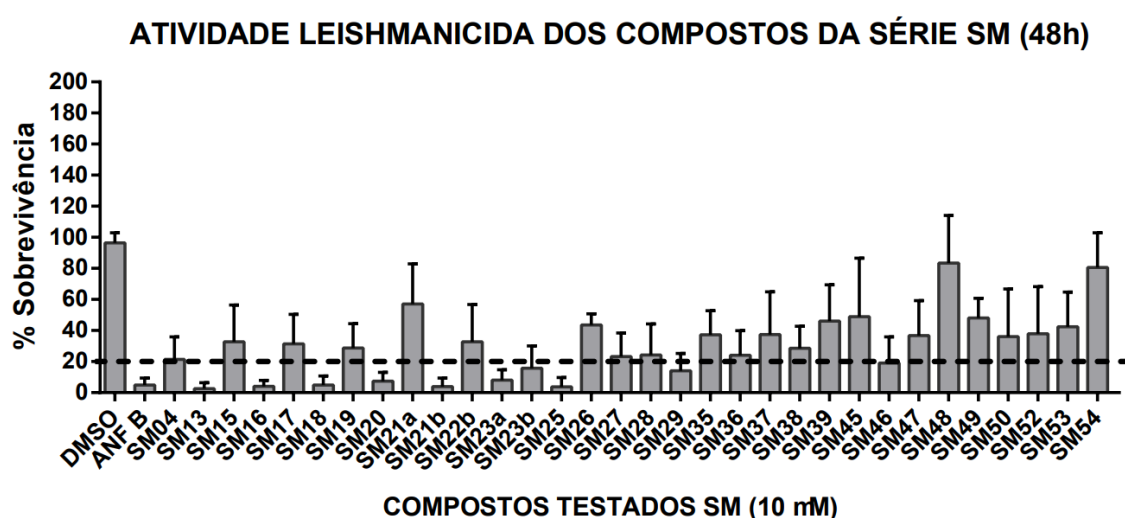


Figura 16: Atividade Leishmanicida dos compostos da série SM em ensaio de infecção. Os controles utilizados nesse ensaio foram Dimetilsulfóxido (DMSO) que é o veículo usado sendo controle negativo e Anfotericina B (ANF B) a 3,125 µg/mL usado como controle positivo. A linha tracejada corresponde a 20% de sobrevivência e foi usado como limite máximo permitido para análise da atividade Leishmanicida, tendo como base, o efeito do controle positivo ANF B.

Os compostos da Série SM também apresentaram resultados promissores quanto a atividade leishmanicida depois do tratamento de 48 horas. Nesse caso, aqueles que apresentaram atividade leishmanicida de até 20% de taxa de sobrevivência, quando comparados com a viabilidade de macrófagos (Figura 9) que deve ser maior ou igual a 80%, foram: SM19, SM20, SM21a, SM23a, SM23b, SM35 e SM47. Porém, apenas com o SM23a os experimentos foram prosseguidos nesse trabalho, selecionado por apresentar maior atividade leishmanicida da sua série.

5.3.3 Atividade Leishmanicida dos compostos da Série MVAB

Na Figura 17, são mostrados os resultados obtidos nas análises dos ensaios de atividade leishmanicida dos compostos da Série MVAB.

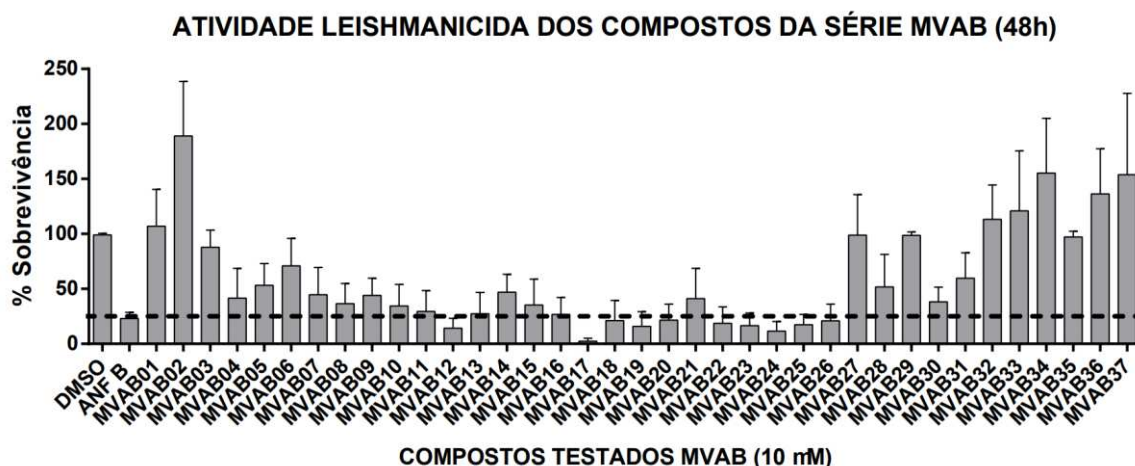


Figura 17: Atividade Leishmanicida dos compostos da série MVAB em ensaio de infecção. Os controles utilizados nesse ensaio foram Dimetilsulfóxido (DMSO) que é o veículo usado sendo controle negativo e Anfotericina B (ANF B) a 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ usado como controle positivo. A linha tracejada corresponde a 20% de sobrevivência e foi usado como limite máximo permitido para análise da atividade Leishmanicida, tendo como base, o efeito do controle positivo ANF B.

Segundo as análises do teste de citotoxicidade em macrófagos RAW264.7 (Figura 10), todos os compostos da série MVAB puderam ser testados na infecção, porém, apenas os compostos MVAB11, MVAB12, MVAB13, MVAB16, MVAB17, MVAB18, MVAB19, MVAB20, MVAB22, MVAB23, MVAB24, MVAB25 e MVAB26, tiveram uma atividade leishmanicida mais efetiva tendo mantido em média menos de 20% da sobrevivência de *Leishmanias* intracelulares depois de tratadas. Com isso, apenas os compostos MVAB17 e MVAB24 foram selecionados para dar prosseguimento aos experimentos.

Os nove compostos selecionados então foram, MR26, MR29, MR45, MR48, MR49, MR52, SM23a, MVAB17 e MVAB24. Devido ao fato de que escolhemos aqueles que apresentaram maior redução da taxa de sobrevivência média de *Leishmanias* intracelulares e que abrangesse todos os grupos estudados.

A partir de então foram realizados os testes de IC_{50} e EC_{50} para determinação do Índice de Seletividade e análise bioinformática de ancoragem molecular para

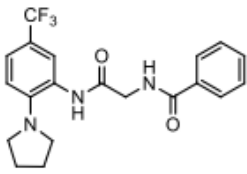
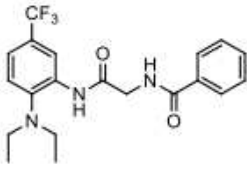
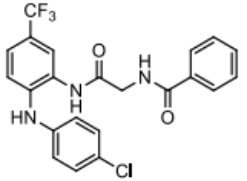
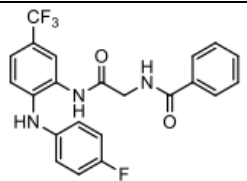

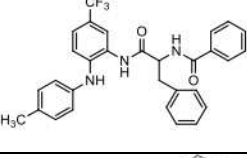
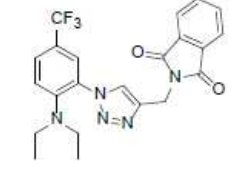
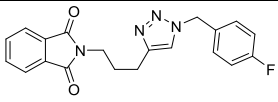
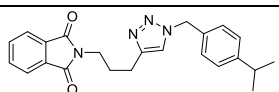
observar se existe interação entre nossos compostos selecionados e a SRPK de *Leishmania braziliensis* M2904 já predita pelo nosso grupo de estudos.

5.4 IC₅₀ e EC₅₀ dos compostos selecionados

O IC₅₀ é o teste que se realiza em linhagens de células do hospedeiro somente, enquanto o EC₅₀, é realizado em células que estejam infectadas com o parasito. Assim o cálculo do Índice de Seletividade é: $IS = IC_{50}/EC_{50}$.

Os resultados obtidos para o IC₅₀ em macrófagos RAW264.7 estão apresentados na Tabela 1, com suas respectivas análises de regressão linear (R²) e estruturas.

TABELA 1: Resultados dos valores de IC₅₀ em macrófagos RAW264.7 depois de 48 horas de tratamento.

| COMPOSTOS | ESTRUTURA | IC ₅₀ | R ² |
|-----------|---|------------------|----------------|
| MR26 |  | 220,8 | 0,7491 |
| MR29 |  | 188,2 | 0,7565 |
| MR45 |  | 132,1 | 0,9449 |
| MR48 |  | 202,1 | 0,7876 |
| MR49 |  | 20,32 | 0,7366 |
| MR52 |  | 7,234 | 0,853 |
| SM23a |  | 174,6 | 0,9404 |
| MVAB17 |  | 5,617 | 0,8747 |
| MVAB24 |  | 6,279 | 0,8575 |

Existe uma discrepância nos valores de IC₅₀ dos compostos MR52, MVAB17 e MVAB24 quando comparados com os valores obtidos na viabilidade celular desses mesmos macrófagos. Fato esse que pode estar relacionado com a baixa solubilidade dos compostos em meio RPMI com 10% de SFB, onde verificou-se a precipitação desses compostos nos poços das concentrações mais elevadas (400µM, 200µM, 100µM e 50µM). Abaixo dessas concentrações 100% das células em média permaneciam viáveis, o que impossibilita os cálculos de IC₅₀.

Além disso, também podemos observar que apenas dois compostos apresentaram valores de R² acima de 0,9, o que é o ideal para análise de regressão. Os demais compostos apresentaram valores de análise de regressão entre 0,7 e 0,8, que pode ser justificado também pela baixa solubilidade dos compostos nos meios de cultura assim como também pela biodisponibilidade de receptores celulares e de compostos nos meios de cultura, aptos a serem reconhecidos.

A análise de EC₅₀ viabiliza calcular a dose efetiva que elimina 50% dos alvos específicos, nesse caso, é realizado esse cálculo para observar a dose efetiva contra 50% das células de macrófagos RAW264.7 infectadas por *L. braziliensis*. Entretanto não foi possível realizar os cálculos, mesmo com os resultados obtidos, pois não entravam na curva de EC₅₀ viável (R² = 1) para análise e cálculo do IS. Mas vale ressaltar que acima de 20µM, mais de 60% das células infectadas com leishmania não sobreviviam. A dificuldade em realizar o cálculo de EC₅₀, também pode estar relacionado com a baixa solubilidade dos compostos o que pode ter dificultado a sua absorção pelas células em concentrações acima de 30µM. Esses experimentos foram realizados em triplicata biológica e quadruplicata interna e mesmo assim, não apresentou mudança para a análise pretendida. Esse cálculo então não foi mais repetido com outras abordagens devido a dois fatores: 1) *Leishmanias* já estavam em passagens próximas de 20, o que as deixa metabolicamente mais fracas, necessitando a reinfecção de um animal vertebrado para obtenção de células mais jovens e tempo necessário para que novas amostras fossem descongeladas e recuperadas e; 2) falta de tempo para a solicitação dos animais, com todas as suas especificações de conselhos de ética que estavam muito próximas do fim do prazo para a defesa. Entretanto, é de meu interesse pessoal terminar esses estudos como colaboradora do laboratório mesmo após minha defesa.

Ainda assim houve tentativas de aumentar essa solubilidade durante os experimentos, como aumento da temperatura das soluções trabalhos dos compostos diluídos em DMSO a até 37°C, antes e depois da solubilização em meio RPMI 10% SFB, como também para o aumento da concentração de SFB final dos poços em até 20%. No primeiro caso, não houve efeito aparente que constatasse o aumento da solubilidade, deixando os poços ainda com precipitados cristalizados dos compostos e no segundo caso, os macrófagos não sobreviveram a concentrações muito elevadas de SFB (acima de 10%), levando-as a morte após 24 horas de exposição.

O problema da solubilidade dos compostos pode ser resolvido, tentando alternativas viáveis de entrega desses compostos ligados a nanopartículas ou em processos de obtenção de estruturas lipossomais, como com a anfotericina B que é entregue de forma muito mais eficiente aos seus alvos quando em sua biodisponibilidade lipossomal, usada no Brasil.

5.5 Ancoragem Molecular dos Compostos Selecionados

A análise *in silico* das interações que os compostos análogos ao SRPIN340 desse estudo, foram comparadas com aquelas interações obtidas nas mesmas análises realizadas por PIMENTEL, 2020, em sua monografia (Figura 18). Essa análise nos mostra as possíveis interações que o SRPIN340 tem com seu alvo, o HsSRPK, e suas possíveis interações também com o nosso alvo de estudo, a LbSRPK predita.

Essas interações, podem nos ajudar a compreender a natureza da inibição observada nos estudos *in vitro* deste trabalho, através da comparação entre elas. Os nove compostos selecionados foram então submetidos a análise de interações *in silico* por ancoramento molecular e seus resultados estão apresentados a seguir individualmente a fim de facilitar a compreensão das interações obtidas.

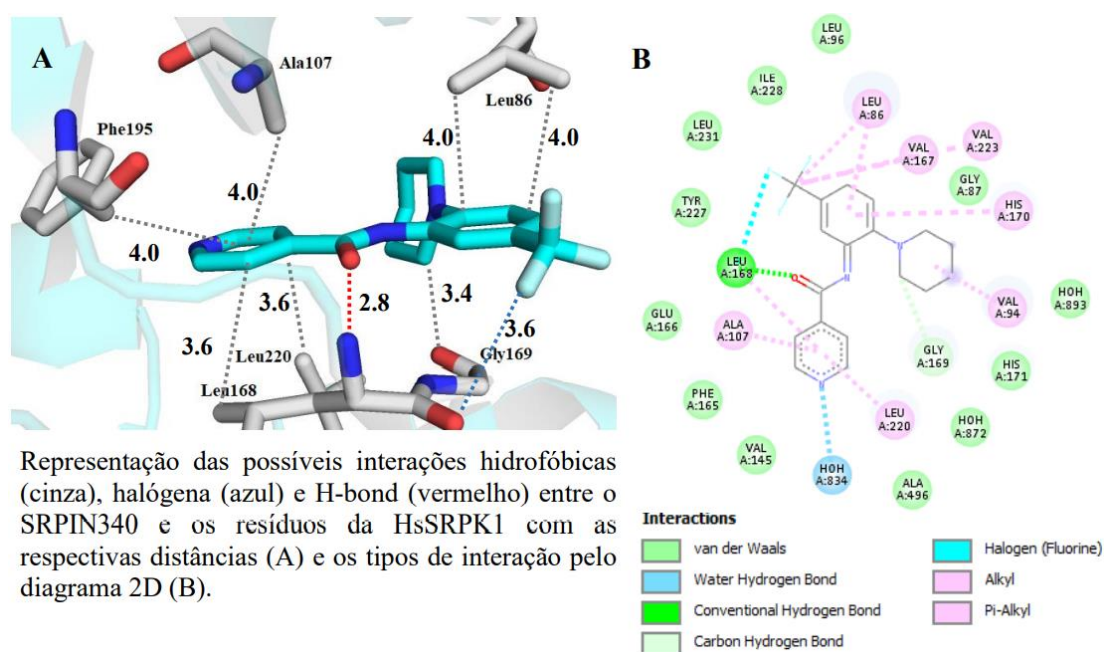


Figura 18: Representação das possíveis interações do SRPIN340 com seu alvo, a HsSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de Ligação de Hidrogênio (2,8Å) com o resíduo de Leucina167 da HsSRPK (linha pontilhada vermelha). (B) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde) (PIMENTEL, 2020).

5.5.1 Ancoragem Molecular dos compostos da Série MR

Todos os seis compostos da série MR se inseriram no sítio ativo de ligação ao ATP da LbSRPK predita anteriormente pelo nosso grupo, onde, como já analisado, todos eles reduziram a sobrevivência do parasito em ensaios de infecção em no mínimo 80% e, portanto, podem ser candidatos a possíveis inibidores de LbSRPK. De cada composto análogo, foram analisadas o total de nove poses de encaixe conformacional na LbSRPK e selecionadas de acordo com as interações realizadas que mais condizem com aquelas realizadas pelo SRPIN340 em seu alvo, a HsSRPK, quando comparadas.

A) MR26

O composto análogo MR26, reduziu a carga parasitária intracelular quando comparado com o controle positivo (ANF B). Em análise *in silico*, o MR26 (Figura 19) se encaixou no sítio ativo de ATP da LbSRPK predita e realizou possíveis interações hidrofóbicas com os resíduos Glu100, Glu146, Lys41 e Asp190, que são interações de estabilização. Além disso é predita uma ligação de Halogênio do flúor do composto com a Ala189 e uma interação do tipo π com a Phe95. Todas essas interações são importantes por garantirem mais estabilidade dos compostos no sítio ativo da enzima. E para essa pose uma ligação de hidrogênio (Hbond) é predita do flúor do composto com o resíduo Tyr98 (2,7Å) da LbSRPK.

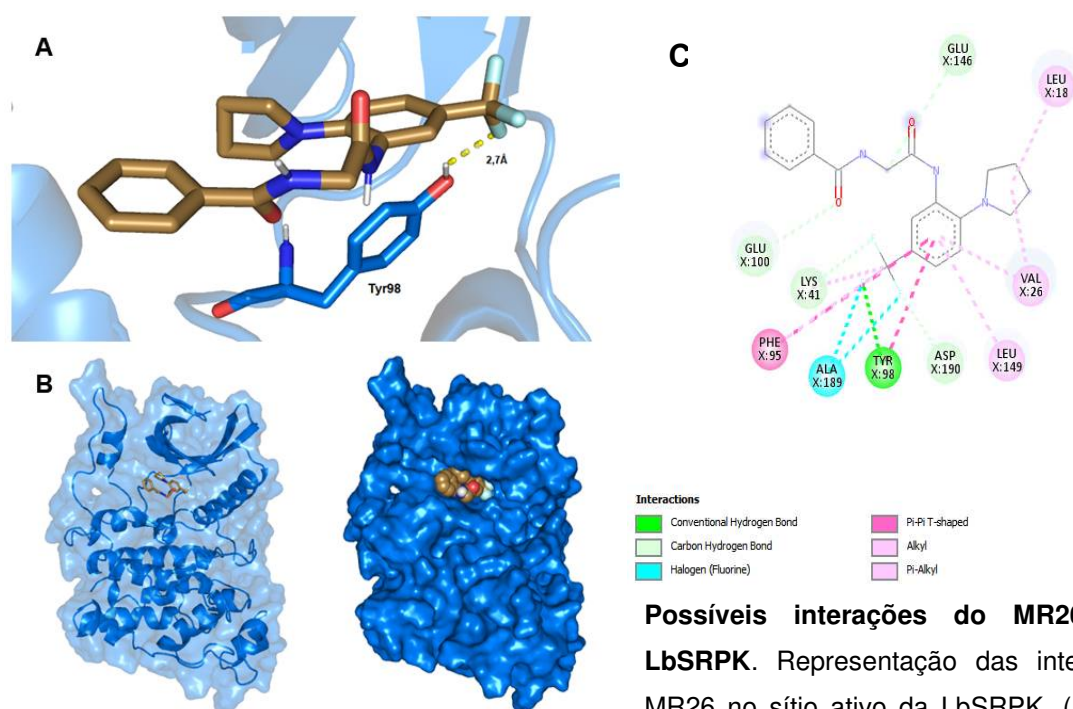


Figura 19:

Possíveis interações do MR26 com a LbSRPK. Representação das interações do MR26 no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem

representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

B) MR29

O composto análogo MR29 apresentou atividade leishmanicida de aproximadamente 100%, reduzindo todos os parasitos intracelulares, como resultados das análises *in vitro* de infecção. Na análise *in silico* (Figura 20) ele se encaixou na conformação A no sítio ativo da LbSRPK onde apresentou possível interação hidrofóbica com Glu100 apenas, interação do tipo π com a Gly99, uma ligação do halogênio flúor com a Glu146 e duas ligações de hidrogênio entre o flúor do ligante com o resíduo Asn101 da LbSRPK e o oxigênio da amida do ligante com o resíduo de Tyr98 do alvo.

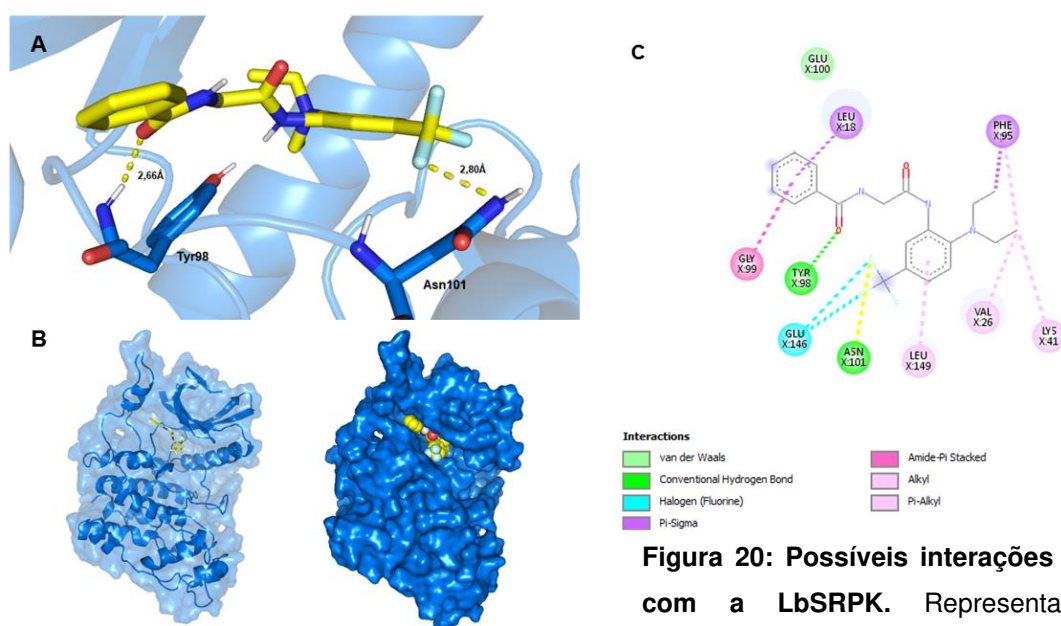


Figura 20: Possíveis interações do MR29 com a LbSRPK. Representação das interações do MR29 no sítio ativo da

LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

C) MR45

O composto análogo MR45 apresentou atividade leishmanicida onde reduziu aproximadamente 90% dos parasitos intracelulares em ensaio *in vitro* de infecção. Na análise *in silico* (Figura 21), ele mostrou interações hidrofóbicas com os resíduos Lys41, Glu100, Glu146 e Asp190. Foi predita também uma interação de halogênio entre o flúor do ligante e o resíduo Ala189 do ligante e uma interação de ligação de hidrogênio entre o flúor do ligante e o resíduo Tyr98 do ligante.

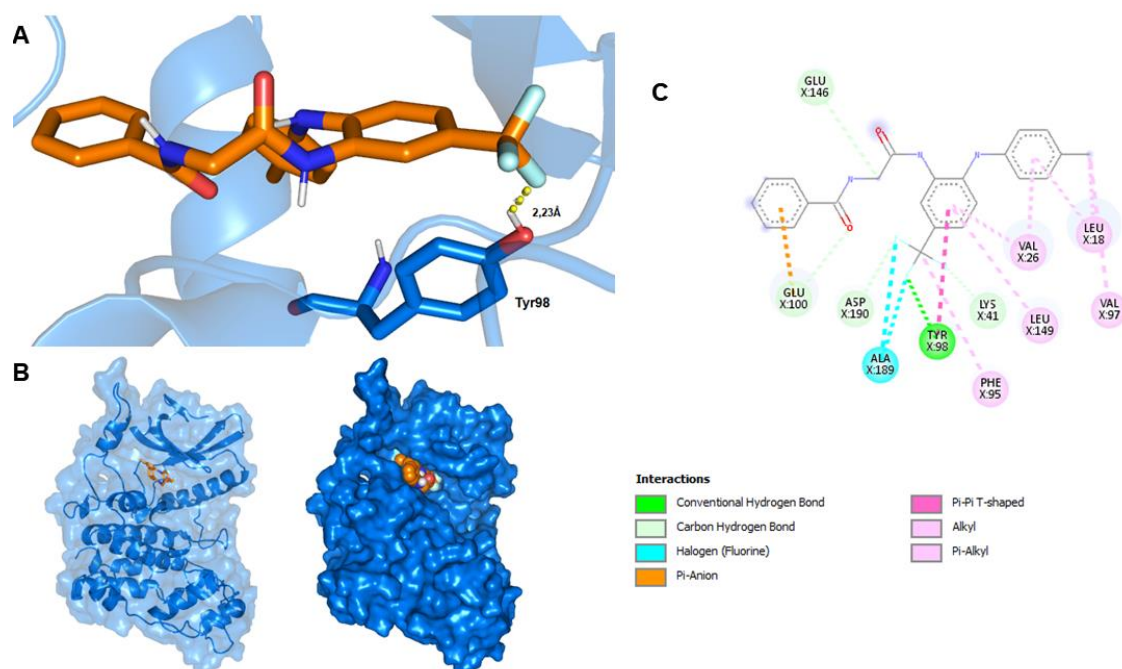


Figura 21: Possíveis interações entre o MR45 e a LbSRPK. Representação das interações do MR45 no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

D) MR48

O análogo MR48 apresentou atividade leishmanicida reduzindo aproximadamente 90% dos parasitos intracelulares em análise *in vitro* de infecção. Ele se encaixou no sítio ativo de ligação de ATP da LbSRPK predita e realizou (Figura 22) possíveis interações hidrofóbicas com os resíduos Lys41, Gly99, Glu100, Glu146 e Asp190. Além disso também foi predita uma interação de halogênio entre o flúor do composto e a Ala189 do ligante alvo, assim como também foi sugerida uma interação de ligação de hidrogênio entre o flúor do composto análogo e o resíduo Tyr98 do ligante alvo.

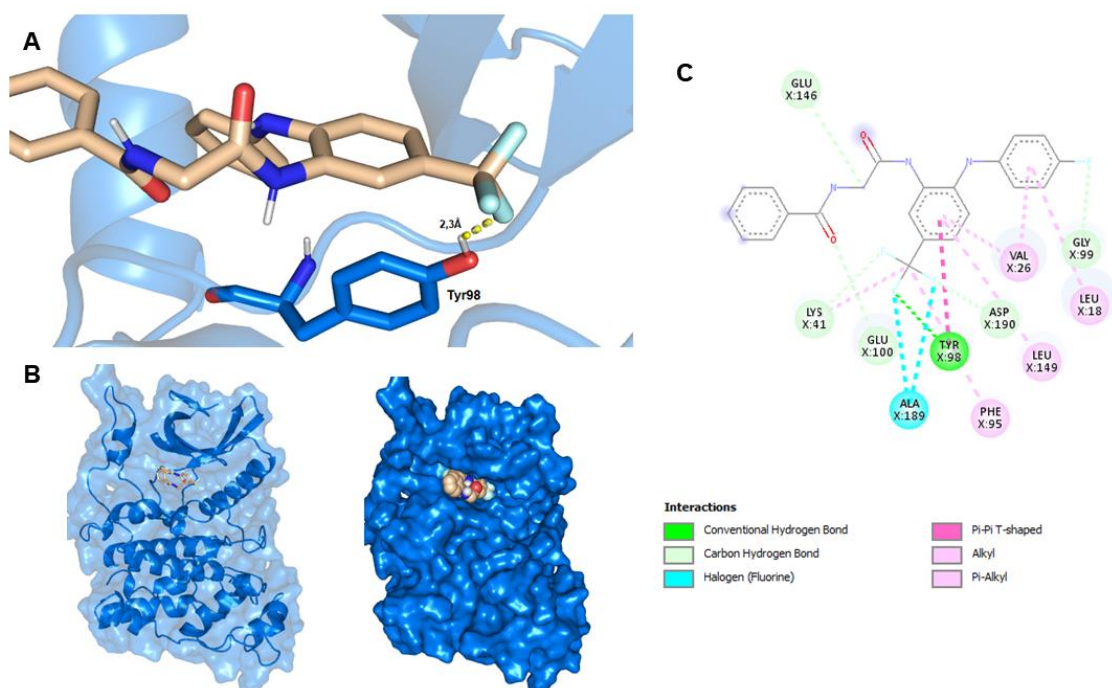
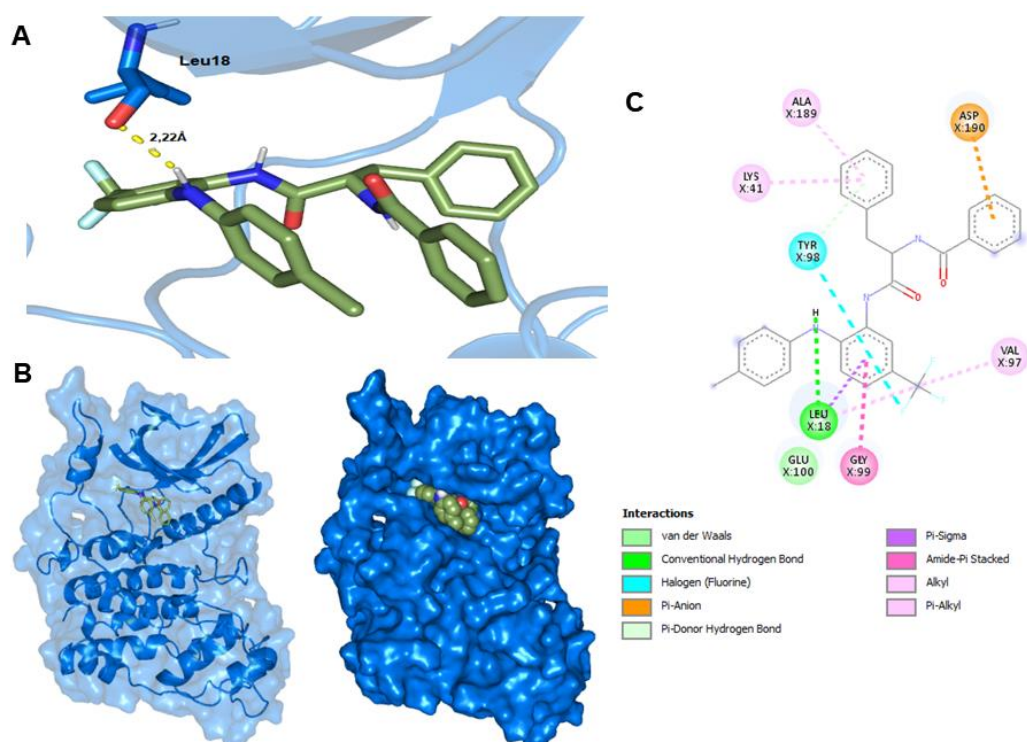


Figura 22: Possíveis interações do MR48 com a LbSRPK. Representação das interações do MR48 no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

E) MR49

O composto análogo MR49 apresentou atividade leishmanicida apresentado redução do parasita intracelular de aproximadamente 90% em estudos *in vitro*. Ele também se encaixou no sítio de ligação da LbSRPK, onde apresentou as possíveis interações hidrofóbicas com o resíduo de Glu100 apenas. Além disso foi sugerida uma interação de halogênio entre o flúor do ligante com o resíduo Tyr98, uma interação do tipo empilhamento ânion- π entre os anéis aromáticos do ligante com o do resíduo de Asp190 da LbSRPK. Assim como também foi sugerida uma interação do tipo de ligação de hidrogênio entre a amina do composto análogo e o resíduo Leu18 da LbSRPK (Figura 23).

Figura 23: Possíveis interações entre o MR49 e a LbSRPK. Representação das interações do



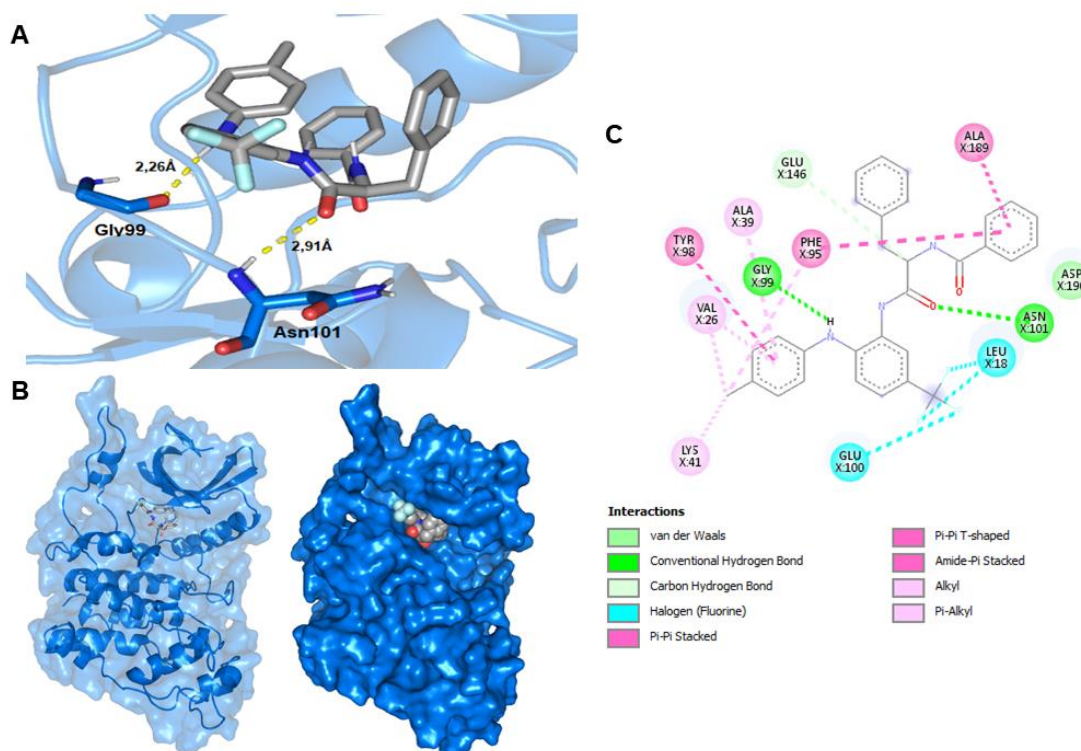
MR49
no sítio
ativo da

LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

F) MR52

O composto análogo MR52 apresentou alta taxa de capacidade leishmanicida diminuindo parasitas intracelulares na infecção *in vitro* em aproximadamente 100%. Na análise *in silico* (Figura 24), podemos observar que possivelmente ele interage com o ligante alvo através de uma interação hidrofóbica com os resíduos Glu146 e Asp190. Além disso, também foram sugeridas duas interações com halogênio flúor com os resíduos Leu18 e Glu100 e três interações do tipo π - π com os resíduos Tyr98, Phe95 e Ala189. Também, nessa posição foram sugeridas duas interações do tipo ligação de hidrogênio entre uma amida do ligante e o resíduo Asn101 e outra com a amina do ligante e o resíduo Gly99.

Figura 24 – Possíveis interações do MR52 com a LbSRPK. Representação das interações do MR52 no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de



Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro) e ligação de hidrogênio (verde).

5.5.2 Ancoragem Molecular do composto da Série SM

Apenas o composto análogo SM23a foi analisado neste estudo e ele também se inseriu no sítio ativo da LbSRPK predita. Nas análises *in vitro* ele apresentou alta atividade leishmanicida reduzindo em até 90% o número de parasitas intracelulares. Na análise *in silico* (Figura 25), foram preditas dez interações hidrofóbicas com os resíduos Lys16, Gly19, Val97, Tyr98, Gly99, Thr152, Ser156, Ser159, Pro168 e His170. Essa pose também mostrou uma interação com halogênio entre o flúor e o resíduo Leu169 da LbSRPK. Além disso também foi predito duas interações com o resíduo Glu100, uma do tipo ânion- π e outra do tipo carga atrativa, com o anel aromático e com oxigênio respectivamente. E ainda foi predito para essa pose uma interação do tipo ligação de hidrogênio entre o amina do anel e a amina do resíduo Leu18.

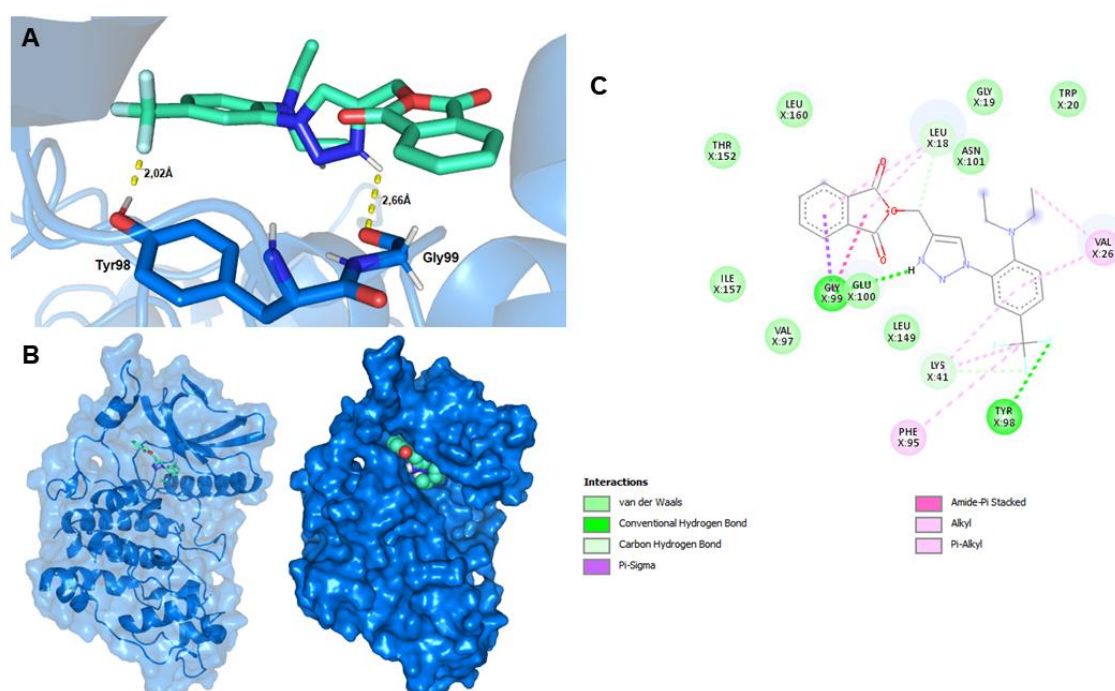


Figura 25 – Possíveis interações entre o SM23a e a LbSRPK. Representação das interações do SM23a no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro) e ligação de hidrogênio (verde).

5.5.3 Ancoragem Molecular dos compostos da Série MVAB

A) MVAB17

O análogo MVAB17 foi um dos compostos que mais apresentaram atividade leishmanicida, reduzindo em aproximadamente 100% dos parasitos intracelulares em análises de infecção *in vitro*. Nas análises *in silico* do MVAB17 (Figura 26), foram preditas duas interações hidrofóbicas com os resíduos Val97 e Glu100; duas interações de empilhamento do tipo π - π com os resíduos Gly99 e Phe95; uma interação do tipo ânion- π com o resíduo Asp190 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr98.

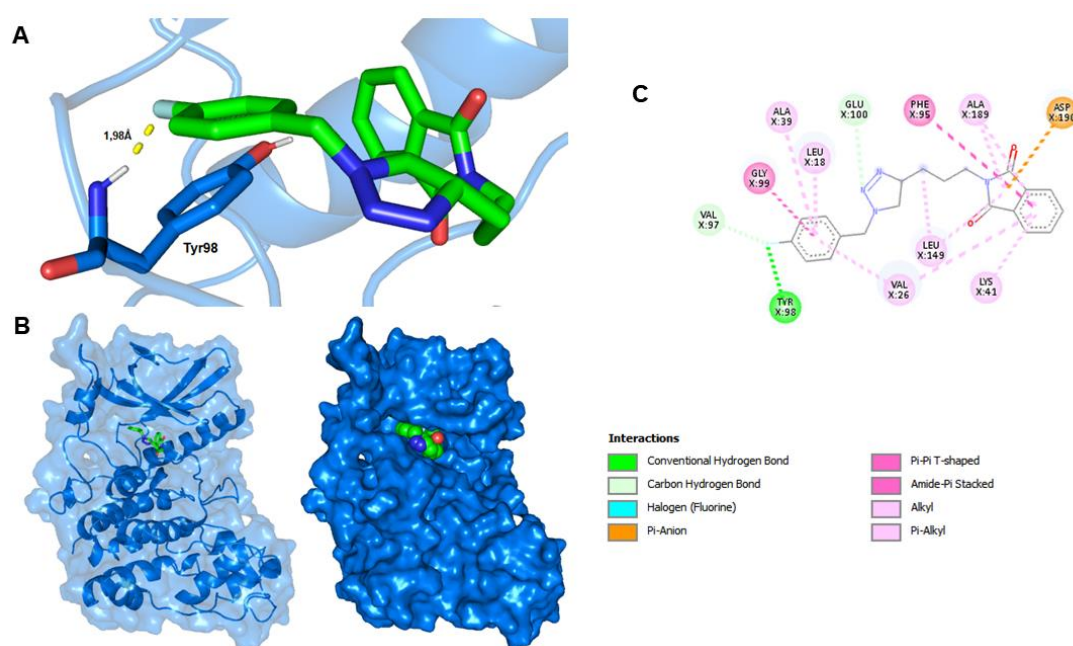


Figura 26 – Possíveis interações do MVAB17 com a LbSRPK. Representação das interações do MVAB17 no sítio ativo da LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), halogênio (azul claro), empilhamento do tipo π -ânion (laranja) e ligação de hidrogênio (verde).

B) MVAB24

O análogo MVAB24 se encaixou no sítio ativo da LbSRPK predita e apresentou boa atividade leishmanicida uma vez que, em análises de infecção *in vitro*, reduziu em aproximadamente 90% dos parasitos intracelulares. Nas análises *in silico* a pose selecionada sugeriu uma interação hidrofóbica com o resíduo Glu100; uma interação do tipo π - π com o resíduo Phe95; uma interação do tipo ânion- π com o resíduo Asp190; assim como também duas interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Asp190 e Asn101 como mostrado na Figura 27.

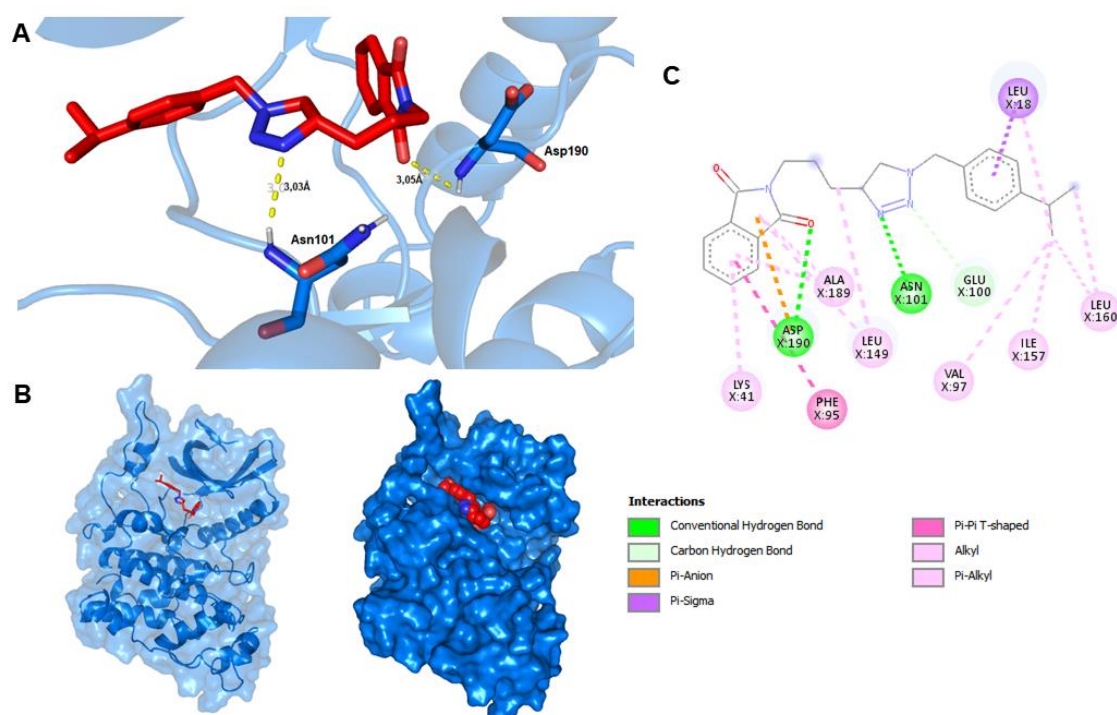


Figura 27 Possíveis interações entre o MVAB24 e a LbSRPK. (A) Imagem representativa da possível interação de ligação de Hidrogênio (2,7Å) com o resíduo de Tirosina98 da LbSRPK. (B) Representação da posição do MR26 com o alvo LbSRPK em bastão e em esferas. (C) Diagrama representativo das possíveis principais interações, que incluem as hidrofóbicas (verde claro), interações de empilhamento π - π (rosa escuro), empilhamento do tipo π -ânion (laranja) e ligação de hidrogênio (verde).

As ligações de hidrogênio, em estudos de ancoramento molecular, são aquelas presentes na maior força de estabilização que o composto pode exercer sobre o sítio ativo, diminuindo a energia de ligação a ele, sendo por isso a de maior

interesse nos estudos *in silico* entre proteína-ligante. O máximo de distância permitida para as ligações de hidrogênio em análises de dinâmica molecular é de 3,0Å entre seus executores. Podemos observar que todas as interações nas possíveis poses consideradas nesse estudo, baseados em análises minuciosas, possuem menos de 3,0Å de distância.

Comparando-se as posições dos compostos análogos na LbSRPK com o SRPIN340 em seu alvo, podemos observar que apenas os análogos MR49, MR52, SM23a, MVAB17 e MVAB24 encaixaram-se no sítio ativo de forma semelhante, levando em consideração tanto a dinâmica da interação quanto a presença das ligações de hidrogênio. O trabalho de conclusão de curso da aluna Débora Cristina Pimentel, 2020, mostrou que dois análogos SRVIC22 e SRVI32, apresentaram predominantemente interações hidrofóbicas com o sítio ativo da LbSRPK em sua posição A, aquela que é semelhante ao posicionamento do SRPIN340 na HsSRPK. Porém, quando se considerava a posição B (diferente da A), pode-se observar interações não somente hidrofóbicas, como também as de ligação de hidrogênio. No entanto, esses compostos não foram capazes de realizar a redução parasitária em mais de 50% (ONOFRE, 2017). Na análise das nove poses dos compostos MR26, MR29, MR45 e MR48, observou-se que eles se inseriram no sítio ativo, somente na posição B, inclusive realizando as mesmas interações previstas, como a ligação de hidrogênio com a Tyr98 (dados não mostrados). Esse posicionamento em B, apesar de não ser o ideal de encaixe de um ligante e também não corresponder à posição do SRPIN340 em HsSRPK, mostrou que a formação da ligação de hidrogênio é mais favorável, o que estabilizaria melhor a molécula no sítio ativo. O que dificulta o encaixe preciso dos ligantes em seu sítio ativo pode estar relacionado com uma menor capacidade de readaptação estrutural dos análogos em seu sítio ativo, uma vez que a análise é realizada com os ligantes rígidos o que não confere a uma flexibilidade dos compostos análogos e do alvo. Para que pudesse haver uma melhor análise, deveria ser realizados estudos de dinâmica molecular em que são contabilizadas as probabilidades de interações e flexibilizações do complexo ligante-receptor. Porém, a necessidade de um computador de análise mais robusto, infelizmente não pudemos realizá-lo.

Para todos os compostos foram previstas ligações de hidrogênio que, é aquela que está presente na interação entre o SRPIN340 e seu alvo natural (HsSRPK), com a capacidade de inibi-lo (FUKUHARA, *et al.*, 2016), podendo ser um dos indícios da

atividade leishmanicida dos compostos, como comprovados nas análises *in vitro*. As outras interações encontradas também são importantes para a estabilização do composto no sítio ativo, como também diminuir a energia de ligação do composto no sítio catalítico da enzima.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Podemos concluir com esse trabalho que, dos 91 compostos análogos testados para citotoxicidade em linhagem de macrófagos murinos RAW264.7, em se tratando de das séries MR e MVAB, nenhum deles causou toxicidade significativa comparada aos controles. Já da série SM, apenas os compostos SM19, SM20, SM21a, SM23a, SM23b, SM35 e SM47, não apresentaram citotoxicidade, fazendo com que fossem prosseguidas as análises com todos os compostos.

Para a triagem dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis*, podemos observar que nenhum composto teve ação citotóxica o que nos auxiliaria a descobrir a seletividade e a eficácia dos compostos frente a infecção intracelular, como o caso da Anfotericina B. Assim, a fim de avaliar os possíveis efeitos dos compostos frente a leishmanias intracelulares, todos os 91 compostos foram testados no ensaio de infecção.

No ensaio de infecção observamos que todas as séries tiveram resultados promissores quanto a potencial atividade leishmanicida. Dos 22 compostos da Série MR testados, apenas três não tiveram atividade leishmanicida quando confrontados com os resultados de citotoxicidade dos macrófagos, sendo eles o MR10, MR19 e o MR25.

Já os da Série SM, daqueles selecionados com o ensaio de citotoxicidade, apenas os compostos análogos SM20, SM23a e SM23b é que tiveram atividade leishmanicida.

Para os compostos da Série MVAB, de todos os 37 compostos selecionados com o ensaio da citotoxicidade em macrófagos, dezenove compostos tiveram atividade leishmanicida reduzindo no mínimo 50% das leishmanias intracelulares em ensaio de infecção *in vitro*.

Devido aos prazos para o término do doutorado, foram selecionados os nove melhores compostos baseado em sua maior atividade leishmanicida intracelular, sendo eles da Série MR: MR26, MR29, MR45, MR48, MR49 e MR52. Da Série SM, apenas o SM23a foi selecionado, e da Série MVAB, somente o MVAB17 e o MVAB24 foram selecionados para dar prosseguimento nos testes.

A partir daí, houve uma extensa tentativa de cálculo de IC₅₀ e EC₅₀ desses compostos, com o intuito de calcular o Índice de Seletividade, que nos diz a respeito,

da seletividade que uma droga possui entre o agente etiológico da doença e a célula do hospedeiro. Os análogos estudados apresentaram IC_{50} variando na faixa de $5\mu M$ a $220\mu M$, porém, apenas os compostos MR45 e SM23a tiveram seu R^2 acima de 0,9 o que deixa os dados mais confiáveis para análise. Aos demais compostos análogos, que não tiveram sua análise de regressão confiável, atribui-se a tal efeito, a baixa solubilidade desses compostos, tornando sua disponibilidade questionável e, portanto, gerando essa dificuldade no cálculo pelo programa. Para o cálculo do EC_{50} , que é quando calculamos a concentração efetiva para redução de 50% das células infectadas, e que nos auxilia a calcular o Índice de Seletividade, não foi possível determinar essa dose, devido a baixa solubilidade dos compostos no meio de RPMI a 10%, em que as curvas de R^2 , apresentaram-se muito ruins (abaixo de 0,1) – dados não mostrados.

A partir desses resultados partimos para análise *in silico* para determinar se há alguma interação favorável entre nossos compostos análogos e nosso alvo molecular, a LbSRPK. Como análise de antemão, a LbSRPK foi moldada segundo a HsSRPK humana, cristalizada com seu inibidor, o SRPIN340. Esse ensaio foi realizado pela aluna, Débora Pimentel, em 2020 para seu trabalho de monografia, e, portanto, usamos as mesmas referências de seu estudo e validação. A partir daí, os compostos análogos foram desenhados e validados e realizada e foi realizado o ancoramento molecular com o nosso alvo que apresentou resultados importantes na análise das poses selecionadas.

Dos nove compostos análogos analisados, todos eles se encaixaram no sítio ativo da enzima. Quatro deles, os MR26, MR29, MR45 e MR48, encaixaram-se na posição que chamamos de B, que é diferente daquela apresentada pelo SRPIN340/HsSRPK, considerada o padrão para análise nesse estudo. Apesar do posicionamento B não ser o padrão de encaixe dos ligantes, ele foi selecionado para esses compostos análogos por não terem sido preditas a posição A e apresentarem a menor energia de ligação entre eles e o alvo.

Os demais compostos análogos, MR49, MR52, SM23a, MVAB17 e MVAB24, encaixaram-se na posição que chamamos de A. As ligações de hidrogênio são aquelas que ligações de maior interesse quando estudos de proteína-ligante são realizados, devido serem ligações com distâncias menores e, portanto, mais fortes. Assim, todas as poses, tanto A quanto B, favoreceram a formação de pelo menos uma interação de ligação de hidrogênio, onde cinco dos nove compostos análogos

apresentaram essa ligação com o resíduo Tyr98 do alvo. Quando analisado o SRPIN340 com a LbSRPK, também pela Débora Pimentel, 2020, essa interação com a Tyr98 se mostrou inviável, o que explica a sua ineficiência em inibir a LbSRPK. Os outros quatro compostos, apresentaram possíveis interações com os resíduos Asn101, Gly99, Leu18 e Asp190, o que poderia estabilizar ainda mais o composto no sítio ativo, melhorando sua função.

Novos testes de IC_{50} e EC_{50} devem ser realizados otimizando a biodisponibilidade desses compostos análogos visando a melhoria da sua solubilidade.

Também devem ser realizados testes *in vitro* que possam comprovar a real interação e atividade dos nossos compostos análogos com a LbSRPK, como o Thermal Shift com a proteína recombinante purificada e ensaios de expressão e fosforilação de proteínas importantes para as diversas fases de vida do parasito. Além disso, ensaios *in vivo* também serão de suma importância nas próximas fases pré-clínicas para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Contudo também deve ser realizado os ensaios para os outros 57 compostos que apresentaram atividade leishmanicida ótima, já com os efeitos da solubilidade levados em consideração. E com outras espécies de leishmania também devem ser realizados com o intuito de se desenvolver uma droga não só para a LTA, mas para as outras formas clínicas de leishmaniose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. L. O.; SANTOS, B. J. **Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 86, n.3, p. 497-506, 2011.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J., JANNIN, J., DEN BOER, M., THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.** PLoS ONE v.7 n.5. Geneva, Suíça, 2012.

AKHOUNDI, M. et al. **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

AKINSOLU, F. T. et al. **Emerging resistance of neglected tropical diseases: A scoping review of the literature.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 16, n. 11, 2019.

ALVAREZ-RUEDA, N.; BIRON, M.; LE PAPE, P. **Infectivity of Leishmania mexicana Is Associated with Differential Expression of Protein Kinase C-Like Triggered during a Cell-Cell Contact.** PLoS One, V. 4. N.10. França, 2009.

ANVERSA, L., TIBURCIO, M. G. S., RICHINI-PEREIRA, V. B., RAMIREZ, L. E.. **Human leishmaniasis in Brazil: A general review.** Revista Associação Médica Brasileira, v. 64, n. 3, p 281-289, São Paulo, Brasil, 2019.

ASHUTOSH, SUNDAR S, GOYAL N. **Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania.** J Med Microbiol. 56(Pt 2):143–53, 2007.

AUBOL, B. E., CHAKRABARTI, S., NGO, J., SHAFFER, J., NOLEN, B., FU, X. D., GHOSH, G. ADAMS, J. A.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

the United States of America. PNAS, V 100, N 22, p. 12601-12606, Califórnia, Estados Unidos, 2003.

BANERJEE, S., BOSE, D., CHATTERJEE, N., DAS, S., CHAKRABORTY, S., DAS, T., SAHA, K. D.. **Attenuated Leishmania induce pro-inflammatory mediators and influence leishmanicidal activity by p38 MAPK dependent phagosome maturation in Leishmania donovani co-infected macrophages.** Nature Publishing Group - Scientific Reports. V 6, p 1-14, West Bengal, India, 2016.

BARANWAL, A.; CHIRANJIVI, A. K.; KUMAR, A.; DUBEY, V. K.; CHANDRA, P. **Design of commercially comparable nanotherapeutic agente against human disease-causing parasite, *Leishmania*.** Scientific Reports, v 8: p 8814, 2018.

BARRETT, M. P.; KYLEM D. E.; SIBLEY, D.; RADKE, J. B.; TARLETON, R. L. **Protozoan persister- like cells and drug treatment failure.** Nature Rev. Microbiology, V. 17. Estados Unidos da América, 2019.

BELO, V. S. WERNECK, G.L., BARBOSA, D.S., SIMÕES, T.C., NASCIMENTO, B.W.L., DA SILVA, E. S., STRUCHINER, C.J. **Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 4, p. e2182, 25 abr. 2013.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. **Leishmania amazonensis downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism.** European Journal of Immunology, v. 48, n. 7, p. 1188–1198, 2018.

CARVALHO LP, PASSOS S, DUTRA WO, SOTO M, ALONSO C, GOLLOB KJ, CARVALHO EM, RIBEIRO DE JESUS A. **Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients.** Scand J Immunol; v. 61, n. 4, p. 337-42, 2005.

CECCARELLI, M. et al. **Unusual signs and symptoms in HIV-positive patients coinfecting with leishmania spp: The importance of neglected tropical disease in differential diagnosis.** Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, v. 6, n. 5, p. 843–847, 2018.

CHAVES, L. F., CALZADA, J. E., VALDERRAMA, A., SALDAN, A.. **Cutaneous Leishmaniasis and Sand Fly Fluctuations Are Associated with El Niño in Panamá.** PLoS Negl Trop Dis V.8, N.10: República do Panamá, 2014.

DAN-GOOR, M.; NASEREDDIN, A.; JABER, H.; JAFFE, C. L. **Identification of a Secreted Casein Kinase 1 in Leishmania donovani: Effect of Protein over Expression on Parasite Growth and Virulence.** PLoS One, V. 8, N. 11. França, 2013.

DUARTE M., WANG L., CALDERWOOD M.A., ADELMANT G., OHASHI M., ROECKLEIN-CANFIELD J., MARTO J.A., HILL D.E., DENG H., JOHANNSEN E.. **An RS motif within the Epstein-Barr virus BLRF2 tegument protein is phosphorylated by SRPK2 and is important for viral replication.** PLoS One 8(1):e53512, 2013.

DUQUE, G. A., DESCOTEAUX , A.. **Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means.** Current Opinion in Microbiology, V. 26 p. 32–40, Quebec, Canadá, 2015.

ENDICOTT, J. A., NOBLE, M. E. M., JHONSON, L. N.. **The Structural basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases.** Ann Review of Bioq. V. 81, p. 587-613. 2012.

ESPADA, C. R.; MAGALHÃES, R. M.; CRUZ, M. C.; MACHADO, P. R.; SHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M.; HORNILLOS, V.; ALVES, J. M.; CRUZ, A. K.; COELHO, A. C.; ULIANA, S. R. B. **Investigation of the pathways relates to intrinsic miltefosine tolerance in Leishmania (Viannia) braziliensis clinical isolates reveals differences in drug uptake.** IJP: Drugs and Drug Resist. V. 11, P: 139-147. São Paulo, SP. Brasil, 2019.

ESPINOSA, O. A., SERRANO, M. G., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M. M. G., SHAW, J. J.. **An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*.** Parasitology, V.145, p. 430–442, São Paulo, Brasil, 2016.

FALCÃO, S. de A. C., JARAMILLO, T. M. G., FERREIRA, L. G., BERNARDES, D. M., SANTANA, J. M., FAVALI, C. B. F.. ***Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system.** Front. Immunol. V. 7 No 287. Rio de Janeiro, Brasil. 2016.

FERGUSON, F. M. & N. S. GRAY. **Kinase inhibitors: the road ahead.** Nature Reviews. V.17, Estados Unidos da América, 2018.

FUKUHARA T, HOSOYA T, SHIMIZU S, SUMI K, OSHIRO T, YOSHINAKA Y, SUZUKI M, YAMAMOTO N, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA & HAGIWARA M.. **Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication.** Proceedings of the National Academy of Sciences 103(30):11329-33, 2006.

GONTIJO, B., CARVALHO, M. de L. R. de,. **American cutaneous leishmaniasis.** Soc. Bras. De Med Tropical, V. 36, No 1: P 71-80. Minas Gerais, Brasil, 2003.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; SOUZA-VIEIRA, T. S. de.; PALETTA-SILVA, R.; FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SARAIVA, E. M. **3'-Nucleotidase/Nuclease Activity Allows *Leishmania* Parasites To Escape Killing by Neutrophil Extracellular Traps.** Infection and Immunity p. 1732–1740, V. 82. Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

GURUNG, P., KARKI, R., VOGEL, P., WATANABE, M., BIX, M., LAMKANFI, M., KANNEGANTI, T-D. **An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis.** J Clin Invest. V. 125, No 3, p. 1329-1338. Bélgica, 2015.

HANDMAN, E. **Cell biology of *Leishmania*.** Adv. Parasitol. v. 44, p 1-39, 1999.

HENRY, W.M.; BERGMAN, J.D.; DAVIES, C.D.; SARAIVA, N. **Advances in leishmaniasis**. The Lancet, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

HUANG, J.; ZHOU, Y.; XUE, X.; JIANG, L.; DU, J.; CUI, Y.; ZHAO, H. **SRPIN340 protects heart muscle from oxidative damage via SRPK1/2 inhibition-mediated AKT activation**. Biochem. and Biophys. Res. Communic. V.510, P.97-103. Changai, China, 2019.

HUSEIN, A.; JAMAL, A; AHMED, M. Z.; ARISH, M.; ALI, R.; TABREZ, S.; RASOOL, F.; RUB, A. **Leishmania donovani infection differentially regulates small G-proteins**. J. Cell Biochem. V.1, N.11. Índia, 2018.

JANG SW, YANG S, EHLÉN A, DONG S, KHOURY H, CHEN J, PERSSON JL & YE K. **Serine/Arginine Protein- Specific Kinase 2 Promotes Leukemia Cell Proliferation by Phosphorylating Acinus and Regulating Cyclin A1**. Cancer Research n. 68, p. 4559-4570, 2008.

JONES, N. G., CATTAPRETA, C. M. C., LIMA, A. P. C. A., MOTTRAM, J. C. **Genetically Validates Drug Targets in Leishmania: Current Knowledge and Future Prospects**. ACS Infect. Dis. Brasil, 2018.

JOUNG, J., RAMM, E., PABO, C. **A bacterial two hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 97, n. 13, p. 7382-7387, 2000.

KARAKAMA Y, SAKAMOTO N, ITSUI Y, NAKAGAWA M, TASAKA-FUJITA M, NISHIMURA-SAKURAI Y, KAKINUMA S, OOOKA M, AZUMA S, TSUCHIYA K, ONOGI H, HAGIWARA M & WATANABE M.. **Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase**. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 54(8):3179-86, 2010.

KAYE, P., SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface**. Nature Reviews Microbiology. V.9. Pensilvânia, Estados Unidos, 2011.

KERN, S.; AGARWAL, S.; HUBER, K.; GEHRING, A. P.; STRÖDKE, B.; WIRTH, C. C.; BRÜGL, T.; ABODO, L. O.; DANDEKAR, T.; DOERIG, C.; FISCHER, R.; TOBIN, A. B.; ALAM, M. M.; BRACHER, F.; PRADEL, G. **inhibition of the SR protein-Phosphorylating CLK Kinases of *Plasmodium falciparum* Impairs Blood Stage P replication and Malaria Transmission.** PLoS ONE, V.9, N.9, Reino Unido, 2014.

LAINSON, R.. **Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia.** Rev Pan-Amaz Saude; V.1, N.2, P.13-32. Pará, Brasil, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.. **American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (*Leishmania*) chagasi.** Trans R Soc Trop Med Hyg. V.81, N.3, P.517. Brasil, 1987.

LARA-SILVA, F. DE O., MICHALSKY, E.M., FORTES-DIAS, C.L., FIUZA, V. O.P., PESSANHA, J.E.M., REGINA-SILVA, S., DE AVELAR, D.M., SILVA, M.A., LIMA, A.C.V.M.R., DA COSTA, A.J.A., MACHADO-COELHO, G., L.L., DIAS, E.S. **Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recente transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil.** Acta Tropica, v. 148, p. 128–136, 2015.

LAMOTTE, S., SPÄTH, G. F., RACHIDI, N., PRINA, E. **The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery.** PLoS Negl Trop Dis. V.11, No.6, Paris, França, 2017.

LESTINOVA, T., ROHOUSOVA, I., SIMA, M., OLIVEIRA, C. I. de, VOLF, P.. **Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*.** PLoS Negl Trop Dis. V. 11, No 7, Salvador, Brasil, 2017.

LIN, G.; DING, Z.; HU, R.; WANG, X.; CHEM, Q.; ZHU, X.; LIU, K.; LIANG, J.; LU, F.; LEI, D.; XU, G., YONG, K-T. **Citotoxicity and immune response of CdSe/ZnS**

Quantum dots towards a murine macrophage cell line. RSC Advanc. V.4, P. 5792-5797. China, 2014.

MACHADO, F. S., DUTRA, O. W., ESPER, L., GOLLOB, K. J., TEIXEIRA, M. M. FACTOR, S. M., WEISS, L. M., NAGAJYOTHI, F., TANOWITZ, H. B., GARG, N. J. **Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease.** Semin Immunopathol, V.34, P. 753–770, Minas Gerais, Brasil, 2012.

MACHADO, P.R.; PENNA, G. **Miltefosine and cutaneous leishmaniasis.** Curr. Opin. Infect. Dis. v. 25, p. 141-144, 2012.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. **Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment.** Qjm, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEHEUS, F., BALASEGARAM, M., OLLIARO, P., SUNDAR, S., RIJAL, S., FAIZ, M.A., BOELAERT, M. **Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 9, 2010.

MENDONÇA, D. V. C.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; CARVALHO, AM. R. S.; DIAS, A. L. T.; MIYAKAZI, C. K.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; TAVARES, C. A. P.; BARICHELLO, J. M.; DUARTE, M. C.; COELHO, E. A. F. **Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B carrying delivery systems against visceral leishmaniasis.** Elsevier Experimental Parasitol. 14-4894, 2018.

MENDONÇA, L. S. O., SANTOS, J. M., KANETO, C. M., CARVALHO, L. D. de, LIMA-SANTOS, J., AUGUSTO, D. G., CARVALHO, S. M. S., SOARES-MARTINS, J. A. P., SILVA-JARDIM, I. **Characterization of serum cytokines and circulating microRNAs that are predicted to regulate inflammasome genes in cutaneous leishmaniasis patients.** Experimental Parasitology, V. 210, Bahia, Brasil, 2020.

MILLER, S. I., WIRTH, D. F. **Trans Splicing in Leishmania enriettii and Identification of Ribonucleoprotein Complexes Containing the Spliced Leader and U2 Equivalent RNAs.** MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, V.8, No.6, p. 2597-2603, Estados Unidos, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO GERAL DE DESENVOLVIMENTO DA EPIDEMIOLOGIA EM SERVIÇOS. **Guia de Vigilância em Saúde.** 1ª Ed Atualizada, Vol. Único. 773p, Brasília, DF, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar.** 2ª Ed. 189p. Brasília, DF, Brasil, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** 1ª Ed. Volume único. Brasília – DF, 2006.

MOREIRA, D. S.; MURTA, S. M. F. Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in Leishmania braziliensis antimony resistance phenotype. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. **Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in Leishmania.** Cell Death and Disease V.2, Canadá, 2011.

MOROOKA, S.; HOSHINA, M.; KII, I.; OKABE, T.; KOJIMA, H., INOUE, N. OKUNO, Y.; DENAWA, M.; YOSHIDA, S.; FUKUHARA, J.; NINOMIYA, K.; IKURA, T.; FURUYA, T.; NAGANO, T.; NODA, K.; ISHIDA, S.; HOSOYA, T.; ITO, N.; YOSHIMURA, N. **identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice.** Mol. Pharm. V.88, NP.316-325, Japão, 2015.

NEVES, P. D. **Parasitologia Humana.** 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NIETO, A., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R., MADRID-ELENA, N., CARRIN, J. **Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model.** Veterinary Research, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NO, J. H. **Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries.** Acta Tropica, v. 155, p. 113–123, 2016.

OGAWA, Y.; HAGIWARA, M. **Challenges to congenital genetic disorder with “RNA-targeting” chemical compounds.** Pharmac. & Therap. V. 134, P.298-305. Kyoto, Japão, 2012.

ONOFRE, T. S. **Desafios na busca por novos salvas para o controle de circovirose suína e leishmaniose.** Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) 124f - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Informe Leishmanioses nº 8. Dezembro de 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 19 de maio de 2020.

PACE, D.. **Leishmaniasis.** Elsevier: Journal of Infection. V. 69. Malta, 2014.

PAIVA, Samuel Inácio da Silva. **Efeito do Inibidor de Serine Arginine Protein kinases (SRPKs) SRPIN340 e Derivados em Células Murinas de Câncer de Mama Metastático.** 2022. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

PANDEY, K., MEHROTRA, S., SHARMA, S., GUDDER R. S., SUNDAR, S., SHAHA, C.. **Leishmania donovani-induced increase in Macrophage Bcl-2 Favors Parasite survival.** Front. Immunol. V. 7, No 456. Índia, 2016.

PEREIRA, A. A. S.; FERREIRA, E. De C.; LIMA, A. C. V. M. Da R. TONELLI, G. B.; RÊGO, F. D.; PAGLIA, A. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; PAZ, G. F.; GONTIJO, C. M. F. **Detection of Leishmania spp in silvatic mammals and isolation of Leishmania (Viannia) braziliensis from Rattus rattus in na endemic area for**

leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. PLoS ONE, V.12, N.11, Belo Horizonte, Brasil, 2017.

PIMENTEL, DÉBORA CRISTINA. **Avaliação *In Silico* da Ligação de Inibidores de Cinases à Serine-Arginine Protein Kinases (Srpk) de *Leishmania braziliensis*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Bioquímica) – Universidade Federal de Viçosa. 52f, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2020.

PINTO, M. O. K. M.; OLIVEIRA, T. M. de; AGUIAR, A. N. de A.; PINTO, P. E. M.; BARBOSA, D. S.; SILVA, M. X. **Profile of American Tegumentary Leishmaniasis in transmission áreas in the state os Minas Gerais, from 2007 to 2017.** BMC Infect. Dis. V. 20, N. 163. Brasil, 2020.

PORTAL, D.; LOBO, G. S.; KADENER, S.; PRASAD, J.; ESPINOSA, J. M.; PEREIRA, C. A.; TANG, Z.; LIN, R.; MANLEY, J. L.; KORNBLIHTT, A. R.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N.. ***Trypanosoma cruzi* TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases.** Molecular & Biochemical Parasitology. V. 127, p. 9–21, Buenos Aires, Argentina, 2003.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, JC.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCIA-HERNANDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge.** PLoS Negl Trop Dis 11(12), 2017.

RAO, S. J.; MELEPPATTU, S.; PAL, J. K. **A GCN2-Like eIF2 α Kinase (LdeK1) of *Leishmania donovani* and Its Possible Role in Stress Response.** PLoS One, V. 11, N. 6, Índia, 2016.

RASTROJO, A.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; VARGAS, P.; CAMACHO, E.; CORVO, L.; IMAMURA, H.; DUJARDIN, J.; CASTANYS, S.; AGUADO, B.; GAMARRO, F.; REQUENA, J. M. **Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs.** LJP: Drugs and Drug Resistance: n. 8, p. 246–264, 2018.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESÚS, M. N. de., MARZAL, P. C.. **Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte.** Quim. Nova, Vol. 26, No. 4, p. 550-555. São Paulo, Brasil, 2003.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. **Cutaneous leishmaniasis.** Lancet Infect Dis 2007;7(9):581-96.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M.. **Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review.** PLoS Negl Trop Dis. V.4, N.1. Brasil, 2010.

RODRIGUES, Michelle Peixoto. **Diamidas inspiradas no SRPIN 340 e ésteres cinamatos: Sínteses e prospecção de bioatividades.** Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Agroquímica) 501f. – Universidade Federal de Viçosa, 2019.

ROSSI, M., FASSEL, N.. **How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!** International Immunology, Vol. 30, No. 3, pp. 103–111. Suíça, 2017.

SAHA, P.; BHATTACHARJEE, S.; SARKAR, A.; MANNA, A.; MAJUMDER, S.; CHATTERJEE, M. **Berberine Chloride Mediates Its Anti-Leishmanial Activity via Differential Regulation of the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway in Macrophages.** PLoS ONE, V.6, N. 4. Índia, 2011.

SANDERSON, L.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.. **Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania spp.*** J Antimicrob Chemother V.69, P.1888–1891. Reino Unido, 2014.

SANTOS, J. C. dos, DAMEN, M. M. A., OOSTING, M., JONG, D. J. de, HEINHUIS, B., GOMES, R. S., ARAÚJO, C. S., NETEA, M. G., RIBEIRO-DIAS, F., JOOSTEN, L. A. B. **The NOD2 receptor is crucial for immune responses towards New World**

Leishmania species. Scientific Reports Nature, V. 7, No. 15219, Goiás, Brasil, 2017.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. **Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review.** Parasitol Res n 103, p. 1–10, 2008.

SILVA, B. V., HORTA, B. A. C., ALENCASTRO, R. B. de., PINTO, A. C.. **Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos.** Quim. Nova, Vol. 32, No. 2, p 453-462, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

SILVA, L. M. R.; MUÑOZ-CARO, T.; BURGOS, R. A., HIDALGO, M. A.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. **Far beyond Phagocytosis: Phagocyte-Derived Extracellular Traps Act Efficiently against Protozoan Parasites In Vitro and In Vivo.** Hindawi Publishing Corporation, Alemanha, 2016.

SILVA, R. B. da.; MACHADO, C. R.; RODRIGUES, A. R. A., PEDROSA, A. L.. **Selective human inhibitors of ATR and ATM render Leishmania major promastigotes sensitive to oxidative damage.** PLoS ONE V.13 N.9. Brasil, 2018.

SIQUEIRA, R. P.; BARBOSA, E. de A. A.; POLÊTO, M. D.; RIGHETTO, G. L.; SERAPHIM, T. V.; SALGADO, R. L.; FERREIRA, G.; BARROS, M. V. de A.; OLIVEIRA, L. L de.; LARANJEIRA, A. B. A.; ALMEIDA, M. R.; JÚNIOR, A. S.; FIETTO, J. L. R., KOBARG, J.; OLIVEIRA, E. B. de.; TEIXEIRA, R. R.; BORGES, J. C.; YUNES, J. A.; BRESSAN, G. C. **Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2- (Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl) Isonicotinamide (SRPIN340).** PLoS ONE, V. 10, N. 8. Minas Gerais, Brasil, 2015.

SCOTT, P., NOVAIS, F. O. **Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis.** Nature Reviews Immunology, V. 16, No 581. Pensilvânia, Estados Unidos, 2016.

SEELIGER, D. AND DE GROOT, B. L. **"Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina."** J Comput Aided Mol Des 24(5): 417-422. 2010.

SHEPARD PJ & HERTEL KJ. **The SR protein family.** Genome Biology v. 10 n. 10, p. 242, 2009.

SILVEIRA FT, LAINSON R, DE CASTRO GOMES CM, LAURENTI MD, CORBETT CE. **Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis.** Parasite Immunol, V. 31, No.8, p.423-31, 2009.

SILVEIRA, F. T.. **What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg V. 00: p.1–12. Brasil, 2019.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>> Acesso em 28 Jun 2018.

SOUSA, Sara Maria Ribeiro. **Síntese de novos 1,2,3-triazóis inspirados no SRPIN 340 e avaliação de atividades antiparasitária e antitumoral.** Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2020.

SOUZA, D. M.; **Estudo de proteínas do parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* ortólogas a proteínas do hospedeiro: papel da infectividade e potencial uso no diagnóstico sorológico das leishmanioses.** Tese de Doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais (Programa de Pós Graduação em Parasitologia) 243 f. Belo Horizonte, Brasil, 2014.

SUNYOTO, T., VERDONCK, K., SAFI, S. EL, POTET, J. PICADO, A., BOELAERT, M.. **Uncharted territory of the epidemiological burden of cutaneous leishmaniasis in sub-Saharan Africa—A systematic review.** PLoS Negl Trop Dis, V.12, N.10: 2018.

TABBABI, A. **Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa**

Afri Health Sci. V19 N. 1, p. 1329-1337. Tunis, Tunisia, 2019.

TEIXEIRA, Leilane Ferreira. **Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial alvo de fármacos em *Leishmania braziliensis***. Universidade Federal de Viçosa – Dissertação Mestrado. 90 p. Minas Gerais, Brasil, 2018

THAKUR, L., SINGH, K. K., SHANKER, V., NEGI, A., JAIN, A., MATLASHEWSKI, G., JAIN, M.. **Atypical leishmaniasis: A global perspective with emphasis on the Indian subcontinent**. PLoS Negl Trop Dis. V.12, N.9: Índia, 2018.

TOMASSONE, L., BERRIATUA, E., SOUSA, R. de, DUSCHER, G.G., MIHALCA, A. D., SILAGHIF, C., SPRONG, H., ZINTL, A..**Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild**. Veterinary Parasitology V. 251 P.17–26, 2018.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., BORTOLETI, B. T. da S., ASSOLINI, J. P., GONÇALVES, M. D., CARLOTO, A. C. M., SAPLA, M. M. M., CONCHON-COSTA, I., BORDIGNON, J., PAVANELLI, W. R. **Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons**. Front. Immunol. V.9, No.2529, São Paulo, Brasil, 2018.

TROTT, O. AND OLSON, A. J. **"AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading."** J Comput Chem 31(2): 455-461, 2010.

VANHAMME L, PAYS E. **Control of gene expression in trypanosomes**. Microbiol Rev. V.59, p.223-240. 1995.

VERAS, P. S. and Bezerra de Menezes, J. P.. **"Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection."** Int J Mol Sci 17(8), 2016.

VIANNA, E. N., HELENA, M., MORAIS, F., SABROZA, P.C., REIS, I.A., DIAS, E.S. **Abundance of Lutzomyia longipalpis in urban households as risk factor of**

transmission of visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 111, n. 5, p. 302–310, 2016.

WANG, H.-Y., ARDEN, K. C., BERMINGHAM, J. R., VIARS, C. S., LIN, W. BOYER, A. D., FU, X-D.. **Localization of Serine Kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), Specific for the SR Family of Splicing Factors in Mouse and Human Chromosomes.** Genomics V. 57, p. 310–315, China. 1999.

WANG, H-Y., LIN, W., DYCK, J. A., YEAKLEY, J. M., SONGYANG, Z., CANTLEY, L. C., FU, X-D. **SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells.** The Journal of Cell Biology, V. 140, N. 4, P. 737–750, China 1998.

WATSON, N. A.; CARTWRIGHT, T. N.; LAWLESS, C.; CÁMARA-DONOSO, M.; SEN, O.; SAKO, K.; HIROTA, T.; KIMURA, H.; HIGGINS, J. M. G.. **Kinase inhibition profiles as a tool to identify kinases for specific phosphorylation sites.** Nature Communications V.11, N.1684. 2020.

WANG, H-Y.; LIN, W.; DYCK, J. A.; YEAKLEY, J. M.; SONGYANG, Z., CANTLEY, L. C.; FU, X-D. **SRPK2: a Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-,RAN Splicing Factors in Mammalian Cells.** The Journal of Cell Biology, V. 140, p. 737-750. Estados Unidos, 1998

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014.** Weekly epidemiological record, n. 47, p. 521–540, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Cutaneous Leishmaniasis control programme. Annual country reports.** Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2020. Published in 16 , Aug., 2021. Disponível em: < leishmaniasis_cl_2020.png (3503×2476) (who.int)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Visceral Leishmaniasis control programme. Annual country reports.** Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020. Published in 16 , Aug., 2021. Disponível em: < leishmaniasis_vl_2020.png (3503×2476) (who.int)>.

ZHENG Y, FU XD & OU JH.. **Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein.** Virology, n342(1):150-8, 2005.

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.