

LARISSA COELHO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE NOVOS INIBIDORES
DE HDAC E DERIVADOS DO EUGENOL EM *Leishmania braziliensis***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

LARISSA COELHO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE NOVOS INIBIDORES
DE HDAC E DERIVADOS DO EUGENOL EM *Leishmania braziliensis***

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

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

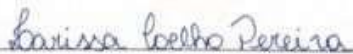
LARISSA COELHO PEREIRA

**AValiação DO EFEITO LEISHMANICIDA DE NOVOS INIBIDORES DE HDAC
E DERIVADOS DO EUGENOL EM *Leishmania braziliensis***

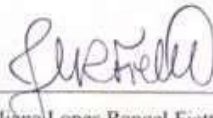
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de junho de 2021

Assentimento:



Larissa Coelho Pereira
Autora



Juliana Lopes Rangel Fietto
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus. Em Filipenses 2:13 está escrito: “Pois é Deus quem efetua em vocês tanto o querer quanto o realizar, de acordo com a boa vontade dele.” E eu sei, no íntimo do meu coração que este trabalho é fruto de algo que o próprio Deus sonhou para mim, e sei que a sua conclusão só foi possível porque em todo o tempo eu fui capacitada e fortalecida por Ele.

Agradeço aos meus avós Horácio, Dalva e Carolina, aos meus pais Reinaldo e Marisa, à minha irmã Mariana e meu cunhado Matheus, por todo apoio, conselho, amor e oração em todos os momentos em que precisei.

Agradeço ao Hudson, meu namorado e melhor amigo, que não só me incentivou, mas passou junto comigo por todas as dificuldades me fazendo sentir segura e capaz.

Agradeço à Juliana Fietto, minha orientadora, pela confiança em ter me aceitado como aluna e por todos os ensinamentos.

Agradeço à Luciana Ângelo, que não só me ensinou a trabalhar com o cultivo celular, mas também me ensinou a confiar em mim mesma, me ajudou nos meus momentos de desânimo e tristeza com sábios conselhos e um ombro amigo.

Agradeço aos colegas Victor, Joice, Laís, Juliana Leopoldo, Flávia, Adriana e Walmir pela boa convivência no laboratório.

Agradeço a Beth, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela boa vontade em me ajudar sempre.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar da finalização desta pesquisa.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela boa vontade em ajudar quando preciso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo suporte financeiro.

Minha eterna gratidão!

*“Porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas;
glória, pois, a ele, eternamente. Amém.” (Romanos 11:36)*

RESUMO

PEREIRA, Larissa Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Avaliação do efeito leishmanicida de novos inibidores de HDAC e derivados do Eugenol em *Leishmania braziliensis***. Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

As leishmanioses são doenças parasitárias de transmissão vetorial, causadas por espécies patogênicas de *Leishmania* que integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas. O tratamento para os diferentes tipos de leishmaniose em humanos depende principalmente de quimioterapia. O tratamento quimioterápico é comprometido pelo alto custo, toxicidade elevada e desenvolvimento de resistência do parasito, o que tem levado à necessidade de desenvolvimento de novas terapias. Neste trabalho foram realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida contra *Leishmania braziliensis*, agente causador de leishmaniose do tipo tegumentar. O primeiro capítulo é continuidade dos trabalhos desenvolvidos durante o Projeto Colaborativo Internacional financiado pela União Europeia denominado A-ParaDDisE (<https://cordis.europa.eu/project/id/602080>), que objetivou o desenvolvimento de novos fármacos, baseando-se em alvos epigenéticos, contra doenças parasitárias negligenciadas, incluindo leishmanioses. Neste capítulo foram realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida com compostos inibidores de histonas deacetilases (iHDACs) da classe dos ácidos hidroxâmicos. Foram avaliadas a toxicidade para as células hospedeiras modelo (macrófagos Raw 264.7) e ação contra amastigotas intracelulares presentes na infecção dos macrófagos por *L. braziliensis*. Os resultados mostram que não houve efeito significativo em amastigotas dos compostos testados na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. O segundo capítulo deste projeto foi desenvolvido em parceria com o pesquisador Dr. Róbson Ricardo Teixeira, da Universidade Federal de Viçosa, e também objetivou a descoberta de novos compostos para desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose. Foram realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida com compostos derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. Foram avaliadas a toxicidade para as células hospedeiras modelo (macrófagos Raw 264.7) e ação contra amastigotas intracelulares presentes na infecção dos macrófagos por *L. braziliensis*. Entre os compostos testados, os compostos RE21 e RE27 apresentaram um efeito significativo, sendo capazes de inibir a infecção em mais de 25%.

Palavras-chave: Leishmaniose. Inibidor de HDAC. Eugenol.

ABSTRACT

PEREIRA, Larissa Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2021. **Evaluation of the leishmanicidal effect of new HDAC inhibitors and Eugenol derivatives on *Leishmania braziliensis***. Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniasis are vector-borne parasitic diseases caused by pathogenic *Leishmania* species that are part of the group of neglected infectious diseases. Treatment for different types of leishmaniasis in humans mainly depends on chemotherapy. Chemotherapy treatment is compromised by the high cost, high toxicity and development of parasite resistance, which has led to the need to develop new therapies. In this work, phenotypic tests were performed to search for leishmanicidal action against *Leishmania braziliensis*, the causative agent of integumentary leishmaniasis. The first chapter is a continuation of the work developed during the International Collaborative Project funded by the European Union called A-ParaDDisE (<https://cordis.europa.eu/project/id/602080>), which aimed at the development of new drugs, based on epigenetic targets, against neglected parasitic diseases, including leishmaniasis. In this chapter, phenotypic tests were performed to search for leishmanicidal action with histone deacetylase inhibitor compounds (iHDACs) of the hydroxamic acid class. Toxicity to model host cells (Raw 264.7 macrophages) and action against intracellular amastigotes present in macrophage infection by *L. braziliensis* were evaluated. The results show that there was no significant effect in amastigotes of the compounds tested on macrophage infection by *L. braziliensis*. The second chapter of this project was developed in partnership with researcher Dr. Róbson Ricardo Teixeira, from the Federal University of Viçosa, and also aimed at discovering new compounds for the development of new drugs against leishmaniasis. Phenotypic tests were performed to search for leishmanicidal action with compounds derived from eugenol containing 1,2,3-triazole nuclei. Toxicity to model host cells (Raw 264.7 macrophages) and action against intracellular amastigotes present in macrophage infection by *L. braziliensis* were evaluated. Among the tested compounds, the compounds RE21 and RE27 showed a significant effect, being able to inhibit the infection by more than 25%.

Keywords: Leishmaniasis. HDAC inhibitor. Eugenol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	13
FIGURA 2. STATUS DA ENDEMICIDADE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNDO PARA O ANO 2016 SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.	17
FIGURA 3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	18
FIGURA 4. CICLO DE VIDA DE <i>LEISHMANIA</i> NO HOSPEDEIRO HUMANO.	19
FIGURA 5. RESPOSTA IMUNE CELULAR NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	21
FIGURA 6. APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.	22
FIGURA 7. NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CROMATINA.....	29
FIGURA 8. MODIFICAÇÕES NA CAUDA E NOS DOMÍNIOS GLOBULARES DAS HISTONAS.....	30
FIGURA 9. A CROMATINA PODE EXISTIR EM DUAS DIFERENTES FORMAS, A EUCROMATINA E A HETEROCROMATINA.....	31
FIGURA 10. ORGANIZAÇÃO DAS DIFERENTES CLASSES DE HDACs PRESENTES NOS HUMANOS.	32
FIGURA 11. ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS INIBIDORES DE HDAC.	35
FIGURA 12. EFEITOS PROVOCADOS PELOS IHDAC NA CÉLULA.	36
FIGURA 13. INIBIDORES DE HDAC DE CLASSE I/II E SIRTUÍNAS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.	37
FIGURA 14. ESTRUTURA MOLECULAR DO EUGENOL.....	62
FIGURA 15. ESTRUTURA DOS HETEROCÍCLICOS TRIAZÓIS.....	64
FIGURA 16. ESTRUTURA GERAL DOS COMPOSTOS ALVOS DE ESTUDO DESTE TRABALHO.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM COMPARAÇÃO COM A ANFOTERICINA B APÓS 48 HORAS..	48
GRÁFICO 2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM COMPARAÇÃO COM A ANFOTERICINA B APÓS 48 HORAS.	49
GRÁFICO 3 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM COMPARAÇÃO COM A ANFOTERICINA B APÓS 48 HORAS.	50
GRÁFICO 4 EFEITO DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP APÓS 48 HORAS.....	52
GRÁFICO 5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM COMPARAÇÃO COM A ANFOTERICINA B APÓS 48 HORAS.	70
GRÁFICO 6 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM COMPARAÇÃO COM A ANFOTERICINA B APÓS 48 HORAS..	71
GRÁFICO 7 EFEITO DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP APÓS 48 HORAS.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 QUIMIOTERÁPICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES, SEU MODO DE AÇÃO ESPECÍFICO E EFEITOS ADVERSOS.	24
TABELA 2 ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS E SUA EFICÁCIA EM AMASTIGOTAS APÓS 48 HORAS.	74
TABELA 3 EC ₅₀ E CC ₅₀ DOS COMPOSTOS RE SELECIONADOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE L. BRAZILIENSIS E MACRÓFAGOS.	75

LISTA DE SIGLAS E ABRIVIATURAS

A-ParaDDisE – Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics

BNIP - Bisnaftalimidopropil

CC50 – Concentração Citolóxica em 50%

DCs – Células Dendríticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

EC₅₀ – Concentração Efetiva em 50%

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FAD – Flavina adenina nucleotídeo

FDA – Food and Drug Administration

HATs – Histonas acetilases

HDACs – Histonas deacetilases

HDMs – Histonas demetilases

HMEs – Enzimas modificadoras de histonas

HMTs – Histonas metiltransferases

iHDAC – Inibidores de HDAC

IL-12 – Interleucina-12

IFN- γ – Interferon gama

IS – Índice de seletividade

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LSD1 – Amino-oxidases dependentes de FAD

NK Cell – Célula Natural Killer

PCR – Polymerase Chain Reaction

PRMT's – Proteínas argininas metiltransferases

PTMs – Modificações pós-traducionais

SAHA – Ácido hidroxâmico suberoilánilida

TSA – Tricostatina A

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	16
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE NOVOS INIBIDORES DE HDAC EM <i>LEISHMANIA</i>	
<i>BRAZILIENSIS</i>	28
1. HISTONAS DEACETILASES	28
1.1 EPIGENÉTICA E HDACS	28
1.2 ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTI-PARASITÁRIAS	33
1.3 INIBIDORES DE HDAC	35
1.4 O CONSÓRCIO DE PESQUISA A-PARADDISE (ANTI-PARASITIC DRUG DISCOVERY IN EPIGENETICS)	38
2. OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 CEPA M2904-GFP DE <i>L. BRAZILIENSIS</i>	41
3.2 LINHAGEM DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	41
3.3 MANUTENÇÃO DOS PARASITOS <i>IN VITRO</i>	41
3.4 OBTENÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP	42
3.5 MANUTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS RAW.264.7	42
3.6 INIBIDORES DE HDACS.....	43
3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS PARA MACRÓFAGOS.....	43
3.8 TESTES COM OS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW. 264.7	44
3.9 ENSAIO DE INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP	44
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 EFEITO DOS COMPOSTOS IHDACS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7	47
4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M294-GFP EM INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS	
51	
5. CONCLUSÕES	54
6. PERSPECTIVAS	55
7. REFERÊNCIAS	56

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO EUGENOL EM LEISHMANIA

BRAZILIENSIS	61
1. EUGENOL.....	61
1.1 OBTENÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS A PARTIR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	61
1.2 EUGENOL – COMPOSTO NATURAL PRESENTE EM ÓLEOS ESSENCIAIS.....	62
1.3 EUGENOL COMO ALVO PARA DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS LEISHMANICIDAS.....	63
1.4 DERIVADOS DO EUGENOL CONTENDO NÚCLEO 1,2,3-TRIAZOL.....	63
2. OBJETIVOS.....	66
2.1 OBJETIVO GERAL	66
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1 CEPA M2904-GFP DE <i>L. BRAZILIENSIS</i>	67
3.2 LINHAGEM DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	67
3.3 MANUTENÇÃO DOS PARASITOS <i>IN VITRO</i>	67
3.4 OBTENÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP.....	67
3.5 MANUTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS RAW.264.7	67
3.6 COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL.....	67
3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS PARA MACRÓFAGOS.....	68
3.8 TESTES COM OS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS RAW. 264.7	68
3.9 ENSAIO DE INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. BRAZILIENSIS</i> M2904-GFP	68
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL EM MACRÓFAGOS RAW 264.7	69
4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> M294-GFP EM INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	72
4.3 ENSAIO DE TOXICIDADE EM AMASTIGOTAS DE <i>L. BRASILIENSIS</i> M2904-GFP PARA DETERMINAÇÃO DE EC ₅₀ E CC ₅₀	75
5. CONCLUSÕES.....	77
6. PERSPECTIVAS	78
7. REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são doenças parasitárias de transmissão vetorial, causadas por espécies patogênicas de *Leishmania* que integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas. Geralmente, ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais suscetíveis e com difícil acesso aos serviços de saúde. Manifestam uma vasta distribuição global e a maioria dos casos ocorre na África, Ásia e Américas (WHO/PAHO, 2019).

Atualmente, são conhecidas 54 espécies de *Leishmania* e as leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies (AKHOUND et al., 2017). A FIGURA 1 ilustra a classificação das diferentes espécies de *Leishmania* e destaca aquelas que causam as leishmanioses.

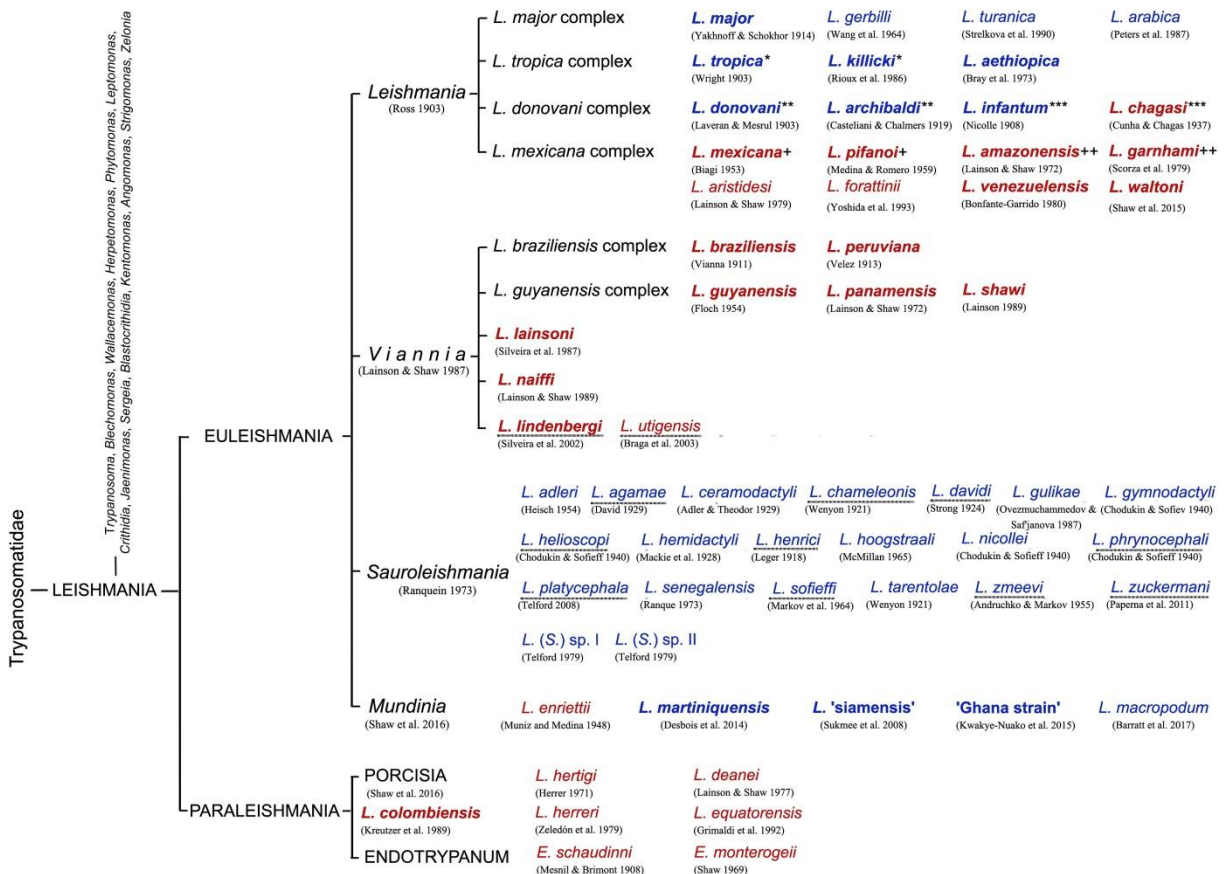


Figura 1. Classificação das espécies de *Leishmania*. (*,+): sinônimos, a quantidade de * + significa que o nome das espécies é sinônimo à espécie original. As espécies patogênicas em humanos estão em negrito. As espécies do Velho e do Novo mundo estão em azul e vermelho, respectivamente (AKHOUND et al., 2017).

Esses protozoários parasitos são transmitidos aos seres humanos pela picada de flebotomíneos fêmea dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* infectados durante o repasto

sanguíneo (WHO, 2019; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015). *Leishmania*, em sua forma promastigota flagelada, ao ser inoculada no hospedeiro vertebrado, é fagocitada por células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos. Dentro dos macrófagos, as formas promastigota se transformam na forma amastigota (arredondada sem flagelo externo), que então se multiplica por fissão binária até o rompimento da célula hospedeira, podendo, assim, infectar outras células fagocitárias. O macrófago é a principal célula infectada por *Leishmania*. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo se alimenta novamente ingerindo as formas amastigotas livres ou células infectadas (GOTO & LINDOSO, 2010; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015).

As leishmanioses são caracterizadas por diferentes manifestações clínicas, definidas pela localização do parasito nos tecidos infectados (ALVAR et al., 2012). A apresentação clínica da doença depende do tipo de vetor flebotomíneo, do histórico genético do hospedeiro, bem como da virulência e patogenicidade da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (AKHOUND et al., 2017).

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum de leishmaniose, sendo caracterizada por lesões na pele, predominantemente úlceras com bordas endurecidas e erosão central (KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015). Em 2017, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2019).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais severa de leishmaniose, que se não diagnosticada e tratada, pode ser letal em 95% dos casos. Os principais sintomas clínicos da leishmaniose visceral são: febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia e perda de peso (ZIJLSTRA et al., 2003; WHO, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019), o maior número de casos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, África Oriental e no Sudeste Asiático. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas 25 a 45% são informados à OMS. Em 2017, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose visceral relatados à OMS ocorreram em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

O diagnóstico parasitológico, em que formas amastigotas podem ser identificadas em esfregaços de tecidos de linfonodos, medula óssea, baço e em feridas é o padrão-ouro no diagnóstico da leishmaniose (SRIVASTAVA et al., 2011; BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). Vários ensaios imunológicos como Teste de Montenegro e ensaios sorológicos podem

ser utilizados como métodos alternativos ou complementares no diagnóstico da doença, incluindo teste de aglutinação direta, técnica de ensaio imunoenzimático “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA), imunofluorescência e “western blot” (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). Para o diagnóstico etiológico da doença, abordagens moleculares, como a amplificação do material genético por Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), são utilizadas, porém, são restritas a grandes laboratórios e centros de pesquisa, devido à sua maior complexidade e ao seu custo elevado (GOTO & LINDOSO, 2010).

O tratamento para os diferentes tipos de leishmaniose em humanos depende principalmente de quimioterapia, visto que não há uma vacina licenciada contra a doença e os programas de controle contra o vetor flebotomíneo não são devidamente colocados em prática. Os antimoniais pentavalentes são a primeira linha de tratamento contra a leishmaniose, todavia, quando se tornam ineficazes devido à resistência do parasito, podem ser substituídos pela Anfotericina B ou outros medicamentos. A pentamidina, a paramomicina e o alopurinol também são utilizados como forma alternativa no tratamento. No entanto, o tratamento quimioterápico é comprometido pelo alto custo, toxicidade elevada dos quimioterápicos e desenvolvimento de resistência do parasito, o que tem levado à necessidade de desenvolvimento de novas terapias (KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015; GILLESPIE et al., 2016; BALAÑA-FOUCE et al., 2019).

O primeiro capítulo deste projeto é continuidade dos trabalhos desenvolvidos em parceria com o pesquisador Dr. Wolfgang Sippl, da Martin Luther Universitt Halle, Alemanha, durante o Projeto Colaborativo Internacional financiado pela União Europeia denominado A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics-<https://cordis.europa.eu/project/id/602080>), que objetivou o desenvolvimento de novos fármacos contra doenças parasitárias negligenciadas, como as leishmanioses, malária e doença de Chagas, baseando-se em alvos epigenéticos. A Universidade Federal de Viçosa (UFV), como uma das colaboradoras nacionais deste Consórcio, foi representada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto.

No capítulo 1 foram realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida com compostos do tipo inibidores de HDAC (iHDAC) da classe dos ácidos hidroxâmicos. Foram avaliadas a toxicidade para as células hospedeiras modelo (macrófagos Raw 264.7) e ação contra amastigotas intracelulares presentes na infecção dos macrófagos por *L. braziliensis*.

O segundo capítulo deste projeto foi desenvolvido em parceria com o pesquisador Dr. Róbson Ricardo Teixeira, da Universidade Federal de Viçosa, e também objetivou a descoberta de novos compostos para desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose cutânea. Foram realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida com compostos derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. Foram avaliadas a toxicidade para as células hospedeiras modelo (macrófagos Raw 264.7) e ação contra amastigotas intracelulares presentes na infecção dos macrófagos por *L. braziliensis*.

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar abrange a forma cutânea, cutânea disseminada, mucocutânea e cutânea difusa de leishmaniose, causada por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania* do Velho e Novo Mundo. A Leishmaniose Cutânea é a forma mais comum da doença, endêmica nas Américas do Sul e Central, norte da África, Oriente Médio e países da Ásia. (ALVAR et al, 2012; GOTO & LINDOSO, 2012; SCOTT & NOVAIS, 2016; WHO, 2019).

Em 2017, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2019). Na FIGURA 2, está representado o status da endemicidade da Leishmaniose Cutânea em todo o mundo no ano de 2016 de acordo com a organização mundial da saúde.

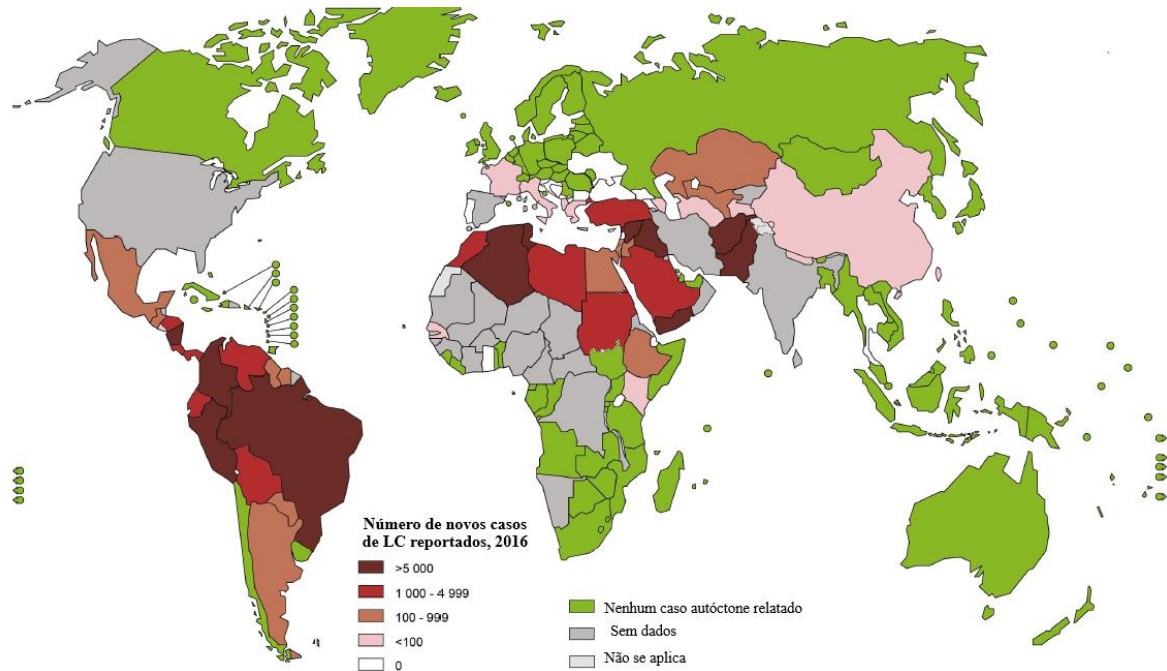


Figura 2. Status da endemicidade da Leishmaniose Tegumentar no mundo para o ano 2016 segundo a Organização Mundial da Saúde. Cada cor do mapa indica o número de novos casos de Leishmaniose Cutânea reportados no ano de 2016, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019).

Diversas espécies de *Leishmania* causam as leishmanioses. Embora essas diferentes espécies sejam divididas por causarem leishmaniose cutânea ou leishmaniose visceral, uma avaliação crítica de diversos estudos revela que essa subdivisão é ineficaz, uma vez que existem espécies associadas a ambos (AKHOUND et al., 2017). Na FIGURA 3 são apresentadas diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral.

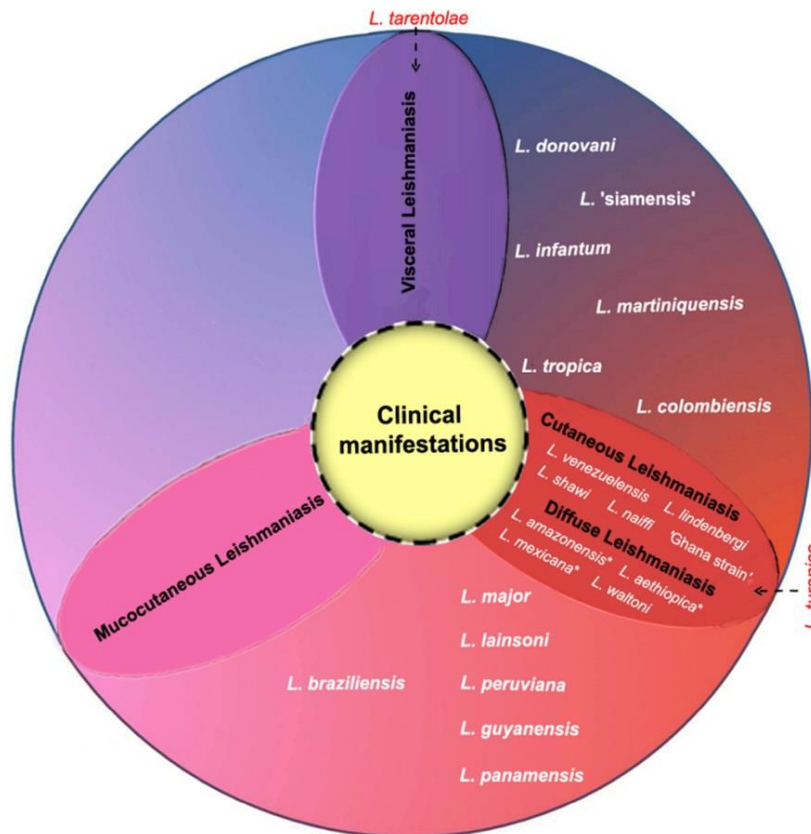


Figura 3. Manifestações clínicas de diferentes espécies de *Leishmania*. *: espécies específicas de *Leishmania* causadores da leishmaniose difusa. A gama de cores demonstra a proximidade relativa das espécies de *Leishmania* a cada manifestação clínica com base na frequência de casos clínicos da doença (AKHOUND et al., 2017).

Cada espécie de *Leishmania* possui características específicas. No entanto, as diferentes espécies compartilham um ciclo de vida semelhante que inclui a participação de diferentes formas evolutivas do parasito e dois hospedeiros (um invertebrado e outro vertebrado). O ciclo de vida está mostrado na FIGURA 4. Inicialmente, *Leishmania* em sua forma promastigota metacíclica presente no hospedeiro invertebrado é inoculada no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Uma vez inoculados, os parasitos são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário (principalmente macrófagos). Na célula hospedeira, o promastigota se transforma na forma amastigota, que então se multiplica por fissão binária e passa a infectar outras células após o rompimento do macrófago. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo se alimenta novamente ingerindo as formas amastigotas, que se transformam novamente na forma promastigota no intestino do flebotomíneo. As formas promastigotas metacíclicas migram para as glândulas salivares da probóscide do flebotomíneo que em um subsequente repasto sanguíneo iniciará um novo ciclo (GOTO & LINDOSO, 2010; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015).

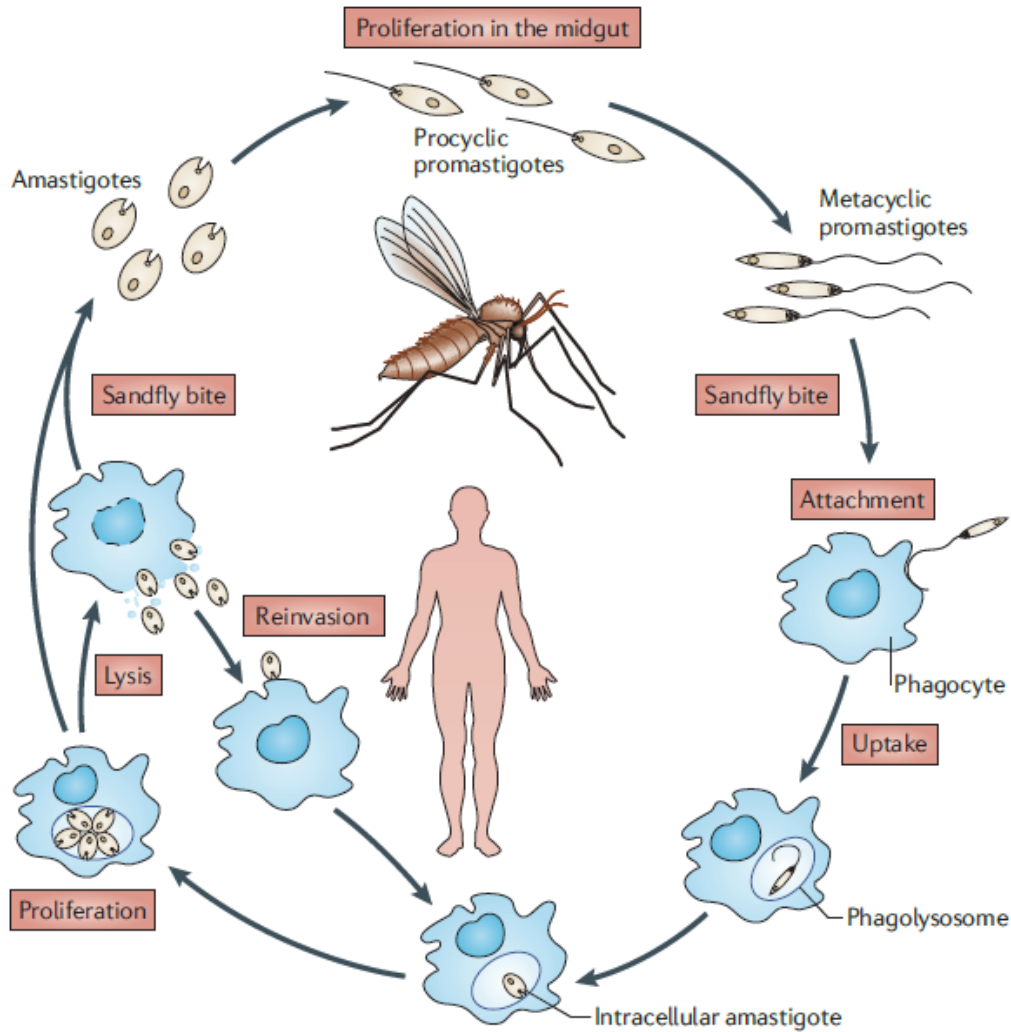


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* no hospedeiro humano. Promastigotas procíclicas de *Leishmania* diferenciam em promastigotas metacíclicas infecciosas nos flebotomíneos. Durante o repasto sanguíneo as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado e fagocitadas por células do sistema imune. Depois de estabelecer uma residência intracelular, as formas promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas aflagelados que irão se proliferar e infectar outras células (KAYE & SCOTT, 2011).

Após a infecção de *Leishmania*, diversas vias podem contribuir para a gravidade da Leishmaniose Tegumentar Americana, e a resposta imune do hospedeiro é essencial para a eliminação dos parasitos. Embora os macrófagos sejam as principais células fagocitárias do parasito no hospedeiro, monócitos, células dendríticas e neutrófilos também são recrutados na infecção e possuem papéis distintos na resposta imune. Os dois principais mecanismos da resposta imune inata do hospedeiro, responsáveis pelo controle dos parasitos, são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a fagocitose e a produção do óxido nítrico pelo NO-sintase (iNOS) após a ativação da célula fagocitária por interferon gama (IFN- γ) (SCOTT & NOVAIS, 2016).

O início da resposta imune determina se a infecção vai desenvolver manifestação clínica crônica ou cura espontânea. Experimentos utilizando camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major* (causadora de Leishmaniose Cutânea no Velho Mundo) demonstraram lesões com cura espontânea e resposta imune T_h1. Enquanto camundongos BALB/c, também infectados com *L. (L.) major* se mostraram suscetíveis à infecção com resposta imune T_h2 (SCOTT et al., 1988; HEINZEL et al., 1989).

As células dendríticas (DCs) iniciam a resposta imune específica, e são as principais fontes de interleucina-12 (IL-12), que, ao interagir com as células T imaturas (T_h0) fazem com que essas se diferenciam em células T CD4+, que por sua vez, vão se diferenciar em linfócitos T helper (T_h1) e produzir IFN- γ , citocina que estimulará as células infectadas, tanto células dendríticas quanto macrófagos, a eliminar os parasitos e também a promover o desenvolvimento de mais T_h1. Linfócitos T CD8+ também são capazes de moldar a resposta imune adaptativa, uma vez que eles podem reconhecer antígenos de *Leishmania*, se ativar e produzir IFN- γ . O controle desse processo de resposta celular é mediado pela liberação de interleucina-10 (IL-10), que pode ser produzida por diferentes tipos celulares, como linfócitos T reguladores (TReg), linfócitos T CD8+, células natural killer, células B, macrófagos e DCs (FIGURA 5) (KAYE & SCOTT, 2011; SCOTT & NOVAIS, 2016).

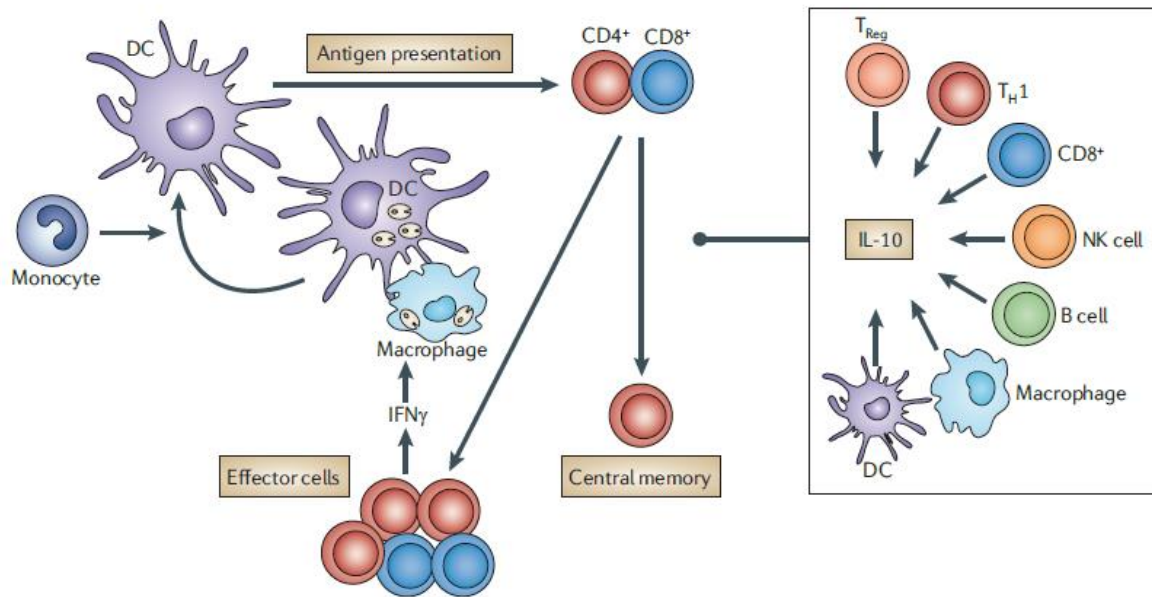


Figura 5. Resposta imune celular na infecção por *Leishmania*. Uma vez que houve a infecção do hospedeiro por *Leishmania*, os monócitos se infiltram no local da infecção e se diferenciam em células dendríticas (DCs), células fundamentais no processo de ativação dos linfócitos T CD4+. Os linfócitos T CD4+, ao serem ativados pelas, se diferenciam em linfócitos T helper (Th1) e produzem interferon- γ (IFN- γ), citocina que estimulará as células infectadas, tanto células dendríticas quanto macrófagos, a eliminar os parasitas e também a promover o desenvolvimento de mais Th1. Algumas células T CD4+ falham em se tornar células Th1, e então adotam o fenótipo de células T de memória central. Linfócitos T CD8+ também são capazes de reconhecer antígenos de *Leishmania*, se ativar e produzir IFN- γ . O controle desse processo de resposta celular é mediado pela ação da interleucina 10 (IL-10), que pode ser produzida por diferentes tipos celulares (à direita), como linfócitos T reguladores (T_{Reg}), Th1, linfócitos T CD8+, células natural killer (NK), células B, e os próprios macrófagos e DCs. (KAYE & SCOTT, 2011).

Uma vez estabelecida à infecção, as manifestações clínicas de Leishmaniose Tegumentar podem ocorrer de forma localizada, disseminada, recidiva cútis, difusa e também pode haver acometimento de mucosas, principalmente do nariz, boca e garganta, juntamente com o acometimento cutâneo. A Leishmaniose Cutânea localizada é caracterizada por lesões que se desenvolvem durante semanas ou meses após a picada do flebotomíneo. A lesão é geralmente do tipo úlcera indolor, exceto se houver infecção bacteriana e comprometimento das articulações, com tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. A Leishmaniose Cutânea disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares que acometem vários segmentos corporais, devido a uma provável disseminação do parasito por via hemática ou via linfática. A Leishmaniose Cutânea Recidiva é caracterizada por ativação da lesão nas bordas, após a cicatrização de lesão anterior. A resposta terapêutica costuma ser inferior à lesão primária. A forma difusa da Leishmaniose Cutânea é caracterizada por várias pápulas ou nódulos não ulcerados. Geralmente ocorre em pacientes

com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. A Leishmaniose Mucocutânea é caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato e é causada por uma forte resposta imunopatológica. Esta é potencialmente fatal e pode levar à desfiguração permanente (BRASIL, 2017; BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). Na FIGURA 6 é possível ver algumas manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar anteriormente descrita.

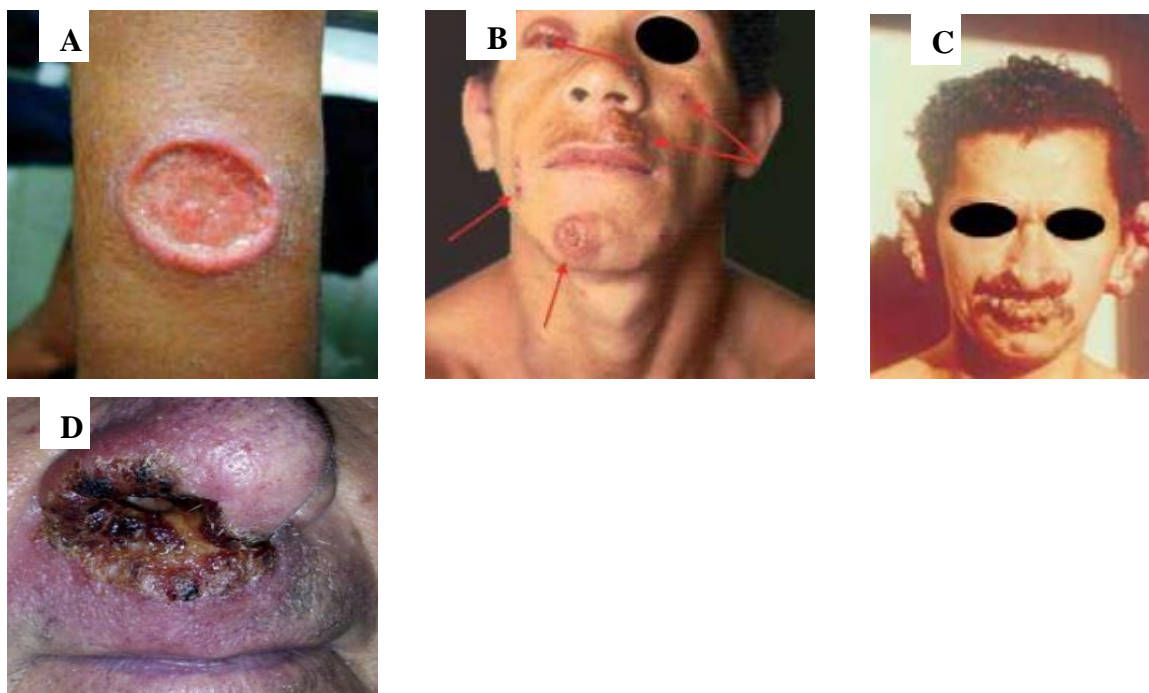


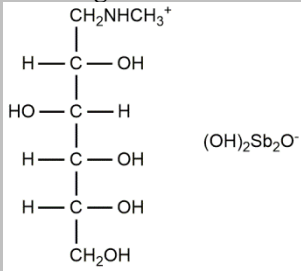
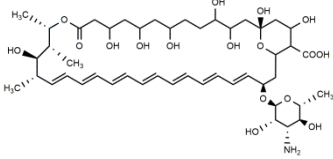
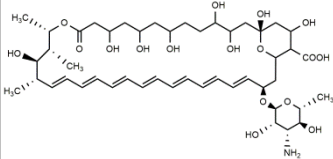
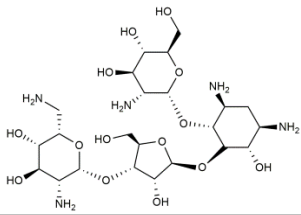
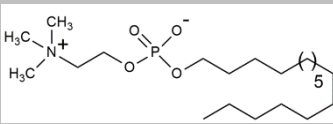
Figura 6. Apresentações clínicas da Leishmaniose Tegumentar. A. Leishmaniose Cutânea Localizada. **B.** Leishmaniose Cutânea Disseminada. **C.** Leishmaniose Cutânea Difusa. **D.** Leishmaniose Mucocutânea (BRASIL, 2017; BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018).

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar baseia-se em testes clínicos, laboratoriais e dados epidemiológicos. O diagnóstico dessa doença pode ser desafiador, dado que as lesões cutâneas podem ser confundidas com outras doenças infecciosas. Por isso, o diagnóstico parasitológico, em que formas amastigotas podem ser identificadas em esfregaços da ferida é o padrão-ouro. Entretanto, essa técnica deve ser combinada com outros métodos, que incluem testes sorológicos, análise de isoenzimas, análise de anticorpos monoclonais e PCR (Polymerase Chain Reaction) (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018).

A terapia medicamentosa para Leishmaniose Tegumentar não mudou muito desde o início do século XX, quando começou a ser utilizada. Todavia, o conhecimento sobre a resposta aos medicamentos entre as diversas espécies de *Leishmania* têm aumentado

significativamente. Os Antimoniais Pentavalentes têm sido as drogas de primeira linha para o tratamento da doença a partir da década de 1940. No entanto, sua toxicidade potencial e as crescentes taxas de resistência observadas na Europa, Ásia e América do Sul nas últimas duas décadas levaram ao uso de medicamentos alternativos, como a Anfotericina B e seus derivados lipossômicos. Outros medicamentos também são utilizados como forma alternativa de tratamento, como a pentamidina, a paramomicina e o alopurinol. Porém, a alta toxicidade, a resistência dos parasitos e o alto custo das terapias atuais levam à urgência pela busca por novas drogas para o tratamento das leishmanioses (GOTO & LINDOSO, 2010; GILLESPIE et al., 2016; BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). Na TABELA 1 estão apresentados os fármacos atualmente utilizados no tratamento das leishmanioses.

Tabela 1 Quimioterápicos utilizados no tratamento das Leishmanioses, seu modo de ação específico e efeitos adversos.

Medicamento	Modo de administração	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
<p>Antimoniato de N-metil glucamina</p>  <p>The structure shows a central antimony atom (Sb) coordinated to two hydroxyl groups (OH) and two N-methylglucamine anions. The N-methylglucamine anion is a six-carbon chain with hydroxyl groups at C2, C3, and C6, and a methylammonium group (CH₂NHCH₃⁺) at C1. The antimony atom is coordinated to the oxygen of the hydroxyl group at C6 and the oxygen of the hydroxyl group at C2 of the glucamine moiety.</p>	Endovenosa ou intramuscular	Influenciam a bioenergética das formas amastigotas de <i>Leishmania</i> . Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP	Artralgia, mialgia, inapetência, náusea, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, dor abdominal, dor no local da aplicação, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda
<p>Desoxicolato de anfotericina B</p>  <p>The structure shows a complex polyene macrolide with a long chain of conjugated double bonds, multiple hydroxyl groups, and a desoxy sugar moiety at the end.</p>	Intravenosa	O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade <i>in vitro</i> na destruição de <i>Leishmania</i> intra e extracelular. Age se ligando ao ergosterol da membrana do parasito, levando à formação de poros e consequente lise celular.	Altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite, cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, alterações cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca, alterações pulmonares, como desconforto respiratório, dispneia e cianose, complicações renais
<p>Ambiose (formulação lipídica da anfotericina B)</p>  <p>The structure is identical to the desoxylated form of amphotericin B, showing the characteristic polyene chain and sugar moieties.</p>	Infusão Venosa	A anfotericina B é incorporada no interior de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações.	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar
<p>Paromomicina</p>  <p>The structure shows a complex oligosaccharide with multiple amino groups and hydroxyl groups, characteristic of aminoglycosides.</p>	Intramuscular	Liga-se à subunidade 30S dos ribossomos, interferem com a iniciação da síntese de proteínas através da fixação do complexo ribossômico 30S-50S no códon de iniciação do mRNA, o que leva à acumulação de complexo de iniciação anormal.	Ototoxicidade e problemas na função hepática
<p>Miltefosina</p>  <p>The structure shows a phosphonium salt with a long alkyl chain and a methylammonium group.</p>	Oral	Principal modo de ação é incerto; apoptose postulada e inibição da citocromo C oxidase	Teratogenicidade

Adaptado de Rajasekaran & Chen, 2015; Souza, 2016.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol Aspects Med.** Oct; 57:1-29. Epub 2017. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159546>>. Acesso em: 03 out 2019.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n.5, p. e35671, 2012. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>>. Acesso em 04 dez 2019.
- BALANÑA-FOUCE R. et al. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today.* 2019 May;24(5):1209-1216. Disponível em: <
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30876846/>>. Acesso em: 04 dez 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il. Disponível em:
<https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 04 abr 2020.
- BURZA, S., CROFT, S. L., & BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet.** (2018). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126638>>. Acesso em: 04 dez 2019.
- GILLESPIE, P.M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine.** 2016 Jun 3;34(26):2992-2995. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26973063>>. Acesso em: 03 out 2019.
- GOTO, H.; LINDOSO, L.J.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 26, n.2, p. 293-307, 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632640>> . Acesso em: 03 jan 2019.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.** 169, 59–72 (1989). Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2521244?dopt=Abstract>>. Acesso em: 12 abr 2020.

KAYE, P.; SCOT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, v. 9, n.8, p. 604-15, 2011. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747391>>. Acesso em: 12 abr 2020.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World *Leishmania* Infections. A Practical Review. **Dermatol Clin.**, v.33, n.3, p. 579-93, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143433>> . Acesso em: 03 out 2019.

SCOTT, P. et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.** 168, 1675–1684 (1988). Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903212?dopt=Abstract>>. Acesso em: 12 abr 2020.

SCOTT, P., & NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27424773>>. Acesso em 04 dez 2019.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 2011;105(1):1–6. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2999003/>>. Acesso em: 03 out 2019.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 14 March 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 03 out 2019.

WHO/PAHO Department of Neglected Infectious Diseases. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7 - 2019, March. Disponível em:

<https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_paho_era7/en/>. Acesso em: 03 out 2019.

ZIJLSTRA, E.E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** 2003 Feb;3(2):87-98. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560194>>. Acesso em: 03 out 2019.

CAPÍTULO 1 - Avaliação do efeito leishmanicida de novos inibidores de HDAC em *Leishmania braziliensis*

1. HISTONAS DEACETILASES

1.1 Epigenética e HDACs

O material genético das células eucarióticas é constituído pela cromatina, cuja estrutura controla fundamentalmente todos os processos nucleares que envolvem o DNA. A unidade estrutural básica da cromatina é o nucleossomo, um complexo de DNA-proteína associados por histonas de ligação (H1). Cada partícula do cerne nucleossômico individual consiste em um complexo de oito proteínas histonas, duas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 em torno das quais se ligam aproximadamente 147 pb de DNA (FYODOROV et al., 2018).

Os nucleossomos são o primeiro grau de compactação da cromatina, fibras de 10 nm, que se tornam ainda mais compactas à medida que os nucleossomos se organizam de forma regular e constituem fibras de 30 nm. O alto grau de compactação do material genético e a forte ligação com as histonas reduzem a acessibilidade ao material genético, levando à inibição da transcrição, replicação e reparo do DNA. Sendo assim, é importante que a estabilidade, a posição e o grau de compactação da cromatina sejam finamente regulados, a fim de permitir que o DNA, os processos que dependem da estrutura da cromatina, como replicação, transcrição e herança genéticas sejam realizadas de forma adequada ao contexto celular. O grau em que a cromatina é organizada e compactada depende de vários fatores, dentre os quais estão à ação da histona H1, variantes de histonas que podem ser substituídas por histonas canônicas no interior do núcleo, remodeladores de cromatina e modificações químicas nas histonas e DNA (KORNBERG & LORCH, 1999; ROTHBART & STRAHL, 2014; FYODOROV et al., 2018). A FIGURA 7 mostra os níveis de organização estrutural da cromatina.

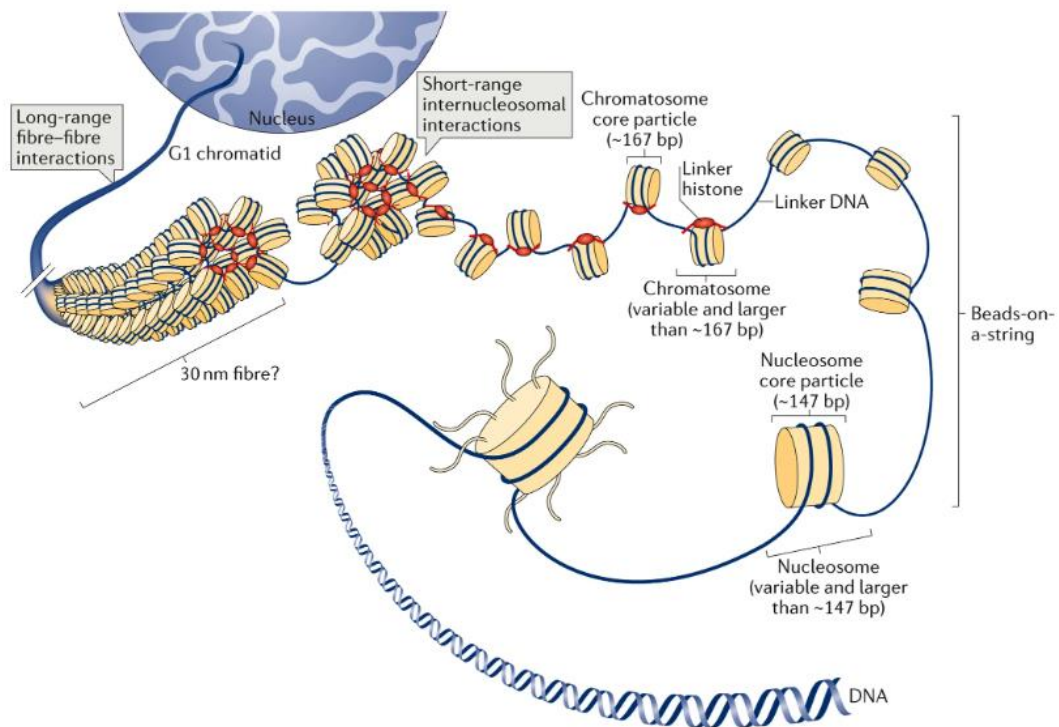


Figura 7. Níveis de organização estrutural da cromatina. A compactação de DNA ocorre por meio de uma hierarquia de interações dependentes de histonas, incluindo a formação da partícula do nucleossomo, cadeias de nucleossomos, fibras de 30 nm e a associação de fibras individuais, que eventualmente produz estruturas terciárias (FYODOROV et al., 2018).

Um dos principais mecanismos de regulação da estrutura e função da cromatina são as Modificações pós-traducionais (PTMs) que ocorrem na cauda N-terminal das histonas. Essas modificações regulam a interação das histonas com o DNA e com outras proteínas e causam o remodelamento da cromatina tornando-a mais ou menos compacta, o que influencia em processos como a transcrição gênica. Além disso, os domínios globulares das histonas, responsáveis pela interação histona-histona e histona-DNA também são alvos de PTMs (TROPBERGER & SCHNEIDER, 2013). A FIGURA 8 ilustra modificações na cauda e no domínio globular das histonas.

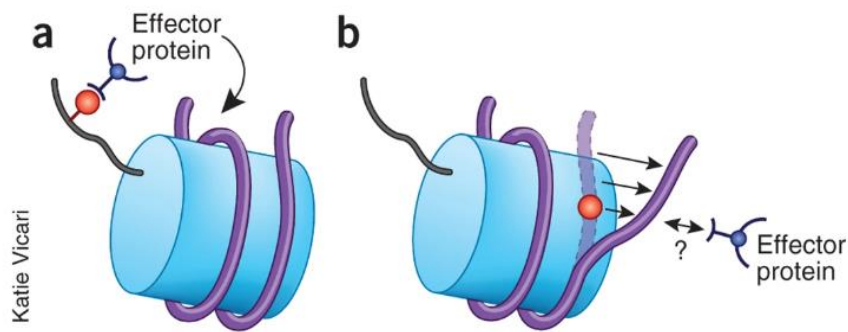


Figura 8. Modificações na cauda e nos domínios globulares das histonas. **A.** As caudas das histonas (preto) se projetam do cerne nucleossômico formado pelo domínio globular das histonas (azul) em torno do qual o DNA (roxo) é envolvido. Modificações pós-traducionais (círculos vermelhos) na cauda das histonas são facilmente acessíveis e reconhecidas pelas chamadas proteínas efetoras. Essas proteínas efetoras recrutadas por essas modificações regulam a função da cromatina. **B.** Modificações no domínio globular das histonas, especialmente nos resíduos da superfície lateral do octâmero de histonas ao redor do qual o DNA é envolvido, podem influenciar diretamente as interações histona-DNA e a dinâmica dos nucleossomos, mesmo na ausência de potenciais proteínas de ligação (TROPBERGER & SCHNEIDER, 2013).

As PTMs nas caudas das histonas constituem um tipo de modificação epigenética, pois não dependem de mudanças na sequência primária do DNA, mas envolve mudanças estruturais na cromatina, que são essenciais nos processos de ativação e silenciamento gênico. O remodelamento da cromatina pode ser o principal mecanismo molecular da epigenética (BIRD, 2017). O termo “código de histonas”, proposto por Strahl e Allis em 2000, está diretamente relacionado com as PTMs, e sugere que essas modificações podem ocorrer de forma isolada ou em múltiplas combinações e em um mesmo período de tempo, determinando uma modificação estrutural na cromatina (STRAHL & ALLIS, 2000).

Diversas PTMs podem ocorrer, como acetilação, metilação, fosforilação, entre muitas outras, sendo as enzimas modificadoras de histonas (HMEs) as responsáveis por catalisar essas PTMs. As proteínas histonas são ricas em resíduos de aminoácidos lisina e arginina, que podem ser alteradas por diversos modificadores de cromatina. Uma das PTMs mais bem caracterizada nas histonas é a acetilação. A acetilação de lisina é catalisada pelas Histonas Acetil transferases (HATs). Essas enzimas convertem a carga positiva das cadeias laterais da lisina em neutra, o que diminui a interação das histonas com o DNA (que tem carga negativa devido aos fosfatos), tornando-o mais acessível aos fatores de transcrição. A acetilação pode ser revertida pela atividade das Histonas Deacetilases (HDACs) que são repressoras da transcrição (TROPBERGER & SCHNEIDER, 2013).

Funcionalmente, a hiperacetilação de lisinas está relacionada com a estrutura descondensada da cromatina (eucromatina), e a hipoacetilação está relacionada com a

estrutura condensada da cromatina (heterocromatina), a FIGURA 9 ilustra esse conceito (TURNER, 2000; AZAD et al., 2018).

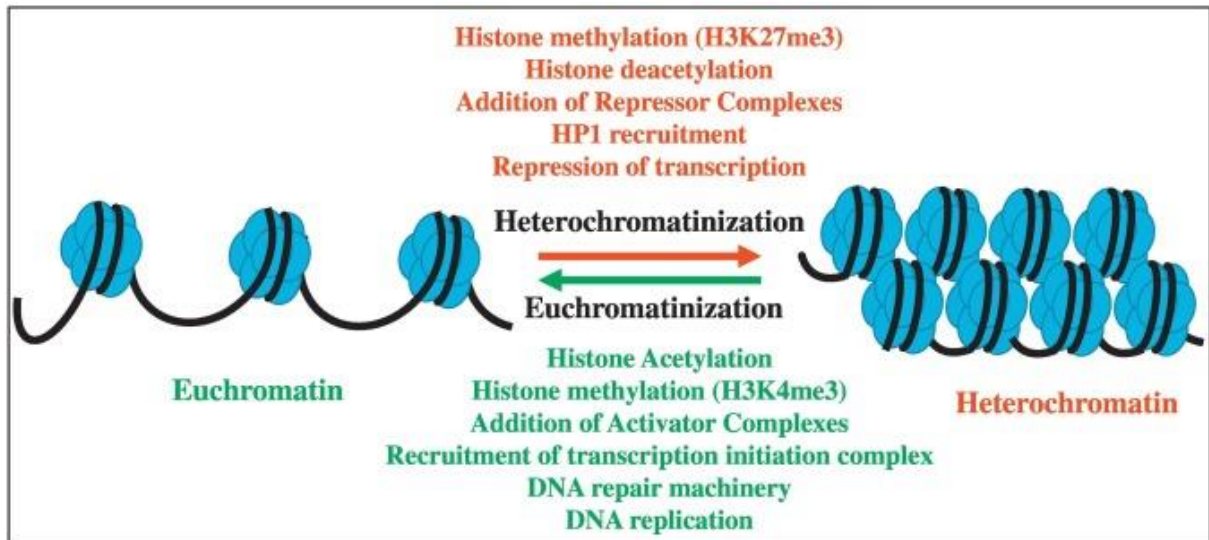


Figura 9. A cromatina pode existir em duas diferentes formas, a eucromatina e a heterocromatina. A ação das enzimas modificadoras de histonas regula e mantém o equilíbrio entre as duas formas nos diferentes tipos de células. Em vermelho destacam-se proteínas e eventos relacionados à formação de heterocromatina e em verde à formação de eucromatina (AZAD et al., 2018).

A localização das HATs dentro das células se divide em duas classes, o tipo A e o tipo B e essas são classificadas em distintas famílias de acordo com as sequências conservadas no domínio HAT (NAWAZ et al., 2020). As HATs do tipo A localizam-se no núcleo e compartilham similaridade funcional devido à catálise de processos transcripcionais. As HATs do tipo B localizam-se no citoplasma e são responsáveis pela adição do grupo acetil às proteínas histonas recém-sintetizadas. Além das histonas, a acetilação também pode se estender a outras proteínas nucleares e mesmo a proteínas citoplasmáticas, regulando diversos processos como ciclo celular, tráfico de vesículas e organização do citoesqueleto (LEE & WORKMAN, 2007; WANG et al., 2008; NAWAZ et al., 2020).

Em humanos, existem 18 enzimas HDACs agrupadas em quatro diferentes classes (I, II, III e IV) segundo a dependência de um mesmo cofator para a atividade catalítica, que pode ser o Zn^{2+} (classe I, II e IV) ou NAD^+ (classe III), e segundo a similaridade com proteínas de leveduras (SETO & YOSHIDA, 2014). As HDACs de Classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), possuem similaridade em sua sequência com a proteína Rpd3 de levedura. As HDACs de Classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10) possuem similaridade com a proteína Hda1 de levedura. As proteínas HDACs de Classe III (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7) possuem similaridade em sua sequência com

a proteína Sir2 de levedura. A HDAC de Classe IV (HDAC11) possui semelhança de sequência com as proteínas Classe I e II e é separada em uma classe diferente. A FIGURA 9 representa as diferentes classes de HDACs de humanos (SETO & YOSHIDA, 2014).

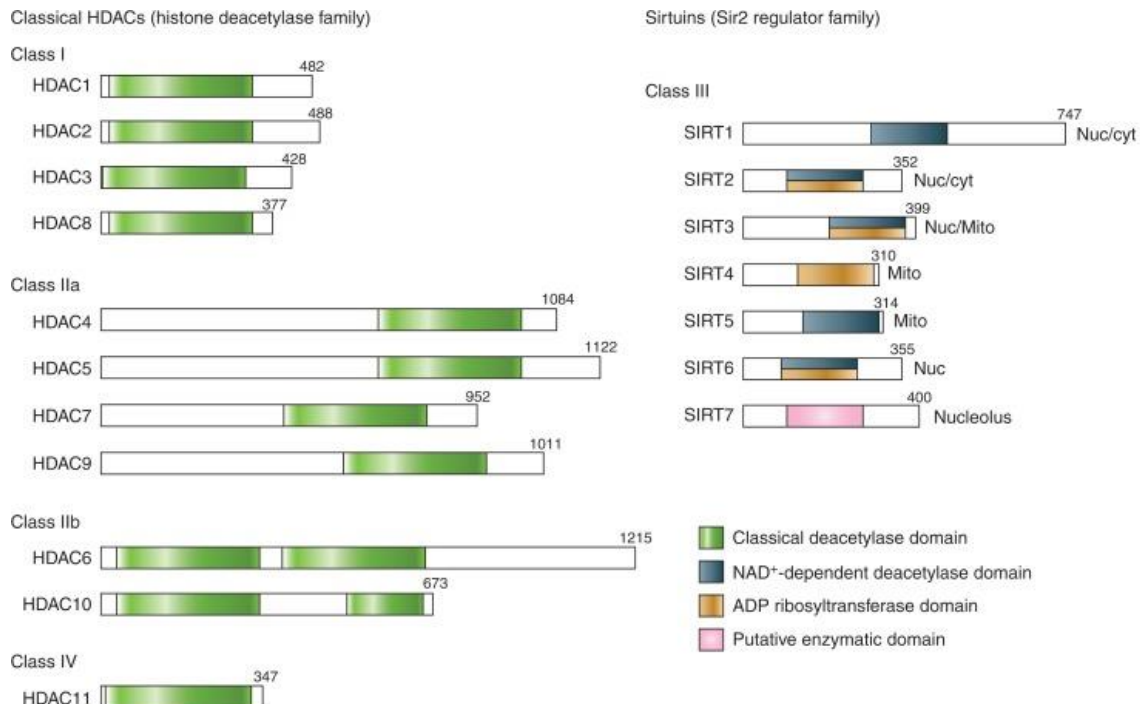


Figura 10. Organização das diferentes classes de HDACs presentes nos humanos. O número total de resíduos de aminoácidos em cada HDAC é mostrado à direita de cada proteína. Muitos HDACs têm várias isoformas, mas apenas a isoforma mais longa é mostrada. Os domínios enzimáticos estão demonstrados em diferentes cores (SETO & YOSHIDA, 2014).

HDACs de parasitos patógenos humanos importantes para a saúde pública como *Plasmodium falciparum* e *Leishmania* já foram identificadas. Em *Plasmodium falciparum* cinco genes codificadores foram descobertos até o momento. Três desses genes codificam proteínas com homologia para HDACs de mamíferos de classe I (PfHDAC1) ou classe II (PfHDAC2 e 3), enquanto dois genes são homólogos de HDAC de classe III (PfSir2A e PfSir2B). Em *Leishmania* quatro genes codificadores de HDACs de Classe I e II e três genes codificadores de classe III foram identificados, entretanto, nenhuma das HDACs de classe I e II foi funcionalmente caracterizada, mas um homólogo demonstrou ser regulado transitoriamente durante a diferenciação promastigota-amastigota em um modelo livre de hospedeiro, indicando modificação na estrutura da cromatina e no processo de transcrição (ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012; HAILU et al., 2017).

1.2 Enzimas modificadoras de histonas como alvo para o desenvolvimento de drogas anti-parasitárias

Atualmente um grande número de ensaios clínicos está em andamento com medicamentos baseados em remodeladores epigenéticos, principalmente em estudos que procuram estratégias terapêuticas no tratamento de câncer. Isso porque já se sabe que os Inibidores de HDACs (iHDAC) inibem a proliferação celular por meio de alterações na estrutura da cromatina e na acetilação das histonas. Além disso, a apoptose pode ser induzida pelos iHDAC por meio de receptores, via mitocondrial, pela ativação de proteínas BH3 ou via regulação de produção de espécies reativas de oxigênio (NAWAZ et al., 2020). As proteínas metiltransferases surgiram também como novos importantes alvos na terapia do câncer, uma vez que a sua superexpressão ou repressão foram encontradas em leucemias, cânceres de mama, prostático e renal (ANDREOLI & DEL RIO, 2015).

Com base na participação das HMEs em diversos processos biológicos como a transcrição e repressão gênica, sabe-se que elas estão envolvidas na patogênese de muitas doenças e são altamente conservadas em eucariotos e essenciais para a sobrevivência de muitos parasitos, como comprovado por Ingram & Horn, em 2002, para *T. brucei*. Diante disso, a inibição da atividade catalítica dessas enzimas tem sido alvo de crescentes estudos para o desenvolvimento de novas drogas contra doenças relevantes para a saúde pública mundial (INGRAM & HORN, 2002; NAWAZ et al., 2020). A demonstração da eficácia desses inibidores em parasitos têm sido demonstrada principalmente para os iHDAC. Alguns exemplos serão descritos a seguir.

Em 2018, Roquis e colaboradores descreveram como a estrutura da cromatina varia de um estágio de desenvolvimento para outro em *Schistosoma*, através da modificação de histonas. Nesse contexto, a atividade da histona metiltransferase (H3K27) bloqueada com inibidores A366 e GSK343 resultou na transição obstruída do miracídio para esporocisto, indicando a importância da metilação do H3K27 para a progressão do ciclo de vida. Um estudo feito por Guidi e colaboradores (2018), com base no papel dos iHDACs avaliou o efeito das HDACs de Classe I no desenvolvimento de *S. mansoni* tratando os parasitos com diferentes concentrações dos inibidores SmI-124, SmI-148 e SmI-558. Verificou-se que os estágios larval e adulto dos parasitos foram afetados e mostrou-se produção reduzida de ovos, com diminuição da viabilidade e defeitos no sistema reprodutivo do parasita (ovário e oviduto). Outros estudos feitos 2009 por Dubois e colaboradores demonstraram que a inibição de HDACs (classes I e II) pelo inibidor Tricostatina A (TSA) resultou na mortalidade de

esquistossômulos e vermes adultos, juntamente com o aumento da atividade da caspase 3/7 e apoptose. Em conjunto, esses resultados indicam que as enzimas modificadoras de histonas são elementos necessários para o ciclo de vida do *Schistosoma*, pois sua inibição não apenas leva ao bloqueio da transformação, mas também às falhas reprodutivas e à morte de parasitos (NAWAZ et al., 2020).

Em 1996, estudos *in vitro* feitos por Darkin-Ratray e colaboradores demonstraram que a apicidina (iHDAC), é eficaz, em determinadas concentrações, contra *P. falciparum* por inibir a atividade de PfHDAC1 e causar a hiperacetilação das histonas, dessa forma, interferindo no crescimento do parasito. Em 2017, foi realizada uma análise de transcriptoma baseado em microarranjos, na qual os transcriptomas de *P. falciparum* foram tratados com TSA. Juntamente com a maturação diminuída de gametócitos, o tratamento com TSA resultou na regulação positiva dos genes atribuídos à invasão, aderência celular e exportação de proteínas. Além disso, a regulação negativa dos genes associados à transcrição e tradução demonstrou papel essencial da acetilação de histonas na preparação do parasita para a transmissão hospedeiro mamífero-hospedeiro invertebrado (NHWA et al., 2017).

Quatro genes codificantes para HDACs dependentes de zinco de classes I e II foram identificados em *L. major*, mas as enzimas ainda não foram caracterizadas funcionalmente. Entretanto, estudos de Saxena e colaboradores, em 2007, mostraram que uma possível HDAC de classe I de *L. major*, codificada pelo gene LmjF.21.0680, em testes sem a presença de uma células hospedeira, sofreram uma maior produção transitória durante a diferenciação de promastigotas em amastigotas, o que provavelmente, levaria a alteração da transcrição (SAXENA et al, 2007; ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012). Em 2008, Tavares e colaboradores mostraram que a LiSIR2RP1 (proteína 1 relacionada a SIR2) de *L. infantum* possui alta atividade de ADP-ribosiltransferase e de deacetilase dependente de NAD⁺, e que é capaz de deacetilar tubulina tanto em extratos de promastigotas quanto de amastigotas. Além disso, em 2010 o mesmo grupo de pesquisadores relataram o primeiro estudo de relação estrutura-atividade de 12 derivados do bisnaftalimidopropil (BNIP), que em estudos anteriores demonstrou atividade antileishmania *in vitro*, em relação à sua atividade contra o SIRT1 humano (hSIRT1) e a enzima parasitária Li-SIR2RP1. Eles descobriram que o BNIP diaminonano6 é um potente inibidor de Li-SIR2RP1 e inibidor competidor de NAD⁺. Esses e demais estudos tornam as HDACs possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra as leishmanioses.

1.3 Inibidores de HDAC

Os iHDAC normalmente têm como alvo HDACs de classe I e II, que compartilham um núcleo catalítico semelhante que utiliza o Zn^{2+} como cofator, mas diferem em tamanho e organização estrutural. Esses inibidores podem ser divididos em quatro principais grupos segundo a sua estrutura química: ácidos hidroxâmicos como o TSA e o SAHA, também conhecidos como Vorinostat; ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico e o ácido valpróico; tetrapeptídeos cíclicos, como a romidepsina e benzamidas, como o entinostat. Todos os iHDACs supracitados, conhecidos como inibidores clássicos de HDAC, agem ao se ligar ao zinco presente no sítio catalítico da enzima, inibindo dessa forma, sua atividade deacetilase (WAGNER et al, 2013; SOUZA, 2015; HAILU et al., 2017). As quatro principais classes supracitadas estão ilustradas na FIGURA 11.

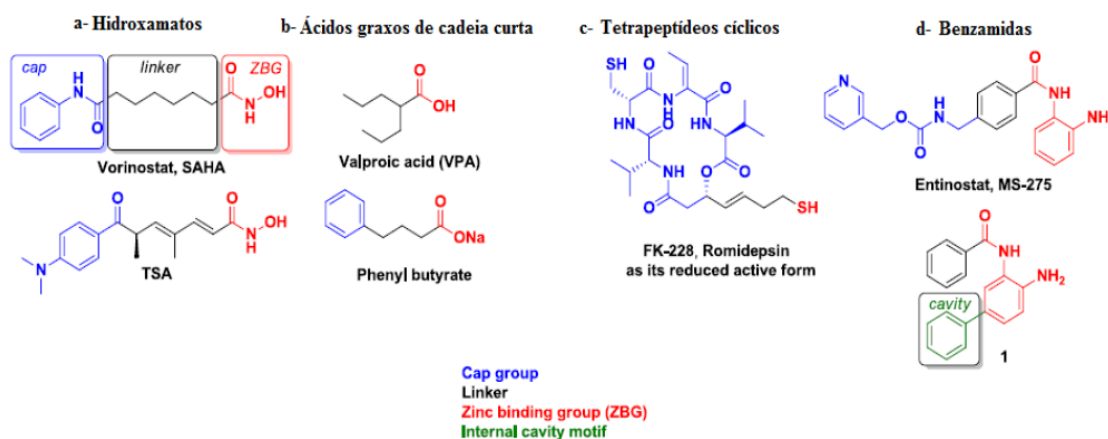


Figura 11. Estrutura química dos principais inibidores de HDAC. a- Hidroxamatos, que são seletivos para as classes I e II de HDAC. b – Ácidos graxos de cadeia curta, classe I seletivos. c- Tetrapeptídeos cíclicos, classe I seletivos. d- Benzamidas, classe I seletivos. É possível observar nessas estruturas a superfície de ligação à enzima (cap group), o linker, o grupo de ligação ao zinco e também um grupo de cavidade interna, presente opcionalmente em iHDAC recentes. A maioria dos iHDAC é desenhada de forma a mimetizar os ligantes de acetil-lisina endógenos (Adaptado de Wagner et al, 2013).

Diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de descobrir eficientes iHDAC para impedir a atividade de HDACs que favorecem o desenvolvimento do câncer. Vários ligantes foram sintetizados para testes clínicos e cinco iHDAC foram aprovados para combater o câncer até o momento pelo FDA (Food and Drug Administration, USA) (SUVANKAR et al., 2019).

Os iHDAC, ao inibir a atividade deacetilase das HDACs, provocam efeitos letais principalmente nas células cancerosas, uma vez que estas têm um metabolismo e replicação

acelerados. Os principais efeitos descritos na literatura são: maior produção de inibidores da progressão do ciclo celular (exemplo: p21); geração de radicais livres; indução de danos ao DNA; promoção de apoptose e interferência nos processos de reparo ao dano no DNA (BOSE; DAI & GRANT, 2014). A FIGURA 12 mostra alguns dos efeitos que os iHDACs podem provocar nas células.

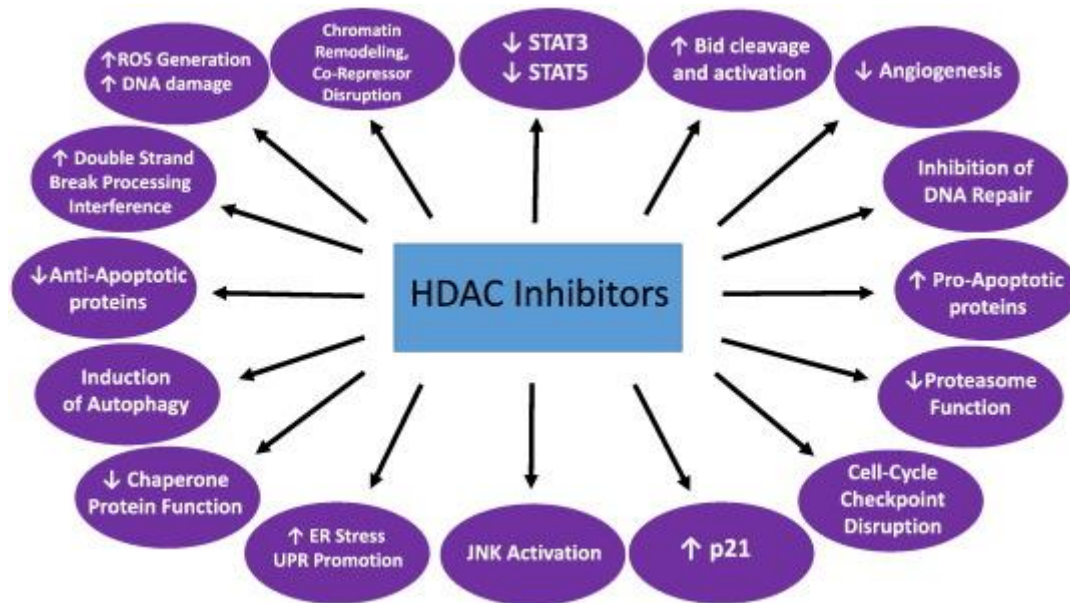
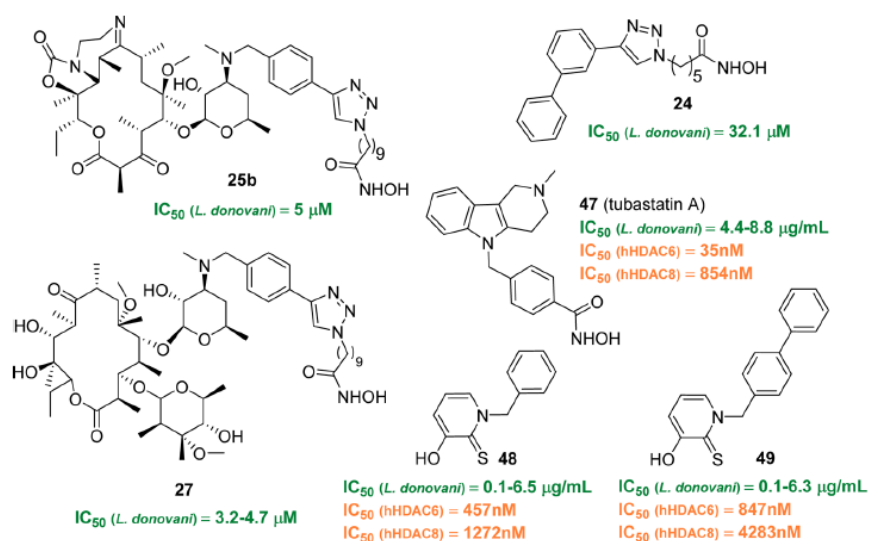


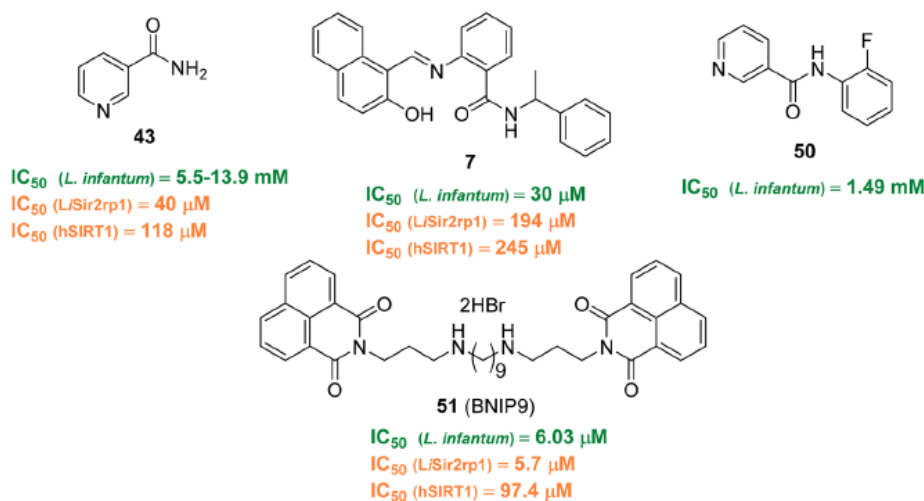
Figura 12. Efeitos provocados pelos iHDAC na célula. Da direita para a esquerda é possível observar: inibição do reparo ao DNA; aumento de proteínas pró-apoptóticas; diminuição da função dos proteossomos, responsáveis por digerir proteínas marcadas para destruição; alteração dos pontos de checagem durante o ciclo celular; aumento do “stress” no retículo endoplasmático; indução da autofagia, geração de radicais livres (BOSE, DAI & GRANT, 2014).

Análises recentes feitas sobre as relações evolutivas entre HDACs e sirtuínas de parasitas patogênicos, mostraram que cinetoplastídeos, como *Leishmania*, têm HDACs de classe I e classe II e quatro genes que codificam HDACs putativos foram encontrados em *L. braziliensis* quando em comparação com ortólogos humanos (SCHOLTE et al., 2017). A relevância da presença de lisinas deacetilases em parasitos tornou-se evidente nos resultados das análises de modelagem molecular por Melesina e colaboradores, onde pequenas diferenças foram observadas no local de ligação do substrato que pode ser explorado como ponto de partida para a inibição seletiva das enzimas destes parasitos (MELESINA et al., 2015).

Neste sentido alguns iHDACs de classe I, II e III com atividade antileishmanial foram descritos, como pode ser observado na FIGURA 13 (DARKIN-RATTRAY, 1996; HAILU et al., 2017).



A. Class-I/II HDAC Inhibitors



B. Sirtuin Inhibitors

Figura 13. Inibidores de HDAC de classe I/II e sirtuínas com atividade antileishmania. Estruturas químicas e dados biológicos. Em verde está indicada a concentração de inibição de crescimento em 50% (IC_{50}) de parasitos, a cor laranja indica o IC_{50} para inibição de HDAC / SIRT (HAILU et al., 2017).

Apesar do crescente interesse de avaliar a ação dos iHDACs como agentes antiparasitários, diversas questões devem ser consideradas a fim de que esses inibidores sejam utilizados na clínica, como: necessidade de elevada potência e seletividade *in vivo* contra parasitos e não contra as células normais do hospedeiro, atividade contra parasitos resistentes aos medicamentos atualmente utilizados, baixa toxicidade e segurança para pacientes imunocomprometidos, crianças e gestantes e, além disso, a necessidade de baixo custo (HAILU et al., 2017).

1.4 O consórcio de pesquisa A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics)

O A-ParaDDisE foi um Projeto do tipo Consórcio Colaborativo Internacional financiado pela Comunidade Europeia com o objetivo de desenvolver novas drogas com alvos epigenéticos direcionados para o tratamento de doenças relevantes para a saúde pública mundial, como a doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose e malária. O método utilizado no A-ParaDDisE para o design de novas drogas foi baseado no projeto SEtTReND FP7, que teve como objetivo desenvolver inibidores de HMEs de *Schistosoma* que pudessem ser compostos chave para novas drogas espécie seletivas.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) participou de três dos dez grupos de trabalho do A-ParaDDisE e foi representada pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dra. Juliana Fietto. Com o objetivo de identificar e obter caracterização molecular e funcional das HMEs de *Leishmania* sp. e *T. cruzi*, diversos pesquisadores disponibilizaram um arsenal de compostos potenciais inibidores de HMEs para serem testados contra os parasitos causadores das doenças alvo.

Em 2017, o Pesquisador Dr. Matheus Silva Bastos, até então membro do grupo de pesquisa da Prof^a Dra. Juliana Fietto, transfectou formas promastigotas de *L. braziliensis* M2904 com uma construção pLExxy para alcançar *L. braziliensis* expressando GFP e então as utilizou para avaliar sua utilidade para a triagem de compostos leishmanicidas contra formas do parasita, incluindo promastigotas axênicos e amastigotas intracelulares. Os resultados mostraram que o uso de *L. braziliensis* GFP para rastreamento de fármacos com potencial contra a leishmaniose é uma alternativa acessível, mais sensível e rápida em comparação à resazurina (BASTOS et al., 2017).

A Pesquisadora e Doutoranda Luciana Ângelo de Souza, deste mesmo grupo de pesquisa, testou 78 derivados de ácido hidroxâmico como putativos iHDACs de *L. braziliensis* nas *L. braziliensis* GFP desenvolvidas pelo grupo. Os compostos foram avaliados em relação à toxicidade em macrófagos e ao efeito leishmanicida contra *L. brasiliensis*. Oito iHDACs mostraram efeitos leishmanicidas significativos e cinco principais compostos mostraram concentrações eficazes (EC50) na faixa de 4,38 a 10,21 μ M e índices de seletividade (SI) de 6 a 21,7. Análises por microscopia eletrônica de transmissão indicaram indução de morte celular por apoptose de amastigotas de *L. braziliensis* com necrose (SOUZA et al, 2020).

O presente trabalho demonstra a continuidade da pesquisa por iHDACs disponibilizados pelo consórcio na busca de novos iHDAC capazes de diminuir a infecção in vitro de *L. braziliensis* em macrófagos e assim contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de Leishmaniose Tegumentar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação leishmanicida de compostos inibidores da classe dos ácidos hidroxâmicos de HDACs como possíveis alvos para desenvolvimento de fármacos para tratamento de Leishmaniose Tegumentar.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a toxicidade de compostos inibidores de HDACs em modelo de célula hospedeira (macrófagos Raw 264.7).
2. Avaliar a ação leishmanicida de compostos inibidores de HDACs, em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* na infecção de macrófagos Raw 264.7.
3. Determinar o IC₅₀ e IC₉₀ dos melhores compostos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepa M2904-GFP de *L. braziliensis*

A cepa M2904-GFP de *L. braziliensis* utilizada no projeto foi obtida pelo Pesquisador Dr. Matheus Silva Bastos, a partir de *L. brasiliensis* pLEXSY-egfp (BASTOS et al., 2017).

3.2 Linhagem de macrófagos Raw 264.7

A linhagem de macrófagos Raw 264.7 utilizada no projeto foi obtida comercialmente da Empresa ATCC (<http://www.atcc.org/>).

3.3 Manutenção dos parasitos *in vitro*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* cepa M2904-GFP foram mantidas em garrafas de cultura de 10 mL, em meio Grace (*Grace's Insect medium*, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) e penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA); pH 6,5; filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25 °C.

Para o congelamento de *L. braziliensis* M2904-GFP, os parasitos crescidos em garrafa de cultura de 10 mL em meio Grace foram contados em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de *Leishmania*/mL por criotubo. Os 10 mL de cultura de *L. braziliensis* presentes na garrafa de cultivo foram transferidos para um tubo de fundo cônico estéril de 15 mL e o volume total foi centrifugado (HERAEUS Multifuge X 1R, Thermo Scientific) a 1.200 x g, a 4 °C, durante 10 minutos. O precipitado obtido foi suspenso em 5 mL de meio de congelamento, composto por Grace com 6,5% de DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon Comercial, Vila prudente, SP, Brasil) estéril, e posteriormente foram feitas alíquotas de 1 mL em criotubos. A seguir, os criotubos foram colocados: 1 hora em geladeira, 24 horas no freezer a -20 °C, 24 horas no freezer -80 °C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido (Thermo Scientific).

Para o descongelamento das amostras de *L. braziliensis* M2904-GFP, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados em temperatura ambiente somente o tempo necessário para o descongelamento. Logo após, o volume de 1 mL de cultura de *L.*

braziliensis presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 10 mL, onde foram adicionados vagarosamente 10 mL de meio Grace. As células foram incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25 °C. O tempo de recuperação das células foi em torno de 7-10 dias. Após esse tempo, foram feitos repiques de 4 em 4 dias com o número inicial de 1×10^5 células/mL para manutenção dos parasitos em fase logarítmica de crescimento que foram acompanhados por visualização em microscópio de fluorescência.

3.4 Obtenção de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP

Formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP foram obtidas a partir do cultivo das formas promastigotas procíclicas do parasito, em garrafas de 10 mL de cultura com meio Grace, por 7 dias após o repique, iniciado com 1×10^5 células/mL (fase estacionária de crescimento).

3.5 Manutenção dos macrófagos Raw.264.7

A linhagem de macrófagos Raw 264.7 foi mantida em garrafas de cultura de 50 mL, em meio RPMI (RPMI-1640, Sigma-Aldrich) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), L-glutamina (2 mM) (Serva), penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation) e HEPES (1M) (Fisher Scientific) pH 7,2, filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubada em estufa (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37 °C.

Para o congelamento dos macrófagos Raw 264.7, inicialmente foram retirados e desprezados 8 mL (dos 10 mL) de RPMI completo da garrafa de cultivo de 50 mL contendo os macrófagos aderidos à superfície plástica da garrafa. A seguir, com o auxílio de um espalhador de células (Kasvi 25 cm), os macrófagos foram desaderidos da garrafa e contados em Câmara de Neubauer (diluição de 25X em PBS e Azul de Tripán) a fim de se determinar o número de macrófagos/mL por criotubo. Os 2 mL de cultura de macrófagos presentes na garrafa de cultivo de 50 mL foram então transferidos para um tubo de fundo cônico estéril de 15 mL, onde foram acrescentados 5 mL de meio de congelamento, composto por RPMI completo com 5% DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon) estéril. Posteriormente, foram feitas alíquotas de 1 mL em criotubos que foram colocados: 1 hora em geladeira, 24 horas no

freezer a -20 °C, 24 horas no freezer -80 °C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido (Thermo Scientific).

Para o descongelamento das amostras de macrófagos Raw 264.7, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados à temperatura ambiente, somente o tempo necessário para o descongelamento. Posteriormente, 1 mL de cultura de macrófagos presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 50 ml, onde foram adicionados vagarosamente 10 mL de meio RPMI completo. As células foram incubadas em estufa de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37°C. Após a recuperação foram feitos repiques de 2 em 2 dias com a contagem de 50.000 macrófagos/mL.

3.6 Inibidores de HDACs

Os compostos inibidores de HDACs utilizados no Projeto foram gentilmente enviados pelo pesquisador Wolfgang Sippl, da Martin Luther Universität Halle- Wittenberg (MLU), na Alemanha. Soluções-estoque a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon) para cada composto e armazenadas a -20 °C. Para utilização nos experimentos *in vitro*, foram preparadas para cada composto soluções de uso em concentrações específicas para cada tipo de experimento sendo o armazenamento feito a -20 °C.

Compostos recebidos – TH156, TH173, TH175, TH177, TH178, TH181, TH182, TH158, TH72, TH60, TH74, TH85, TH 189, AT5*, AT6*, AT12*, AT13*, AT14*, AT15*, ATT4*, ATT5*, ATT3(f), ATT4(f), ATT5(f), EG25, EG26, EG27, EG28, EG29, EG30, EG24, EG24A, EG31, EG31A, EG32, EG39, EG46, EG47, EG48, EG50, EG51, EG53, EG55, EG60, PZ005_2, PZ009_2, PZ011_2, PZ013_2, PZ015_2, PZ017_2, KH19_2, SD14.

3.7 Avaliação da toxicidade dos compostos para macrófagos

A avaliação da ação citotóxica dos compostos foi realizada a partir do Método da Resazurina (BASTOS et al., 2017). O sal de sódio, resazurina, é utilizado em ensaios de cultivo celular como um indicador colorimétrico de proliferação e viabilidade. Em sua forma oxidada, a resazurina é um corante azul. Na presença de atividade metabólica celular, ela é reduzida a resofurin, de coloração rosa, que pode ser medida por leitura colorimétrica ou de fluorescência (DINIZ, 2013). A resazurina utilizada nesta pesquisa (Sigma-Aldrich, Mw: 251.17 g/mol) foi preparada a 1 mM em PBS. Nos experimentos *in vitro*, a leitura da reação foi feita em 570 nm e 600 nm em leitor de microplacas (Spectramax M5).

3.8 Testes com os compostos em macrófagos Raw. 264.7

Os testes para avaliar a ação dos compostos em macrófagos Raw 264.7 foram feitos em placas de 96 poços. Inicialmente, os macrófagos cultivados em garrafas de 50 mL em meio RPMI completo, com 2 dias de cultivo, foram desaderidos da garrafa com o auxílio de um espalhador de células (Kasvi 25 cm) e contados em Câmara de Neubauer (diluição de 25X em PBS e Azul de Tripán) a fim de se determinar o número de macrófagos/mL. Após a contagem, foram plaqueados 5×10^4 macrófagos por poço, todos em um volume final de 200 μ L/poço (macrófagos + meio RPMI completo). Em seguida, foram adicionados os controles: Anfotericina B (250 μ g/mL) (controle positivo) e DMSO 5% (controle negativo) e os compostos. Também foi feito um controle para avaliar o crescimento dos macrófagos na ausência de drogas, constando apenas de macrófagos e meio RPMI completo. Seguindo-se à adição dos compostos e dos controles, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C. Após 47 horas, cada placa foi retirada da estufa e em cada poço foram adicionados 20 μ L de resazurina 1 mM, sendo a placa incubada novamente em estufa de CO₂ por mais 1 hora. Completadas 48 horas, as placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax M5) em 570 nm e 600 nm, em intervalos de 1 hora, por 3 horas.

A porcentagem de redução da resazurina, em cada tempo avaliado, foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Redução da resazurina} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)]$$

Nessa fórmula, A_{570} significa a absorbância da resazurina a 570 nm, A_{600} equivale à absorbância da resazurina a 600 nm, e R_0 é um fator de correção (branco), representado pela média das absorbâncias do controle negativo contendo somente meio RPMI completo com resazurina (em quadruplicata). A porcentagem de células viáveis foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ Células viáveis} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}] \times 100 / \text{Média}[A_{570} - (A_{600} \times R_0)]_{\text{Não tratado}}$$

3.9 Ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis* M2904-GFP

Os ensaios de infecção *in vitro* foram realizados em placas de 96 poços. Inicialmente, foram montadas placas com 1×10^5 macrófagos Raw 264.7, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.8. Posteriormente, foi feita a infecção dos macrófagos com formas promastigotas enriquecidas em formas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP, na proporção de 10 *Leishmania* por um macrófago. As formas promastigotas em formas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP, obtidas segundo descrito no item 3.4, foram transferidas para um tubo de fundo cônico esterilizado de 50 mL e centrifugadas (HERAEUS Multifuge X 1R, Thermo Scientific) a $1.200 \times g$, a 4°C , durante 10 minutos. O precipitado obtido foi suspenso em 5 mL com RPMI completo e as células foram contadas em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de *Leishmania*/mL.

Depois da contagem, 1×10^6 *Leishmania* foram adicionadas à placa com os macrófagos previamente incubada por 3-4 horas e esta foi incubada novamente em estufa de CO_2 por mais 24 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada 3X com RPMI base (sem adição de L-glutamina), pH 7,2; foram adicionados 200 μL de RPMI completo por poço na placa e esta foi incubada por 24 horas em estufa de CO_2 . Após 24 horas, o meio RPMI completo metabolizado foi substituído por meio novo e foram adicionados na placa 4 μL dos compostos (das soluções de uso a 0,5 mM) para concentração final de 10 μM , 4 μL de DMSO 5%, (controle negativo) e 2,5 μL de Anfotericina B (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (controle positivo), todos em quadruplicata. Dois controles para avaliar o crescimento dos macrófagos não infectados também foram feitos. Em um deles foi adicionado 2,5 μL de Anfotericina B (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e no outro não foi adicionado nada.

Posteriormente à adição dos compostos e dos controles, a placa foi incubada em estufa de CO_2 por 48 horas. Após 48 horas, a placa foi retirada da estufa e lavada 3X com RPMI base (sem adição de L-glutamina), pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados 50 μL por poço da solução de lise (RPMI base + SDS 0,1%) e a placa foi deixada por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 150 μL de meio Grace suplementado por poço na placa e esta foi vedada com Parafilm e incubada em estufa B.O.D a 25°C por 5 dias. Após os 5 dias, as placas foram lidas por fluorescência na região de detecção de GFP em leitora de microplacas (Spectramax M5) a 490 nm (excitação) e 520 nm (emissão). Os cálculos para determinar o efeito dos compostos sobre as formas amastigotas foram feitos segundo a seguinte equação:

% Células viáveis = [(Emissão fluorescência)_{Tratado}] x 100/ Média [(Emissão fluorescência)_{Não tratado}]

3.10 Análises Estatísticas

Os cálculos que foram utilizados para avaliar a citotoxicidade em macrófagos e o efeito leishmanicida em formas amastigotas de *L. braziliensis*, foram realizados pelo programa Microsoft Excel 2010. A Análise de Variância (ANOVA), a determinação do IC50 e os gráficos referentes aos ensaios de infecção em macrófagos foram feitos no GraphPad Prisma, versão 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos compostos iHDACs em macrófagos Raw 264.7

O alvo deste capítulo foi as HDACs e os testes com seus potenciais inibidores. Para o screening inicial dos compostos, todos eles foram testados a 10 μ M em macrófagos e a toxicidade foi avaliada após 48 horas. A partir desse screening inicial, os compostos que não foram tóxicos para macrófagos seguiram para o ensaio de infecção em macrófagos. Tanto os controles (Anfotericina B e DMSO) quanto os compostos foram testados em quadruplicada dentro de cada experimento e três repetições independentes foram realizadas.

A Organização Internacional de Padronização considera citotóxicos os compostos que desencadeiam uma redução na viabilidade celular de mais de 30% (ISO, 2009). Aliado a isso, neste trabalho somente foi considerado significativo o efeito dos compostos que não foram tóxicos quando comparados com droga leishmanicida controle Anfotericina B. Como pode ser visto nos GRÁFICOS 1, 2 e 3, os compostos que não desencadearam redução de viabilidade celular maior que 30% foram submetidos à análise estatística e comparados com a Anfotericina B. Um total de 48 compostos foi testado, mas apenas 19 foram selecionados para os experimentos de infecção.

Segundo os critérios adotados, os seguintes compostos foram tóxicos para macrófagos e não foram empregados nos ensaios de infecção: TH189, EG24, EG31, EG32, EG39, EG46, EG47, EG48, EG50, EG51, EG53, EG54, EG55, EG60, EG24A, KH19_2, SD14, PZ005_2, PZ009_2, PZ011_2, PZ013_2, PZ015_2, PZ017_2 AT5*, AT12*, AT13*, AT14*, AT15*, ATT4*.

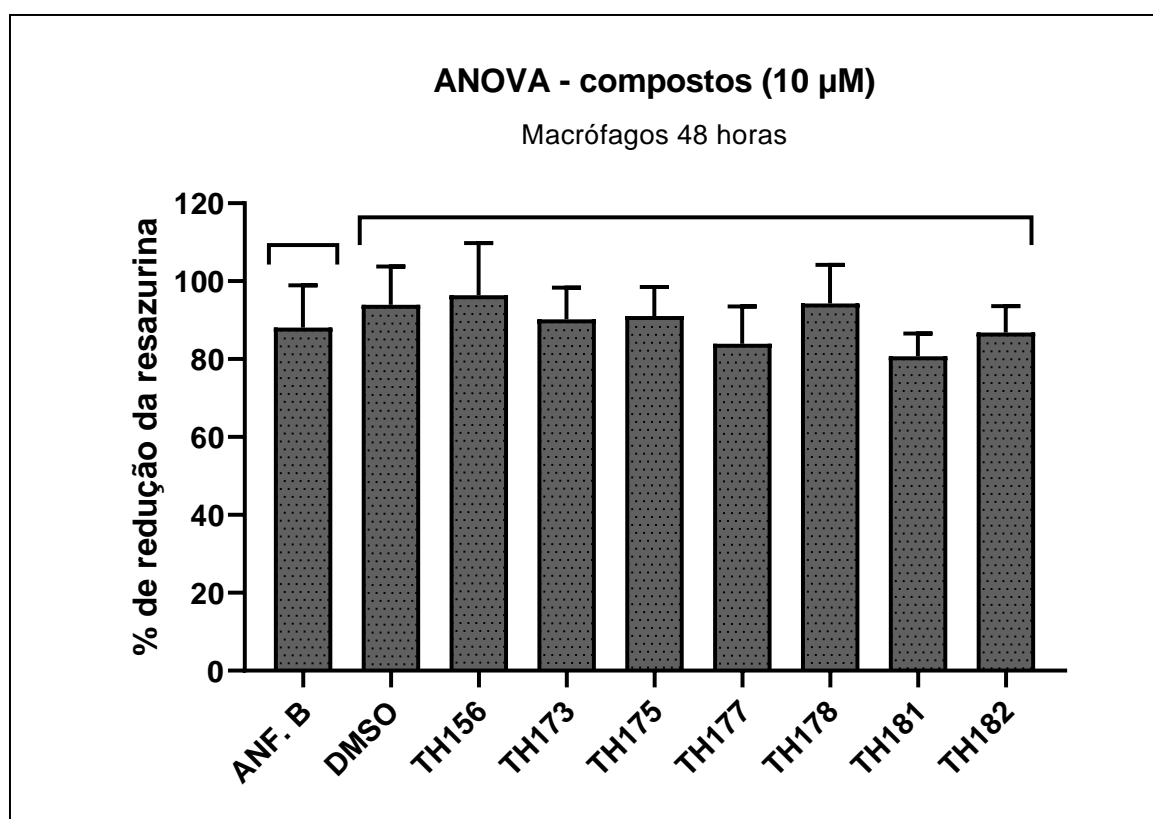


Gráfico 1 Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 em comparação com a Anfotericina B após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto e DMSO em comparação com a Anfotericina B a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

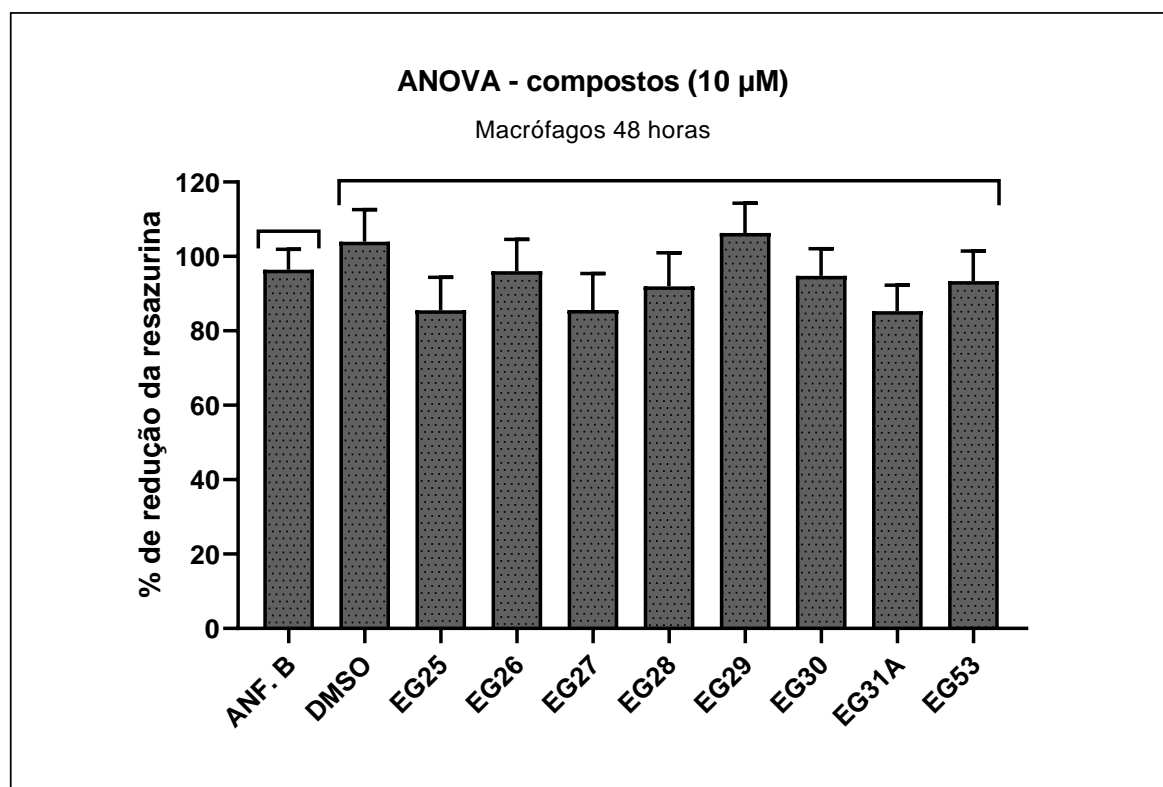


Gráfico 2 Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 em comparação com a Anfotericina B após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto e DMSO em comparação com a Anfotericina B a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

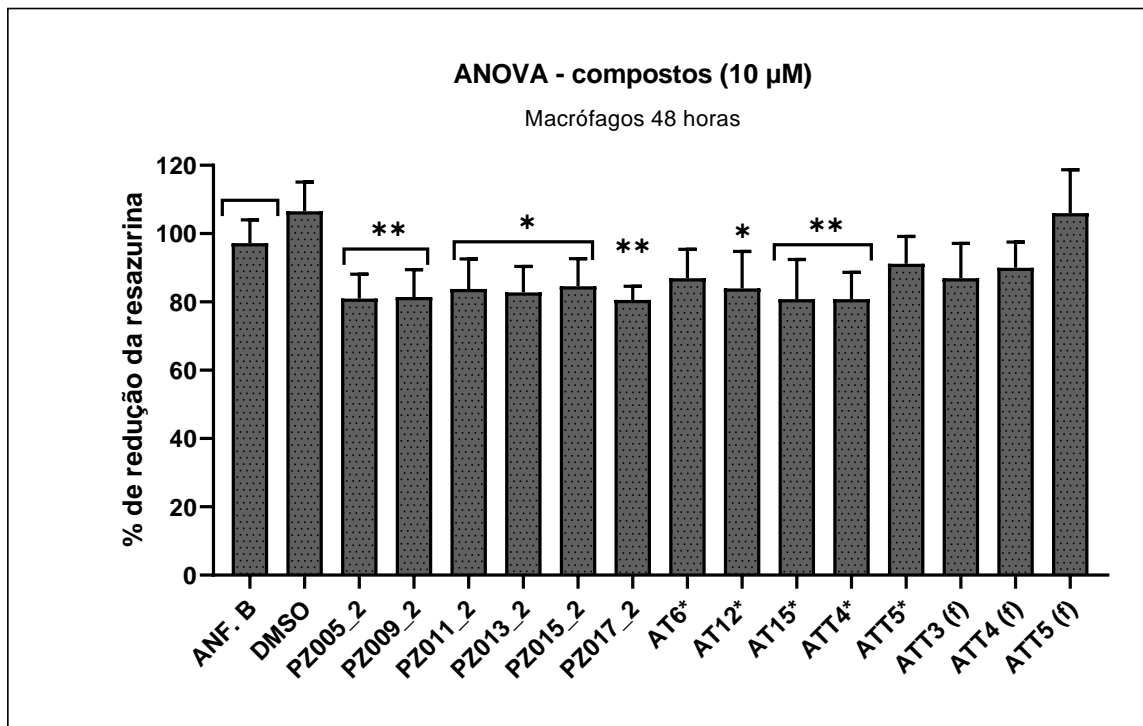


Gráfico 3 Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 em comparação com a Anfotericina B após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto e DMSO em comparação com a Anfotericina B a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. * = $p > 0,5$ ** $p > 0,05$.

Os macrófagos são células fagocíticas encontrados em muitos tecidos. Na imunidade inata, os macrófagos são responsáveis principalmente pelo controle de patógenos, e na imunidade adaptativa, eles participam do reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos às células T (MURRAY & WYNN, 2011). Os macrófagos desempenham um papel duplo na infecção por *Leishmania*. Essas células são responsáveis pela destruição de parasitos internalizados, mas também podem fornecer um local seguro para a replicação de *Leishmania*. Portanto, os macrófagos são essenciais para o sucesso ou fracasso da infecção por *Leishmania* e ambos os fatores estão intimamente relacionados às formas clínicas da doença (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Considerando a importância dos macrófagos na progressão e principalmente na supressão da doença, foi feito um screening inicial nessas células fagocíticas. Muitos compostos foram citotóxicos para os macrófagos e isso porque esses compostos podem estar agindo sobre as enzimas-alvo dos macrófagos, especialmente nas HDACs dessas células, e como estas estão envolvidas em processos celulares cruciais, uma vez inibidas, podem levar a morte celular.

4.2 Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M294-GFP em infecção de macrófagos

Todos os compostos que, testados em macrófagos, não apresentaram efeito citotóxico, deveriam ter o seu efeito avaliado em amastigotas de *L. braziliensis* M2904-GFP em infecção de macrófagos. Todavia, apenas uma parte dos compostos teve seu efeito avaliado, devido aos problemas no nosso estoque de células que foi perdido devido ao fechamento do laboratório de pesquisa durante uma parte pandemia de COVID-19. Com isso as células fluorescentes de *L. braziliensis* foram perdidas e não houve possibilidade de analisar todos os compostos selecionados. Desta forma os resultados aqui apresentados são somente daqueles compostos que foi possível serem testados.

Os ensaios de infecção foram feitos de acordo com o protocolo descrito no item 5.9, a uma concentração de 10 μ M, mesma concentração utilizada nos ensaios com macrófagos. Neste ensaio, inicialmente a cultura de macrófagos é infectada por promastigotas totais, contendo formas metacíclicas infecciosas. Após a infecção, esta é tratada com os compostos por 48 horas e depois os macrófagos são lisados para liberar os amastigotas intracelulares. Estes então são incubados em estufa B.O.D a 25 °C até que se transformem novamente em promastigotas e repliquem, a fim de ser possível quantificar a fluorescência. O resultado da ação dos compostos é então comparado com os controles internos sem nenhum composto e com o DMSO na mesma concentração usada pra uso dos compostos solubilizados com este solvente. Seriam considerados significativos os efeitos dos compostos que reduzam pelo menos 25% da fluorescência quantificada, ou seja, que diminuíssem a viabilidade celular em 25% pelo menos. Sendo ideal que a inibição fosse maior do que 50%, porém nenhum dos compostos foi eficiente neste nível, como pode ser visto no GRÁFICO 4.

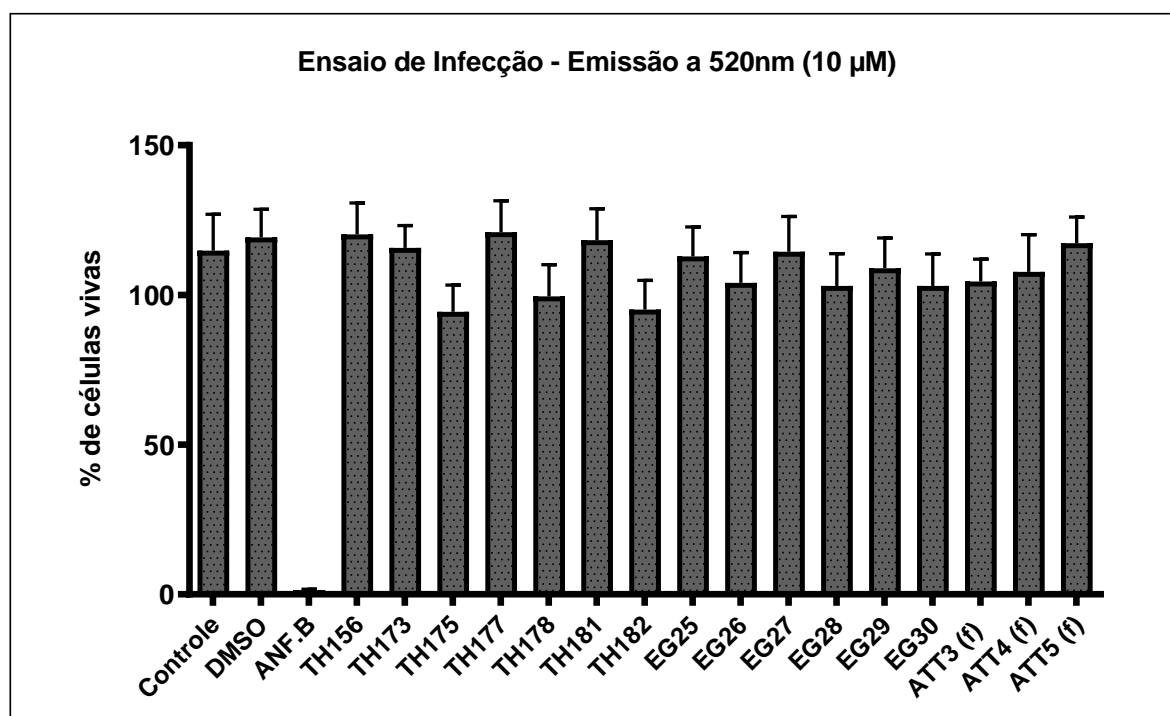


Gráfico 4 Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2904-GFP após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. A leitura dos experimentos foi feita em leitora de microplacas, com os seguintes comprimentos de onda: com 490 nm (excitação) e 520 nm (emissão).

As HDACs são enzimas que catalisam a remoção de grupos acetil dos resíduos de acetil-lisina nas caudas das histonas, e dessa forma aumentam o grau de compactação entre as histonas e o DNA, sendo por isso conhecidas como co-repressoras da transcrição. (SETO & YOSHIDA, 2014; AZAD et al., 2018). Os iHDACs, ao inibir a atividade deacetilase das HDACs, provocam efeitos letais para a célula. Demonstração da eficácia desses inibidores em parasitos tem sido publicada, inclusive em *L. braziliensis*, como foi feito por nosso grupo de pesquisa recentemente (SOUZA et al., 2020). O intuito da continuidade desse trabalho foi procurar por inibidores ainda mais efetivos que os encontrados até então, porém como pode se observar, os compostos iHDACs testados não apresentaram efeito significativo em amastigotas.

Muitas podem ser as explicações da não eficácia dos compostos nas formas amastigotas. Uma delas é que os transportadores presentes na membrana dos amastigotas podem influenciar a captação da droga e a mesma pode não ter sido entregue de forma

eficiente para o interior da célula parasitária. Aliado a isso, a capacidade dos amastigotas em metabolizar as drogas pode ter sido mais eficiente, contribuindo para uma menor toxicidade.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, diferentes efeitos dos compostos testados em *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 foram encontrados.

Um total de 48 compostos foi testado em macrófagos, mas apenas 19 foram selecionados para os experimentos de infecção. Isso porque somente foi considerado significativo o efeito daqueles compostos que não foram tóxicos para macrófagos.

Um total de 16 compostos foi testado na infecção, mas nenhum deles demonstrou efeito leishmanicida na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*.

6. PERSPECTIVAS

Embora os compostos que foram testados na infecção não tenham apresentado efeito leishmanicida, ainda restam compostos que precisam ser testados. O primeiro passo é recuperar as *L. braziliensis*-GFP, ou fazer uma nova transfecção para uma possível continuidade do projeto.

Caso os compostos que ainda serão testados apresente efeito leishmanicida, novos estudos devem ser feitos para elucidar e identificar possíveis alvos e mecanismos biológicos envolvidos na toxicidade em *Leishmania*.

7. REFERÊNCIAS

ANDREOLI, F.; DEL RIO, A. Computer-aided Molecular Design of Compounds Targeting Histone Modifying Enzymes. **Comput Struct Biotechnol J.**, v. 13, p. 358-365, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459771/>>. Acesso em: 03 jun 2020.

ANDREWS, K.; HAQUE, A.; JONES, M.K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunol Cell Biol**, v. 90, n.1, p. 66-77, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124373>>. Acesso em: 24 out 2019

AZAD, K.G. et al. Modifying Chromatin by Histone Tail Clipping. *Journal of Molecular Biology*. **J Mol Biol**, (2018) 430, 3051–3067. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283618302948>>. Acesso em: 20 nov 2019.

BASTOS, M.S. et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Inst Oswaldo Cruz**, (2017) Feb;112(2):155-159. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/9WWbrrCCbnvqnL6HXpyBxSp/?lang=en>>. Acesso em: 23 jun 2021.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature** **447**, 396–398 (2007). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17522671/>>. Acesso em: 22 mai 2020.

BOSE, P., DAI, Y., & GRANT, S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights. **Pharmacology & Therapeutics**, 143(3), 323–336, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769080>>. Acesso em: 04 dez 2019.

DARKIN-RATTRAY, S. J. et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 1996, 93, 13143- 13147. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917558>>. Acesso em 04 dez 2019.

F. DUBOIS, S. et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 168 (2009), pp. 7-15. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19538992/>>. Acesso em: 23 jun 2020.

FYODOROV, D.V. et al. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. **Molecular Cell Biol**, v.19 (2018). Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm.2017.94#Fig1>>. Acesso em: 20 nov 2019

GORDON, S.; TAYLOR, P. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol** 5, 953–964 (2005). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322748/>>. Acesso em: 14 abr 2021.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.** 2012 Jun;26(2):309-22. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632641>>. Acesso em: 03 out 2019.

GUIDI, A. et al. Identification of novel multi-stage histone deacetylase (HDAC) inhibitors that impair *Schistosoma mansoni* viability and egg production. **Parasit. Vectors**, 11 (2018), p. 668. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307185/>>. Acesso em: 23 jun 2020.

HAILU, G.S. et al. Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, 60 (12), 4780-480, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28241112>>. Acesso em: 04 dez 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2009. International standard: biological evaluation of medical devices part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. ISO10993-5. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

KORNBERG, R.D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell** 98, 285–294, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458604>>. Acesso em: 08 mar 2020.

LEE, K.K.; WORKMAN, J.L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2007;8(4):284-295. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm2145>>. Acesso em: 03 jun 2020.

MELESINA, J. et al. Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. **J Mol Graph Model.** 2015 Nov;62:342-361. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26595183/>>. Acesso em: 15 jun 2021.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol.** 2011;11(11):723-737. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422549/>>. Acesso em: 14 abr 2021.

NAWAZ, M. et al. Modifications of histones in parasites as drug targets. **Vet Parasitol.** 2020;278:109029. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978703/>>. Acesso em: 03 jun 2020.

NGWA, C.J. et al. Transcriptional Profiling Defines Histone Acetylation as a Regulator of Gene Expression during Human-to-Mosquito Transmission of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Front Cell Infect Microbiol.** 2017;7:320. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791254/>>. Acesso em: 24 jun 2020.

ROQUIS, D. et al. Histone methylation changes are required for life cycle progression in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathog.** 2018;14(5):e1007066. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/297825300/>>. Acesso em: 23 jun 2020.

ROTHBART, S.B.; STRAHL, B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochim Biophys Acta**, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631868>>. Acesso em: 18 mar 2020.

SAXENA, A. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 152, n.1, p. 53-65, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204342>>. Acesso em: 24 jun 2020.

SCHOLTE, L.L.S. et al. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. **Infection, Genetics and Evolution** 53 (2017) 175-188, Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134817301624>>. Acesso em: 15 jun 2021.

SETO, E; YOSHIDA, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2014;6(4):a018713, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691964>>. Acesso em: 29 nov 2019.

SMITH, B.C; DENU, J.M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. **Biochim Biophys Acta.** 2009 Jan;1789(1):45-57. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18603028>>. Acesso em: 29 nov 2019.

SOUSA, L.A. Avaliação da ação leishmanicida de inibidores de enzimas modificadoras de histonas em *Leishmania brasiliensis* e na infecção de macrófagos/ Luciana Ângelo de Souza. –Viçosa, MG,2016. Acesso em: 30 jun 2020.

SOUSA, L.A. et al. Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world tegumentary leishmaniasis. **Biochemical Pharmacology.** v. 180, p. 114191, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295220304275>>. Acesso em: 10 jun 2021.

STRAHL, B., ALLIS, C. The language of covalent histone modifications. **Nature** 403, 41–45 (2000). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10638745/>>. Acesso em: 23 mai 2020.

TAVARES, J. et al. The *Leishmania infantum* cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. **Biochem J.**, v. 415, n. 3, p. 377-386, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598238>>. Acesso em: 24 jun 2020.

TAVARES, J. et al. Bisnaphthalimidopropyl derivatives as inhibitors of *Leishmania* SIR2 related protein 1. **ChemMedChem**. 2010;5(1):140-147. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19937668/>>. Acesso em: 24 jun 2020.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Front Immunol**. 2018;9:2529. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30429856/>>. Acesso em: 14 abr 2021.

TROPBERGER, P., SCHNEIDER, R. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. **Nat Struct Mol Biol** 20, 657–661 (2013). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23739170/>>. Acesso em: 22 mai 2020.

TURNER, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. **BioEssays**, 22(9), 836–845, 2000. Disponível em: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0033848849&origin=inward&txGid=52058a0e0163642d077790b63d730f5f>>. Acesso em: 29 nov 2019.

WANG L, TANG Y, COLE PA, MARMORSTEIN R. Structure and chemistry of the p300/CBP and Rtt109 histone acetyltransferases: implications for histone acetyltransferase evolution and function. **Current opinion in structural biology**. 2008;18(6):741-7. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18845255/>>. Acesso em: 23 mai 2020.

WILHELM, T.J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**. Oct 2019, Vol. 90, Issue 10, pp 833–837. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00104-019-0994-1>>. Acesso em: 03 out 2019.

CAPÍTULO 2 - Avaliação do efeito leishmanicida de derivados do eugenol em *Leishmania braziliensis*

1. EUGENOL

1.1 Obtenção de novos fármacos a partir de metabólitos secundários de plantas

O uso de plantas medicinais para tratar doenças desde a antiguidade até os dias de hoje é amplamente aceito e valorizado por uma série de razões, como fácil acesso, baixo custo e por serem culturalmente aceitos pela maioria das pessoas (WHO, 2013).

Os extratos naturais, ricos em metabólitos ativos obtidos de várias partes da planta são também amplamente utilizados em pesquisas científicas (FURST & ZUNDORF 2014). Para realização de estudos *in vitro* e *in vivo*, os diversos componentes da planta (caules, raízes, folhas e sementes) são submetidos à maceração, separação, purificação e processos de fracionamento e colocados na presença de um solvente volátil (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, metanol ou etanol) que auxilia no isolamento dos compostos bioativos (ROMANIK et al., 2007).

Como revisado por Furst e colaboradores, a análise da lista de medicamentos aprovados nas últimas décadas demonstra que os extratos vegetais continuam a ser essenciais na busca e descoberta de novos medicamentos. Vincristina, vimblastina e seus derivados semissintéticos, originalmente isolados da pervinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), são drogas anticâncer de alto valor. Galantamina de gola branca (*Galanthus caucasicus*), paclitaxel de teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) e capsaicina de pimenta (*Capsicum*) são outros exemplos proeminentes de metabólitos vegetais secundários que chegaram à clínica (FURST & ZUNDORF, 2014).

Desde o século 19, com os primeiros estudos com plantas medicinais em que foram registrados relatos sobre o isolamento de metabólitos secundários, a natureza tem fornecido diversas substâncias que fundamentam estudos de relação estrutura-atividade e inspiram o desenvolvimento da síntese orgânica. Exemplos de compostos derivados de plantas que serviram como estruturas principais e foram quimicamente modificados, são o ácido salicílico (ácido acetilsalicílico), morfina (escoros de derivados), camptotecina (topotecano e irinotecano), artemisinina (artemeter) e dicumarol (varfarina) (FURST & ZUNDORF, 2014).

Um número crescente de estudos tem sido realizado usando extratos de plantas com atividade seletiva *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania* (TARIQ et al., 2016; SILVA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018; KAR et al., 2021).

1.2 Eugenol – Composto natural presente em óleos essenciais

O eugenol é um composto natural encontrado em diversos óleos essenciais, especialmente no óleo extraído do cravo da Índia, (*Eugenia caryophyllata*), uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade, utilizada na indústria alimentícia como conservante, principalmente por sua propriedade antioxidante, como aromatizante para alimentos e cosméticos e na medicina popular (KAR et al., 2021).

O eugenol é um composto fenólico da classe dos fenilpropanóides (C₁₀H₁₂O₂), quimicamente designado de acordo com a IUPAC como 4-alil-2-metoxifenol (FIGURA 14). Parcialmente solúvel em água, o eugenol tem sua solubilidade aumentada em solventes orgânicos. Possui consistência líquida e oleosa, aroma característico, sabor ardente e picante (RAJA et al., 2015).

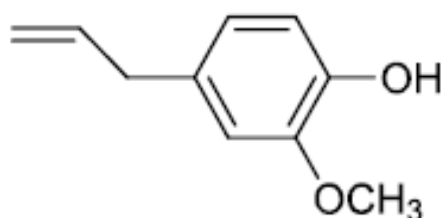


Figura 14. Estrutura molecular do Eugenol (GAZOLLA, 2015).

Dentre as atividades biológicas do eugenol descritas na literatura, podem-se destacar as seguintes: antiinflamatória (KIM et al., 2003), antitumoral (DERVIS & YURT, 2017), antibacteriana (HAMED, SADEK & EDRIS, 2012), antifúngica (DARVISH et al., 2007), antipirética (TAHER et al., 2015), anestésica (TSUCHIYA, 2017), analgésica (BALDISSEROTTO, PARODE & STEVENS, 2018) e antiparasitária (KAR, et al., 2021).

1.3 Eugenol como alvo para desenvolvimento de compostos leishmanicidas

Assim como o eugenol puro, que possui ação leishmanicida confirmada e documentada na literatura, o efeito de diversos compostos que possuem o eugenol em sua composição e compostos sintetizados derivados do eugenol tem se mostrado eficazes. Um estudo feito por Raja e colaboradores (2020), demonstrou que o Oleato de Eugenol foi capaz de reduzir em 86,5% e 84,1% a carga parasitária do fígado e do baço, respectivamente, em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Os resultados obtidos demonstram que o composto foi capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, aumentando o perfil de citocinas do tipo Th1 e diminuindo o perfil de citocinas do tipo Th2.

O efeito do óleo essencial de *Mitracarpus frigidus*, que possui como um dos seus principais componentes químicos o acetato de eugenol, foi testado na viabilidade de promastigotas de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. O óleo essencial apresentou atividade contra formas promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* com valores de IC₅₀ de $47,2 \pm 4,0$ e $89,7 \pm 8,6$ µg/mL, respectivamente. Essas formas foram suscetíveis ao óleo essencial a 108 µg/mL com 97% e 86% de inibição celular, respectivamente (FABRI et al., 2012).

Derivados benzilados e acetilados de eugenol exibiram melhor atividade antileishmania do que a forma pura contra promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* (DE MORAIS et al., 2014).

Um estudo feito por Islamuddin e colaboradores (2016), demonstrou uma atividade leishmanicida da emulsão de eugenol em ensaios *in vivo* contra *L. donovani*, ao estimular uma resposta imune do tipo Th1 sem causar efeitos colaterais em camundongos BALB/c.

Em 2018, Teixeira e colaboradores demonstraram que diferentes compostos derivados do eugenol possuindo núcleos 1,2,3-triazólicos possuem diferentes graus de eficácia contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e consideraram que esses compostos devem ser explorados no desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da leishmaniose.

1.4 Derivados do eugenol contendo núcleo 1,2,3-triazol

A química orgânica heterocíclica é um dos ramos mais importantes e bem estudados da química medicinal. Uma característica importante dos compostos bioativos heterocíclicos são seus vários átomos constituintes, incluindo nitrogênio, enxofre, oxigênio e outros. Esses

átomos afetam diretamente a reatividade do esqueleto-alvo, a atividade dos compostos, as interações entre os fármacos-alvo e os diferentes inibidores-alvo, além de poderem influenciar no metabolismo e na farmacocinética (BOZOROV, ZHAO & AISA, 2019).

Os heterocíclicos de nitrogênio são abundantes na natureza e possuem grande importância por se tratar de subunidades estruturais presentes em produtos naturais como vitaminas, hormônios, antibióticos e alcaloides. São também, partes integrantes das estruturas de agroquímicos, corantes e polímeros, além de estarem entre os componentes estruturais mais significativos dos produtos farmacêuticos (PHOLSHETTIWAR & VARMA, 2008; VITAKU, SMITH & NJARDARSON, 2014; BOZOROV, ZHAO & AISA, 2019).

Vitaku e colaboradores (2014) ao analisarem um banco de dados de medicamentos aprovados pelo FDA demonstraram que 59% dos medicamentos de pequenas moléculas contêm um heterocíclico de nitrogênio.

Dentre os sistemas heterocíclicos mais estudados encontram-se os triazólicos, que podem ser subclassificados como vicinais (1,2,3-triazóis) ou simétricos (1,2,4-triazóis) (MELO et al., 2006; BOZOROV, ZHAO & AISA, 2019). A estrutura destes heterocíclicos está demonstrada na FIGURA 15.

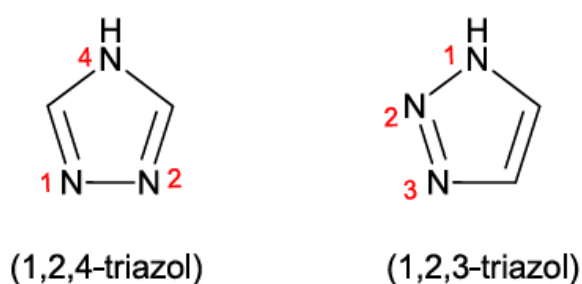


Figura 15. Estrutura dos heterocíclicos triazóis (GAZOLLA, 2015).

Várias são as atividades biológicas relatadas para os derivados 1,2,3-triazólicos. Dentre elas destacam-se: antimicrobiana (ZHOU et al., 2018; ZHANG, 2019), antitumoral (LAL & YADAV, 2018; LANG et al., 2020), antimalárica (GUANTAI et al., 2010; XU et al., 2018), leishmanicida (PORTA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2018) entre outros.

Considerando a alta toxicidade, a resistência dos parasitos, o alto custo das terapias atuais contra as leishmanioses e os benefícios já demonstrados na literatura sobre o eugenol e heterocíclicos de nitrogênio, compostos derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-

triazólicos foram testados neste trabalho pela primeira vez na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Os compostos foram cedidos pelo professor Dr. Róbson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. A estrutura geral dos compostos está amostrada na FIGURA16.

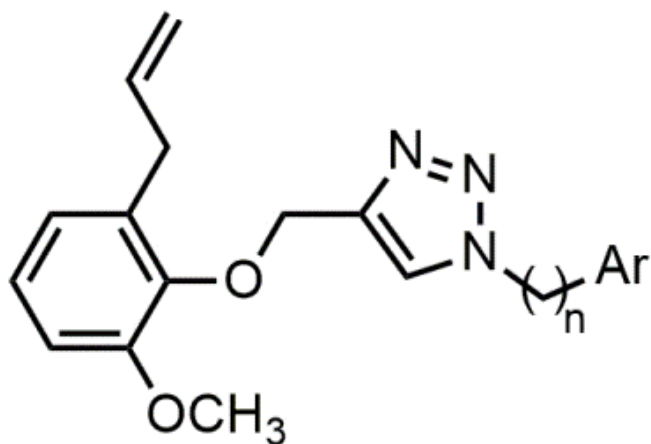


Figura 16. Estrutura geral dos compostos alvos de estudo deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de compostos derivados do eugenol associados a anel triazólico como possíveis agentes leishmanicidas contra *L. braziliensis* como possíveis novos alvos terapêuticos para tratamento de Leishmaniose Tegumentar.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a toxicidade de compostos derivados do eugenol em modelo de célula hospedeira (macrófagos Raw 264.7).
2. Avaliar a ação leishmanicida de compostos derivados do eugenol, em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* na infecção de macrófagos Raw 264.7.
3. Determinar o EC₅₀ e CC₉₀ dos melhores compostos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepa M2904-GFP de *L. braziliensis*

A cepa M2904-GFP de *L. braziliensis* utilizada no projeto foi obtida pelo Pesquisador Dr. Matheus Silva Bastos, a partir de *L. brasiliensis* pLEXSY-egfp (BASTOS et al., 2017).

3.2 Linhagem de macrófagos Raw 264.7

A Linhagem de macrófagos Raw 264.7 utilizada no projeto foi obtida comercialmente da Empresa ATCC (<http://www.atcc.org/>).

3.3 Manutenção dos parasitos *in vitro*

A manutenção dos parasitos *in vitro* seguiu o mesmo protocolo descrito no item 3.3.

3.4 Obtenção de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP

Formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP foram obtidas conforme descrito no item 3.4.

3.5 Manutenção dos macrófagos Raw.264.7

A manutenção dos macrófagos Raw 264.7 seguiu o mesmo protocolo descrito no item 3.5.

3.6 Compostos derivados do Eugenol

Os compostos derivados do eugenol utilizados no Projeto foram gentilmente enviados pelo pesquisador Róbson Ricardo Teixeira, da Universidade Federal de Viçosa.

Soluções-estoque a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon) para cada composto e armazenadas a -20 °C. Para utilização nos experimentos *in vitro*, foram preparadas para cada composto soluções de uso em concentrações específicas para cada tipo de experimento sendo o armazenamento feito a -20 °C.

Compostos recebidos – RE06, RE19, RE20, RE21, RE25, RE26, RE27, RE38, RE39, RE40, RE41, RE43, RE44, RE45, RE46, RE47, RE48, RE49, RE50, RE51, RE52, RE53.

3.7 Avaliação da toxicidade dos compostos para macrófagos

A avaliação da ação leishmanicida dos compostos em macrófagos seguiu o protocolo descrito no item 3.7.

3.8 Testes com os compostos em macrófagos Raw. 264.7

Os testes para avaliar a ação dos compostos em macrófagos Raw 264.7 seguiu o protocolo descrito no item 3.8.

3.9 Ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis* M2904-GFP

Os ensaios de infecção in vitro seguiu o protocolo descrito no item 3.9.

3.10 Análises Estatísticas

Os cálculos que foram utilizados para avaliar a citotoxicidade em macrófagos e o efeito leishmanicida em formas amastigotas de *L. braziliensis*, foram realizados pelo programa Microsoft Excel 2010. A Análise de Variância (ANOVA), a determinação do IC50 e os gráficos referentes aos ensaios de infecção em macrófagos foram feitos no GraphPad Prisma, versão 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos compostos derivados do eugenol em macrófagos Raw 264.7

O alvo deste capítulo foi os compostos derivados do eugenol ligados à núcleos triazólicos. Para o screening inicial de toxicidades dos compostos para a célula hospedeira, todos eles foram testados em macrófagos a 10 μM e o efeito desses compostos foi avaliado após 48 horas. A partir desse screening inicial, os compostos que não foram tóxicos para macrófagos foram utilizados para o ensaio de infecção em macrófagos.

O efeito dos compostos testados a uma concentração de 10 μM foi avaliado pelo método de resazurina 48 horas após a sua adição na placa de 96 poços. Tanto os controles (Anfotericina B e DMSO) quanto os compostos foram testados em quadruplicada dentro de cada experimento e três repetições independentes foram realizadas. Foi considerado significativo o efeito daqueles compostos que não foram tóxicos para macrófagos. A Organização Internacional de Padronização considera citotóxicos os compostos que desencadeia uma redução na viabilidade celular de mais de 30% (ISO, 2009). Aliado a isso, neste trabalho somente foi considerado significativo o efeito dos compostos que não foram tóxicos quando comparados com droga leishmanicida controle Anfotericina B.

Os compostos derivados de eugenol testados foram enviados pelo Dr. Róbson Ricardo Teixeira. Um total de 22 compostos foi testado, e como pode ser visto nos GRÁFICOS 5 e 6, todos os compostos foram selecionados para os experimentos de infecção pois nenhum deles apresentou toxicidade em macrófagos.

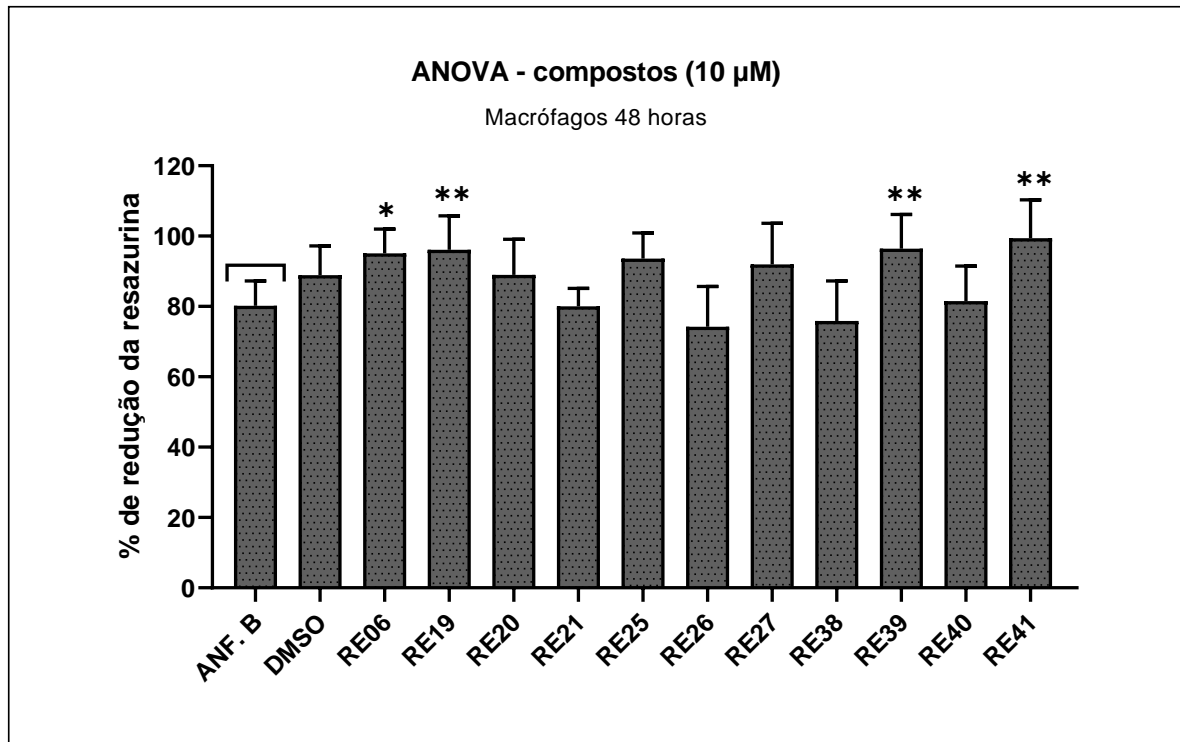


Gráfico 5 Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 em comparação com a Anfotericina B após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto e DMSO em comparação com a Anfotericina B a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. * = $p > 0,5$
** $p > 0,05$.

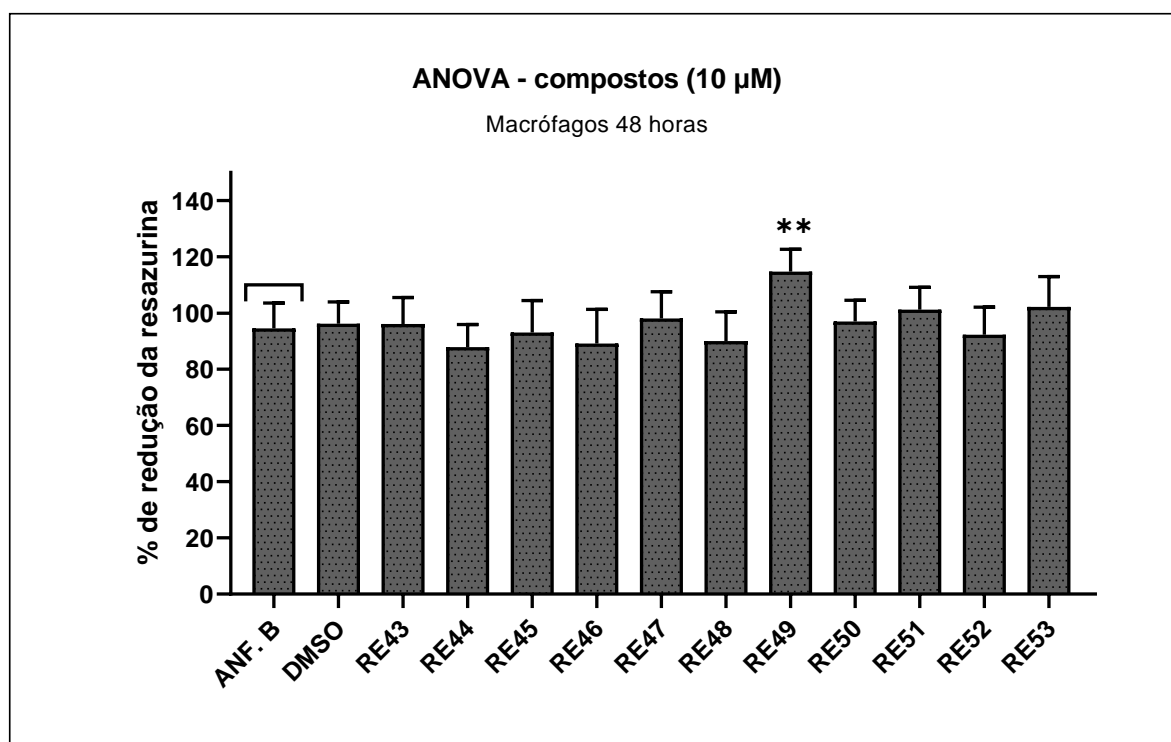


Gráfico 6 Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 em comparação com a Anfotericina B após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto e DMSO em comparação com a Anfotericina B a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. * = $p > 0,5$ ** $p > 0,05$.

Como dito anteriormente, os macrófagos são células fagocíticas encontrados em muitos tecidos e desempenham um papel duplo na infecção por *Leishmania*. Essas células são responsáveis pela destruição de parasitos internalizados, mas também pode fornecer um local seguro para a sua replicação. Portanto, os macrófagos são essenciais para o sucesso ou fracasso da infecção por *Leishmania* e ambos os fatores estão intimamente relacionados às formas clínicas da doença (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Considerando a importância dos macrófagos na progressão e principalmente na supressão da infecção, foi feito um screening inicial nessas células fagocíticas. Nenhum dos compostos testados foi considerado citotóxico para os macrófagos e por isso, todos foram utilizados nos experimentos de infecção.

4.2 Efeito dos compostos derivados do eugenol em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M294-GFP em infecção de macrófagos

Os amastigotas são as formas parasitárias persistente no hospedeiro, e responsáveis pelos sintomas causados pela doença. Logo, este deve ser o principal alvo quimioterápico em estudos de novos agentes leishmanicidas (DE MORAIS et al., 2014). Com base nisso, todos os compostos que testados em macrófagos não apresentaram efeito citotóxico, tiveram o seu efeito avaliado em amastigotas de *L. braziliensis* M2904-GFP em infecção de macrófagos.

Os ensaios de infecção foram feitos de acordo com o protocolo descrito no item 10.9, a uma concentração de 10 μ M, mesma concentração utilizada nos ensaios com macrófagos. O resultado da ação dos compostos foi comparado com os controles internos sem nenhum composto e com o DMSO. Foi considerado significativo, o efeito dos compostos que reduziram pelo menos 25% da fluorescência quantificada. Tanto os compostos quanto os controles (Anfotericina B e DMSO) foram testados em quadruplicata dentro de cada experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Para os compostos que foram testados, os resultados são mostrados no GRÁFICO 6.

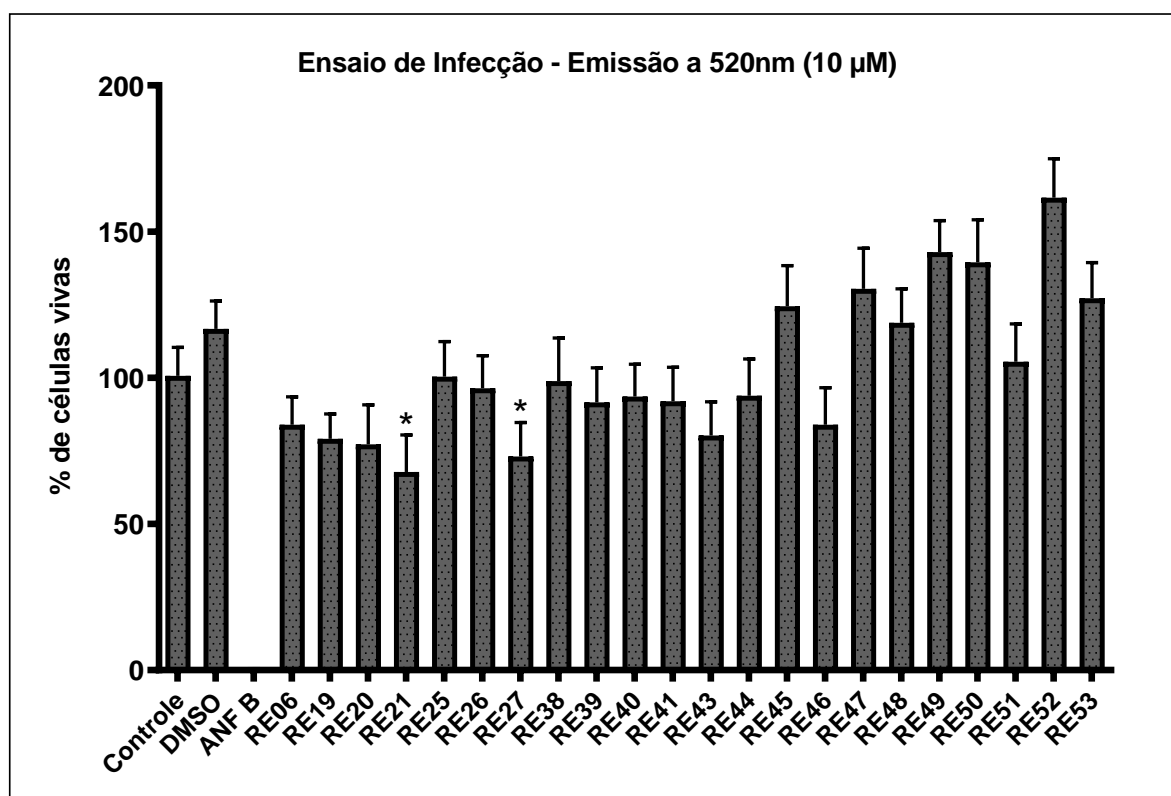
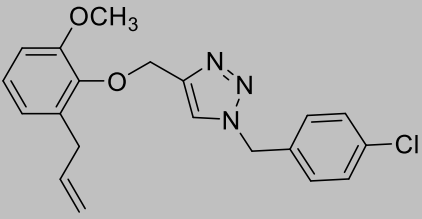
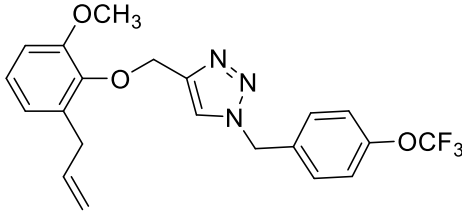


Gráfico 7 Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2904-GFP após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. A leitura dos experimentos foi feita em leitora de microplacas, com os seguintes comprimentos de onda: com 490 nm (excitação) e 520 nm (emissão).

Como se pode observar os compostos RE21 e RE27 apresentaram um efeito significativo, sendo capazes de inibir a infecção em mais de 25%, RE21 (% de redução da fluorescência = $33\% \pm 12$ SD) e RE27 (% de redução da fluorescência = $27\% \pm 11$ SD). O resultado positivo dos compostos pode estar diretamente relacionado com a sua composição química. Tanto o composto RE21 quanto o composto RE27 são derivados do eugenol sintetizados com o núcleo 1,2,3-triazólico. A estrutura química desses compostos é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 Estrutura química dos compostos e sua eficácia em amastigotas após 48 horas.

Composto	Efeito no ensaio de infecção (% de células vivas)	Estrutura química dos compostos
RE21	67	
RE27	73	

Os 1,2,3-triazóis são heterocíclicos que constituem uma classe de compostos que tem despertado grande interesse científico por apresentarem um grande campo de aplicações, entre elas a farmacologia. Várias são as atividades biológicas relatadas para os derivados 1,2,3-triazólicos, dentre elas a atividade leishmanicida (FERREIRA et al., 2007, PORTA et al., 2014). A atividade do núcleo 1,2,3-triazólico contra parasitos de *Leishmania* tem sido comparada a outros tripanocidas esteróis, como azasteróis, que foram sintetizados como inibidores da esterol metiltransferase, uma enzima que foi validada como alvo para drogas leishmanicidas e tripanocidas (PORTA et al., 2014).

Portanto, a capacidade imunomoduladora do eugenol descrita anteriormente associada à capacidade do núcleo 1,2,3-triazólico agir sobre enzimas essenciais para a sobrevivência dos parasitos de *Leishmania*, pode ter agido positivamente, controlando parcialmente a infecção de *Leishmania* em macrófagos.

Além disso, é importante levar em conta fatores relacionados aos macrófagos quanto a uma maior ou menor toxicidade de um composto para formas amastigotas *in vitro*. Os macrófagos ao se tornarem ativados na presença de moléculas dos amastigotas podem eliminar o parasito e cooperar para a inibição da infecção. Todavia, no controle infectado e não tratado podemos observar que a porcentagem de fluorescência permaneceu em 100% o que confirma que a redução da infecção foi devido aos compostos e não à ativação dos macrófagos (GORDON & TAYLOR, 2005; SOUZA, 2016).

4.3 Ensaio de Toxicidade em amastigotas de *L. braziliensis* M2904-GFP para determinação de EC₅₀ e CC₅₀

Ensaio de toxicidade na infecção em macrófagos foram realizados para os compostos eficazes contra o parasito na infecção após 48 horas. Os compostos RE21 e RE27 foram testados nas concentrações de: 160 µM, 80 µM, 40 µM, 30 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, e 1 µM. Neste ensaio, inicialmente a cultura de macrófagos foi infectada por promastigotas totais, contendo formas metacíclicas infecciosas. Após a infecção, esta foi tratada com os compostos por 48 horas e depois os macrófagos foram lisados para liberar os amastigotas intracelulares. Estes então foram incubados em estufa B.O.D a 25°C até que se transformaram novamente em promastigotas e replicaram, quando por fim foi quantificada a fluorescência. Tanto estes quanto os controles (Anfotericina B e DMSO) foram testados em quadruplicata e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Dessa forma, a Concentração Efetiva em 50% (EC₅₀) e a Concentração Citotóxica em 50% (CC₅₀) foi identificada para os compostos RE21 e RE27 como mostra a tabela 3:

Tabela 3 EC₅₀ e CC₅₀ dos compostos RE selecionados em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e macrófagos.

Composto	CC ₅₀ (µM) MØ	EC ₅₀ (µM) <i>L. braziliensis</i> amastigotas (ensaio de infecção)	Índice de Seletividade (IS)
RE21	> 150	28.09	> 5.3
RE27	> 150	52.03	> 2.8

O EC₅₀ e o CC₅₀ foram determinados após 48 horas pelo método de rezazurina em macrófagos e por fluorescência na infecção de *L. braziliensis* em macrófagos. MØ: macrófagos. SI = CC₅₀ (MØ) / EC₅₀ (*L. braziliensis* amastigotas).

O EC₅₀ reflete a eficácia de determinado composto. Quanto maior o seu valor, menos eficaz a droga é. Como pode ser observado o EC₅₀ do composto RE21 foi de 28,09 µM e o EC₅₀ do composto RE27 foi de 57,03 µM, demonstrando que RE21 é mais eficaz como agente leishmanicida contra *L. braziliensis* do que RE27.

Neste trabalho também foi calculado o Índice de Seletividade (IS) como mostrado na Tabela 3. Este é utilizado em ensaios de citotoxicidade para avaliar o quanto uma droga é mais eficaz contra determinado parasito sem causar danos à viabilidade de células de

mamíferos. Seu resultado é a razão entre a CC50 e a EC50. Quanto maior o IS, mais seletiva é a droga sobre o parasito e menos efeito ela tem sobre as células de mamíferos (ENGEL et al, 2015). De acordo com a Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), uma organização sem fins lucrativos que visa o desenvolvimento de novas drogas para doenças negligenciadas, incluindo as leishmanioses, um IS > 10 em um ensaio de infecção com *Leishmania*, é o que valida determinado composto para testes *in vivo* (DNDi, 2009). Como pode se observar na Tabela 3, o IS tanto do composto RE21 (IS > 5,3), quanto do composto RE27 (IS > 2,8), foram menores que o valor recomendado pelo DNDi para seguir para os experimentos *in vivo*. Todavia, como eles não apresentaram toxicidade significativa para macrófagos nem na concentração máxima usada de 150 µM, é importante salientar que os IS reais são maiores do que os encontrados, o que pode justificar que sejam testados em modelo de infecção em camundongos como próxima etapa da pesquisa. Outra possibilidade é teste de terapia combinada a medicamentos que já são clinicamente utilizados para tratar as leishmanioses, tendo em vista a possibilidade de uma potencialização no tratamento ao reduzir ainda mais a carga parasitária e diminuir a citotoxicidade nas células de mamíferos.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, diferentes efeitos dos compostos testados em *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 foram encontrados.

Um total de 22 compostos foi testado e todos foram selecionados para os experimentos de infecção, pois nenhum deles apresentou toxicidade para os macrófagos.

Em amastigotas, o RE21 e o RE27 foram os compostos mais eficazes na inibição da infecção. Sendo assim, a Concentração Efetiva em 50% (EC₅₀) e a Concentração Citotóxica em 50% (CC₅₀) foi identificada para esses compostos.

O EC₅₀ do composto RE21 foi de 28,09 µM e o EC₅₀ do composto RE27 foi de 57,03 µM, demonstrando que RE21 é mais eficiente como agente leishmanicida contra *L. braziliensis* do que RE27.

Além disso, o IS para ambos os compostos foi calculado, RE21 (IS > 5,3) e RE27 (IS > 2,8). O IS tanto do composto RE21, quanto do composto RE27 foram menores que o valor recomendado pelo DNDi para seguir para os experimentos in vivo.

Todavia, como eles não apresentaram toxicidade significativa para macrófagos nem na concentração máxima usada de 150 µM, é importante salientar que os IS reais são maiores do que os encontrados, o que pode justificar que sejam testados em modelo de infecção em camundongos como próxima etapa da pesquisa.

6. PERSPECTIVAS

A toxicidade para *Leishmania* atribuídas a alguns compostos neste capítulo deve ser levada em consideração e outros estudos podem ser feitos para se tentar elucidar e identificar possíveis alvos e os mecanismos biológicos envolvidos na sua toxicidade.

Para o RE21 e RE27, que foram os compostos mais eficazes contra amastigotas intracelulares, análises de microscopia eletrônica e de citometria de fluxo para avaliação de ciclo celular podem ajudar a elucidar os mecanismos de ação desses compostos no parasito.

Outra possibilidade é teste de terapia combinada a medicamentos que já são clinicamente utilizados para tratar as leishmanioses, tendo em vista a possibilidade de uma potencialização no tratamento ao reduzir ainda mais a carga parasitária e diminuir a citotoxicidade nas células de mamíferos.

7. REFERÊNCIAS

- ARANGO, V. et al. Synthesis and leishmanicidal activity of quinoline-triclosan and quinoline-eugenol hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 3445-3454, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00044-011-9886-8>>. Acesso em: 21 abr 2021.
- BOZOROV, K; ZHAO, J; AISA, H.A. Híbridos contendo 1,2,3-triazol como líderes na química medicinal: uma visão geral recente. **Bioorg Med Chem**. 2019; 27 (16): 3511-3531. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7185471/>>. Acesso em: 16 jun 2021.
- BALDISSEROTTO, B; PARODI, T. V; STEVENS, E. D. Lack of postexposure analgesic efficacy of low concentrations of eugenol in zebrafish. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. 2018;45(1):48–56. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29239756/>>. Acesso em: 20 abr 2021.
- DA SILVA, B. J. M. et al. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **J Integr Med**. 2018 Jul;16(4):211-222. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29691188/>>. Acesso em: 19 abr 2021.
- DARVISHI, E. et al. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **PLoS One**. 2013;8(10):p. e76028. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204588/>>. Acesso em: 20 abr 2021.
- DE MORAIS, S.M. et al. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorg Med Chem**. 2014 Nov 1;22(21):6250-5. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25281268/>>. Acesso em: 21 abr 2021
- DERVIS, E. et al. *In vitro* incorporation of radioiodinated eugenol on adenocarcinoma cell lines (Caco2, MCF7, and PC3) **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. 2017;32(3):75–81. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358602/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

DNDi. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases. A Training Manual for Screening in Neglected Diseases, 2009. Disponível em:

<http://www.dndi.org/images/stories/pdf_scientific_pub/2009/kinetoplastid_drug_screening_manual_final.pdf>. Acesso em: 26 abr 2021.

ENGEL, J.A. et al. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against Plasmodium and Trypanosoma parasites. **International Journal for**

Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v.5, n.6, p. 117-126, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320715000123>>. Acesso em: 26 abr 2021.

FABRI, R.L. et al. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **An Acad Bras Cienc**. 2012 Dec;84(4):1073-80. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23207707/>>. Acesso em: 21 abr 2021.

FERREIRA, S. B. et al. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles. **Eur J Med Chem**, 2007, v. 42, p. 1388-1395. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17445951/>>. Acesso em: 26 abr 2021.

FÜRST, R; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators Inflamm**. 2014; 2014:146832. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24987194/>>. Acesso em: 19 abr 2021.

GUANTAI, E. M. et al. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazolelinked chalcone and dienone hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 8243-8256, 2010. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21044845/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

GAZOLLA, P. A. R.- Síntese e avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos / Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla. – Viçosa, MG, 2015.

GORDON, S.; TAYLOR, P. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol** **5**, 953–964 (2005). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322748/>>. Acesso em: 14 abr 2021.

HAMED, S. F; SADEK, Z; EDRIS, A. Antioxidant and antimicrobial activities of clove bud essential oil and eugenol nanoparticles in alcohol-free microemulsion. **Journal of Oleo Science**. 2012;61(11):641–648. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23138253/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

ISLAMUDDIN, M. et al. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniosis. **PLoS Negl Trop Dis** . 2016; 10 (10): e0005011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27776125/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

KAR, A. et al. Synergic effect of eugenol oleate with amphotericin B augments anti-leishmanial immune response in experimental visceral leishmaniasis in vitro and in vivo. **Int Immunopharmacol**. 2021 Feb;91:107291. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33360084/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

KIM, S. S. et al. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. **Life Sciences**. 2003;73(3):337–348. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12757841/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

LAL, K.; YADAV, P. Avanços recentes em 1,4-dissubstituído 1H-1,2,3-triazoles como potenciais agentes anticâncer. **Anti-Cancer Agents Med Chem**. 2018; 18 : 21–37. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27528183/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

LANG, D.K. et al. Nitrogen-Containing Heterocycles as Anticancer Agents: An Overview. **Anticancer Agents Med Chem**. 2020;20(18):2150-2168. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628593/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

PHOLSHETTIWAR, V.; VARMA, R. S. Greener and expeditious synthesis of bioactive heterocycles using microwave irradiation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, p. 777-790, 2008. Disponível em:

<https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryID=186050>. Acesso em: 16 jun 2021.

PORTA, E. O. J. et al. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs. **Steroids**, v. 79, p. 28-36, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24200958/>>. Acesso em: 26 abr 2021.

RAJA, M. R. C. et al. Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. **Pharm Anal Acta**. 2015, 6: 367. Disponível em: <<https://www.longdom.org/abstract/versatile-and-synergistic-potential-of-eugenol-a-review-22037.html>>. Acesso em: 20 abr 2021.

RAJA, M. R. C. et al. Oral administration of eugenol oleate cures experimental visceral leishmaniasis through cytokines abundance. **Cytokine**. 2020 Oct 28:155301. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33127258/>>. Acesso em: 21 abr 2021.

ROMANIK, G. et al. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **J Biochem Biophys Methods** 2007; 70(2): 253–61. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17126405/>>. Acesso em: 19 abr 2021.

SOUSA, L.A. Avaliação da ação leishmanicida de inibidores de enzimas modificadoras de histonas em *Leishmania brasiliensis* e na infecção de macrófagos/ Luciana Ângelo de Souza. –Viçosa, MG,2016. Acesso em: 30 jun 2020.

TAHER Y. A. et al. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. **Libyan Journal of Medicine**. 2015;10(1, article 28685). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26333873/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

TARIQ, A. et al. Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants against Plasmodia and Leishmania parasites. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2016 Sep 20;15(1):52. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27647140/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

TEIXEIRA, R.R. et al. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **Eur J Med Chem**. 2018 Feb 25;146:274-286. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29407957/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Front Immunol**. 2018;9:2529. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30429856/>>. Acesso em: 14 abr 2021.

TSUCHIYA, H. Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. **Molecules**. 2017;22(8):p. 1369. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28820497/>>. Acesso em: 20 abr 2021.

VITAKU, E. et al. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. **J Med Chem**. 2014 Dec 26;57(24):10257-74. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255204/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1>. Acesso em: 19 abr 2021.

HU, X. L. et al. Desenvolvimento recente de derivados cumarínicos como potenciais agentes antiplasmódicos e antimaláricos. **Curr Top Med Chem**. 2018; 18 : 114–123. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29243579/>>. Acesso em 16 jun 2021.

ZHANG, B. Comprehensive review on the anti-bacterial activity of 1,2,3-triazole hybrids. **Eur J Med Chem**. 2019 Apr 15;168:357-372. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30826511/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

ZHOU, J. et al. Boronic acid inhibitors of the class A β -lactamase KPC-2. **Bioorg Med Chem**. 2018; 26 : 2921–2927. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784271/>>. Acesso em: 16 jun 2021.