

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MICHELE MIDORI KOYAMA DE SOUZA

POTENCIAL INIBITÓRIO E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO EUGENOL
SOBRE A CINASE *Serine Arginine Protein Kinase* DE *Leishmania braziliensis*
(LbSRPK)

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

MICHELE MIDORI KOYAMA DE SOUZA

**POTENCIAL INIBITÓRIO E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO
EUGENOL SOBRE A CINASE *Serine Arginine Protein Kinase* DE *Leishmania
braziliensis* (LbSRPK)**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada para obtenção do título de
Magister Scientiae

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos
Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto
Christiane Mariotini-Moura
Vasconcellos
Joice de Melo Agripino

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

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

T

S729p
2024
Souza, Michele Midori Koyama de, 2000-
Potencial inibitório e leishmanicida de derivados do
eugenol sobre a cinase *Serine Arginine Protein Kinase* de
Leishmania braziliensis (LbSRPK) / Michele Midori Koyama de
Souza. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (107 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 84-92.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.675>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas recombinantes. 2. Leishmaniose. 3.
Leishmania braziliensis. 4. Eugenol. 5. Simulação de
acoplamento molecular. I. Vasconcellos, Raphael de Souza,
1982-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.6

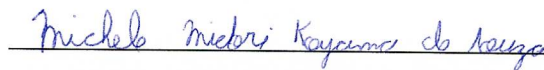
MICHELE MIDORI KOYAMA DE SOUZA

**POTENCIAL INIBITÓRIO E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO
EUGENOL SOBRE A CINASE *Serine Arginine Protein Kinase* DE *Leishmania
braziliensis* (LbSRPK)**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 23 de agosto de 2024

Assentimento:



Michele Midori Koyama de Souza

Autora

gov.br

Documento assinado digitalmente
RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS
Data: 10/10/2024 10:53:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Raphael de Souza Vasconcellos

Orientador

“Porém, temos este tesouro em vasos de barro, para que transpareça claramente que este poder extraordinário provém de Deus e não de nós”

2 Coríntios 4, 7.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por ter me dado a vida e me sustentado todos os dias até aqui. Agradeço à Virgem Maria, por sua doce intercessão.

Agradeço à minha família, meus pais Carlos e Maria, meus irmãos Diego, Jonathan e Diana por sempre acreditarem e confiarem em mim, não teria chegado até aqui sem vocês.

Agradeço ao meu orientador, professor Raphael Vasconcellos, por toda a orientação e por tudo o que me ensinou. Agradeço aos meus coorientadores, professora Juliana Fietto, professora Christiane e à Joyce, por todo apoio e disposição.

Agradeço a todo mundo com quem pude trabalhar no LAPEM, em especial à Rayane, Sara, Bianca, Bárbara e Edlêla por toda a ajuda com os experimentos, por toda a paciência em me ensinar e pela companhia no café. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Agradeço aos meus amigos, em especial Vitória, por tantos anos de amizade e por sempre estar presente quando precisei. Agradeço a Diana por todas as palavras de conforto. Agradeço aos meus padrinhos Júlia e Gabriel por serem uma inspiração e por todo incentivo e apoio.

Agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro: Capes, FAPEMIG e CNPq

E a todos aqueles que estiveram presentes na minha vida ao longo desse mestrado e que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho pudesse ser feito, meu muito obrigada.

RESUMO

SOUZA, Michele Midori Koyama de. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Potencial inibitório e leishmanicida de derivados do eugenol sobre a cinase *Serine Arginine Protein Kinase* de *Leishmania braziliensis* (LbSRPK)**. Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto; Christiane Mariotini-Moura Vasconcellos e Joice de Melo Agripino.

Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas que afetam milhares de pessoas no Brasil e no mundo. Causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, manifestam-se principalmente como Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Visceral (LV). No Brasil, LC e LV são endêmicas, causadas predominantemente pela espécie *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*. Não há vacinas disponíveis, e os tratamentos existentes são caros, inespecíficos e apresentam efeitos colaterais, além de casos de resistência parasitária. Novos alvos farmacológicos estão sendo estudados, e as *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) mostraram-se promissoras, pois estão envolvidas em processos celulares essenciais. Estudos mostraram a presença de SRPK em tripanossomatídeos, e nosso grupo de pesquisa é pioneiro nos estudos envolvendo SRPK em *L. braziliensis* bem como dos inibidores dessa proteína e seu potencial leishmanicida. O eugenol é um composto natural do grupo dos fenóis que é conhecido por possuir propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antimutagênicas e antialérgicas. Há relatos na literatura de sua eficácia na inibição do crescimento de promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania*. Sendo assim, este trabalho avaliou o potencial de oito compostos derivados do eugenol, da classe das amidas aromáticas com diferentes substituintes no anel benzênico, como agentes leishmanicidas, seu potencial citotóxico e a capacidade de agir como inibidores de LbSRPK. Para os experimentos de CC_{50} , células de macrófagos (RAW 264.7) e células de promastigotas de *L. braziliensis* (M2904) foram cultivadas para avaliar a atividade dos compostos. Os compostos não foram tóxicos às células de leishmania na concentração testada e apresentaram valores de CC_{50} variados em macrófago (295,2 μ M; 217,9 μ M; ~2775,8 μ M; ~241,1 μ M; ~267,7 μ M; 575,3 μ M; 159,0 μ M e 759,3 μ M respectivamente para compostos numerados de 1 a 8). Para testar o potencial inibitório dos compostos, eles foram projetados na plataforma do Avogadro e avaliados por *docking* molecular no *software* GOLD, usando a proteína LbSRPK previamente modelada e validada pelo grupo de pesquisa. As melhores poses foram analisadas no *PyMOL* e *Discovery Studio* e ranqueados pelo servidor *online Pose & Rank*. Todos os

compostos demonstraram interação com resíduos presentes no sítio ativo da proteína, sugerindo seu potencial como inibidores, embora mais estudos sejam necessários para confirmar esses achados. Para complementar os estudos, a proteína recombinante LbSRPK foi expressa em sistema bacteriano *E. coli* BL21(DE3) para posterior teste de atividade e inibição pelos compostos. Esses estudos visam ampliar o conhecimento sobre o papel da LbSRPK em *L. braziliensis* e explorar esses compostos derivados do eugenol da classe das amidas aromáticas como possíveis inibidores dessa proteína.

Palavras-chaves: Leishmanioses, *Leishmania braziliensis*, LbSRPPK, derivados do eugenol, *docking* molecular

ABSTRACT

SOUZA, Michele Midori Koyama de. Universidade Federal de Viçosa, august de 2024. **Inhibitory and leishmanicidal potential of eugenol derivatives on the *Leishmania braziliensis* Serine Arginine Protein Kinase (LbSRPK)**. Advisor Raphael de Souza Vasconcellos. Co-advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto; Christiane Mariotini-Moura Vasconcellos and Joice de Melo Agripino.

Leishmaniasis are neglected tropical diseases that affect thousands of people in Brazil and worldwide. Caused by parasites of the *Leishmania* genus, they primarily manifest as Cutaneous Leishmaniasis (CL), Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL), and Visceral Leishmaniasis (VL). In Brazil, CL and VL are endemic, predominantly caused by the species *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*. There are no available vaccines, and current treatments are expensive, nonspecific, and have side effects, as well as cases of parasite resistance. New pharmacological targets are being studied, and Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) have shown promise as they are involved in essential cellular processes. Studies have shown the presence of SRPKs in trypanosomatids, and our research group is a pioneer in studying SRPKs in *L. braziliensis* as well as inhibitors of this protein and its leishmanicidal potential. Eugenol is a natural compound from the phenol group that is known to possess anti-inflammatory, analgesic, antimutagenic, and antiallergic properties. There are reports in the literature of its efficacy in inhibiting the growth of promastigotes and amastigotes of various *Leishmania* species. Therefore, this study evaluated the potential of eight eugenol-derived compounds, from the aromatic amide class with different substituents on the benzene ring, as leishmanicidal agents, their cytotoxic potential, and their ability to act as LbSRPK inhibitors. For CC_{50} experiments, macrophage cells (RAW 264.7) and *L. braziliensis* promastigote cells (M2904) were cultured to assess the activity of the compounds. The compounds were non-toxic to *Leishmania* cells at the tested concentration and presented varying CC_{50} values in macrophages (295.2 μ M; 217.9 μ M; ~2775.8 μ M; ~241.1 μ M; ~267.7 μ M; 575.3 μ M; 159.0 μ M and 759.3 μ M respectively for compounds numbered 1 to 8). To test the inhibitory potential of the compounds, they were designed on the Avogadro platform and evaluated through molecular docking using GOLD software, with the LbSRPK protein previously modeled and validated by the research group. The best poses were analyzed in PyMOL

and Discovery Studio and ranked by the Pose & Rank online server. All compounds demonstrated interaction with residues present in the protein's active site, suggesting their potential as inhibitors, although further studies are needed to confirm these findings. To complement the studies, the recombinant LbSRPK protein was expressed in the bacterial system *E. coli* BL21(DE3) for subsequent activity testing and inhibition by the compounds. These studies aim to expand knowledge on the role of LbSRPK in *L. braziliensis* and explore these eugenol-derived compounds from the aromatic amide class as potential inhibitors of this protein.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, LbSRPPK, eugenol derivatives, molecular docking

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Leishmanioses: transmissão e manifestações clínicas.....	15
2.2. Ciclo de vida do parasito.....	20
2.3. Diagnóstico e tratamentos.....	25
2.4. Proteínas cinases como alvos farmacológicos.....	30
2.5. Atividade leishmanicida de Eugenol e derivados.....	33
2.6. Bioinformática no desenho racional de fármacos.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Cultivo de células.....	38
4.2. Curva de Crescimento.....	38
4.3 Detecção de viabilidade celular.....	38
4.4 Compostos.....	39
4.5 Citotoxicidade em macrófago.....	40
4.6 CC50 dos compostos.....	41
4.7 Triagem em promastigota.....	41
4.8 Análise de bioinformática.....	42
4.8.1. Estrutura tridimensional da proteína.....	42
4.8.2. Padronização do protocolo de ancoragem molecular.....	42
4.8.3. Ancoragem molecular dos compostos com a LbSRPK.....	43
4.9. Expressão, padronização e purificação da LbSRPK.....	43
4.9.1 Clonagem no vetor de expressão.....	43
4.9.2 Transformação das cepas bacterianas e indução da expressão com IPTG.....	44
4.9.3 Testes para padronizar as condições de expressão.....	46
4.9.4 Purificação da proteína com coluna em FPLC.....	46
4.9.5 - Avaliação da expressão por SDS e confirmação da especificidade por Western blot.....	47
4.10 Análises estatísticas.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Curva de Crescimento.....	49
5.2. Ensaio de citotoxicidade.....	50
5.3. CC50 dos compostos.....	51
5.4. Toxicidade dos compostos em promastigotas.....	54
5.5. Bioinformática.....	56

5.5.1 Estrutura tridimensional da proteína.....	56
5.5.2. Padronização da ancoragem molecular.....	59
5.5.3. Ancoragem dos compostos com LbSRPK.....	60
5.6. Expressão e purificação da proteína recombinante LbSRPK em E. coli BL21 (DE3).....	76
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8. ANEXOS.....	93
APÊNDICE A - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações de hidrogênio.....	95
APÊNDICE B - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações carbono-hidrogênio.....	97
APÊNDICE C - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo π-π empilhamento-T.....	99
APÊNDICE D - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo π-sigma.....	101
APÊNDICE E - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo alquil e π-alquil.....	103
APÊNDICE F - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - π-amida.....	107

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que afetam diversos países no mundo, especialmente na África, América do Sul e sudeste asiático (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; VERMA *et al.*, 2022, OMS 2024). São transmitidos aos seres humanos e outros mamíferos hospedeiros pela picada do flebotomíneo, artrópode sugador de sangue, infectado quando a fêmea se alimenta de sangue (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022). O parasito apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo duas formas principais: amastigota (forma infecciosa que se desenvolve no interior dos macrófagos) e promastigota (forma infecciosa que é transmitida pela picada do flebotomíneo) (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

A doença apresenta várias formas clínicas, entre elas a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Visceral (LV ou Calazar). A Leishmaniose Cutânea se manifesta por lesões ulcerativas, muitas vezes autocicatrizantes, sendo a forma mais simples da doença. A Leishmaniose Mucocutânea pode evoluir da forma cutânea, sendo caracterizada por lesões desfigurantes nas mucosas do nariz, boca, nasofaringe, pálpebras e outras regiões, prejudicando a respiração e a nutrição (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A Leishmaniose Visceral, por sua vez, é a forma mais grave da doença devido ao seu caráter sistêmico, com proliferação do parasito em macrófagos do fígado, baço e medula óssea, levando ao comprometimento desses órgãos e sendo fatal em 90% dos casos não tratados (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O tratamento de Leishmanioses é complexo, a maioria dos medicamentos são caros, inespecíficos, causam muitos efeitos colaterais (alta toxicidade) e a administração é complicada porque normalmente é feita de forma parenteral, o que dificulta ainda mais o tratamento por ser doloroso e precisar do deslocamento do paciente até uma unidade de saúde, além de casos de resistência parasitária já relatados (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021). As principais drogas antiparasitárias incluem Antimoniais Pentavalentes, Anfotericina B, Miltefosina, Paromomicina, Pentamidina e Sitamaquina (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; ROATT *et al.*, 2020; SEIFERT, 2011)

Nesse cenário, o desenvolvimento de medicamentos melhores e mais baratos para o tratamento de Leishmanioses é uma necessidade a ser considerada e a busca por novos alvos farmacológicos tem crescido. As proteínas cinases são proteínas que exercem um papel fundamental no metabolismo e ciclo celular da maioria dos organismos e estudos já mostraram sua presença e importância em tripanossomatídeos e em *Leishmanias* (BORBA et al., 2019; EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021). Nosso grupo de pesquisa é pioneiro nos estudos relacionados às proteínas *Serine-Arginine Protein Kinases* (SRPKs) como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de Leishmanioses (PIMENTEL et al., 2023, LEOPOLDO, 2022, TEIXEIRA 2018).

As SRPKs são proteínas que fosforilam resíduos específicos de serina e arginina em proteínas SR que apresentam esse motivo dipeptídico (GIANNAKOUROS et al., 2011; ZHENG, K.; REN; WANG, 2023). As proteínas SR estão associadas ao processamento do RNAm como maturação do spliceossomo e *splicing* alternativo e assim acabam atuando em funções importantes relacionadas ao ciclo celular. Não se conhece muito sobre a função da SRPK em *Leishmania*, uma vez que essas proteínas estão relacionadas ao processo de *cis-splicing* e em organismos como os tripanossomatídeos os RNAs são processados por *trans-splicing* (MICHAELI, 2011).

Nos estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, inibidores clássicos de SRPK como 340N-(2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil) isonicotinamida (SRPIN340) e análogos desses compostos como os pertencentes ao grupo SRVIC demonstraram uma atividade leishmanicida promissora, o que mostra seu potencial como alvo farmacológico (PIMENTEL et al., 2023, LEOPOLDO, 2022, TEIXEIRA 2018). Mais estudos precisam ser feitos para entender melhor sobre as características dessa proteína e estudar o efeito de possíveis inibidores na viabilidade dos parasitos.

Estudos mostraram que parece existir mecanismos patológicos em comum entre algumas manifestações de leishmanioses e alguns tipos de câncer, o que pode levar a semelhanças nos sintomas e confusão no diagnóstico, e também parece haver uma correlação onde a presença de um pode favorecer o aparecimento do outro. (KOPTERIDES et al., 2007; RASHIDI et al., 2021) Esses estudos sugerem que ambas as doenças podem ter alvos moleculares em comum e que os mecanismos relacionados tanto ao desenvolvimento dos parasitos quanto ao crescimento desordenado das células tumorais podem ser parecidos (SCHWING et al., 2019).

Considerando também que alguns compostos antitumorais demonstraram atividade leishmanicida como os selenocompostos, derivados de naftilamida, além de medicamentos já usados no tratamento de câncer como a cisplatina, miltefosina e tamoxifeno e que também se mostraram eficazes contra leishmanioses (RASHIDI et al., 2021). Torna-se relevante avaliar compostos que demonstraram potencial inibitório no crescimento de células cancerígenas quanto à uma possível atividade leishmanicida (RASHIDI *et al.*, 2021).

Muitos compostos naturais têm se mostrado promissores na prevenção e no tratamento de vários tipos de câncer, sendo que alguns estudos têm sido feitos com o eugenol, um composto aromático, que pertence à classe dos fenóis e pode ser extraído de várias plantas aromáticas como *Ocimum gratissimum* e têm propriedades antioxidantes, analgésicas, antimutagênicas, antiplaquetárias, antialérgicas, anti-inchaço e anti-inflamatórias bem descritas na literatura (ULANOWSKA; OLAS, 2021). Além dessas propriedades, há estudos testando o óleo essencial rico em eugenol e compostos derivados do eugenol da classe dos triazóis que mostraram atividade leishmanicida contra promastigota e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (EVANGELISTA *et al.*, 2023; ISLAMUDDIN; SAHAL; AFRIN, 2013; OCHOA *et al.*, 2021; TEIXEIRA R *et al.*, 2018, 2022; UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006).

Assim, testar compostos derivados do eugenol contendo diversos grupos funcionais para avaliar seu potencial leishmanicida pode ser uma estratégia efetiva na busca por compostos que não sejam tóxicos para a célula hospedeira.

Neste trabalho, oito compostos derivados do eugenol da classe das amidas aromáticas com diferentes substituintes no anel aromático, sintetizados pelo grupo de pesquisa chefiado pela professora Patrícia Fontes Pinheiro do departamento de Química Geral da Universidade Federal de Viçosa foram testados quanto a toxicidade em células de macrófago murino tipo RAW 264.7 e quanto a atividade leishmanicida em promastigota de *Leishmania braziliensis*. Foram realizados também estudos de ancoragem molecular desses compostos frente a proteína LbSRPK para avaliar o potencial desses compostos em interagir e possivelmente atuar como inibidores dessa proteína. Espera-se com esses estudos entender melhor sobre o papel da LbSRPK como alvo farmacológico no combate à Leishmaniose Cutânea causada pela *Leishmania*

braziliensis além de estudar compostos derivados do eugenol da classe N-fenil amidas como possíveis inibidores e seu potencial efeito leishmanicida.

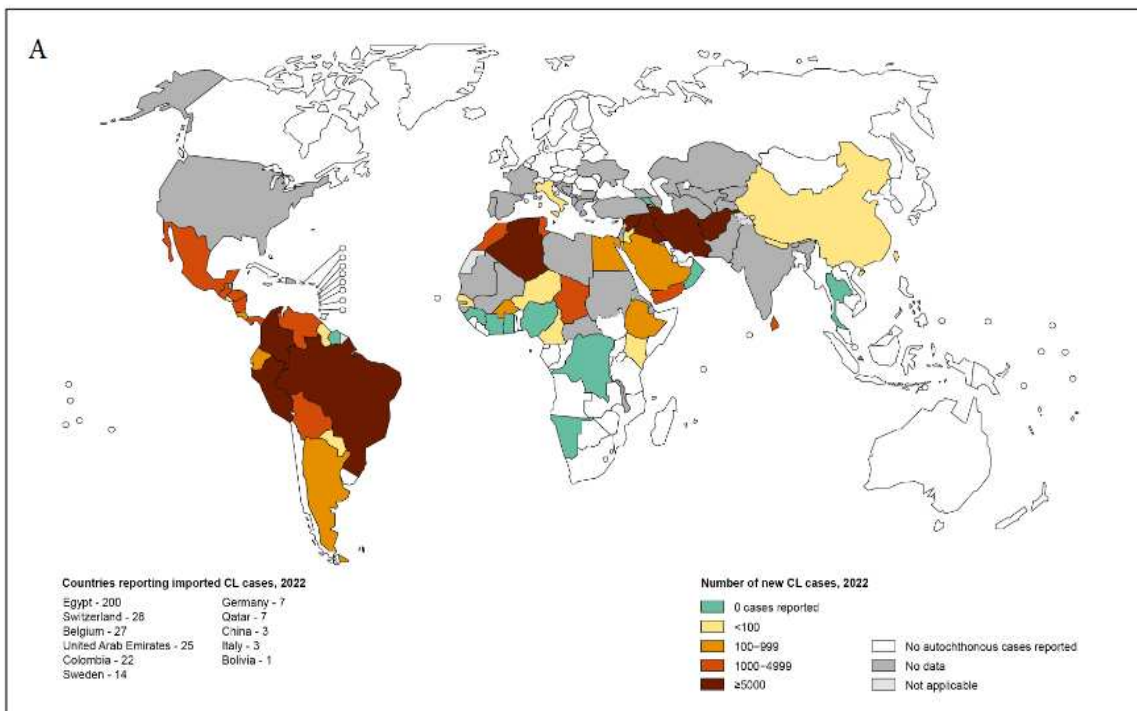
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leishmanioses: transmissão e manifestações clínicas

As Leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas infecciosas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae* (VERMA *et al.*, 2022). Existem várias espécies que são patogênicas para os seres humanos, estando agrupadas no subgênero *Leishmania* e *Viannia* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

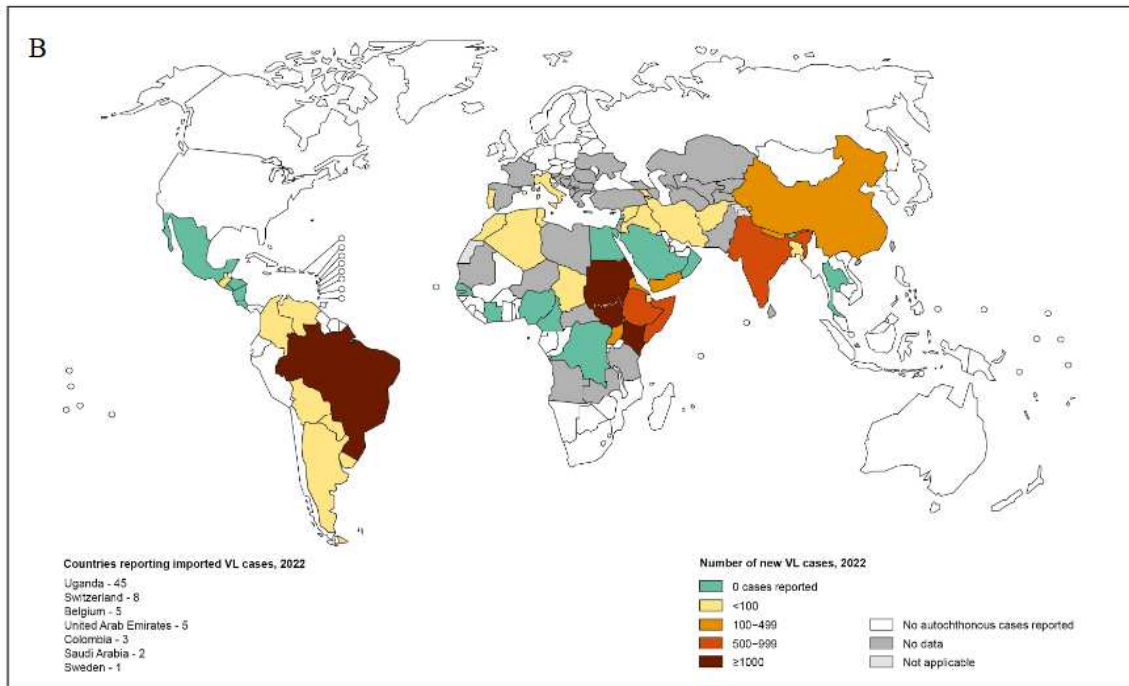
No cenário mundial, as leishmanioses são endêmicas em países da Ásia, África, América e no mediterrâneo (ARENAS *et al.*, 2017), afetando principalmente regiões mais pobres e com menos acesso a saneamento básico e serviços de saúde (PAN, 2022), (Figura 1 A e B). Na América, leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde, afetando milhares de pessoas com sua alta taxa de morbidade e mortalidade (PAN, 2022; OMS, 2024).

Figura 1 A: Status da endemicidade da Leishmaniose Cutânea (LC) no mundo em 2022.



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde

B: Status da endemicidade da Leishmaniose Visceral (LV) no mundo em 2022.

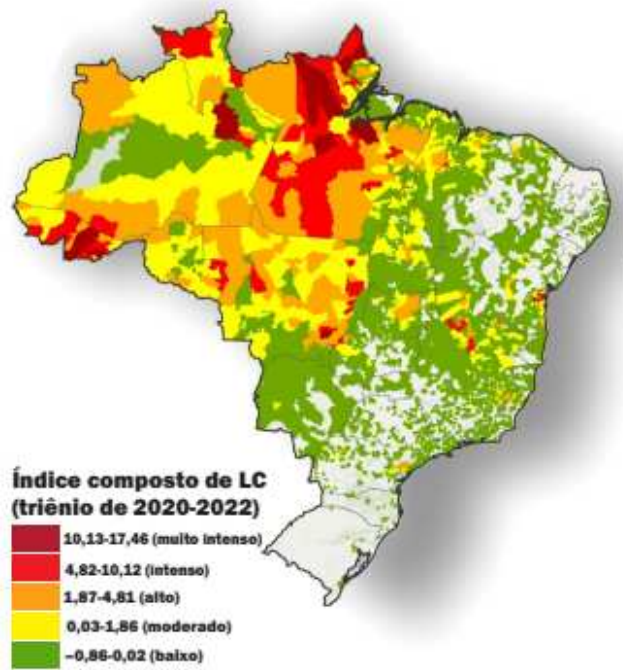


Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde

As manifestações clínicas da Leishmaniose variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e com a resposta imune do hospedeiro, mas em geral as três principais formas são a **Leishmaniose Cutânea (LC)**, **Leishmaniose Mucocutânea (LMC)** e **Leishmaniose Visceral (LV)**, sendo a última a forma mais grave da doença por ser fatal em 90% dos casos não tratados (ARENAS *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2021; PAN 2022).

O Brasil é um dos mais afetados pela Leishmaniose na América, sendo, com Colômbia e Peru, um dos 9 países com maior índice de leishmaniose cutânea do mundo (OPAS 2023). Com maior número de novos casos de Leishmaniose Mucocutânea na América em 2023 e, apesar da grande redução de casos de 2021 para 2022, houveram mais de 12.000 novos caso de Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea no país em 2022 (OPAS 2023), a **Figura 2** mostra o índice de LC no Brasil de 2020 a 2022. Além disso, tanto a Leishmaniose Cutânea quanto a Visceral são endêmicas no Brasil (OPAS 2023).

Figura 2: Índice de Leishmaniose Cutânea no Brasil de 2020 a 2022.



Fonte: Adaptado de Informe Epidemiológico das Américas, OPAS, 2023.

De modo geral, as Leishmanioses são transmitidas principalmente pela picada das fêmeas infectadas dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (VERMA *et al.*, 2022). Flebotomíneos são artrópodes e insetos incluídos na ordem Diptera cuja as fêmeas se alimentam de açúcares vegetais - para energia de voo e longevidade; e de sangue para postura de ovos e se desenvolver (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022) . Existem 6 gêneros de flebotomíneos, dos quais *Phlebotomus* e *Lutzomyia* incluem espécies que se alimentam de sangue humano e estão envolvidos em transmissão de doenças.

No Velho Mundo (África e Ásia), são transmitidas pelos gêneros *Phlebotomus* e no Novo Mundo (África e América) pelo gênero *Lutzomyia*, sendo que há mais de 30 espécies diferentes de flebotomíneos que servem como vetores para as mais diversas espécies de *Leishmania* (**Tabela 1**) (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA).

Tabela 1: Dados sobre espécies de *Leishmanias*, as manifestações clínicas causadas por essas espécies, os principais vetores flebotomíneos e as principais regiões afetadas.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Manifestação clínica	Vetor de transmissão	País/Região de incidência
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC e LCD	<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia neivai</i> , <i>Lutzomyia carrerai</i>	América do Sul
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	LV e LDPK	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i> , <i>Phlebotomus alexandri</i>	Índia, Bangladesh, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	LC	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i> , <i>Phlebotomus salehi</i> , <i>Phlebotomus caucasicus</i>	Irã, Arábia Saudita, norte da África, Oriente Médio, Ásia Central e África Ocidental
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	LC e LV	<i>Phlebotomus Larroussius subgenus</i> (e.g., <i>P. ariasi</i> , <i>P. Perniciosus</i>), <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia cruzi</i>	China, sul da Europa, Brasil e América do Sul para LV e CL; América Central para CL
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD e LCDs	<i>Lutzomyia olmeca</i> , <i>Lutzomyia ayacuchensis</i>	América do Sul

<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i>	LC, LCD e LCDs	<i>Lutzomyia</i> <i>flaviscutellata</i>	América do Sul
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i>	LC, LCD e LCDs	<i>Lutzomyia</i> <i>flaviscutellata</i>	América do Sul

LC – Leishmaniose Cutânea; LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa; LMC – Leishmaniose Mucocutânea; LV – Leishmaniose Visceral; LDPK – Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar; LCDs – Leishmaniose Cutânea Disseminada.

Fonte: Adaptada de Cecílio 2022

Quanto às manifestações clínicas, a LC é caracterizada pela formação de pápulas no local da inoculação, que são úlceras arredondadas com bordas pontiagudas e ocorrem geralmente em áreas expostas do corpo como rosto e extremidades (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021; ARENAS *et al.*, 2017). Essas pápulas podem durar de poucos meses até anos, não são dolorosas, podem ser solitárias ou múltiplas, se espalhando para locais perto de onde ocorreu a picada (difusa); não é comum febre (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021), Em muitos casos as feridas podem se curar espontaneamente, deixando uma cicatriz no lugar ou podem também reabrir após um tempo (ARENAS *et al.*, 2017). A LC também pode se desenvolver para formas mais graves como a LMC, a Leishmaniose Difusa (LCD) e Leishmaniose Disseminada (LD) a depender da espécie causadora (REIMÃO *et al.*, 2020).

LD é uma forma mais grave da LC caracterizada pela presença de várias lesões cutâneas polimórficas distribuídas por regiões do corpo não contíguas, podendo também afetar a mucosa nasal. Ainda não se sabe o que leva ao seu aparecimento, estando relacionada a vários fatores como ambiente e resposta imune tanto do hospedeiro quanto do parasito, além disso, o tratamento é difícil e tem baixa taxa de cura (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019). A LCD, por sua vez, é caracterizada por lesões cutâneas difusas que podem se espalhar por todo o corpo do paciente, sendo também considerada uma forma mais rara e mais grave da doença. Está associada a uma resposta imune inadequada do hospedeiro e seu tratamento também é um desafio por

causa das constantes recidivas ou da não resposta do paciente aos tratamentos (SAMPAIO *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2020).

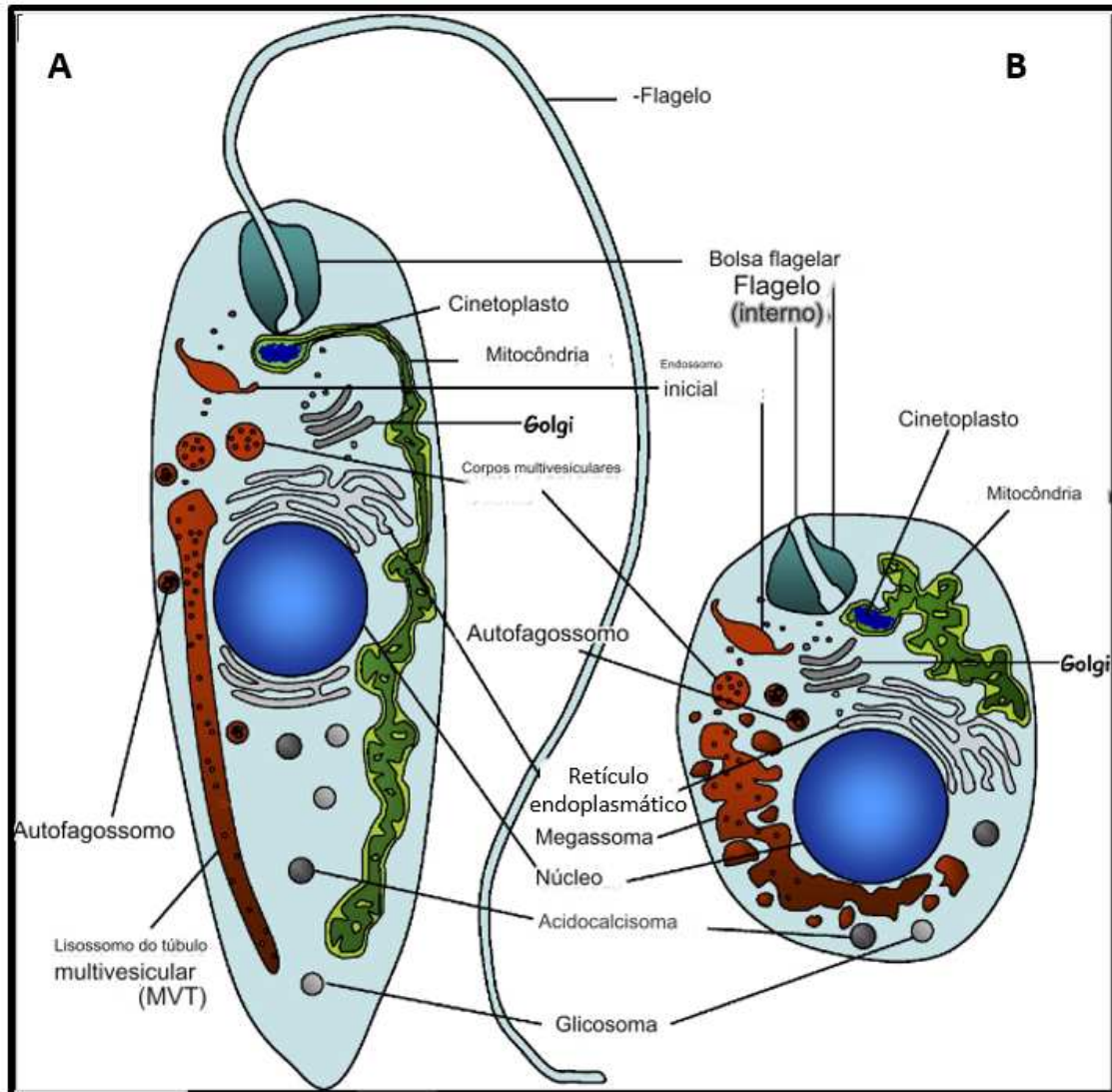
A LMC geralmente é associada com a LC ou pode ocorrer quando as lesões cutâneas já foram resolvidas. Em muitos casos, a infecção se espalha pelo sangue ou linfa e chega até as mucosas, sendo a nasal e a oral as mais afetadas. Entretanto há casos onde a orofaringe e a laringe são afetadas, no qual as lesões também são ulceradas e podem causar desfiguração, causando assim grandes problemas para a respiração, nutrição e o convívio social do paciente (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021).

Na LV, por sua vez, os parasitos se espalham pelo organismo e chegam à medula óssea, baço e fígado; os sintomas incluem febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço) e aumento dos linfonodos, alguns casos podem ter o desenvolvimento de lesões cutâneas que podem ser pápulas ou apresentar hiperpigmentação levando à Leishmaniose dérmica pós-Calazar (LDPK). (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021). A LDPK não é uma condição fatal e é considerada uma complicação dermatológica da LV observada em pacientes às vezes muitos anos após o tratamento para LV (VOLPEDO *et al.*, 2021).

2.2.Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é complexo e envolve duas formas genéticas principais (**Figura 3**), ocorrendo uma parte no hospedeiro vertebrado como cães, ser humano e outros mamíferos (forma amastigota) e outra parte no vetor invertebrado, isto é, no flebotomíneo (forma promastigota) (ROUTARAY *et al.*, 2022; VERMA *et al.*, 2022). A diferenciação do estágio de promastigota para amastigota é uma etapa crucial para a sobrevivência do parasito (ROUTARAY *et al.*, 2022).

Figura 3: Diferença morfológica entre as duas formas digenéticas observadas em leishmanias Em **A** forma promastigota e em **B** forma amastigota com algumas estruturas destacadas.



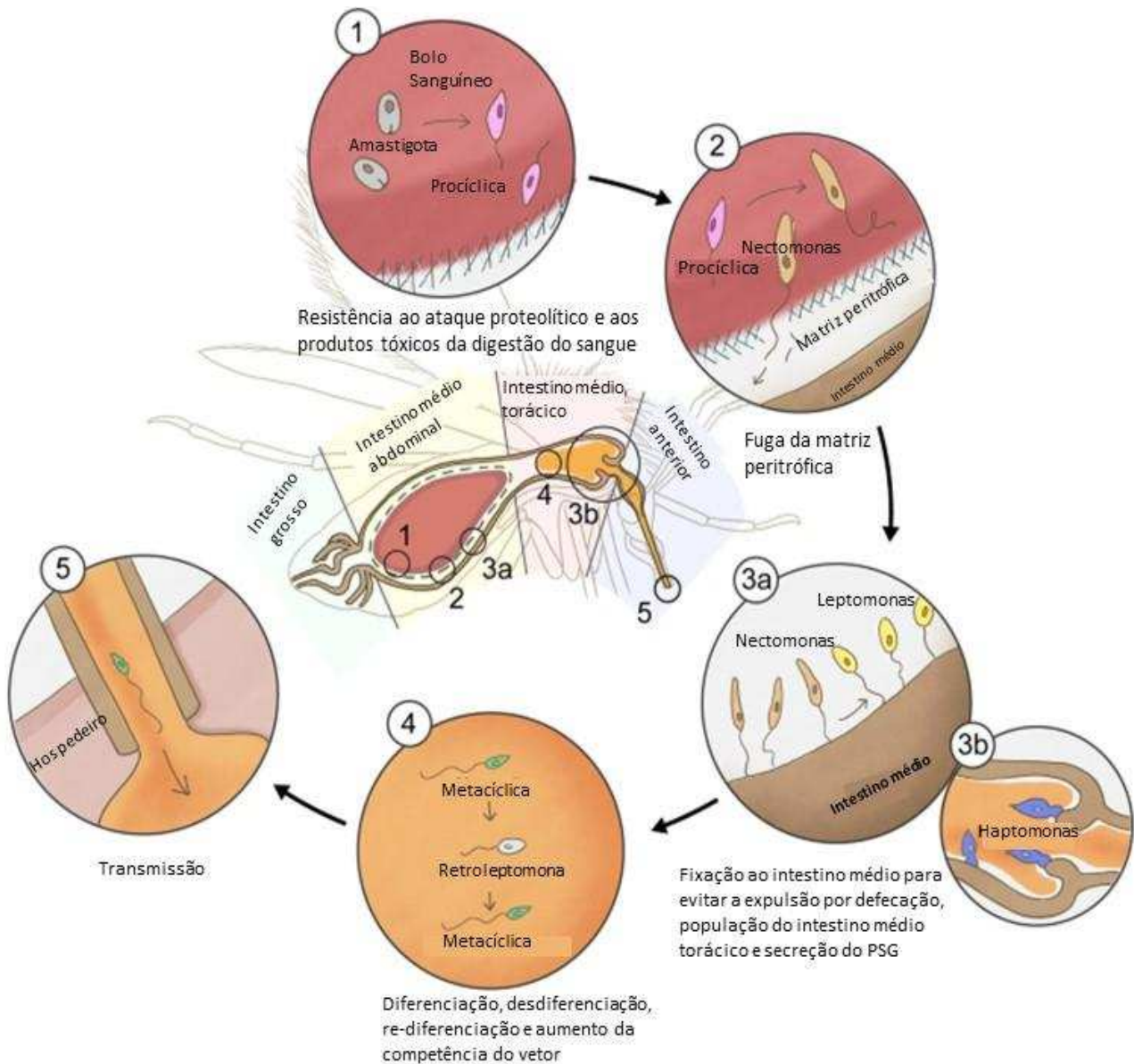
Fonte: Adaptado de Besteiro 2007.

Apesar de apresentar principalmente as formas citadas, existem outras variações de promastigota, resultado da diferenciação do parasito ao longo do ciclo de vida dentro do flebotomíneo (**Figura 4**) (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022). De forma simplificada, o ciclo de *Leishmania* começa quando as fêmeas dos flebotomíneos se alimentam de sangue onde os macrófagos estão contaminados com a forma amastigota do parasito (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). A mudança brusca nas condições ambientais desencadeiam alterações morfológicas no parasito e este se diferencia para a

forma **promastigota pró-cíclicas (Figura 4(1))**, nessa etapa, o parasito precisa sobreviver nas condições hostis do intestino do flebotomíneo e se replicar (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Para isso, o parasito precisa romper a estrutura da matriz peritrófica (estrutura presente no intestino dos flebotomíneo que envolve o bolo sanguíneo durante a digestão do sangue) e se fixar no intestino para não ser eliminado por defecação com os restos do repasto sanguíneo, para isso, os promastigota pró-cíclicos se diferenciam numa forma conhecida como **promastigota nectomona (Figura 4 (2))** (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

Essas formas do parasito migram para o intestino anterior do flebotomíneo e se diferenciam em **promastigota leptomonas (Figura 4 (3a))** que é uma forma mais curta, replicativa e que é responsável pela produção do PSG (*promastigote secretory gel*) que é essencial no processo de transmissão do parasito (TOM *et al.*, 2024). As leptomonas passam por um processo de metaciclogênese e se diferenciam em **promastigota metacíclica (Figura 4 (5))** que é a forma infecciosa do parasito para hospedeiros vertebrados. Fora essas formas citadas, há outras como as haptomonas e retroleptomonas (**Figura 4 (3b e 4)**) que são importantes para a sobrevivência e replicação do parasito (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; TOM *et al.*, 2024).

Figura 4: Diferentes formas de promastigota que ocorrem dentro do vetor flebotomíneo.



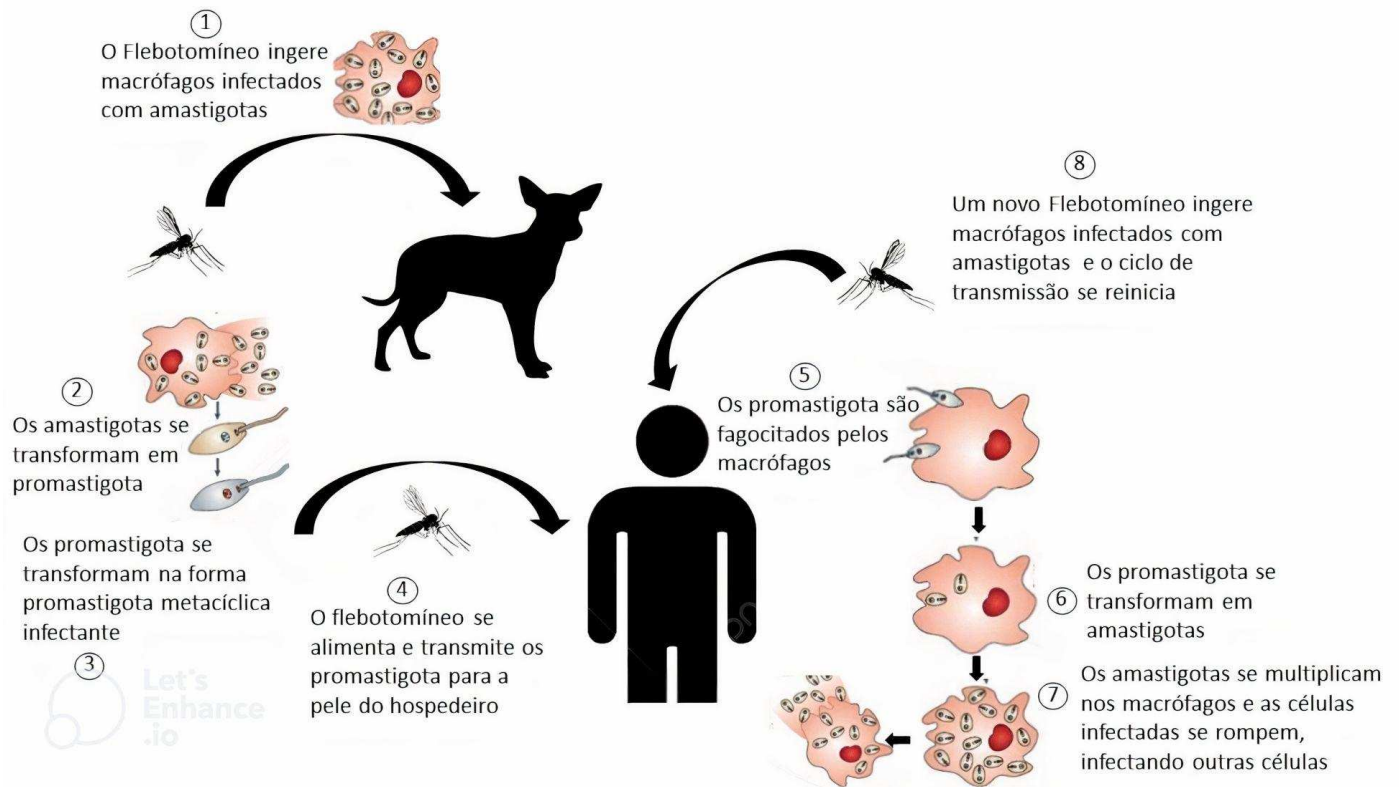
1 – Amastigotas se diferenciando em promastigotas procíclicas no intestino do flebotomíneo; 2 – Diferenciação de procíclicas em nectomonas para escapar da matriz peritrófica; 3a – Diferenciação em leptomonas, que se fixam no intestino do flebotomíneo, se replicam e produzem PSG; 3b – Haptomonas fixadas na válvula estomodeal do flebotomíneo; 4 – Dinâmica de diferenciação e desdiferenciação de metacíclica para leptomonas (retroleptomonas) e novamente para metacíclicas; 5 – promastigota metacíclica sendo transmitida para novo hospedeiro .

Fonte: Adaptado de Cecílio, 2022.

Durante a alimentação sanguínea do flebotomíneo infectado com *Leishmania*, as formas metacíclicas serão depositadas na pele do hospedeiro por regurgitação, esse processo é facilitado por uma série de mecanismos, entre eles o gel PSG que age como um tampão atrapalhando o fluxo do sangue para o intestino médio; e os danos que os parasitos causam na válvula estomodeal do flebotomíneo (TOM *et al.*, 2024). Como o PSG atrapalha a alimentação, o flebotomíneo infectado com *Leishmania* pica mais vezes o hospedeiro vertebrado tentando se alimentar; o gel facilita também a regurgitação, aumentando assim a possibilidade dos parasitos serem transmitidos.

Como leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios, após transmissão ao hospedeiro vertebrado, eles precisam invadir a célula hospedeira. Em mamíferos leishmanias residem principalmente nos macrófagos, onde se diferenciam de promastigota para amastigotas imóveis (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; ROSSI; FASEL, 2018). Algumas espécies de leishmanias precisam do recrutamento de outras células do sistema imune como monócitos inflamatórios e neutrófilos no local da infecção para estabelecerem uma infecção eficiente (ROSSI; FASEL, 2018). Quando um novo flebotomíneo ingerir esse sangue contaminado, o ciclo da doença será reiniciado (**Figura 5**) (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; TOM *et al.*, 2024)).

Figura 5: Esquema simplificado do ciclo de vida de *Leishmania*, passando pelo vetor flebotomíneo e o vetor vertebrado.



Fonte: Feito pela autora, baseado e adaptado de Lipoldová, 2006

2.3. Diagnóstico e tratamentos

Um diagnóstico precoce, preciso e eficiente pode contribuir para a eficácia do tratamento da doença (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). O diagnóstico para Leishmanioses envolve inúmeros desafios como as diversas formas de manifestação, casos assintomáticos ou co-infecção com outros parasitos, identificação imprecisa da espécie causadora (KUMARI *et al.*, 2021), e sintomas semelhantes a outras doenças como tuberculose, febre tifoide e malária (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Os principais métodos diagnósticos incluem os exames parasitários, imunológicos e moleculares (REIMÃO *et al.*, 2020; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Os métodos parasitológicos são baseados na detecção e visualização das formas promastigota e amastigota em tecidos infectados que, embora seja bastante específica para identificar a doença não é sensível o suficiente e não consegue discriminar entre as

espécies de *Leishmania* (REIMÃO *et al.*, 2020). Basicamente, as amostras são adquiridas por biópsia ou raspagem da lesão e coradas com Giemsa para o exame histopatológico. Há também a técnica de *press-imprint-smear*, onde o tecido recolhido para análise é prensado entre duas lâminas de vidro por pressão, em seguida esses esfregaços são corados com Giemsa e avaliados no microscópio, onde é possível identificar as formas amastigotas como corpos redondos ou ovoides dentro das células do tecido (KUMARI *et al.*, 2021). Essa técnica é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de LV por ser possível a observação de amastigotas em tecidos da medula óssea. O exame microscópico também não permite a identificação de espécies de *Leishmania*, o material obtido a partir das lesões é cortado e observado em microscópio, também só é possível a visualização de amastigotas (REIMÃO *et al.*, 2020).

Uma técnica interessante, mas raramente usada é o cultivo do material biopsado em um meio de cultura *in vitro*, esse método permite o isolamento e o desenvolvimento das formas promastigota e, apesar de não permitir a identificação de espécie, é uma técnica que pode facilitar essa identificação posteriormente por métodos moleculares (REIMÃO *et al.*, 2020). A desvantagem é que esse é um método demorado (7-21 dias de incubação), com considerável risco de contaminação da cultura e requer um laboratório sofisticado e mão de obra técnica (KUMARI *et al.*, 2021)

Os métodos moleculares são baseados em PCR e são os principais métodos para o diagnóstico molecular de leishmanioses, permitindo a detecção e tipagem de espécies; é uma metodologia interessante por sua viabilidade, segurança, sensibilidade e possibilidade de análise de várias amostras simultaneamente (KUMARI *et al.*, 2021; REIMÃO *et al.*, 2020). Como é possível fazer PCR a partir de amostras de sangue, é uma metodologia mais fácil do que a extração de amostras de tecido para a biópsia também (KUMARI *et al.*, 2021). As principais desvantagens desse método são a necessidade de equipamentos para biologia molecular, mão de obra especializada, risco de contaminação e incapacidade de diferenciar infecção atual e recidiva, além da dificuldade de diferenciar espécies cujos genomas sejam muito parecidos (KUMARI *et al.*, 2021). Além do PCR convencional, PCR em tempo real e PCR multiplex também podem ser usadas (REIMÃO *et al.*, 2020)

Outras formas de diagnóstico incluem os métodos imunológicos, baseados na detecção de antígenos ou anticorpos de *Leishmania*, tais como teste de anticorpos

fluorescente indireto (RIFI), ensaio imunoenzimáticos (ELISA), Western blot, teste de aglutinação indireta, teste de aglutinação em látex e outros (REIMÃO *et al.*, 2020). Tais testes são interessantes por serem rápidos e não invasivos e os principais desafios dessas técnicas são a reação cruzada com outras doenças infecciosas, falsos-positivos em regiões endêmicas e possibilidade de falsos-negativos em indivíduos co-infectados com HIV que apresentaram baixa contagem de anticorpos (KUMARI *et al.*, 2021; REIMÃO *et al.*, 2020). Cada uma das técnicas citadas apresenta diferentes níveis de sensibilidade, aplicação e faixas de especificidade que são próprias das características de cada metodologia (KUMARI *et al.*, 2021).

Apesar dos métodos citados, ainda há uma necessidade de desenvolver um teste que seja rápido, simples, preciso, com alta sensibilidade e que não precise de mão de obra especializada nem uma estrutura robusta, visto que em regiões endêmicas em países mais pobres essas condições dificilmente seriam satisfeitas (REIMÃO *et al.*, 2020).

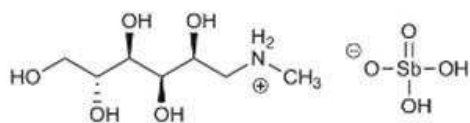
Quanto ao tratamento, as opções são limitadas, com vários efeitos adversos, custo elevado, dificuldade de administração (grande parte é por via parenteral, o que dificulta a adesão) e por serem usados há muito tempo, há vários relatos de cepas resistentes a eles (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; PRADHAN *et al.*, 2022; ROATT *et al.*, 2020). Também não existem vacinas eficientemente disponíveis para nenhum tipo de leishmaniose (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021). Entre os medicamentos convencionais estão os Antimoniais Pentavalentes, a Anfotericina B, a Miltefosina, Paromomicina e Pentamidina (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PRADHAN *et al.*, 2022; ROATT *et al.*, 2020). A **Figura 6** apresenta a estrutura química desses medicamentos.

Os **Antimoniais Pentavalentes** foram historicamente os primeiros a serem utilizados, podendo ser administrados por via muscular, intravenosa ou intralesional. As principais vantagens incluem fácil disponibilidade e baixo custo, porém, as injeções do medicamento são dolorosas e o mesmo apresenta efeitos adversos graves como cardiotoxicidade, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e alguns casos de resistência parasitária já foram relatados (TEIXEIRA *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2022) O antifúngico **Anfotericina B**, junto com suas formulações lipídicas, começaram a ser utilizados posteriormente como tratamento de segunda escolha e sua

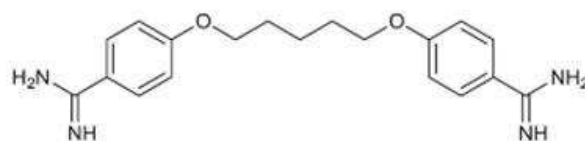
administração ocorre por via intravenosa, o que exige que o paciente seja internado. Há casos de resistência parasitária e efeitos adversos que incluem toxicidade renal (TEIXEIRA *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2022.).

A **Miltefosina**, é um análogo de fosfocolina administrado por via oral, o que facilita a administração, sendo bastante usado em LV e LC. Sua eficácia é considerada boa, porém, é um medicamento de alto custo e seus efeitos adversos incluem teratogenicidade, toxicidade renal e hepática, e também foram encontrados casos de resistência parasitária (TEIXEIRA *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2022.). A **Paromicina**, antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, por sua vez, mostrou um efeito interessante em LV na Índia, mas não foi tão bem sucedida em outras regiões, assim, sua eficácia precisa ser mais investigada. É um medicamento administrado por via intramuscular ou tópica; é relativamente barata, mas os efeitos adversos também incluem toxicidade renal, além da auditiva e hepática (TEIXEIRA *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2022.). Por fim, a **Pentamidina**, antifúngico utilizado no tratamento de pneumonia, é administrada por via intramuscular e apresenta uma eficácia razoável que depende da espécie de *Leishmania*, porém, apresenta alta toxicidade e efeitos adversos como hiperglicemia; hipotensão; taquicardia e alterações eletrocardiográficas (TEIXEIRA *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2022.).

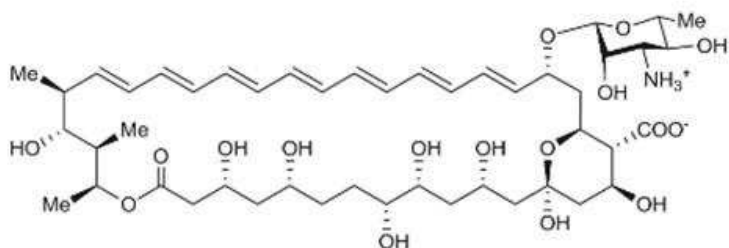
Figura 6: Estrutura dos principais medicamentos usados no tratamento de leishmanioses.



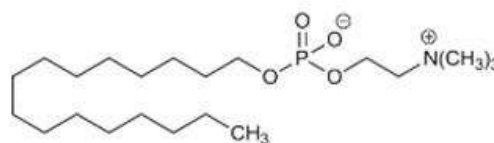
Antimoniato de N-metilglucamina



Pentamidina



Anfotericina B



Miltefosina



Paromicina

Fonte: Adaptado de Teixeira, R 2018

Considerando todas essas desvantagens dos medicamentos existentes para o tratamento das Leishmanioses, fica evidente a necessidade de estudos visando uma terapia mais eficaz, mais barata e menos danosa aos pacientes. Entre esses estudos, está a busca por componentes de vias metabólicas que são essenciais para a sobrevivência ou estabelecimento da infecção do parasito no hospedeiro e que podem servir como alvo farmacológico, seguidos por experimentos que visam a validação desses compostos

como alvos, sendo que um dos alvos mais utilizados são as proteínas cinases (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021)

2.4. Proteínas cinases como alvos farmacológicos

As proteínas cinases são proteínas que catalisam a transferência de um ATP para um resíduo de serina, treonina ou tirosina em proteínas substratos com domínios contendo esses aminoácidos (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021). As cinases exercem um papel fundamental em diversos processos celulares em praticamente todos os organismos eucarióticos, e estudos em *Leishmania* mostraram que essas proteínas estão envolvidas em processos como progressão do ciclo celular, diferenciação e virulência (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021), com base nisso, supõe-se que sua inibição afete a sobrevivência do parasito.

O estudo do kinoma de *Leishmania* é uma ferramenta muito usada para identificar proteínas cinases presentes no parasito e que podem servir como alvo farmacológico. As proteínas cinases eucarióticas (ePk) encontradas em *Leishmania* foram divididas em seis grupos de acordo com a conservação do grupo catalítico: CMGC, AGC, CAMK, STE, NEK e CK1, outras proteínas cinases como Aurora, Polo e AMP cinases também estão presentes nesses organismos (BAKER *et al.*, 2021). Dentre essas proteínas, o grupo CMGC é o mais estudado englobando, entre outras, as cinases dependentes de ciclina (CDKs), cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), glicogênio sintase 3 (GSK-3), quinases reguladas por tirosina de dupla especificidade (DYRKs) e outras (BAKER *et al.*, 2021; EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021).

Algumas dessas proteínas cinases são tão essenciais para a sobrevivência do parasito, que a deleção de seus genes não pode ser observada em promastigotas, entre elas as proteínas CRK1, CRK3, CRK12, MPK4, TOR1 e TOR2, corroborando a hipótese de que a inibição de proteínas cinases deve afetar drasticamente a sobrevivência dos parasitos (BAKER *et al.*, 2021).

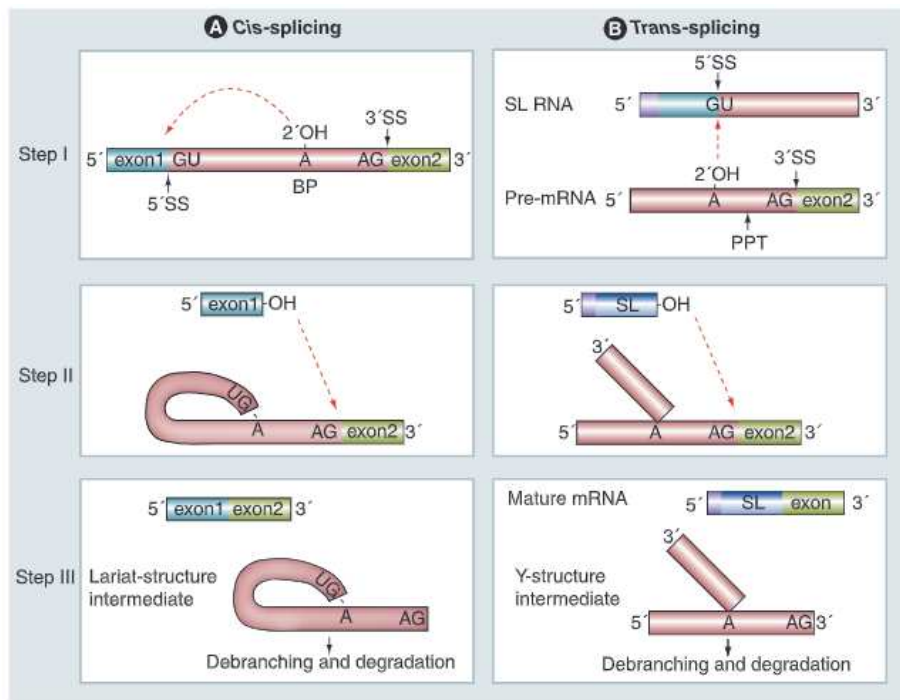
Nosso grupo de pesquisa vem estudando as SRPKs de *Leishmania* (*Serine/Arginine Protein Kinase*) (TEIXEIRA 2018; LEOPOLDO 2022; PIMENTEL *et al.*, 2023), proteínas que chamam a atenção por causa da sua importância na regulação

de processos relacionados ao *Splicing* (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; GIANNAKOUROS *et al.*, 2011). As SRPKs são cinases que fosforilam proteínas SR, que são um grupo de fatores de *Splicing* altamente conservados. As SRPKs regulam processos relacionados à maturação do spliceossomo, *Splicing* alternativo e processamento do RNA mensageiro, afetando assim processos celulares essenciais do metabolismo de organismos eucariotos (ZHENG; REN; WANG, 2023).

Alguns estudos identificaram a presença de SRPK em tripanossomatídeos, como o estudo de Portal e colaboradores (2003), que identificaram pela primeira vez a presença de SRPK no protozoário *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK) (PORTAL *et al.*, 2003). Estudo esse que mostrou a presença de uma rede de SR em protozoários. Outro estudo, envolvendo SRPK em *Plasmodium falciparum* (PfSRPK1), mostrou que a inibição desta proteína afetou o desenvolvimento sexuado desse protozoário levando ao bloqueio do desenvolvimento dos gametócitos e prejudicando a transmissão (KUMAR *et al.*, 2022).

Um dado importante é que em tripanossomatídeos os RNAs são processados de forma diferente de outros eucariotos, nesses organismos, os RNAs sofrem *trans-splicing*, possuindo uma sequência líder de *Splicing* (SL) que, em conjunto com a poliadenilação, serão usados para o processamento do RNAm (MICHAELI, 2011). O processo de *trans-splicing* é um processo de transesterificação em duas etapas, onde um intermediário em Y é formado, diferente do *cis-splicing* que forma uma espécie de laço (**Figura.7**) (MICHAELI, 2011). Considerando que SRPKs e SRs estão envolvidas em *cis-splicing*, sua função em *Leishmania* não seria totalmente conhecida.

Figura 7: Diferenças do processamento de RNAm quando esse ocorre via *cis*-Splicing (A) ou *trans*-Splicing (B).



Em *cis* a junção de éxons ocorre numa mesma molécula de RNAm, enquanto que no *trans* ocorre entre éxons que estão em diferentes fitas

Fonte: Michaeli 2011

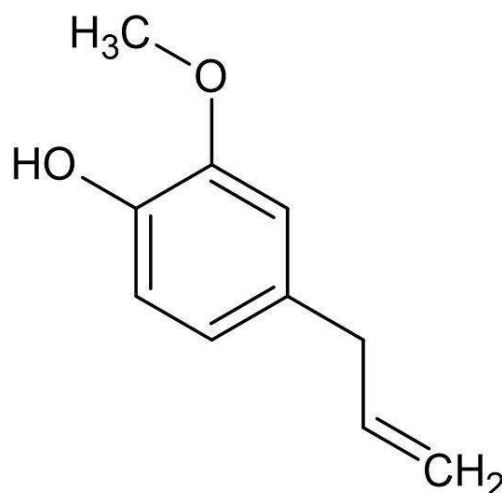
Entre os estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa estão as evidências da presença de uma SRPK em *Leishmania braziliensis* (LbSRPK) via análise de bioinformática e comparação da conservação de domínios com outras SRPKs conhecidas como TcSRPK, FpSRPK, SRPK1 e SRPK2 de humano e SRPK de *Saccharomyces cerevisiae* (DIXIT *et al.*, 2010; MOROOKA *et al.*, 2015; PIMENTEL *et al.*, 2023; PORTAL *et al.*, 2003) (PIMENTEL *et al.*, 2023). Além disso, houve também o estudo de alguns inibidores de SRPK como o 340N-(2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil) isonicotinamida (SRPIN340) - que já havia sido demonstrado como um inibidor de SRPK em células leucêmicas (MOROOKA *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2015) – e outros análogos do grupo SRVIC para avaliar a toxicidade em macrófago e efeito leishmanicida em *L. braziliensis* (PIMENTEL *et al.*, 2023).

Os resultados observados em macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com SRVIC22 e 32 foram promissores, pois foi observado uma redução da taxa de infecção e no número de amastigotas intracelulares (PIMENTEL *et al.*, 2023). Esse efeito leishmanicida poderia estar relacionado a inibição da LbSRPK, uma vez que os níveis de expressão da enzima aumentaram, podendo estar relacionado com uma tentativa de compensar o efeito de inibição através de um *up regulation*. Porém, mais estudos são necessários para avaliar tanto se a inibição da LbSRPK levou a essa redução no número de parasitos e por isso seria um alvo farmacológico interessante.

2.5. Atividade leishmanicida de Eugenol e derivados

O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$; fenilpropanoide - **Figura 8**) é um composto aromático, natural, pertencente ao grupo dos fenóis, que foi identificado em várias plantas aromáticas como *Myristica fragrans* - noz moscada; *Syzygium aromaticum* - cravo da Índia; plantas da família *Lauraceae* como *Cinnamomum verum* - caneleira verdadeira e *Cinnamomum Loureiroi* - canela de Saigão; da família *Lamiaceae* tem as espécies *Ocimum gratissimum* - manjerição-aniz e *Ocimum basilicum* - manjerição; além de ser o componente mais importante do óleo de cravo (TEIXEIRA *et al.*, 2018; ULANOWSKA; OLAS, 2021).

Figura 8: Estrutura química do eugenol.



Fonte: Elaborado pela autora baseado em Ulanowska 2021.

O eugenol possui várias propriedades antioxidantes, analgésicas, antimutagênicas, antiplaquetárias, antialérgicas, anti-edematogênica e anti-inflamatórias (ULANOWSKA; OLAS, 2021). Alguns estudos relataram a atividade leishmanicida do óleo essencial rico em eugenol: o estudo desenvolvido por Ueda-Nakamura e colaboradores (2006), por exemplo, observou que o óleo essencial rico em eugenol oriundo de *O. gratissimum* inibiu o crescimento tanto de amastigotas quanto de promastigotas em *L. amazonensis* (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006); Islamuddin e colaboradores (2013) observaram que o óleo essencial rico em eugenol da *S. aromaticum* teve efeito contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (ISLAMUDDIN; SAHAL; AFRIN, 2013).

Teixeira e colaboradores (2018) investigaram a atividade leishmanicida de 26 compostos derivados do eugenol com funcionalidade 1,2,3-triazol para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* sendo que um dos compostos (4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metilbenzil)-1 H -1,2,3-triazol teve uma atividade leishmanicida significativa (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Um outro estudou testou esses mesmos compostos 1,2,3-triazol contra *Leishmania braziliensis*, que é a principal espécie relacionada à Leishmaniose Tegumentar no novo mundo, e os compostos 4-((2-alil-6-metoxi)fenoximetil)-1-(4-clorobenzil)-1 H -1,2,3-triazol (8c) e 4-((2-alil-6-metoxi)fenoximetil)-1-(4-trifluoro-metoxibenzil)-1 H -1,2,3-triazol (8h) foram os que demonstraram melhor atividade e uma baixa toxicidade (EVANGELISTA *et al.*, 2023).

Todos esses resultados citados corroboram o potencial do eugenol e seus derivados como agente leishmanicida. Apesar dos efeitos observados, o mecanismo de ação do eugenol em *Leishmania* ainda não foi elucidado, sendo que mais estudos serão necessários para entender a nível molecular e metabólico o efeito que o eugenol e seus derivados causam em células de *Leishmania*. (HUGHES *et al.*, 2023).

Embora esse mecanismo de ação não seja totalmente esclarecido, os estudos sobre mecanismos moleculares e celulares do eugenol relacionados à prevenção e terapia do câncer mostraram que eugenol induz citotoxicidade, inibe fases dos ciclos celulares, morte celular programada e autofagocitose em linhagens de células tumorais,

sendo que os mecanismos variam de acordo com o tipo de câncer, dose e tempo (OCHOA et al., 2021).

Há algumas semelhanças entre as manifestações clínicas de alguns tipos de câncer e certas formas de Leishmanioses, como a LC e a LMC, que podem ser diagnosticadas incorretamente como carcinoma de células escamosas, ou a LV, que possui sintomas semelhantes à leucemia infantil, como anemia, esplenomegalia (aumento do baço), febre e perda de peso (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021; RASHIDI *et al.*, 2021). Além disso, muitos medicamentos usados no tratamento do câncer possuem ação leishmanicida como agentes antineoplásicos alquilantes como a cisplatina, que induz morte celular em células tumorais e em células do parasito, e a miltefosina, que originalmente é utilizada no tratamento de câncer de mama e ao mesmo tempo é um dos medicamentos mais usados para o tratamento da Leishmaniose. Tudo isso são evidências que apontam para a existência de mecanismos semelhantes de patogenicidade e alvos terapêuticos em comum entre células cancerosas e células do parasito (RASHIDI *et al.*, 2021). Considerando essas semelhanças mencionadas, consideramos promissor avaliar compostos que demonstraram atividade contra o câncer quanto à sua possível atividade leishmanicida, como é o caso do eugenol (OCHOA et al., 2021).

Considerando também o estudo de Abdullah e colaboradores que investigaram o efeito do eugenol em células de câncer de mama e encontraram que as células tratadas com eugenol apresentaram um aumento na expressão da proteína AKT (Proteína Cinase B) que é uma proteína relacionada principalmente ao crescimento e proliferação celular, sugerindo assim, que o eugenol e derivados podem agir como inibidores de proteínas cinases (ABDULLAH et al., 2021). Assim, esse trabalho também tem o interesse de investigar o potencial do eugenol como inibidor de LbSRPK e ferramentas de bioinformática relacionadas à ancoragem molecular serão utilizadas para isso.

2.6. Bioinformática no desenho racional de fármacos

Em geral, o desenvolvimento de um novo medicamento é bastante custoso e demorado, estima-se que pode levar até 13 anos e custar cerca de US\$ 1,8 bilhão. Além disso, problemas como toxicidade inesperada, falta de eficácia clínica e outros podem

surgir durante o desenvolvimento e impedir que um novo medicamento seja produzido (WOOLLER *et al.*, 2017). Nesse cenário, as ferramentas relacionadas à bioinformática podem ser uma grande ajuda. Bioinformática é um termo que se refere ao uso de técnicas computacionais para coletar e avaliar dados biológicos como genes e diversas moléculas, por meio de bancos de dados e *softwares*. (BEHL *et al.*, 2021).

Entre as abordagens feitas através da bioinformática para o desenvolvimento de novos fármacos está a avaliação da “drogabilidade” de um alvo, isto é, se determinada proteína, que é o alvo, pode se ligar a pequenas moléculas semelhantes a fármacos com alta afinidade (WOOLLER *et al.*, 2017). Esse estudo citado utiliza informações sobre a estrutura tridimensional da proteína e da estrutura de pequenas moléculas para realizar uma série de estudos como triagem *in silico* de encaixe de possíveis inibidores de proteínas nos seus sítios ativos, investigação dos sítios catalíticos das proteínas através de estudos de energia ou dinâmica molecular dessas regiões quanto à especificidade e estabilização de ligações. Também podem ser feitos estudo das propriedades químicas e dos parâmetros de bioatividade das moléculas testadas além de redes de interação molécula-molécula; proteína-proteína e molécula-proteína que podem ser usadas, entre outras coisas, no aprendizado de máquinas visando reposicionamento de fármacos. (WOOLLER *et al.*, 2017).

Um estudo que exemplifica a utilidade de algumas dessas ferramentas citadas é o trabalho de Durieu e colaboradores (2016), onde os pesquisadores selecionaram mais de 5000 compostos numa biblioteca virtual tendenciosa para cinases de *Leishmania*. Após encontrarem compostos com potencial para interagir *in silico*, os compostos foram testados quanto a atividade *in vitro*. Uma segunda triagem *in silico* foi realizada para identificar compostos mais específicos e mais potentes onde foi feita uma nova pesquisa num banco de dados de compostos por estruturas semelhantes às já encontradas, essas novas estruturas também foram avaliadas quanto a especificidade e capacidade de inibir a proteína *in vitro* (DURIEU *et al.*, 2016). Ao final do estudo, os pesquisadores conseguiram selecionar dois compostos que apresentaram características interessantes de inibição, especificidade e baixa toxicidade às células de macrófago (DURIEU *et al.*, 2016). Esse estudo exemplifica como uma triagem *in silico* pode ajudar a selecionar bons candidatos para os experimentos em bancada, economizando assim, tempo, material e ajudando a ter resultados mais positivos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de interação de oito compostos derivados do eugenol com *Serine Arginine Protein Kinase* de *Leishmania braziliensis* (LbSRPK), seu potencial leishmanicida em promastigotas e toxicidade em células de macrófago, além da padronização da expressão da LbSRPK para análises futuras.

3.2. Objetivos específicos

- Cultivar as células de macrófago RAW 264.7 e *Leishmania braziliensis* da cepa M2904 que serão utilizados nos experimentos;
- Avaliar citotoxicidade dos compostos em macrófagos;
- Determinar CC₅₀ dos compostos em macrófagos;
- Avaliar potencial leishmanicida dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis*;
- Realizar análises *in silico* das interações dos compostos com a LbSRPK;
- Seleção de domínios catalíticos da LbSRPK para construção do vetor adequado para expressão
- Expressar e otimizar a expressão da LbSRPK em cepa bacteriana (*Escherichia coli* BL21(DE3));

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo de células

Macrófagos murinos do tipo RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI - 1640 (Gibco) pH 7.2 suplementado com L-glutamina (2 mM), Penicilina (100 µg/mL), HEPES (25mM) e bicarbonato de sódio (2 g/L) e 10% de Soro Fetal Bovino, em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

As células de *Leishmania braziliensis* cepa M2904 foram cultivadas em meio Grace's (Sigma) pH 6.5, suplementado com L-glutamina (2 mM), Penicilina (100 µg/mL) e Soro Fetal Bovino a 10%, e incubadas em estufa a 25°C.

As células bacterianas de *Escherichia coli* tanto da cepa DH5α quanto da BL21 (DE3) foram cultivadas em meio Luria Bertani (Tryptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 10 g/L), acrescido de ágar 15 g/L quanto o meio for sólido (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012) e colocadas em estufa a 37°C para crescimento tanto em meio líquido quanto sólido.

4.2. Curva de Crescimento

A curva de crescimento da *L. braziliensis* foi feita a partir de um repique de 1×10^5 células/mL em Grace's suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo o dia do repique o dia 0 da curva. A partir do dia 1, as células foram contadas na Câmara de Neubauer todos os dias aproximadamente no mesmo horário. Para a contagem, as células foram homogeneizadas e diluídas em formalina 4% e 10 uL foram aplicados na câmara. Foram contadas três garrafas (triplicata biológica) e feita uma média da quantidade de células presentes nas garrafas.

4.3 Detecção de viabilidade celular

A detecção da viabilidade celular é feita pelo método de redução da resazurina (ou Alamar Blue): na célula viva, a resazurina é reduzida a resofurina e há uma mudança na coloração de azul para violeta/rosa, sendo que o grau da redução está relacionado com a atividade metabólica da célula (MIKUS; STEVERDING, 2000).

Para esse teste, 20 µL de resazurina foram adicionados 47 horas após a adição dos compostos na placa de 96 poços, em seguida a placa foi incubada a 37°C e foram feitas leituras de absorvâncias nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm após 1,2 e 3 horas de incubação.

Essas leituras foram usadas para o cálculo de redução da resazurina (GOEGAN; JOHNSON; VINCENT, 1995) seguindo a fórmula:

$$AR_{570} = (A_{570} - A_{600} R_0)$$

AR_{570} é a redução da resazurina

A_{570} e A_{600} são as absorvâncias nesses respectivos comprimentos de onda

R_0 é um fator de correção que consiste na razão da absorvância do meio a 570 pela absorvância do meio a 600 nm

Como controle, é considerado o meio com as células sem nenhum tratamento, considerado como 100% de viabilidade, a partir disso, o cálculo da viabilidade celular é considerado:

$$\%Viabilidade = (AR_{570}T / AR_{570}ST) * 100$$

$AR_{570}T$ é a redução da resazurina com tratamento, isto é, controles ou compostos

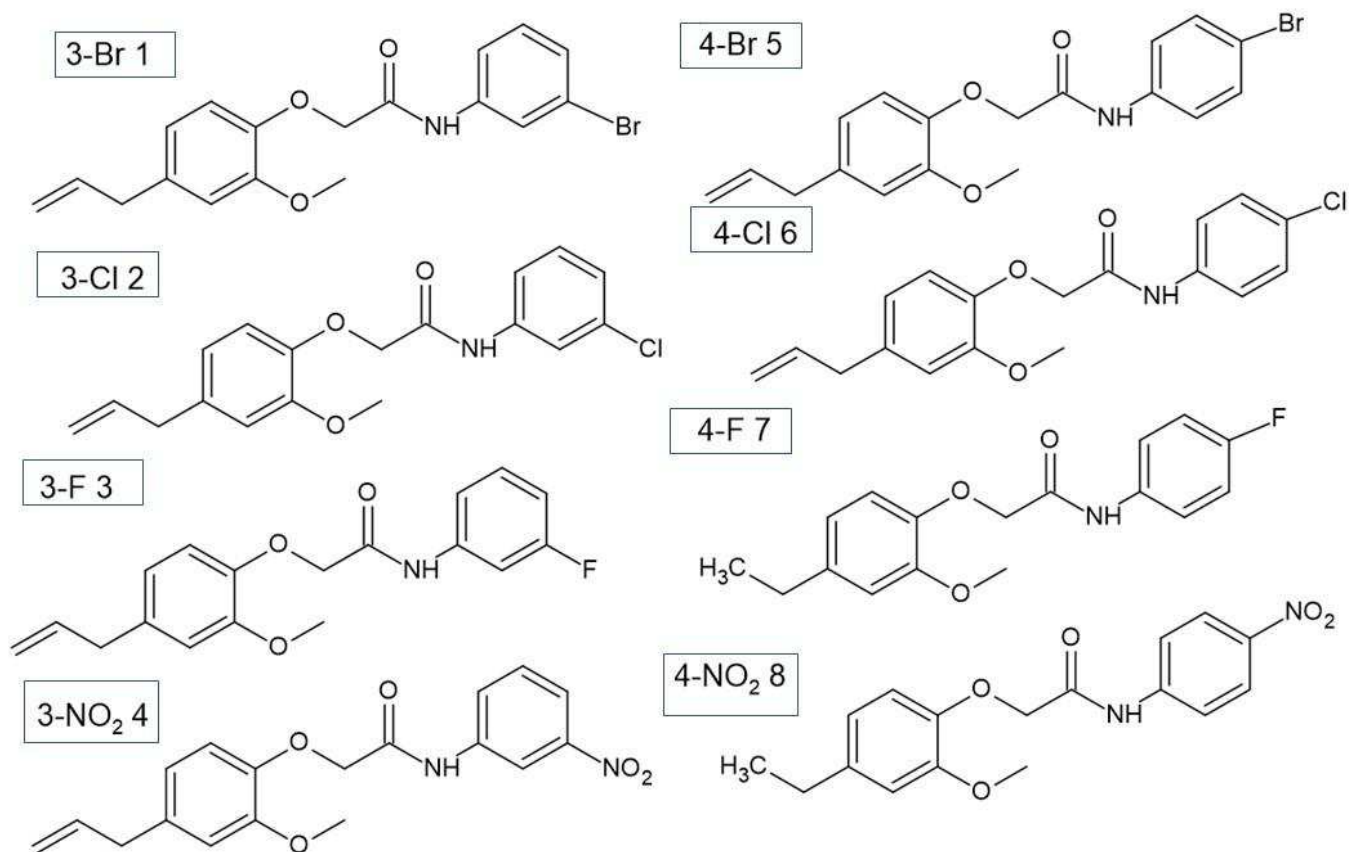
$AR_{570}ST$ é a redução da resazurina sem nenhum tratamento

4.4 Compostos

Os compostos usados neste trabalho são derivados do eugenol e foram sintetizados por um estudante do grupo de pesquisa chefiado pela professora Patrícia Fontes Pinheiro do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa e podem ser visualizados na **Figura 9**.

Os compostos foram diluídos inicialmente em 100% de DMSO estéril de modo a terem concentração de 10mM sendo esse o estoque de armazenamento; partindo desse estoque foram feitas as diluições de trabalho de 25 mM em 100% de DMSO e de 0.5 mM em DMSO 51% (RPMI incompleto e DMSO 100%).

Figura 9: Estrutura química dos ligantes



Fonte: Elaborado pela autora baseado nas estruturas fornecidas pela professora Patrícia Fontes Pinheiro. Os compostos foram numerados de 1 a 8 de acordo com o que está representado na figura

4.5 Citotoxicidade em macrófago

Os ensaios de citotoxicidade dos compostos em macrófagos foram feitos adicionando 1×10^5 células de macrófagos com 80 a 100% de confluência e alta viabilidade em cada poço de uma placa de 96 poços. Como controle foram usados poços apenas com meio RPMI, macrófagos tratados com DMSO 1%, macrófagos tratados com Anfotericina B a $3,125 \mu\text{M}$ (medicamento já usado para tratamento de Leishmanioses) e macrófagos sem tratamento. A placa foi colocada na estufa a 37°C e 5% de CO_2 , e esperado 4 horas para a aderência das células na placa. Após esse tempo,

os oito compostos foram adicionados na placa de 96 de modo que sua concentração final foi de 10 mM em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 horas para que os compostos pudessem agir.

A revelação da placa ocorreu com adição de 20 µL de resazurina 1 mM por poço, após a adição, a placa é incubada por 1 hora a 37°C e depois é feita a leitura do espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A leitura é repetida depois de duas e três horas e o cálculo da viabilidade celular é feito como descrito no item 4.3.

4.6 CC50 dos compostos

Para a detecção do CC50 (Concentration for 50% Cytotoxicity) dos compostos foram adicionadas 1×10^5 células de macrófagos em cada poço de uma placa de 96 poços, a placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas para adesão das células. Após esse tempo, foi feita uma diluição seriada dos compostos partindo da diluição de 1 mM até 15,625 µM e adicionado nos macrófagos, sendo essa adição feita em triplicata.

Como controle foram usados RPMI, macrófagos tratados com Anfotericina B (3,125 µM), macrófagos tratados com DMSO (1%) e macrófagos sem tratamento, também em triplicata.

4.7 Triagem em promastigota

Para avaliar a atividade leishmanicida dos oito compostos derivados do eugenol nas formas promastigotas da *L. braziliensis* foi feita uma placa de 96 poços contendo 4×10^6 células de leishmania na fase *log* por poço. Em seguida, foram adicionados os compostos de forma que sua concentração final fosse de 10 µM por poço e a concentração de DMSO não passasse de 1% (DMSO é tóxico para a leishmania acima dessa concentração), a placa foi colocada na estufa a 25°C e após 48 horas foi feita a revelação por resazurina e o cálculo de viabilidade celular como já mencionado.

4.8 Análise de bioinformática

4.8.1. Estrutura tridimensional da proteína

A predição da estrutura tridimensional da LbSRPK foi feita como descrita por Pimentel e colaboradores (2023) onde a sequência da proteína foi obtida no banco de dados de tripanossomatídeos *TritypBD - The Kinetoplastid Genomics Resource* (ID: LbrM.30.3610) e, em seguida, foi modelada por homologia a partir estrutura cristalizada da SRPK1 humana, cuja estrutura está depositada no *PDB- Protein Data Bank* (ID: 4WUA), sendo que a SRPK1 humana foi escolhida por apresentar mais de 40% de identidade com a sequência da LbSRPK. A estrutura da LbSRPK foi truncada, sendo a porção N-terminal e a região espaçadora removidas por serem partes flexíveis e que não são resolvidas na estrutura cristalizada (MOROOKA et al., 2015). A predição da estrutura foi feita usando o *Alphafold2*, o modelo em seguida teve a energia minimizada no *Yasara* e a qualidade do modelo foi avaliada pelos servidores online *Procheck*, *ERRAT*, *Verify3D*, E *PROSA-WEB* (VERLI 2014) (PIMENTEL et al., 2023, CARVALHO 2024)

4.8.2. Padronização do protocolo de ancoragem molecular

O *GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking)* foi o programa escolhido para realizar a ancoragem molecular dos oito compostos derivados do eugenol no sítio ativo da LbSRPK (JONES et al., 1997).

Primeiramente foi feito o *re-docking* entre a SRPK1 humana e o ligante SPIN340 - ligante cristalizado com a proteína (MOROOKA et al., 2015). Foram testadas as 4 funções de pontuação: ASP, ChemScore, GOLDScore e Chemplp; e o número de GA de 10, 50, 100, 150 e 200 poses. Em seguida foi usado o servidor *LigRMSD* para análise das melhores posições fornecidas pelo GOLD e o ligante co-cristalizado com a proteína. A partir disso, a posição com o melhor RMSD foi determinada pelo *LigRMSD* e o melhor protocolo encontrado, isto é, aquele no qual o ligante teve a posição mais próxima da que ele possui na estrutura cristalizada, foi usado como referência tanto para a função de pontuação quanto o número de GA para todas as

análises posteriores envolvendo a proteína de interesse (LbSRPK) e os compostos de interesse (derivados do eugenol).

4.8.3. Ancoragem molecular dos compostos com a LbSRPK

Os oito compostos já citados foram avaliados quanto a ancoragem molecular no sítio ativo de LbSRPK, partindo do resíduo tirosina 98, que corresponde na SRPK humana ao resíduo de leucina 168, aminoácidos que são importantes no sítio ativo dessas proteínas. Essas entradas são exigências do programa GOLD para realizar a ancoragem. Seguindo esse protocolo a melhor pose dos ligantes foi definida pelo GOLD e as interações entre os aminoácidos do sítio ativo da enzima e grupos funcionais do ligante foram avaliados usando *softwares PyMOL - Molecular Graphics System, Version 3.0*) e *Discovery Studio Visualizer* e os dados foram anotados para posterior discussão.

4.9. Expressão, padronização e purificação da LbSRPK

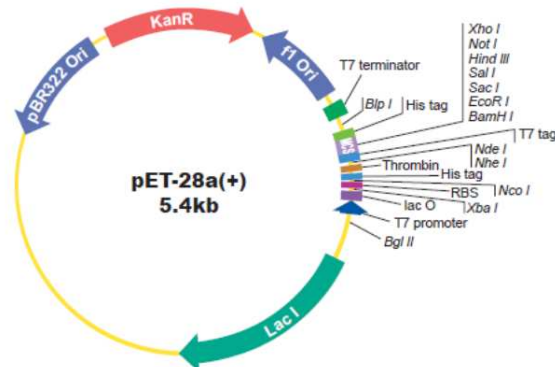
4.9.1 Clonagem no vetor de expressão

A sequência usada para expressão LbSRPK foi a mesma utilizada para a modelagem, obtida no site *TriTrypDB* (ID: LbrM.30.3610) e para obter a sequência truncada, foi usada como base a sequência gênica da SRPK1 de *Homo sapiens* obtida no *NCBI* e sua estrutura cristalizada obtida no *PDB* (ID: 4WUA). As duas sequências foram alinhadas no *Clustal Omega* e podem ser visualizadas no anexo A, as regiões diferem principalmente no início das regiões C e N-terminal e uma região entre os domínios cinases. Assim, foi truncada a região que pega a primeira glicina (G) até a tirosina (Y) na posição 143 na região N-terminal, a região entre os dois domínios cinases foi da lisina (K) 296 até ácido glutâmico 382 (E), e na região C-terminal foi deletado da fenilalanina 564 (F) até ácido aspártico 742 (D).

Após editar a sequência do gene para LbSRPK para expressar apenas os domínios cinases sítios para enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* foram adicionados em suas extremidades; a sequência foi otimizada para expressão em bactéria e clonada no vetor pET-28a (Fast Bio) que possui resistência ao antibiótico canamicina, o vetor possui

também uma cauda de histidina que será usada tanto para purificação quanto para confirmação da identidade, o mapa dele por ser visualizado na **Figura 10**.

Figura 10: Mapa do vetor pET-28a



Fonte: FastBio

4.9.2 Transformação das cepas bacterianas e indução da expressão com IPTG

O plasmídeo comercial foi tratado de acordo com as instruções do fabricante e transformado na cepa de *E. coli* DH5 α por choque térmico, seguindo o protocolo descrito em Sambrook (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012). Um tubo ependorf contendo 200 μ L da célula bacteriana previamente tratada com cloreto de cálcio, foi adicionado cerca de 50 ng do plasmídeo e deixado num banho de gelo por 30 minutos. Para o choque térmico, a célula foi colocada em banho maria a 42 °C por cerca de 90 segundos e rapidamente transferida para o gelo por 5 cinco minutos, foi adicionados 800 μ L de meio LB e a célula foi colocada para crescer a 37 °C num *shaker* por cerca de uma hora, por fim, 200 μ L da célula transformada foi plaqueados com o auxílio de uma alça de Drigalski numa placa de Petri com LB sólido e canamicina e deixado na estufa a 37°C *overnight*.

Das colônias isoladas obtidas nas placas, foram feitos pré-inóculos que tiveram seu DNA plasmidial extraído usando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen - K210010) seguindo o protocolo do fabricante. Com o DNA plasmidial foi feita uma reação de PCR usando os primers T7 promotor e T7 terminador cuja sequência está na Tabela 2; seguindo o programa de ciclagem: 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C 40 segundos, 56°C 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos, para confirmar a presença do gene correspondente a proteína recombinante. O produto de PCR foi aplicado num gel de agarose 1% com brometo de etídio e as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram observadas num fotodocumentador.

Tabela 2: sequência dos primers utilizados

T7Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7Terminador	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Fonte: Addgene - Sequencing Primers.

Para expressão da proteína recombinante, o plasmídeo comercial foi transformado por choque térmico na cepa *E. coli* BL21 (DE3), usando a variação de três choques térmicos para aumentar a eficiência da transformação, onde a célula junto com o DNA foi deixada no banho a 42°C por 45 segundos e em seguida transferida para o gelo por 5 minutos, esse procedimento foi repetido três vezes e na terceira vez a célula ficou no gelo por 15 minutos, o resto do protocolo é semelhante ao de apenas um choque térmico e a célula também foi plaqueada em LB sólido com Canamicina (30 µg/mL).

Clones isolados obtidos a partir da placa de petri foram cultivados em meio LB com Canamicina (30 µg/mL) a 37° C e 180 RPM em shaker por cerca de 12-14 horas. Após esse tempo, esse pré-inóculo foi adicionado em um inóculo com um volume maior de LB com Canamicina (30 µg/mL) e deixado crescer até atingir a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0.6 – 0.8. Atingida a DO foi adicionado IPTG - isopropil

β -D-Tiogalactopiranosídeo (Sigma®) como indutor para iniciar a expressão da proteína recombinante.

4.9.3 Testes para padronizar as condições de expressão

Para os testes de padronização das condições de expressão da proteína recombinante uma colônia transformada foi isolada e cultivada em LB com Canamicina (30 μ g/mL) a 37°C, 180 RPM de rotação por cerca de 16 horas. Em seguida o pré-inóculo vertido em volume maior de LB com Canamicina (30 μ g/mL) e cultivado em 37°C, 180 RPM até atingir DO₆₀₀ 0.6..

Para testar as diferentes condições de expressão foram testadas as temperaturas de 30°C e 20°C com 0.10 mM e 0,25 mM de concentração de IPTG, e nos tempos de indução de 0 a 5 horas e 18 horas. Os inóculos foram sedimentados e armazenados a -20°C para uso posterior.

Os sedimentos foram ressuspensos em tampão A, tampão de lise - 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 20 mM Imidazol e 5% de glicerol - mais 1 μ g/mL de inibidores de protease leupeptina, aprotinina e pepstatina e 30 μ g/mL de lisozima e deixado no gelo por 30 minutos. Depois foram lisadas no sonicador CV18 (Vibra Cell™ - Sonics) por 5 minutos (20% de amplitude, 30 segundos de pulso e 30 segundos de intervalo) e centrifugados a 4°C por 15 minutos a 12000 RPM. A fração solúvel (FS) foi coletada e o pellet correspondente à fração insolúvel (FI) foi ressuspensado em tampão A com 8 M de uréia, vortexada por 30 segundos e centrifugado novamente a 4°C, por 15 minutos a 12000 RPM e coletado num novo tubo. As duas frações foram armazenadas no freezer a -20°C para posterior avaliação em gel de SDS-PAGE.

4.9.4 Purificação da proteína com coluna em FPLC

A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade. As frações solúveis e insolúveis foram filtradas e injetadas no FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) modelo AKTA PURIFIER UPC10 (GE Healthcare) e coluna HisTrap™ Crude FF, o fluxo no aparelho foi de 0.5 mL/min e as frações

correspondentes ao volume não ligado, lavagem e eluição foram coletadas para posterior avaliação no gel de SDS-PAGE.

4.9.5 - Avaliação da expressão por SDS e confirmação da especificidade por Western blot

Para avaliar a expressão da proteína recombinante as amostras correspondentes ao extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel foram corridas num gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 12% seguindo o metodologia descrita por Sambrook (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012). As amostras foram preparadas com Laemmli buffer (tampão de amostra contendo β -mercapto), fervidas por 5 minutos e aplicadas nas canaletas do gel, o marcador de peso molecular de proteínas *Amersham Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare - código 17.0446-01) ou o marcador *TrueColor High Range Protein Marker S2600* (Sinapse) também foi aplicado junto. A corrida ocorreu a 120 V por 90 minutos ou até a amostra chegar ao final do gel. Após a corrida, o gel foi corado com uma solução de Coomassie brilhante blue R-250 em constante agitação por pelo menos 30 minutos e depois descorado com solução descorante com etanol e ácido acético até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas.

Foi feito um Western Blot para confirmação da presença da proteína recombinante, que possui cauda de histidina. O protocolo também está descrito em Sambrook (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012). Foi usado uma membrana de nitrocelulose em um sistema úmido no equipamento West-i10 (Loccus) e a corrida ocorreu a 400mA por cerca de uma hora e meia. O anticorpo primário usado é o *anti-his* (6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8), MA1-21315, Invitrogen) produzido em camundongo na diluição de 1:5000 e o anticorpo secundário (*Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit*, A9044 Sigma) anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:10000 e revelado com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

4.10 Análises estatísticas

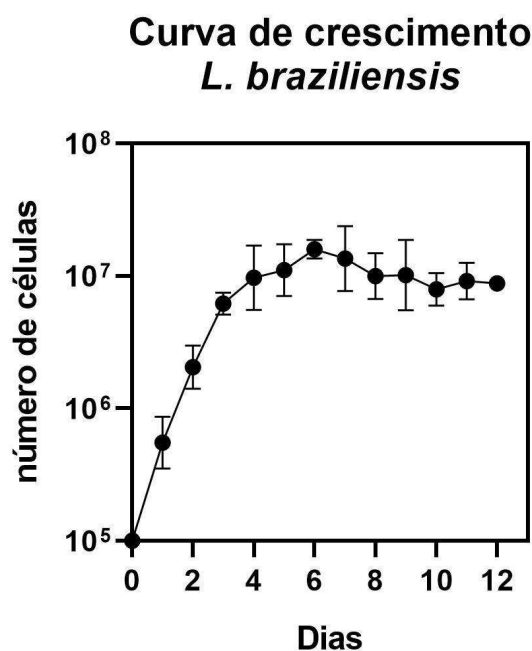
Os experimentos de curva de crescimento foram realizados em triplicata biológica e os testes de Cc50 foram feitos em triplicata biológica e triplicata técnica. As análises estatísticas foram feitas usando o programa Graphpad Prism 8.0

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de Crescimento

O perfil de crescimento da *L. braziliensis* foi obtido a partir da contagem diária das células do parasito durante 12 dias (Figura 11) sendo que no dia 0 foi feito um repique com 1×10^5 células/mL.

Figura 11: Curva de crescimento da *L. braziliensis* em meio Grace's suplementado com SFB



Fonte: Elaborado pela autora

Pela curva obtida pode-se perceber que a fase *lag* vai dos dias 1 ao 3, a fase *log* entre os dias 4 e 6, sendo que no 6º dia a célula já começa a entrar na fase estacionária/fase de morte celular, assim, definiu-se os melhores dias para se fazer experimento com a célula os dias 4 e 5.

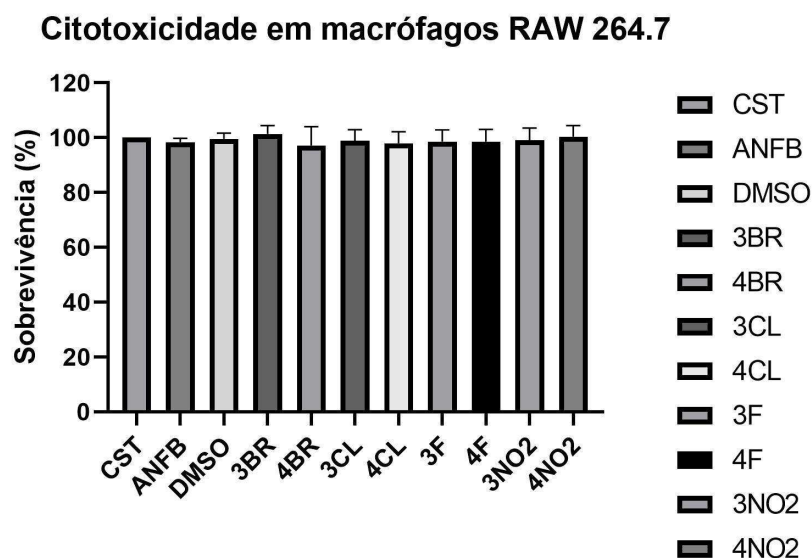
Promastigotas de fase *log* são diferentes de promastigotas de fase estacionária (GRÖGL et al., 1987), assim, a fase *log* em promastigotas em geral é usada para experimentos em cultura *in vitro* de leishmanias porque essa é a fase onde as células estão em crescimento ativo o que torna metabolicamente mais interessantes para os

estudos com drogas, além da população ser mais homogênea e por isso a reprodutibilidade dos experimentos são melhores.

5.2. Ensaio de citotoxicidade

Inicialmente foi feita uma triagem para avaliar a citotoxicidade dos compostos em macrófagos na concentração de 10 μM após 48 horas de tratamento, como descrito anteriormente. O resultado pode ser visualizado na **Figura 12** e mostra que não houve morte celular causada por nenhum dos oito compostos testados nessa concentração. Como controles foram usadas células sem tratamento, a anfotericina B (3,125 μM) e o DMSO (1%). A Anfotericina é usada como controle por ser um medicamento usado comumente no tratamento de leishmaniose e o DMSO por ser o solvente onde os compostos são diluídos.

Figura 12: Triagem de citotoxicidade em macrófagos, a concentração de 10 μM dos compostos não foi tóxica para a célula.



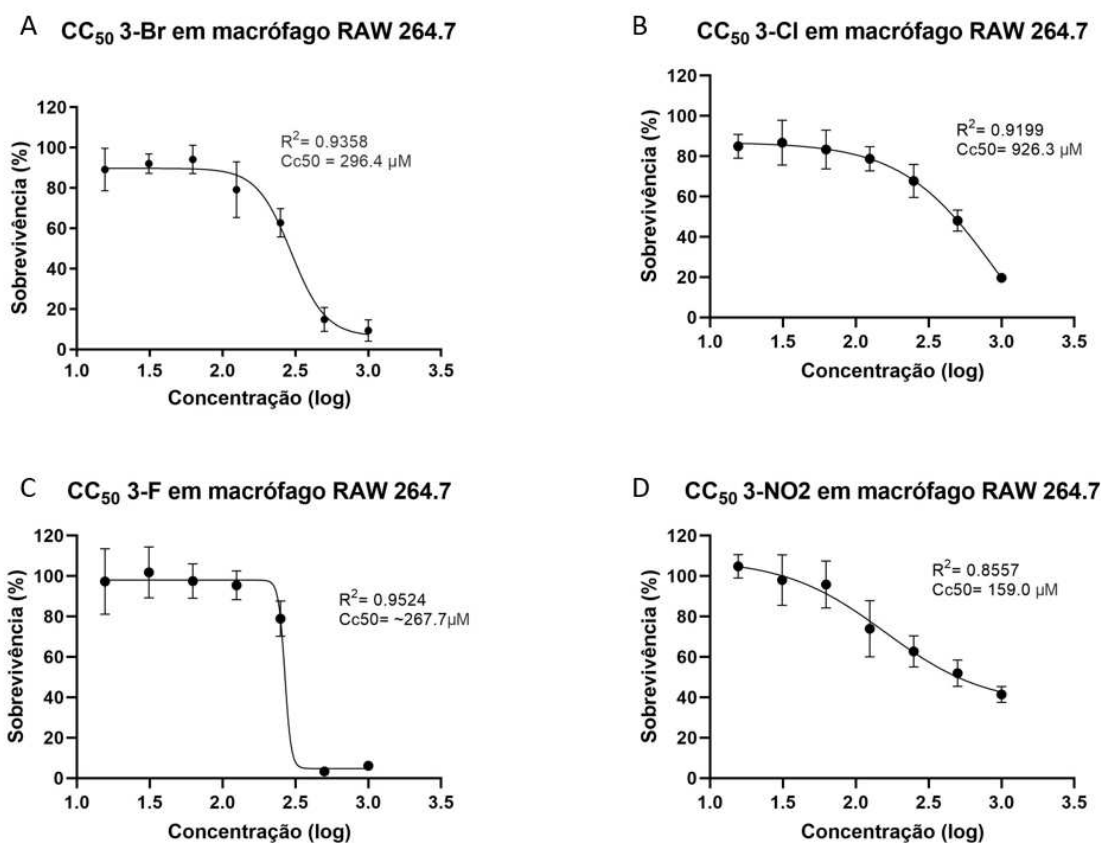
Fonte: Elaborado pela autora

5.3. CC50 dos compostos

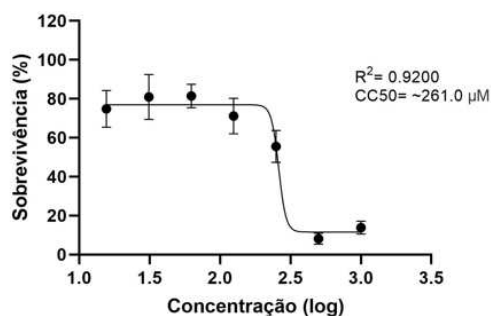
Para a avaliar a citotoxicidade dos macrófagos foi determinado o CC₅₀ (Concentration for 50% Cytotoxicity), assim, foi estimada a concentração de cada um dos compostos capaz de matar 50% das células dos macrófagos RAW 264.7 nas condições testadas.

O experimento foi realizado em placas de 96 poços contendo 1×10^5 células de macrófagos em cada poço e foram adicionados concentrações dos compostos equivalentes a 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62.5 μ M, 31.25 μ M e 15.525 μ M, além dos controles do meio, Anfotericina B (3,125 μ M), DMSO (1%) e célula sem tratamento. Após adição dos compostos foram esperadas 48 horas para os compostos fazerem efeitos e em seguida foram feitas leituras com resazurina para análise da viabilidade, a célula sem tratamento foi considerada com 100% de viabilidade e a viabilidade das células tratadas com os compostos foi considerada em relação a ela. A **Figura 13** mostra esse resultado, os gráficos foram feitos no Graphpad Prisma 8.0 e o próprio programa calculou o CC₅₀.

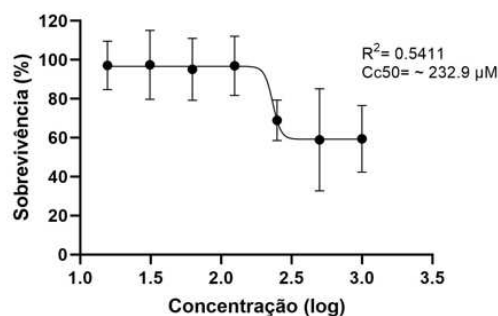
Figura 13: CC₅₀ dos compostos derivados do eugenol em macrófagos tipo RAW 264.7.



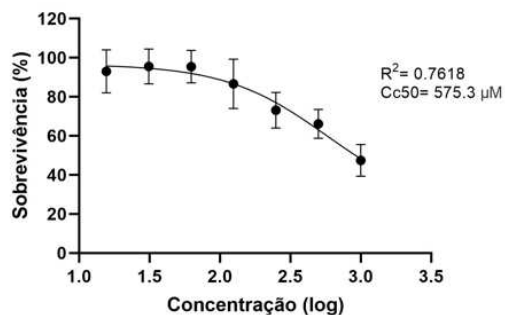
E CC_{50} 4-Br em macrófago RAW 264.7



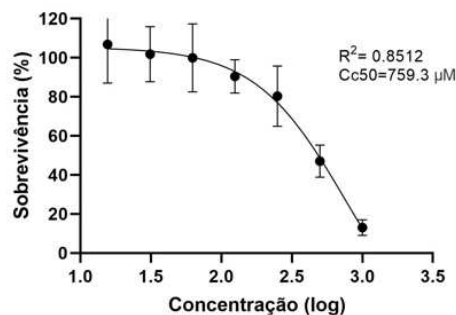
F CC_{50} 4-Cl em macrófago RAW 264.7



G CC_{50} 4-F em macrófago RAW 264.7



H CC_{50} 4-NO2 em macrófago RAW 264.7



No eixo x está representada a concentração dos compostos em escala logarítmica e no eixo Y a sobrevivência em porcentagem. **A** composto 3-Br; **B** composto 3-Cl, **C** composto 3-F; **D** composto 3-NO₂; **E** composto 4-Br; **F** composto 4-Cl; **G** composto 4-F e em **H** composto 4-NO₂.

Fonte: Elaborado pela autora

Em relação ao CC_{50} , o composto que apresentar o menor valor é o mais tóxico, pois é necessário uma menor quantidade dele para que a célula seja afetada e morta, assim, pelos gráficos da **Figura 13** pode-se perceber que o composto mais que teve o menor CC_{50} foi 3-NO₂ com 159 μ M, seguido por 4-Cl (232.9 μ M); 4-Br (261.0 μ M), 3-F (267.7 μ M), 3-Br (296.4 μ M), 4-F (575.3 μ M), 4-NO₂ (759.3 μ M) e o composto que se mostrou menos tóxico foi o 3-Cl com CC_{50} estimado em 926.3 μ M. Apesar dos valores estimados, seria interessante realizar mais experimentos com concentrações intermediárias, especialmente para aqueles que apresentaram um R^2 abaixo de 0.9 para determinar o CC_{50} com mais precisão

É válido destacar que alguns compostos não solubilizam muito bem em concentrações muito altas, foi o caso do 4-Cl, que formou muitos cristais nas concentrações de 1000 μM e alguns cristais em 500 μM , e dos compostos 3- NO_2 e 4- NO_2 que formaram pequenos cristais na concentração 1000 μM , isso pode afetar na forma como o composto interage com os macrófagos e levar a R^2 mais baixos.

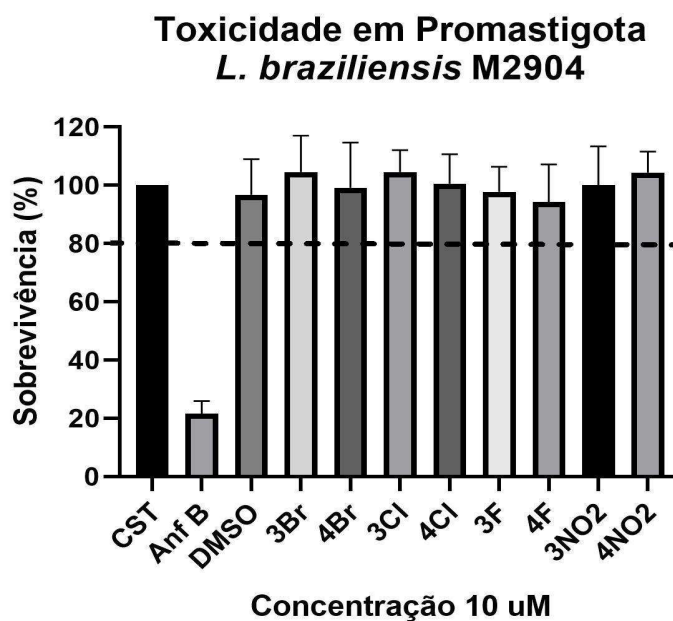
Um estudo descrito na literatura com compostos derivados do eugenol com funcionalidade 1,2,3-triazol e cuja diferença também era a presença de diferentes átomos de halogênio e do grupo nitro em diferentes posições na molécula, testaram esses compostos quanto ao CC_{50} em macrófagos e encontraram valores variados, sendo que de forma geral, os compostos com F foram mais tóxicos (CC_{50} abaixo de 100 μM), seguido pelos compostos com grupo NO_2 (CC_{50} entre 100-200 μM), e os compostos com Cl e Br apresentaram toxicidades variando muito dependendo da posição: Br na posição *para* apresentou CC_{50} de aproximadamente 993 μM , enquanto na posição *meta* teve 155.8 μM , o Cl teve um resultado parecido, na posição *para* apresentou CC_{50} de 1780 μM e em *meta* 817 μM (TEIXEIRA et al., 2022). Esses resultados descritos na literatura diferem um pouco dos descritos nesse trabalho, demonstrando que a toxicidade dos compostos parece estar associada não só ao tipo de substituinte (o CC_{50} do 3-F foi bastante próxima do 4-Cl apesar de serem átomos diferentes), mas também a posição que o grupo substituinte ocupa na molécula (se *para* ou *meta*), pois o grupo 3-Cl foi o menos tóxico enquanto o 4-Cl aparentemente apresentou o segundo menor CC_{50} .

Dutra e colaboradores testaram o efeito citotóxico do eugenol em macrófagos murinos e encontraram o CC_{50} de aproximadamente 300 $\mu\text{g/mL}$ (DUTRA et al., 2016), considerando a massa molar dos compostos usados (3-Br – 376.25; 3-Cl – 331.80; 3-F – 315.34; 3- NO_2 - 342.35; 4-Br – 376.25; 4-Cl – 331.80; 4-F – 315.34 e 4- NO_2 - 342.35) os compostos apresentaram, respectivamente, os CC_{50} de 111.52 $\mu\text{g/mL}$; 307.35 $\mu\text{g/mL}$; 84.41 $\mu\text{g/mL}$; 54.43 $\mu\text{g/mL}$; 98.20 $\mu\text{g/mL}$; 77.27 $\mu\text{g/mL}$; 181.41 $\mu\text{g/mL}$ e 259.94 $\mu\text{g/mL}$. Com base nisso, é possível perceber que, com exceção do composto 3-Cl que apresentou o CC_{50} de 307.35 $\mu\text{g/mL}$, os demais compostos apresentaram toxicidade mais alta do que o eugenol puro, sugerindo que as modificações feitas foram tóxicas para as células de macrófagos.

5.4. Toxicidade dos compostos em promastigotas

Foi testada a atividade leishmanicida dos compostos contra promastigotas de *L. braziliensis* na concentração de 10 μ M. Na **Figura 12** é possível visualizar a toxicidade deles, como controles foram usados Anfotericina B (3,125 μ M), célula sem tratamento e DMSO (0.04%).

Figura 14: Toxicidade dos compostos frente à promastigota de *L. braziliensis*.



CST - célula sem tratamento. O experimento de toxicidade foi feito em triplicata técnica e biológica, a célula tratada com DMSO foi usada como referência para o cálculo da sobrevivência em relação aos compostos. O desvio padrão é mostrado na figura como a linha em cima das barras, foi calculado pelo software já mencionado considerando as triplicadas e quanto maior a linha, maior o desvio. A linha tracejada indica 80% de sobrevivência.

Fonte: Elaborado pela autora

Pelo gráfico mostrado na **Figura 14**, é possível perceber que nessa concentração não foi identificado nenhuma atividade leishmanicida em nenhum dos compostos testados.

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* envolve duas formas principais, a promastigota presente no vetor e a amastigota presente nos macrófagos de vertebrados

infectados (ROUTARAY *et al.*, 2022). Assim, a promastigota é mais fácil de ser cultivada *in vitro* do que as formas amastigotas, que precisa que os parasitos sejam isolados de lesões ou cultivados *in vitro* em macrófagos ou outras células adequadas, procedimento esse que é demorado e trabalhoso, além do risco de contaminação (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2010). O cultivo de amastigotas axênicas ainda é um desafio por conta da dificuldade de estabilização e manutenção da célula. Sendo assim, é relativamente frequente que os experimentos de triagem de compostos em *Leishmania*, em geral, comecem com uma triagem primária nas formas promastigota e posteriormente façam uma triagem secundária em amastigotas (DE ALMEIDA RODRIGUES *et al.*, 2010; DE MUYLDER *et al.*, 2011; SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2010).

Apesar da facilidade de cultivo, como a forma promastigota é presente no inseto-vetor, ela acaba não sendo necessariamente o alvo de um composto leishmanicida. Por isso, é necessário realizar estudos envolvendo também a forma amastigota, pois um composto pode ter ação sobre apenas uma das formas (DE MUYLDER *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi testado apenas uma concentração dos composto (10 µM) e seu efeito em promastigota, Dutra e colaboradores observaram uma atividade leishmanicida do eugenol contra promastigota de *L. infantum* em concentrações de 550 ug/mL (~3350 µM), que é bastante superior à concentração testada, sugerindo que algum efeito leishmanicida pode ser observado em concentrações maiores (DUTRA *et al.*, 2016).

Nosso grupo de pesquisa analisou a expressão de RNAm de LbSRPK nas formas promastigota e amastigotas de *L. braziliensis* e observou que há um aumento da expressão de SRPK em promastigota que estão na fase logarítmica indo para a fase estacionária; e que as formas amastigotas expressam significativamente maiores quantidades de LbSRPK do que os promastigota da fase logarítmica (PIMENTEL *et al.*, 2023).

Considerando o estudo onde o eugenol levou a uma maior expressão da proteína cinase AKT (ABDULLAH *et al.*, 2021) e a hipótese de que os compostos testados podem atuar como inibidores de cinases, especificamente como inibidores de SRPK, o

efeito leishmanicida que os compostos podem causar seria mais efetivo nas formas amastigotas do que nas promastigota. Para testar essa possível inibição, estudos de ancoragem molecular foram realizados entre os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima e os compostos.

5.5. Bioinformática

5.5.1 Estrutura tridimensional da proteína

A predição estrutural 3D da LbSRPK foi feita anteriormente pelo grupo de pesquisa, usando o *AlphaFold2 (AF2)*, um sistema de inteligência artificial baseado no aprendizado de máquinas, desenvolvido pela *DeepMind* capaz de prever estruturas tridimensionais de proteínas. A estrutura tridimensional de uma proteína é determinada por sua sequência de aminoácidos e muitos algoritmos foram criados para fazer predições das estruturas 3D. Eles se baseiam geralmente em Modelagem por Homologia, Modelagem de Novo e Aprendizado de Máquina (ML) (YANG *et al.*, 2023).

A Modelagem por Homologia se baseia no princípio de que a estrutura tridimensional é determinada por sua sequência de aminoácidos e que sequências semelhantes devem ter estruturas 3D semelhantes, isto é, a estrutura é mais conservada do que a sequência primária (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019). É feito um alinhamento de sequências seguido por modelagem molecular, as vantagens são os algoritmos simples, velocidade rápida e alta precisão para proteínas que têm homólogos, a principal desvantagem é a impossibilidade de prever estruturas de proteínas que não possuam homólogos determinados (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

A Modelagem *de Novo* é baseada na modelagem de uma proteína a partir de sua sequência primária, sem se basear em uma estrutura homóloga conhecida (BENDER *et al.*, 2016). Guiada por funções de energia projetadas considerando as posições atômicas dos aminoácidos como variáveis, a projeção que possuir menor energia é escolhida. As vantagens desse método são não depender de uma estrutura conhecida e poder encontrar novos tipos de estruturas proteicas, porém, é uma abordagem que exige um algoritmo mais complexo e um poder computacional maior, esses dois fatores levam à necessidade de aproximações (YANG *et al.*, 2023).

Os Modelos Baseados em ML utilizam algoritmos de ML, como o *deep learning* (aprendizado profundo), e estruturas conhecidas de proteínas na predição. Também é uma técnica que precisa de grande poder computacional. O AF2 é baseado nesse princípio e utiliza uma rede neural que é treinada para gerar estruturas de proteínas partindo de sua sequência de aminoácidos usando informações de proteínas homólogas e alinhamento de sequência (HE et al., 2023). Partindo do princípio da conservação da estrutura da proteína, isto é, que mutações na sequência não vão afetar a função da proteína, mesmo que a sequência de proteínas possa ser diferentes a estrutura 3D pode permanecer a mesma; o AF2 também é capaz de tratar cada resíduo de aminoácido como um objeto único e prevê rotações e translações no espaço para acomodá-lo melhor na estrutura. Apesar de tudo, o AF2 não consegue prever a dinâmica das proteínas (ele fornece um modelo estático) e possui uma limitação na previsão de proteínas com múltiplos domínios ou com regiões intrinsecamente desordenadas (YANG et al., 2023).

Apesar disso, o AF2 é o algoritmo que tem tido o melhor desempenho nas Avaliações Crítica de Predição de Estruturas (CASP), uma competição realizada a cada dois anos para avaliar os algoritmos de previsão de estruturas, nela são liberadas sequências de proteínas cujas estruturas resolvidas não são conhecidas e os participantes enviam para o comitê a estrutura prevista por seus algoritmos e elas são comparadas com a resolvida experimentalmente (YANG et al., 2023).

Após a modelagem no *AF*, a energia do modelo foi minimizada no servidor *YASARA*. Ele é um programa que executa simulações de dinâmica molecular em solventes explícito, otimizando as funções de energia para que os modelos de proteínas de baixa energia tenham mais probabilidade de estarem corretamente dobradas; para isso ele combina equação de campo de força de todos os átomos AMBER com potenciais de torção multidimensionais como se houvesse um campo de força que tem mínimos de energia mais próximos das estruturas nativas e esse campo de força vai guiando o modelo para mais perto da estrutura nativa durante a simulação (KRIEGER et al., 2009).

Depois de ter sua energia minimizadas é necessário avaliar a qualidade do modelo tridimensional da proteína, para isso são analisados alguns fatores como o comprimento das ligações, planaridade das ligações peptídicas, planaridade de anéis e ângulos de torção nas cadeias principais e laterais, quiralidade, impedimento estérico,

energia e função, além da análise do valor de RMSD (Root Mean Square Deviation) entre o modelo gerado e a estrutura molde (VERLI 2014).

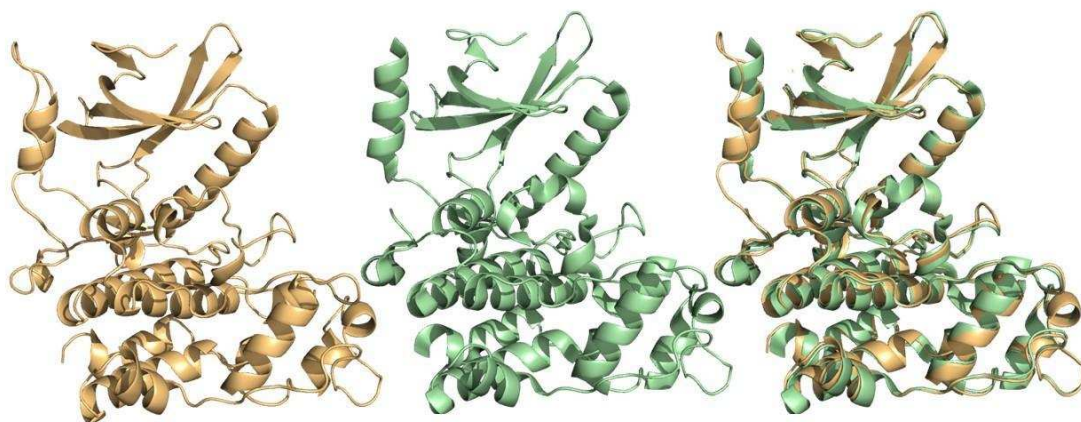
Entre as ferramentas escolhidas para realizar essa validação estão o **Prosa-WEB**, que identifica erros potenciais em modelos de proteínas e faz comparações com proteínas conhecidas, fornecendo um resultado em *Z*-score, uma medida da qualidade da estrutura que mede o desvio da energia, o programa fornece uma faixa para proteínas nativas daquele tipo, onde valores fora da faixa sugerem estruturas erradas (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Também utilizou-se do **PROCHECK**, para avaliar a estereoquímica (a estabilidade conformacional dos átomos) a geometria e ângulos de torção, foi usado para isso o gráfico de Ramachandran (VERLI 2014).

O resultado da qualidade do modelo nos servidores citados foi: Verify 3D - aprovado com 90.31% de resíduos pontuados ≥ 2 ; PROCHECK - o gráfico de Ramachandran mostrou 90.2% dos resíduos estão em regiões energeticamente favoráveis; ProSa-Web - pontuação -8,22; ERRAT - fator de qualidade de 93.878, indicando que os resíduos estão nas regiões corretas. Pontuações negativas indicam a ausência de regiões mal estruturadas (PIMENTEL *et al.*, 2023, CARVALHO 2024).

A estrutura prevista para LbSRPK e a estrutura cristalizada da SRPK1 humana podem ser visualizadas no visualizador de macromoléculas *PyMOL* (*Molecular Graphics System, Version 3.0*) e a sobreposição pode ser vista na **Figura 15**, podemos ver que a predição da estrutura da LbSRPK e o modelo cristalográfico da SRPK1 de humano se sobrepõe muito bem com um RMSD de 0.499 previsto pelo *PyMOL*.

Figura 15: Alinhamento da estrutura modelada da LbSRPK e a estrutura cristalográfica da SRPK1 humana.



Em verde, o cristal da SRPK1 humana (PDB ID: 4WUA), em bege a estrutura prevista para LbSRPK e a sobreposição das duas estruturas.

Fonte: Elaborado pela autora

5.5.2. Padronização da ancoragem molecular

GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) é um programa baseado num algoritmo GA, que realiza encaixe automatizado com flexibilidade parcial em ligantes cíclicos e total em ligantes acíclicos no sítio ativo de proteínas, considerando a vizinhança com flexibilidade parcial, satisfazendo o princípio de que o ligante precisa deslocar a água da ligação antes que uma nova ligação seja feita (JONES *et al.*, 1997). O GA precisa, como entrada, do tamanho e a localização aproximada do sítio ativo da proteína, bem como as coordenadas da proteína e uma conformação do ligante, como saída, o programa fornece o ligante e quais conformações ele poderia assumir no sítio da proteína, sendo que o programa realiza um número de execuções de GA é estabelecido e testado pelo usuário e usa esse número de poses para fornecer a pose com maior pontuação (JONES *et al.*, 1997).

A melhor função de pontuação encontrada para o *re-docking* do SPIN340 com SRPK1 humana usando o programa GOLD foi ASP com 200 poses (0.56) e esses valores foram usados para o *docking* entre LbSRPK e os compostos estudados, o

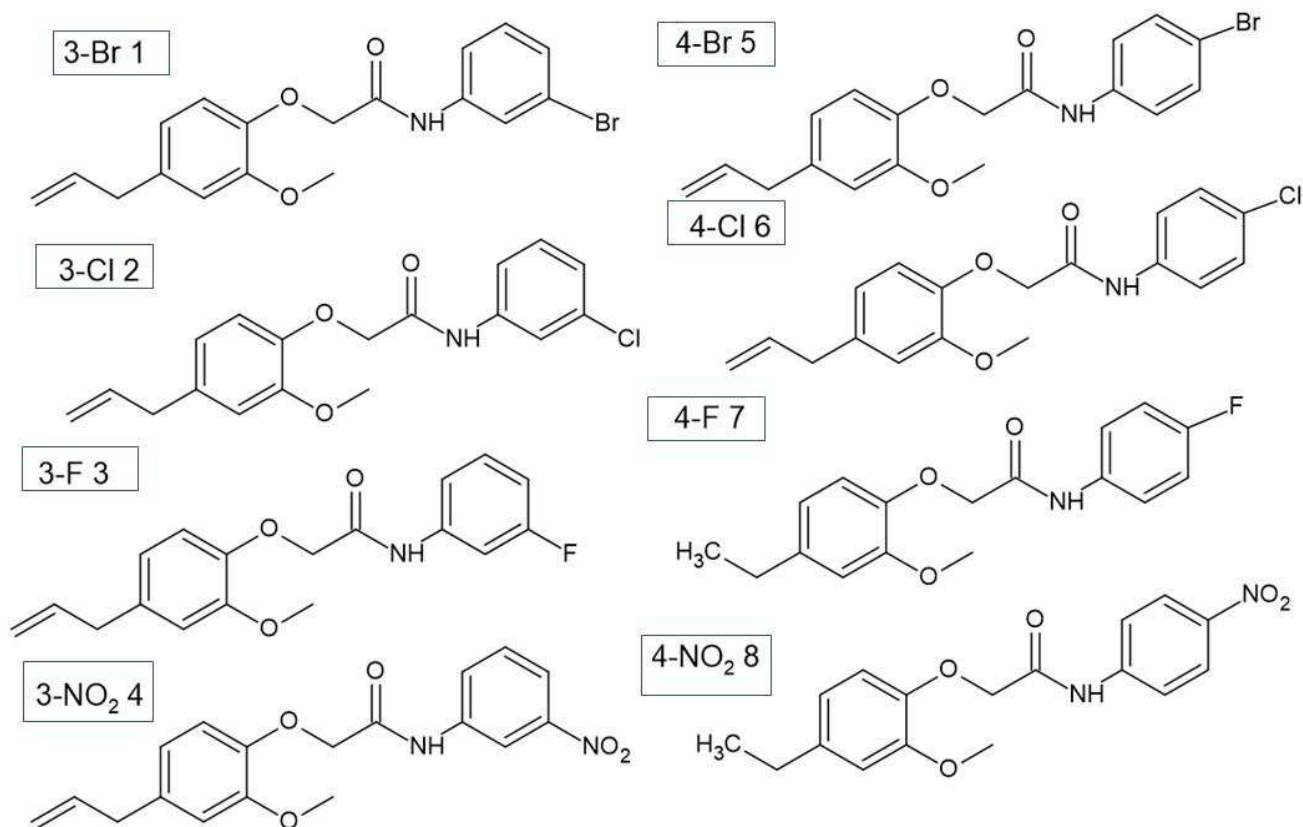
programa faz um ranqueamento das melhores poses e elas foram visualizadas e analisadas no *PyMOL*.

5.5.3. Ancoragem dos compostos com LbSRPK

Como descrito no tópico de materiais e métodos, para avaliar a ancoragem dos oito compostos no sítio ativo da LbSRPK, foi feito o *re-docking* com o SRPIN340 e a SRPK1 humana para padronizar o protocolo no programa GOLD e em seguida esse protocolo foi usado para a ancoragem dos compostos no sítio ativo. Para entrada no GOLD foi necessário fornecer a localização aproximada do sítio ativo da enzima, foi escolhido o aminoácido tirosina 98 na LbSRPK, que é, no alinhamento das duas estruturas, o aminoácido correspondente a leucina 168 na SRPK1, que é um aminoácido central nessa região (MOROOKA *et al.*, 2015). O programa forneceu 200 poses usando o protocolo selecionado e ele ranqueou a melhor posição para cada ligante. Para estudar e entender melhor como é essa interação proteína-ligante, as posições foram visualizadas e analisadas quanto aos tipos de ligação que estão ocorrendo entre os aminoácidos do sítio ativo e os átomos dos compostos.

Os compostos que foram usados como ligantes para a proteína, como já mencionado, são derivados do eugenol e possuem estruturas bastante similares como pode ser observado na **Figura 16**, variando o substituinte de um dos anéis aromáticos (Br, Cl, F ou NO₂) e sua posição no mesmo (*meta*, quando na posição 3, ou *para* quando na posição 4 do anel). Esses grupos variantes possuem volumes e características diferentes que devem influenciar no seu encaixe no sítio ativo e conseqüentemente levar a uma variação em suas interações com resíduos próximos a essas regiões. A partir do *docking* é possível analisar essas interações.

Figura 16 : Estrutura química dos ligantes

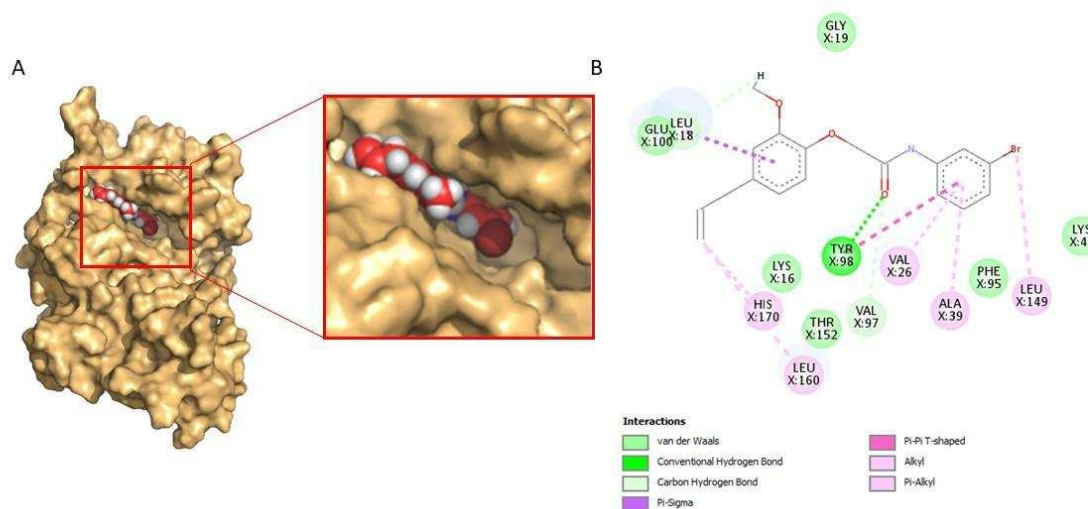


Fonte: Elaborado pela autora a partir das estruturas fornecidas pela professora Patrícia Fontes Pinheiro

Em relação ao *docking*, a melhor conformação do composto 3-Br no sítio ativo da LbSRPk, pode ser visualizado na **Figura 17**, foram identificados uma ligação de hidrogênio convencional entre Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante; uma ligação do tipo pi-pi entre os anéis da Tyr98 e o anel aromático, uma ligação do tipo pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, duas ligações do tipo carbono-hidrogênio - são ligações de hidrogênio não convencionais, envolvendo os resíduos Leu18 e Val97, interações do tipo alquil e pi-alquil entre os resíduos Leu149, Ala39, Val26, Leu160 e His170 e o composto, além dos resíduos que não estão interagindo diretamente com o

ligante, mas ajudam na estabilização por meio de interações de Van der Waals, são esses resíduos Lys41, Phe95, Gly19, Glu100 e Thr 152.

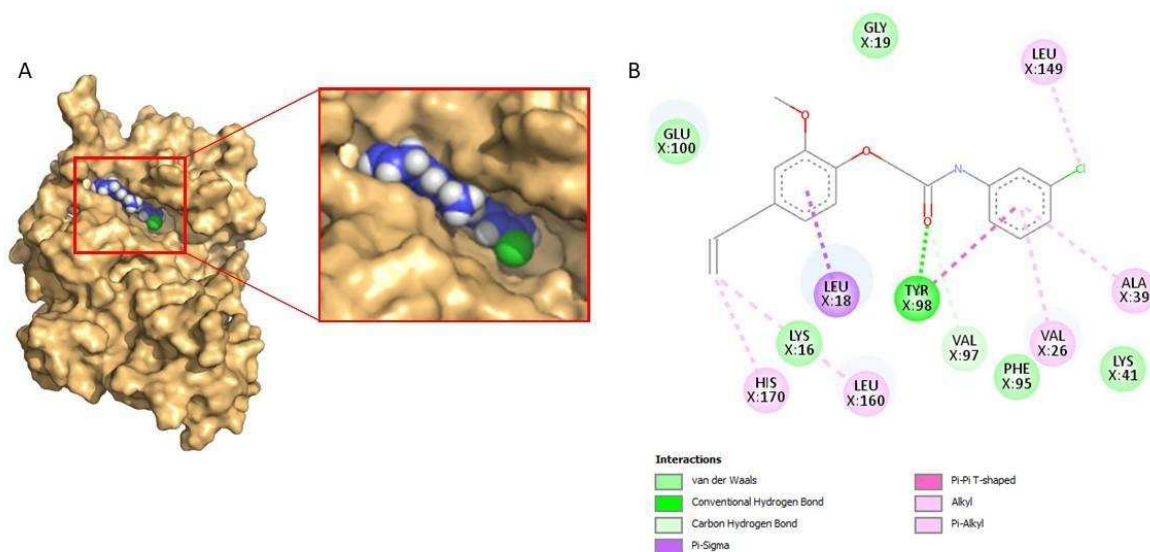
Figura 17 A: Representação em esferas do ligante 3-Br no sítio ativo da LbSRPK, B: tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D.



Fonte: Elaborado pela autora

Na melhor conformação de 3-Cl com LbSRPK é possível visualizar uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi também envolvendo Tyr98 e dessa vez o anel aromático ligado ao átomo de Cl, uma ligação carbono-hidrogênio entre Val97 e um átomo de oxigênio, uma ligação do tipo pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Leu149, Ala39, Val26, Leu160 e His170, e interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Lys16, Glu100 e Gly19 (**Figura 18**)

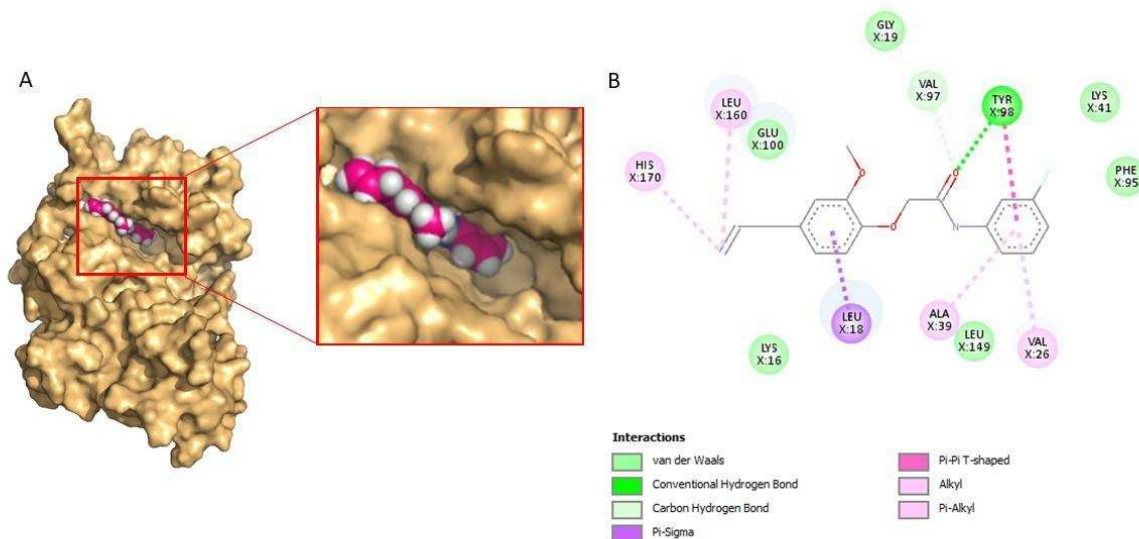
Figura 18 A: Representação em esferas do ligante 3-Cl no sítio ativo da LbSRPK, B: tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D.



Fonte: Elaborado pela autora

3-F apresentou uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi entre Tyr98 e o anel aromático ligado ao átomo de F, uma ligação carbono-hidrogênio entre Val97 e um átomo de oxigênio, uma ligação do tipo pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Val26, Ala39, Leu160 e His170, e interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Leu149, Lys16, Glu100 e Gly19, as ligações podem ser visualizadas na **Figura 19**.

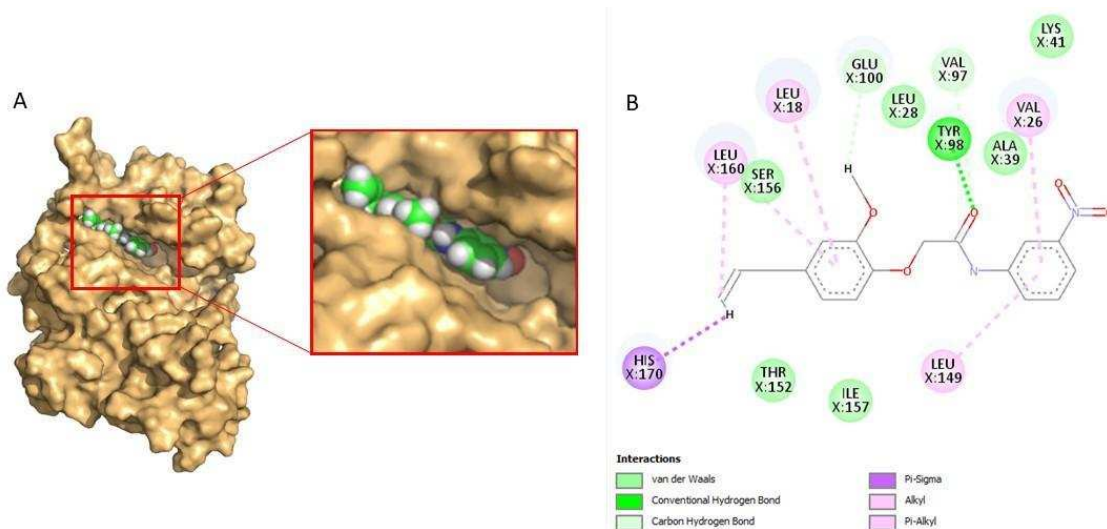
Figura 19 A: Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, B: tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

As interações entre a melhor pose de 3-NO₂ podem ser visualizadas na **Figura 20**, o composto apresentou uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr9 e um átomo de oxigênio presente no ligante, duas ligações carbono-hidrogênio sendo uma entre Val97 e um átomo de oxigênio e a outra entre Glu100 e o hidrogênio ligado ao carbono do éter ligado ao anel aromático; uma ligação do tipo pi-sigma envolvendo o anel do resíduo de His170, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Val26, Leu149, Leu160 e Leu18, além das interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys41, Ala39, Ile157, Thr152, Ser156 e Glu100.

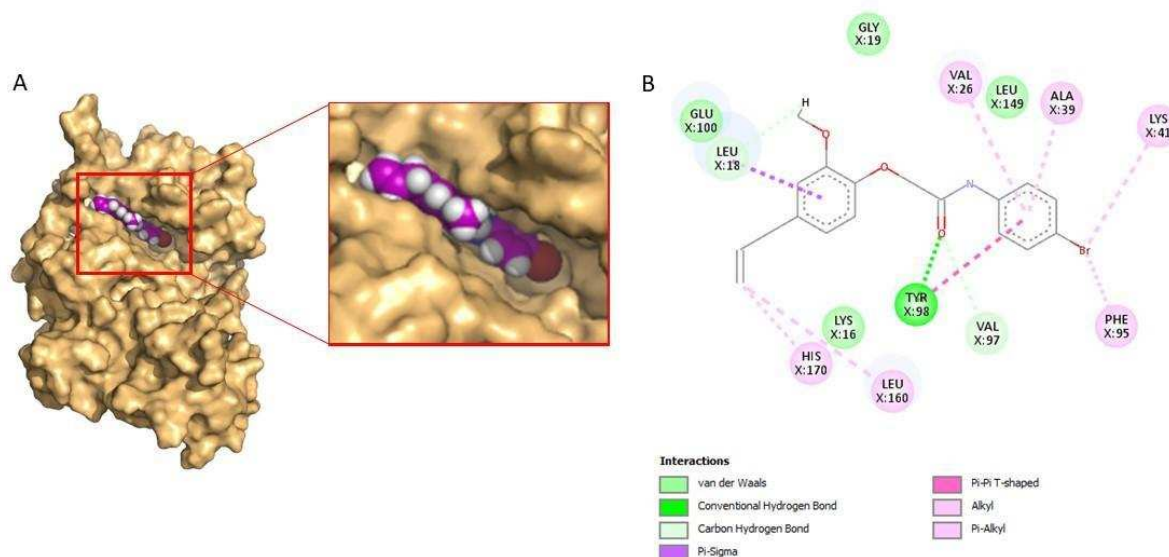
Figura 20 **A:** Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, **B:** tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

Na melhor pose, 4-Br apresentou uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi entre Tyr98 e o anel aromático ligado ao Br, uma ligação pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, duas ligações carbono-hidrogênio sendo uma entre Val97 e um átomo de oxigênio e a outra entre Leu18 e o hidrogênio ligado ao carbono do éter ligado ao anel aromático, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Ala39, Val26, Leu160 e His170, além das interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys16, Glu100, Gly19 e Leu149. As ligações podem ser visualizadas na **Figura 21**.

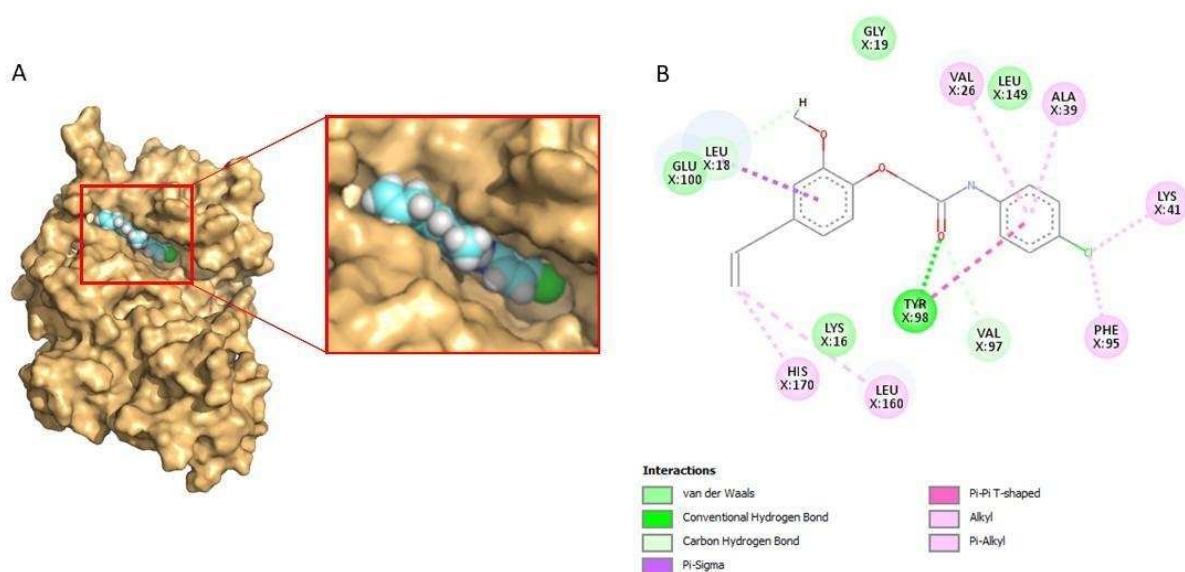
Figura 21 A: Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, B: tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

As interações de 4-Cl podem ser visualizadas na **Figura 22** e apresentou uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi entre Tyr98 e o anel aromático ligado ao Cl, duas ligações carbono-hidrogênio sendo uma entre Val97 e um átomo de oxigênio e a outra entre Leu18 e o hidrogênio da hidroxila ligado carbono do éter ligado ao anel aromático, uma ligação do tipo pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Ala39, Val26, Leu160 e His170, e interações de van der Waals com os resíduos Lys16, Glu100, Gly19 e Leu149.

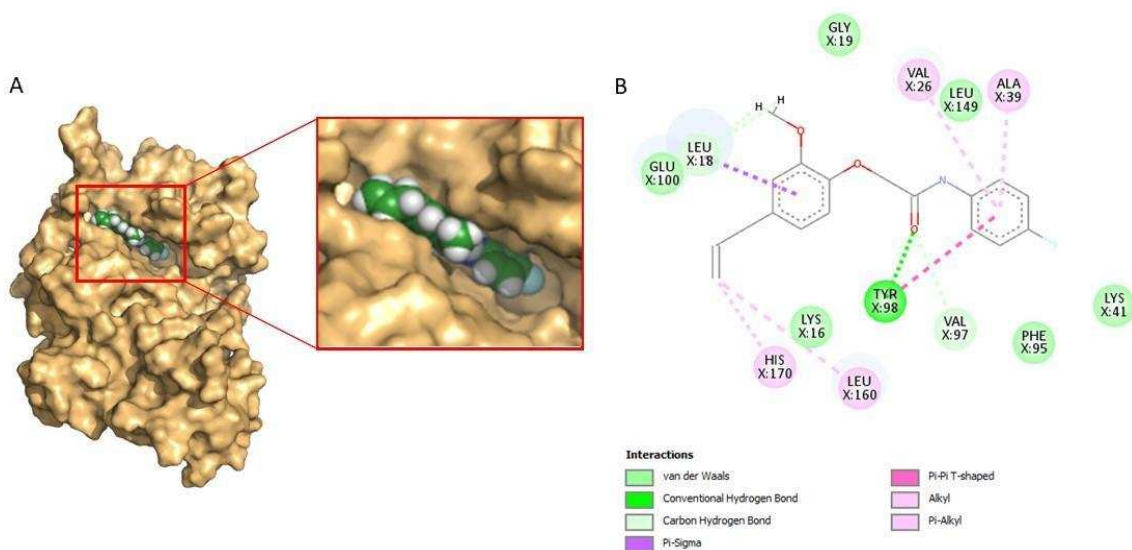
Figura 22 **A:** Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, **B:** tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

4-F por sua vez fez apresentou uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi entre Tyr98 e o anel aromático ligado ao F, três ligações do tipo carbono-hidrogênio uma entre Val97 e um átomo de oxigênio e duas entre Leu18 e os hidrogênios do carbono do éter que está ligado ao anel aromático, uma ligação do tipo pi-sigma entre Leu18 e o anel aromático, ligações do tipo alquil e pi-alquil envolvendo os resíduos Ala39, Val26, Leu160 e His170, também as interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Lys16, Glu100, Lgy19 e Leu149, as interações estão na **Figura 23**).

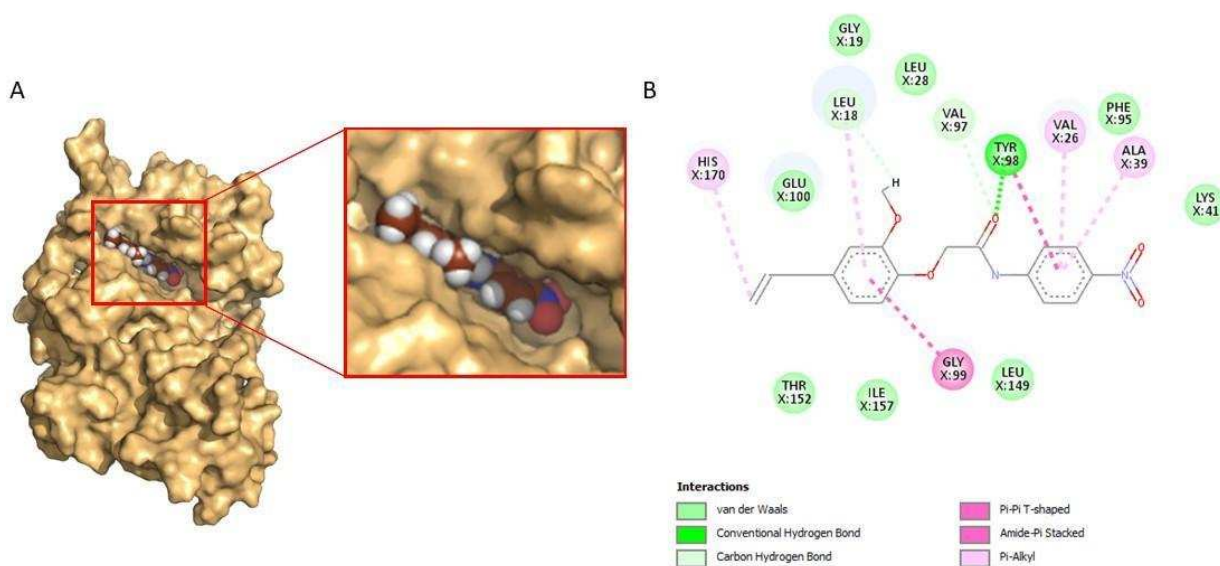
Figura 23 **A:** Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, **B:** tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

As interações do composto 4-NO₂ estão representadas na **Figura 24** e é possível visualizar uma ligação de hidrogênio convencional entre o resíduo Tyr98 e um átomo de oxigênio presente no ligante, uma ligação do tipo pi-pi entre Tyr98 e o anel aromático ligado ao NO₂, duas ligações do tipo carbono-hidrogênio sendo uma entre Val97 e um átomo de oxigênio e a outra entre Leu18 e o hidrogênio do carbono do eter ligado ao anel aromático, uma ligação do tipo pi-amida entre o resíduo de Gly99 e o anel aromático, ligações do tipo pi-alkil envolvendo os resíduos Ala39, Val96, Leu18 e His170, além das interações de van der Waals envolvendo os resíduos Lys41, Phe95, Leu28, Gly19, Glu110, Thr152, Ile157 e Leu149.

Figura 24 A: Representação em esferas do ligante 3-F no sítio ativo da LbSRPK, B: tipos de ligação entre os resíduos da proteína e o ligante pelo diagrama 2D



Fonte: Elaborado pela autora

Para que um complexo proteína-ligante seja formado, é necessário que haja uma complementaridade de características físico-químicas e estruturais entre o ligante e a proteína, isso está relacionado às propriedades físico-químicas de ambos e o arranjo espacial molecular de seus componentes, permitindo que haja essa interação, sendo esse processo de reconhecimento dirigido por efeitos entálpicos e entrópicos (VERLI 2014).

Assim, ligante e proteína vão interagir entre si através de interações intermoleculares, das quais as principais são ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals, interações iônicas, interações do tipo cátion- π , interações envolvendo anéis aromáticos do tipo π - π e empilhamentos-T (ou em forma de T) (VERLI 2014). As interações citadas são ligações não covalentes, que são mais fracas do que as ligações covalentes e por não conferirem muita rigidez aos átomos envolvidos, além de serem fáceis de serem formadas e quebradas, geram uma dinamicidade essencial para as macromoléculas que é essencial para suas funções bioquímicas (ADHAV; SAIKRISHNAN, 2023).

As ligações de hidrogênio desempenham um papel significativo em sistemas de biomoléculas em solução aquosa, são interações mais fracas que a ligação covalente,

porém são mais fortes do que as interações de van der Waals. (BULUSU; DESIRAJU, 2020). As ligações de hidrogênio abrangem uma faixa de energia de 40 a 1 kcal/mol, dependendo de quem são os átomos envolvidos, o que leva a uma distinção entre ligações de hidrogênio muito fortes, fortes e fracas, o que afeta na estabilidade da interação e conseqüentemente na dinamicidade da interação (BULUSU; DESIRAJU, 2020). Em proteínas, as ligações de hidrogênio C – H...O formadas principalmente pelos resíduos de Gly, Phe e Tyr são bastante relevantes (BULUSU; DESIRAJU, 2020).

Assim, embora os compostos só tenham apresentado uma interação de hidrogênio, essa interação foi do tipo N – H... O = C e ocorreu entre um resíduo de Tyr98 e um oxigênio que está em dupla ligação com o carbono na estrutura do ligante, sendo classificada como uma ligação de hidrogênio forte (BULUSU; DESIRAJU, 2020). Essas interações podem ser visualizadas no Apêndice A.

Além disso, o aminoácido Tyr98 é o aminoácido que corresponde ao resíduo Leu 168 na SRPK1 humana quando o alinhamento das duas proteínas é realizado, e esse resíduo também faz uma ligação de hidrogênio do tipo N – H...O = C com o ligante SRPIN 340, um inibidor conhecido dessa proteína (MOROOKA *et al.*, 2015), sugerindo que essa interação é importante para a inibição da atividade da enzima.

As ligações descritas como carbono-hidrogênio são ligações de hidrogênio não convencionais ocorrendo na forma C – H...O = C, apesar de serem consideradas uma ligação de hidrogênio fraca, elas normalmente atuam como suporte e são comuns em proteínas (ADHAV; SAIKRISHNAN, 2023; BULUSU; DESIRAJU, 2020). Os oito ligantes apresentaram uma ligação desse tipo entre o resíduo Val97 da LbSRPK e o oxigênio envolvido em dupla ligação com o carbono na estrutura do ligante (imagens no apêndice B). Como essa é uma ligação próxima a ligação de hidrogênio convencional formada pela Tyr98 citada acima, provavelmente ela está agindo como estabilizadora, contribuindo para a interação proteína-ligante nesta região.

Além dessa ligação citadas para o resíduo Val97, outras interações desse tipo são encontradas em alguns compostos: em 3-NO₂ há uma interação entre o oxigênio da carbonila do resíduo Glu110 e o hidrogênio ligado ao carbono do éter ligado ao anel aromático; nos compostos 3-Br, 4-Br, 4-Cl, 4-F e 4- NO₂ há uma interação desse tipo entre o oxigênio fazendo uma dupla ligação com carbono no resíduo Leu18 e o H do carbono do éter ligado ao anel aromático, sendo que em 4-F foram identificados duas

interações entre Leu18 e esses hidrogênios. Todas essas interações provavelmente estão contribuindo para a estabilidade da interação proteína-ligante e também podem estar contribuindo para a ação inibidora desses complexos.

Além disso, interações de empilhamento do tipo π - π também desempenham um papel importante na estabilidade de estruturas secundárias e terciárias de proteínas e podem ser fundamentais para garantir a ligação de ligantes dentro do sítio ativo de proteínas (VAN LOMMEL *et al.*, 2022). São ligações não covalentes típicas envolvendo sistemas aromáticos π -eletrônicos (PAIK *et al.*, 2022). Os compostos 3-Br, 3-Cl, 3-F, 4-Br, 4-Cl, 4-F e 4-NO₂ apresentaram uma ligação desse tipo, mais especificamente uma interação do tipo π - π empilhamento-T entre o resíduo de Tyr 98, que possui um anel aromático em sua estrutura, e o anel aromático ligado ao substituinte na molécula dos compostos (as ligações podem ser visualizadas no apêndice C). O composto 3-NO₂ não apresentou esse tipo de interação, é possível visualizar na **Figura 20 A** que mostra o ligante em esferas e a proteína em superfície, que esse composto fica posicionado um pouco diferente dos outros no sítio ativo, essa diferença provavelmente devido a presença do grupo volumoso do NO₂ nessa posição parece levar a uma distância entre os átomos de tal forma que essa interação não acontece.

As interações descritas como do tipo pi-sigma são interação do tipo C-H... π , são interações fracas que também podem ser caracterizadas como ligações de hidrogênio fracas e ocorrem em praticamente todas as proteínas, principalmente envolvendo doadores C-H alifáticos e π -aceitadores aromáticos e entre doadores CH aromáticos e π -aceitadores aromáticos (BRANDL *et al.*, 2001), Apesar de serem ligações fracas, elas afetam a energética de interações proteína-ligante e podem contribuir para sua estabilização (FANFRLÍK *et al.*, 2023). Os compostos 3-Br, 3-Cl, 3-F, 4-Br, 4-Cl e 4-F apresentaram esse tipo de interação entre o grupo C-H do resíduo Leu18 e o anel aromático (figura pode ser visualizada no apêndice D) e o composto 4-NO₂ apresentou uma interação desse tipo entre o anel do resíduo His170 e C-H do ligante. O resíduo de Leu18 presente na LbSRPK se alinha com o resíduo Leu86 na estrutura da SRPK1 que por sua vez é um resíduo que faz interações hidrofóbicas com o inibidor SRPIN 340 na fenda de ligação ao ATP nessa proteína (MOROOKA *et al.*, 2015). Esse dado também sugere que essa interação pode estar contribuindo para uma inibição da atividade da LbSRPK.

As ligações do tipo alquil e pi-alquil também foram encontradas em grande quantidade entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo e os átomos dos ligantes como pode ser visualizado nas **Figuras 17 a 24 B**. Essas ligações são uma das interações mais fracas que são importantes a nível biológico e químico e ocorrem entre grupos alquil ou entre grupos envolvidos em interações do tipo π aromáticos e ligações duplas entre carbonos; ocorrem principalmente através de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. Essas interações podem ser visualizadas no apêndice E (GIESE; ALBRECHT, 2020). Todos os ligantes tiveram resíduos envolvidos nesse tipo de interação que provavelmente estão contribuindo para que os compostos interajam com a proteína.

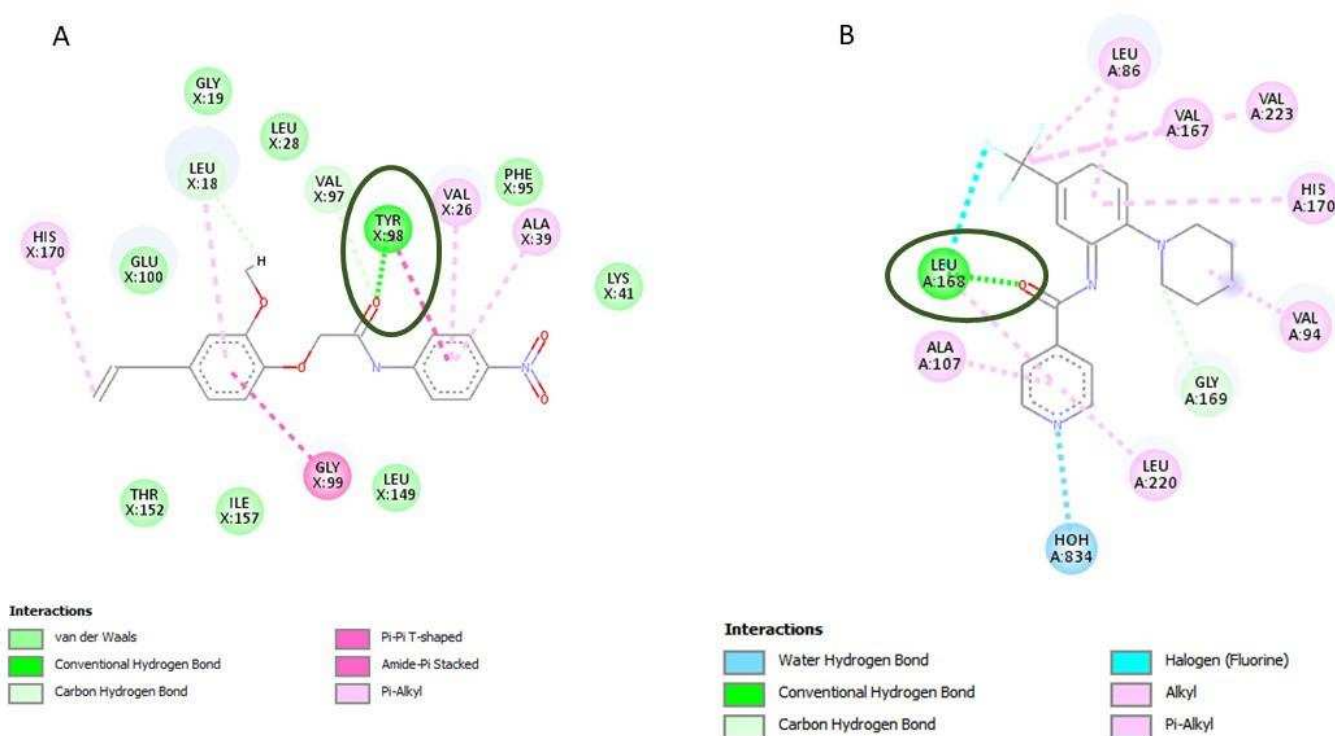
Uma interação do tipo amida-pi foi encontrada entre o resíduo Gly99 e o composto 4-NO₂, esse tipo de interação empilhamento amida... π está relacionados ao empilhamento π aromático onde a superfície π da ligação amida se empilha contra a superfície π do anel aromático, os resíduos mais comuns para esse tipo de interação são a Gly e Trp, e podem desempenhar um papel importante na ligação do ligante à proteína (FERREIRA DE FREITAS; SCHAPIRA, 2017), essa interação pode ser visualizada no apêndice F.

As interações de Van der Waals ocorrem quando átomos não carregados estão próximos e suas nuvens eletrônicas exercem efeito uma sobre a outra de tal forma que dipolos elétricos transitórios são formados e levam a formação de outros dipolos de cargas oposta em átomos próximos e esses dipolos passam a se atrair (NELSON; COX, 2014). Apesar de serem consideradas interações fracas, a formação dessas interações contribui para a diminuição da energia livre do sistema e conseqüentemente contribuem para a estabilidade do sistema (NELSON; COX, 2014).

É possível visualizar vários resíduos envolvidos em interações de van der Waals no sítio ativo da LbSRPK com os ligantes (item B das **Figuras 17 a 24**) que devem estar contribuindo para a estabilização deles no sítio ativo. Em relação a quantidade dessas interações, o composto 4-NO₂ apresentou 8 resíduos envolvidos em interações de van der Waals, os compostos 3-Br, 3-F, 3-NO₂ e 4-F apresentaram 6, o composto 3-Cl apresentou 5 e os compostos 4-Br e 4-Cl apresentaram 4 interações de van der Waals.

Fazendo uma comparação entre as interações encontradas entre os compostos derivados do eugenol testados e a LbSRPK e as interações que existem entre os resíduos do sítio ativo da SRPK1 humana e seu ligante o SRPIN 340, é possível encontrar semelhanças entre os tipos de ligação (ligação de hidrogênio, ligações alquil e pi-alquil) e os resíduos correspondentes quando é feito o alinhamento entre as duas estruturas (Tyr98 da LbSRPK alinha com Leu168 da SRPK1, por exemplo). Algumas dessas ligações podem ser visualizadas na **Figura 25**.

Figura 25: Comparação entre as interações entre 4-NO₂ e LbSRPK (A) e as interações entre SRPIN 340 e a SRPK1 humana (B).



Destaque para a ligação de hidrogênio convencional que existe entre Leu168 SRPK1 humana e o resíduo de aminoácido que alinha com ele na LbSRPK, Tyr98. Essas interações também podem ser observadas para outros resíduos como His170 – Glu100; Leu86 - Leu18; Val167 – Val97 ; Leu220 – Leu149 e Ala107 – Ala37, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quando se está estudando proteína-ligante, é interessante conseguir classificar essas diferentes moléculas por sua complementaridade no sítio ativo da proteína. O **Pose & Rank** é um serviço gratuito que fornece pontuações para complexos proteína-ligante usando teoria da probabilidade, ele usa duas funções de pontuação estatística dependentes de distância entre os átomos, o *PoseScore* e o *RankScore* (FAN *et al.*, 2011). O *PoseScore* é usado para prever a pose de ligação de um ligante conhecido e o *RankScore* é usado para identificar ligantes de não ligantes por meio de triagem virtual (FAN *et al.*, 2011).

Como arquivos de entrada, foi fornecido a estrutura modelada da LbSRPK e os oito compostos em suas melhores poses determinadas pelo *docking*. A função *RankScore* foi escolhida para as análises uma vez que o objetivo era avaliar a capacidade dos compostos de agirem como ligantes no sítio ativo da proteína, sendo que quanto mais negativo a pontuação, maior a força de interação do ligante com a proteína. O *Pose & Rank* forneceu um score para cada um deles e o resultado pode ser visualizado na **Tabela 3**.

Tabela 3: Score fornecido pela função *RankScore*.

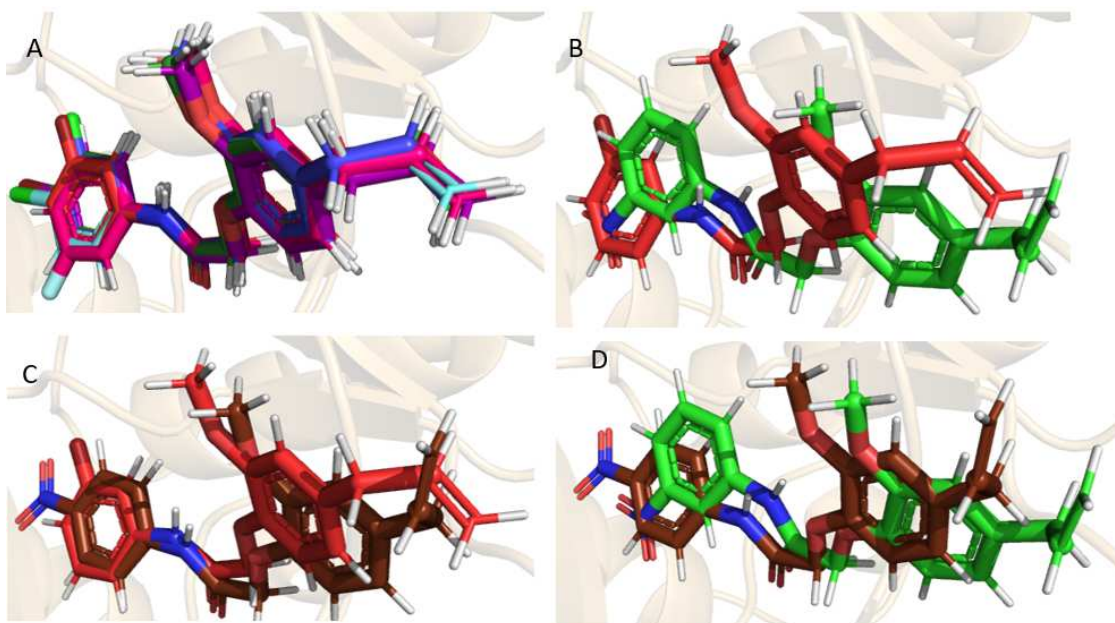
Composto	Score
3-Br	-4.62
3-Cl	-2.93
3-F	-2.27
3-NO ₂	-6.18
4-Br	1.56
4-Cl	-5.67
4-F	-4.97
4-NO ₂	-6.09

Fonte: Elaborado pela autora

Pelos *scores* das interações fornecidos pela função *RankScore* do *Pose & Rank*, o composto que interage melhor com a LbSRPK é o 3-NO₂, seguido pelo 4-NO₂, em sequência 4-Cl, 4-F, 3-Br, 3Cl, 3-F e o que apresentou menor pontuação foi 4-Br.

Essas diferenças podem ser explicadas, por exemplo, pelos tipos e quantidades de interação que existem entre os resíduos presente no sítio ativo da LbSRPK e os átomos dos ligantes, interações essas que estão relacionadas à pose que os ligantes assumem no sítio ativo. A **Figura 26** mostra a sobreposição dos ligantes em suas melhores poses determinadas pela ancoragem molecular, no sítio ativo da LbSRPK. É possível observar que os compostos 3-Br, 3-Cl, 3-F, 4-Br, 4-Cl e 4-F se sobrepõem, enquanto que os compostos 3-NO₂ e 4-NO₂ não se sobrepõem com os já citados e nem entre si.

Figura 26: Sobreposição dos ligantes no sítio ativo da LbSRPK



Em **A**: sobreposição dos ligantes 3-Br (vermelho), 3-Cl (azul), 3-F (rosa), 4-Br (roxo), 4-Cl (azul claro) e 4-F (verde escuro). **B**: sobreposição do composto 3-Br (vermelho) e 3-NO₂(verde claro). **C**: sobreposição do composto 3-Br (vermelho) e do 4-NO₂ (marrom). **D**: sobreposição dos compostos 3-NO₂ (verde claro) e 4-NO₂ (marrom). Foi usado apenas o composto 3-Br para sobreposição com 3-NO₂ e 4-NO₂ para facilitar a visualização.

Fonte: Elaborado pela autora

Entre os compostos 3-NO₂ e 4-NO₂ a diferença de pontuação encontrada para eles pelo *Pose & Rank* foi pequena, sendo necessários mais estudos para investigar qual deles teria uma interação melhor com a LbSRPK.

Para aprofundar os estudos e confirmar se há realmente essa interação entre os compostos e a proteína LbSRPK que foi sugerido pela ancoragem molecular, avaliar qual a magnitude dessas interações e confirmar qual composto se liga melhor à proteína, foi realizada a clonagem gênica para expressar e purificar a LbSRPK e posteriormente realizar estudo de interação proteína-compostos e avaliar o potencial efeito inibidor desses compostos sobre a proteína.

5.6. Expressão e purificação da proteína recombinante LbSRPK em *E. coli* BL21 (DE3)

A bactéria *Escherichia coli* BL21 e o sistema de expressão pET são um dos sistemas mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes. Nesse sistema, o gene que codifica T7RNAP é controlado pelo promotor LacUV5 que é induzido por IPTG (DU *et al.*, 2021). O plasmídeo recombinante para a expressão da LbSRPK truncada foi o pET-28a, que possui como marca de seleção a resistência ao antibiótico Canamicina, além dos sítios de restrição para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e uma cauda de histidina, esse plasmídeo foi comprado comercialmente da SYN BIO TECHNOLOGIES.

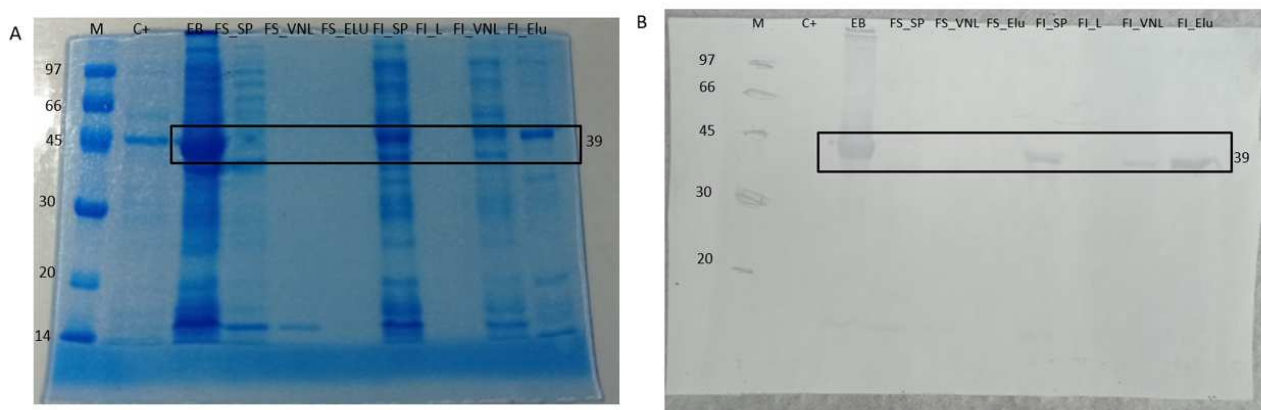
A região truncada da proteína foi definida como a partir da primeira glicina (G) até a tirosina (Y) na posição 143 na região N-terminal, a região entre os dois domínios cinases que pegou a lisina (K) 296 até ácido glutâmico 382 (E), e a região C-terminal foi deletado da fenilalanina 564 (F) até ácido aspártico 742 (D). Essa região pode ser visualizada no anexo B quando comparada com a sequência não truncada da LbSRPK.

Esse plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico e as bactérias transformadas foram cultivadas em LB líquido na presença de Canamicina para seleção dos clones transformados. Esses clones foram cultivados até atingir DO 0.6-0.8 e nessa condição foi adicionado o IPTG para indução da expressão da LbSRPK.

Essas induções ocorreram em diferentes temperaturas (20°C, 30°C e 37°C), foram retiradas alíquotas em diferentes tempos (3, 4, 5, 6 e 18 - dependendo do teste) e foram testadas duas concentrações de IPTG (0.25mM e 0.10mM). As frações correspondentes ao extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel (ou corpo de inclusão) nas condições citadas, foram avaliadas por SDS-PAGE e um Western blot também foi feito para avaliar a identidade da proteína. As amostras foram quantificadas por Bradford (BRADFORD, 1976) e aproximadamente a mesma quantidade de amostra foi aplicada em cada poço.

A primeira indução foi feita a 37°C, 0.25mM de IPTG e 2 horas de indução, baseado no protocolo descrito no trabalho de Teixeira (2018). Após a indução as frações solúveis e insolúveis foram separadas e tratadas como descrito no tópico 4.9.3 de metodologia. As duas frações foram purificadas no FPLC e tiveram as amostras correspondentes ao Volume não ligado (VNL), Eluição com 100% do tampão B (Elu) e Lavagem (L) coletadas e avaliadas para se investigar onde a proteína recombinante estava sendo mais expressas e se era possível obter a proteína purificada por meio do protocolo testado, a expressão pode ser visualizadas na **Figura 27** a seguir

Figura 27: Expressão da proteína LbSRPK a 37°C, 0.25mM de IPTG após o tempo de indução de 2 horas. **A:** gel de SDS corado com corante Coomassie brilhante blue R-250. **B:** membrana de WB revelada com DAB e peróxido



M- marcador de peso molecular de proteínas; C+ é uma proteína de aproximadamente 45 kDa que foi usada para controle do gel de SDS. EB - extrato bruto; ES_SP - fração solúvel sem purificar, FS_VNL - fração solúvel volume não ligado; FS_Elu - fração solúvel eluída após adição de 100% do tampão B; FI_SP- fração insolúvel sem

purificar, FI_VNL - fração insolúvel volume não ligado; FI-Elu - fração insolúvel eluída após adição de 100% do tampão B.

Fonte: Elaborado pela autora

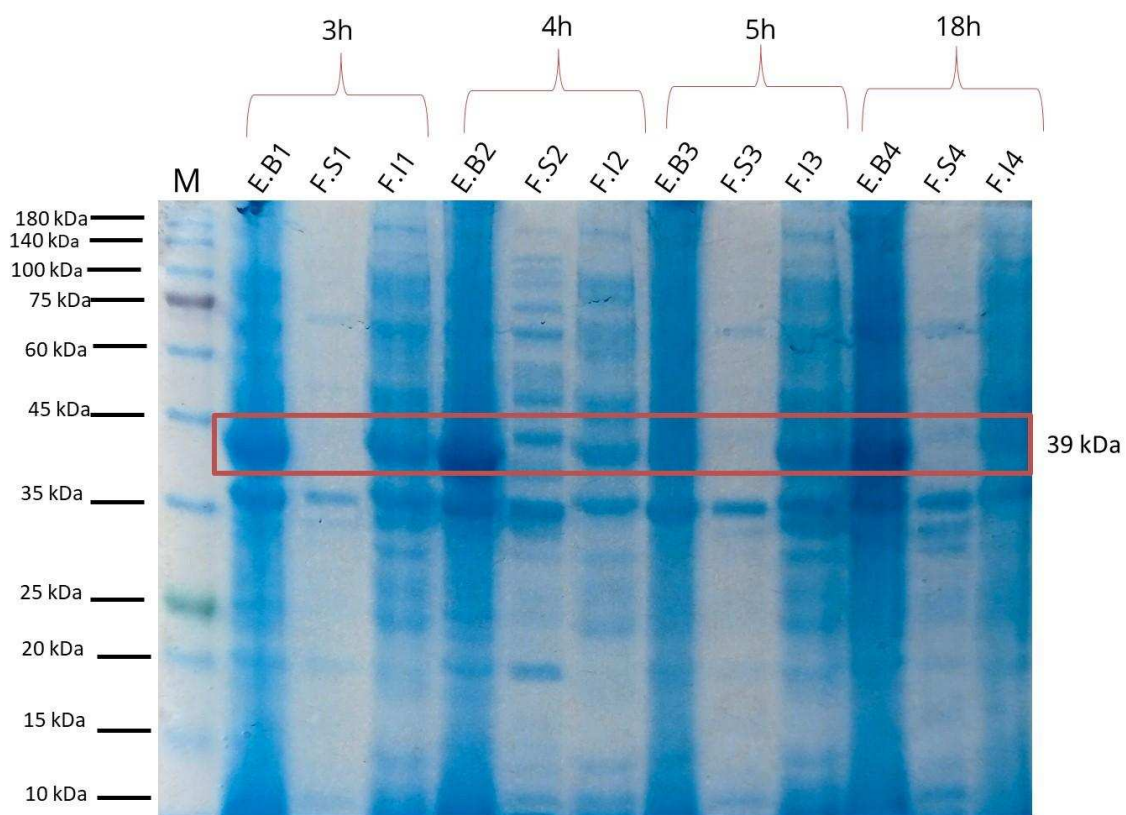
Pela **Figura 27 A** é possível perceber que a LbSRPK está presente na fração insolúvel e quase não foi detectada na fração solúvel. Durante a superexpressão de proteínas recombinantes pode acontecer das proteínas não se dobrarem corretamente e se agregarem formando os corpos de inclusão (FALAK; SAJED; RASHID, 2022). Pela figura é possível perceber também que a purificação foi eficiente, assim, após conseguir uma quantidade maior de proteína na fração solúvel, a purificação será realizada e a testes futuros com a proteína serão realizados.

Apesar da estabilidade e fácil manipulação dos corpos de inclusão, as proteínas ali presentes, por estarem mal dobradas, também estão inativas, e o redobramento de proteínas *in vitro* ainda é um desafio (KACHHAWAHA *et al.*, 2023). Como o alvo desse trabalho é avaliar a atividade e especificidade da LbSRPK frente a inibidores, é necessário que a mesma se encontre em sua forma nativa e, portanto, a alta presença da proteína nos corpos de inclusão não é interessante. Para aumentar a concentração de proteína na fração solúvel alguns parâmetros da indução serão testados como diminuir a temperatura da indução, alterar a concentração de indutor, aumentar o tempo de expressão ou mesmo adicionar algum composto que favoreçam a expressão da proteína na fração solúvel ao invés do corpo de inclusão (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018).

Após a primeira purificação, foi feito também o Western blot com anticorpo primário anti-his de mouse e anticorpo secundário anti-mouse ligado a peroxidase; e na **Figura 27 B** é possível ver a proteína marcada com anticorpo na altura estimada de 39 kDa, indicando que a proteína que está sendo expressa é a LbSRPK. Após essa primeira confirmação, não foram mais feitos Western blots e nem purificações em FPLC até que se conseguisse padronizar a expressão para maiores quantidades da proteína serem produzidas na fração solúvel do que na insolúvel, tal metodologia foi adotada para simplificação dos experimentos, porém, sem o Western blot não é possível afirmar que a proteína que está sendo visualizada na marca de 39 kDa é realmente a LbSRPK, apenas supor com base no primeiro Western blot, assim, novos Western blots antes da purificação serão realizados para confirmar novamente a identidade da proteína.

Com o objetivo de aumentar a expressão da proteína recombinante na fração solúvel, outras induções foram feitas, a **Figura 28** mostra a indução a 30°C, 0.25mM de IPTG e após o tempo de 3, 4, 5 e 18 horas de indução. Nessa condição a maior parte da proteína ainda é visualizada nos corpos de inclusão, sendo que no tempo de 4 horas foi o que mais teve expressão da proteína na fração solúvel.

Figura 28: Gel de SDS mostrando a expressão da LbSRPK a 30°C, 0.25mM de IPTG nos tempos 3, 4, 5 e 18 horas.



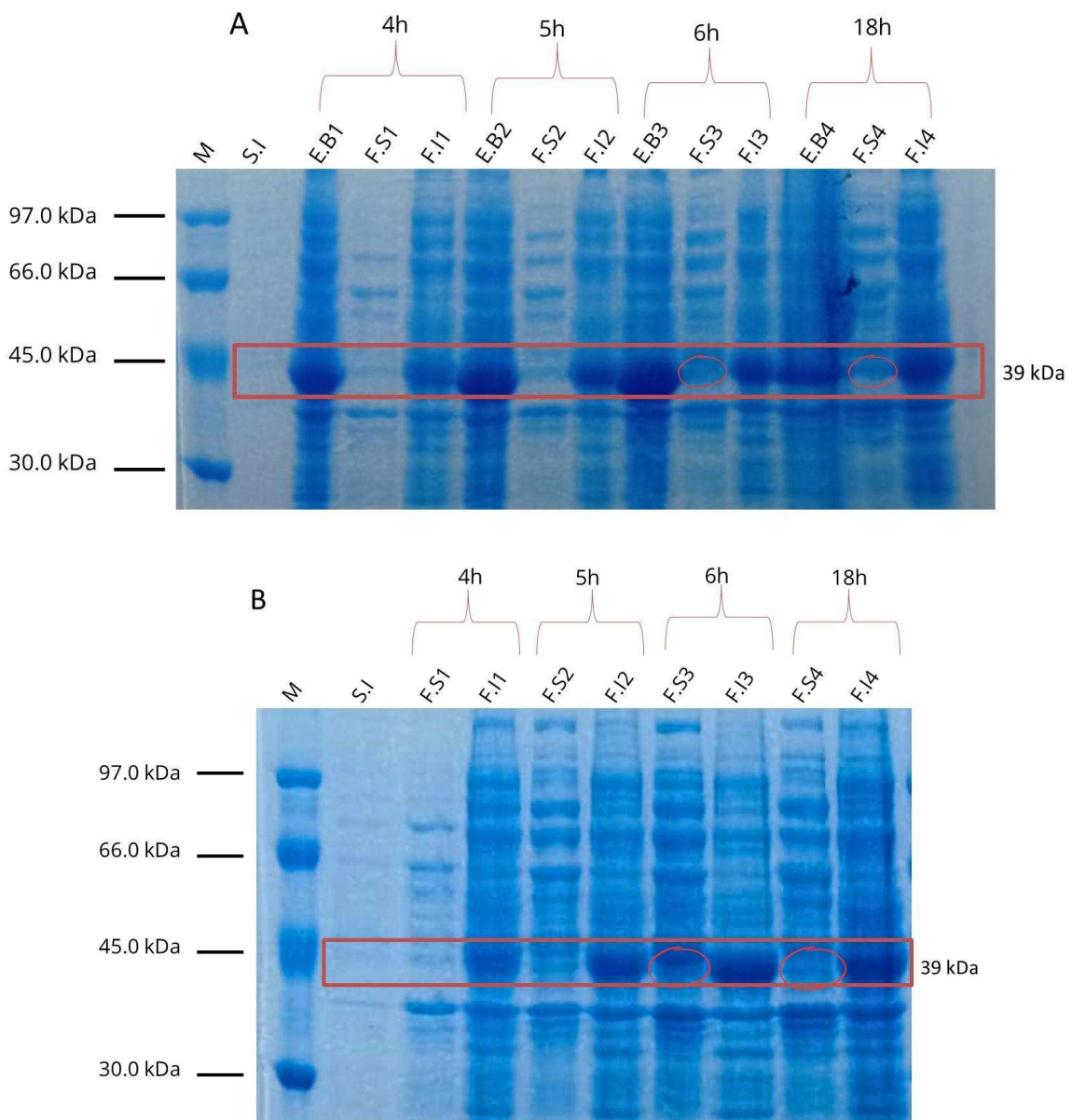
M - marcador de peso molecular de proteínas da Sinapse, EB- extrato bruto; FS- fração solúvel e FI- fração insolúvel, 1 corresponde às alíquotas retiradas após 3 horas de indução, 2 após 4 horas, 3 após 5 horas e 4 corresponde a 18 horas de indução.

Fonte: Elaborado pela autora

A outra condição testada foi 20°C nas concentrações de IPTG de 0.10 mM e de 0.25 mM dessa vez nos tempos de 4, 5, 6 e 18 horas de indução. Pela **Figura 29**

pode-se perceber que com houve uma maior expressão das proteínas do que nas condições anteriores e apesar da proteína ainda se encontrar em maior quantidade nos corpos de inclusão, bandas mais fortes passaram a serem visualizadas na fração solúvel, indicando que a temperatura de 20°C é melhor para a proteína recombinantes ir para a fração solúvel do que as temperaturas de 30°C e 37°C, e de fato, na literatura temperaturas mais baixas favorecem a expressão de proteínas recombinantes na fração solúvel (FALAK; SAJED; RASHID, 2022).

Figura 29: Gel de SDS mostrando a expressão a 20°C, em A com 0.10mM de IPTG e em B com 0.25mM de IPTG, nos tempos de 4, 5, 6 e 18 horas de indução.



M - marcador de peso molecular de proteínas da GE Healthcare, EB- extrato bruto; FS- fração solúvel e FI- fração insolúvel, 1 corresponde às alíquotas retiradas após 4 horas de indução, 2 após 5 horas, 3 após 6 horas e 4 corresponde a 18 horas de indução. Os círculos vermelhos destacam a presença da LbSRPK nas frações solúveis nos tempos de 6 e 18 horas de indução. Não foram corridos os extratos brutos para a condição de 0.25 mM de IPTG.

Fonte: Elaborado pela autora

Além das estratégias mencionadas de otimização de temperatura e concentração do indutor, a adição de aditivos pode ajudar na solubilização da proteína, como a adição de glicose (0.5-1.0 %), que por ser um repressor do operon *lac* quando adicionado no meio vai inibir a expressão basal da proteína, é uma estratégia muito usada quando a proteína recombinante que está sendo expressa é tóxica para a *E. coli*. (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Alguns aditivos podem ajudar a aumentar o rendimento das proteínas solúveis por aumentar a pressão osmótica no meio e levar a produção de osmoprotetores na célula o que indiretamente ajuda na estabilização da proteína nativa, é o caso de compostos como sorbitol, sacarose e glicerol (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Outro aditivo interessante é o etanol, que geralmente causa estresse oxidativo nas células de *e. coli* e induz a produção de proteínas de choque térmico que atuam no dobramento de proteínas, essas proteínas por sua vez, podem ajudar no dobramento da proteína recombinante a aumentar sua concentração na fração solúvel (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; ZHENG *et al.*, 2019). Algumas dessas estratégias serão testadas para tentar aumentar a produção de LbSRPK na fração solúvel.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como os compostos derivados do eugenol, da classe das amidas aromáticas, testados neste trabalho não demonstraram ser tóxicos para as células de macrófagos em concentrações baixas, os oito compostos foram testados quanto a sua atividade leishmanicida em promastigotas de *L. braziliensis*. Apesar de não terem sido capazes de inibir o crescimento do parasito nas condições testadas, estudos do seu potencial leishmanicida em amastigotas podem ser interessantes, pois pode acontecer dos compostos serem capazes de inibir o crescimento e/ou viabilidade de uma forma de leishmania e outra não por conta das diferenças de expressão gênica que existem entre esses dois estágios da vida em leishmanias. Além disso, como os compostos são possíveis inibidores de LbSRPK e foi encontrado maior expressão dessa proteína na forma amastigota em comparação com a promastigota, estudar o potencial leishmanicida dos compostos em amastigotas pode ser promissor.

O *docking* molecular entre os compostos e a proteína LbSRPK mostrou que existem interações, de vários tipos tais como ligação de hidrogênio, ligação carbono-hidrogênio, interações do tipo π - π , π -sigma, interações alquil e π -alquil, além de interações de van der Waals, entre os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da LbSRPK e os compostos testados, apesar de em sua maioria serem ligações fracas, são interações que contribuem para a estabilidade proteína-ligante, além disso, muitas das interações observadas, também estão presentes entre o SRPIN 340 e a SRPK1 humana, contribuindo para a sugestão de que as interações encontradas podem ser significativas em termos de atividade. Esses resultados sugerem que os compostos podem agir como inibidores de LbSRPK.

A partir da melhor pose fornecida pelo *docking* foi possível determinar qual seria o melhor ligante a partir de um servidor que usa funções de pontuação estatística dependentes de distância entre os átomos, o *Pose & Rank*, por meio dele foi possível determinar que os compostos 3-NO₂ e 4-NO₂ parecem ser os melhores candidatos entre os compostos testados. Considerando também, que pelo ensaio de citotoxicidade o composto 4-NO₂ apresentou um alto CC₅₀, isto é, é necessário uma quantidade alta

desse composto para matar 50% das células, ele parece ser o mais promissor entre os compostos testados. Mais estudos são necessários para validar os dados obtidos.

Não se tem muitas informações na literatura sobre o papel e importância de SRPKs em *Leishmanias*, assim, estudar as propriedades dessa proteína cinase pode ser uma ferramenta útil para entender melhor o metabolismo do parasito e a validação dessa proteína como alvo farmacológico pode abrir portas para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse sentido, a proteína LbSRPK está sendo expressa em sistema bacteriano *E. coli* BL21(DE3) para posteriores estudos de caracterização enzimática e também estudos de inibidores, após conseguir altas concentrações desta proteína na fração solúvel, serão feitos estudos de inibição com os oito composto derivados do eugenol para confirmar os dados obtidos pelo *docking*. A obtenção da proteína abre portas para diversos estudos de função, estrutura e inibição da atividade enzimática, que, além de contribuir para entender um pouco melhor uma parte do metabolismo do parasito, podem ajudar a validar essa proteína como um alvo farmacológico interessante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis**. Actas Dermo-Sifiliográficas. [S.l: s.n.], 2021

ABDULLAH, M. L. et al. **Eugenol-induced autophagy and apoptosis in breast cancer cells via pi3k/akt/foxo3a pathway inhibition**. International Journal of Molecular Sciences, 2021

Addgene: **Sequencing Primers**. Disponível em:
<<https://www.addgene.org/mol-bio-reference/sequencing-primers/>>.

ADHAV, V. A.; SAIKRISHNAN, K. **The Realm of Unconventional Noncovalent Interactions in Proteins: Their Significance in Structure and Function**. ACS Omega. [S.l: s.n.], 2023

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. **Immunotherapy in treatment of leishmaniasis**. Immunology Letters. [S.l: s.n.], 2021

ARENAS, R. et al. **Leishmaniasis: A review**. F1000Research. [S.l: s.n.], 2017

BAKER, N. et al. **Systematic functional analysis of Leishmania protein kinases identifies regulators of differentiation or survival**. Nature Communications, 2021.

BEHL, T. et al. **Bioinformatics accelerates the major tetrad: A real boost for the pharmaceutical industry**. International Journal of Molecular Sciences. [S.l: s.n.], 2021

BENDER, B. J. *et al.* **Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts**. *Biochemistry*, 2016.

BESTEIRO, S. *et al.* **Protein turnover and differentiation in Leishmania**. International Journal for Parasitology. [S.l: s.n.], 2007

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 1976.

BRANDL, M. et al. **C-H \cdots π -interactions in proteins.** Journal of Molecular Biology, 2001.

BULUSU, G.; DESIRAJU, G. R. **Strong and Weak Hydrogen Bonds in Protein–Ligand Recognition.** Journal of the Indian Institute of Science. [S.l: s.n.], 2020

CARVALHO, R. L. **Caracterização de Compostos Sintéticos com Potencial Antileishmania: Abordagens *in vitro* e *in silico*.** Dissertação. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2024

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. **Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites.** Communications Biology. [S.l: s.n.], 2022

DE ALMEIDA RODRIGUES, I. et al. **A new experimental culture medium for cultivation of Leishmania amazonensis: Its efficacy for the continuous *in vitro* growth and differentiation of infective promastigote forms.** Parasitology Research, 2010.

DE MUYLDER, G. et al. **A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 2011.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. **Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview.** Parasites and Vectors. [S.l: s.n.], 2012

DU, F. et al. **Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production.** Microbial Cell Factories, 2021.

DUTRA, F. L. *et al.* **Effects of linalool and eugenol on the survival of Leishmania (L.) infantum chagasi within macrophages.** Acta Tropica, 2016.

DURIEU, E. et al. **From drug screening to target deconvolution: A target-based drug discovery pipeline using Leishmania casein kinase 1 isoform 2 to identify compounds with antileishmanial activity.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016.

EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D. **Leishmania protein kinases: Important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis.** Microorganisms, 2021.

EVANGELISTA, R. S. et al. **Synthesis and Evaluation of the Antileishmanial Activity of Novel Eugenol Analogs Containing 1,2,3-Triazole Fragments against Intracellular Leishmania braziliensis.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 2023.

FALAK, S.; SAJED, M.; RASHID, N. **Strategies to enhance soluble production of heterologous proteins in Escherichia coli.** Biologia. [S.l: s.n.], 2022

FAN, H. et al. **Statistical potential for modeling and ranking of protein-ligand interactions.** Journal of Chemical Information and Modeling, 2011.

FANFRLÍK, J. et al. **B-H \cdots π and C-H \cdots π interactions in protein-ligand complexes: carbonic anhydrase II inhibition by carborane sulfonamides.** Physical Chemistry Chemical Physics, 2023.

FERREIRA DE FREITAS, R.; SCHAPIRA, M. **A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB.** MedChemComm, 2017.

GIANNAKOUROS, T. et al. **Serine-arginine protein kinases: A small protein kinase family with a large cellular presence.** FEBS Journal, 2011.

GIESE, M.; ALBRECHT, M. **Alkyl-Alkyl Interactions in the Periphery of Supramolecular Entities: From the Evaluation of Weak Forces to Applications.** ChemPlusChem. [S.l: s.n.], 2020

GOEGAN, P.; JOHNSON, G.; VINCENT, R. **Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures.** Toxicology in Vitro, 1995.

GRÖGL, M. et al. **Leishmania braziliensis: Protein, carbohydrate, and antigen differences between log phase and stationary phase promastigotes in vitro.** *Experimental Parasitology*, 1987.

HE, X. HENG *et al.* **AlphaFold2 versus experimental structures: evaluation on G protein-coupled receptors.** *Acta Pharmacologica Sinica*. [S.l: s.n.]. , 2023

HUGHES, K. et al. **The Antileishmanial Activity of Eugenol Associated with Lipid Storage Reduction Rather Than Membrane Properties Alterations.** *Molecules*, 2023.

ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. **Apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes induced by eugenol-rich oil of Syzygium aromaticum.** *Journal of Medical Microbiology*, 2013.

JONES, G. et al. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking.** *Journal of Molecular Biology*, 1997.

KACHHAWAHA, K. et al. **Bioprocessing of recombinant proteins from Escherichia coli inclusion bodies: insights from structure-function relationship for novel applications.** *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. [S.l: s.n.]. , 2023

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. **Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements.** *International Journal of Biological Macromolecules*. [S.l: s.n.]. , 2018

KRIEGER, E. et al. **Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8.** *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. [S.l: s.n.]. , 2009

KUMAR, S. et al. **Pf SRPK1 Regulates Asexual Blood Stage Schizogony and Is Essential for Male Gamete Formation .** *Microbiology Spectrum*, 2022.

KUMARI, D. et al. **Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update.** *European Journal of Pharmacology*. [S.l: s.n.]. , 2021

LANDFEAR, S. M. *New Vistas in the Biology of the Flagellum—Leishmania Parasites. Pathogens*. [S.l: s.n.], 2022

LEIFSO, K. et al. **Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: The Leishmania genome is constitutively expressed**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007.

LEOPOLDO, J. R. **As Serine/Arginine Protein Kinases De Leishmania braziliensis (LbSRPK's) como novo alvo terapêutico para tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. Dissertação. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa , 2022

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. **Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis**. *Nature Reviews Genetics*. [S.l: s.n.], 2006

PAHO PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION . **Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Region of the Americas**. Second edition ed. washington D.C: [s.n.].

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. **Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects**. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2019.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. **Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment**. *QJM*, 2014.

MICHAELI, S. **Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome**. *Future Microbiology*. [S.l: s.n.], 2011

MIKUS, J.; STEVERDING, D. **A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue®**. *Parasitology International*, 2000.

MOROOKA, S. et al. **Identification of a dual inhibitor of SRPK1 and CK2 that attenuates pathological angiogenesis of macular degeneration in mice**. *Molecular Pharmacology*, 2015.

MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. **Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives.** *Chemical Biology and Drug Design*. [S.l: s.n.], 2019

NELSON; COX, 2014; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leningher Principios de Bioquímica.** 6. ed. [s.l.] Barcelona Omega, 2014.

OCHOA, R. et al. **Identification of potential kinase inhibitors within the pi3k/akt pathway of leishmania species.** *Biomolecules*, 2021.

OPAS. **Leishmaniose.** Organização Pan-Americana de Saúde. Agosto 2024

PAIK, D. et al. **Thermodynamics of π - π Interactions of Benzene and Phenol in Water.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2022.

PIMENTEL, D. C. et al. **First evidence of a serine arginine protein kinase (SRPK) in leishmania braziliensis and its potential as therapeutic target.** *Acta Tropica*, v. 238, p. 106801, fev. 2023.

PORTAL, D. et al. **Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003.

PRADHAN, S. et al. **Treatment options for leishmaniasis. Clinical and Experimental Dermatology.** [S.l: s.n.], 2022

RASHIDI, S. et al. **Potential therapeutic targets shared between leishmaniasis and cancer.** *Parasitology*. [S.l: s.n.], 2021

REIMÃO, J. Q. et al. **Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: Current and future methods.** *Microorganisms*. [S.l: s.n.], 2020

ROATT, B. M. et al. **Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2020

ROSSI, M.; FASEL, N. **How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!** *International Immunology*, 2018.

ROUTARAY, C. B. et al. **Quantitative proteomic analysis reveals differential modulation of crucial stage specific proteins during promastigote to amastigote differentiation in *Leishmania donovani***. Journal of Proteins and Proteomics, 2022.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning - A laboratory manual**. 4. ed. New York: John Ingli, 2012. v. 33

SAMPAIO, R. N. R. et al. **Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis***. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2021.

SAÚDE, O. P.-A. DA. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Núm. 12 (Dezembro de 2023). iris.paho.org, 2023.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. **Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds**. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010.

SIQUEIRA, R. P. et al. **Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)isonicotinamide (SRPIN340)**. PLoS ONE, 2015.

SOARES, G. H. C. et al. **Case report: Coinfection by *leishmania amazonensis* and HIV in a Brazilian diffuse cutaneous leishmaniasis patient**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2020.

TEIXEIRA, L. F. **Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial alvo de fármacos em *Leishmania braziliensis***. Tese. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa , 2018.

TEIXEIRA, R. R. et al. **Eugenol derivatives with 1,2,3-triazole moieties: Oral treatment of cutaneous leishmaniasis and a quantitative structure-activity relationship model for their leishmanicidal activity**. Experimental Parasitology, 2022.

TEIXEIRA, R. R. et al. **Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities**. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. **Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods.** Journal of Parasitic Diseases. [S.l: s.n.], 2020

TOM, A. *et al.* **Interactions between Leishmania parasite and sandfly: a review.** *Parasitology Research.* [S.l: s.n.], 2024

UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* **Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum.** Parasitology International, 2006.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. **Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review.** *International Journal of Molecular Sciences.* [S.l: s.n.], 2021

VAN LOMMEL, R. *et al.* **A Quantum Chemical Deep-Dive into the π - π Interactions of 3-Methylindole and Its Halogenated Derivatives—Towards an Improved Ligand Design and Tryptophan Stacking.** Pharmaceuticals, 2022.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular.** 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014b.

VERMA, G. *et al.* **Review on Leishmaniasis.** Asian Journal of Research in Infectious Diseases, 2022.

VOLPEDO, G. *et al.* **Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL).** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* [S.l: s.n.], 2021

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: **Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.** Nucleic Acids Research, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso julho 2024

WOOLLER, S. K. *et al.* **Bioinformatics in translational drug discovery.** Bioscience Reports. [S.l: s.n.], 2017

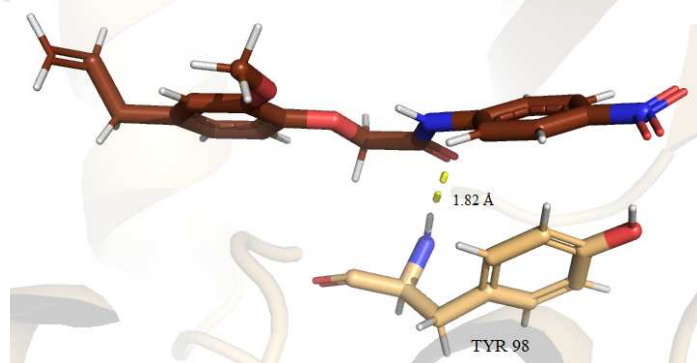
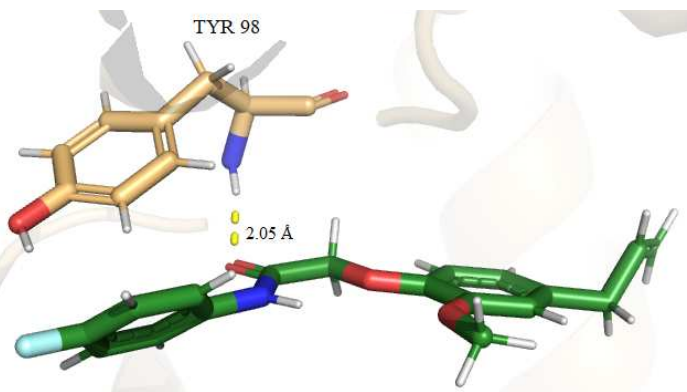
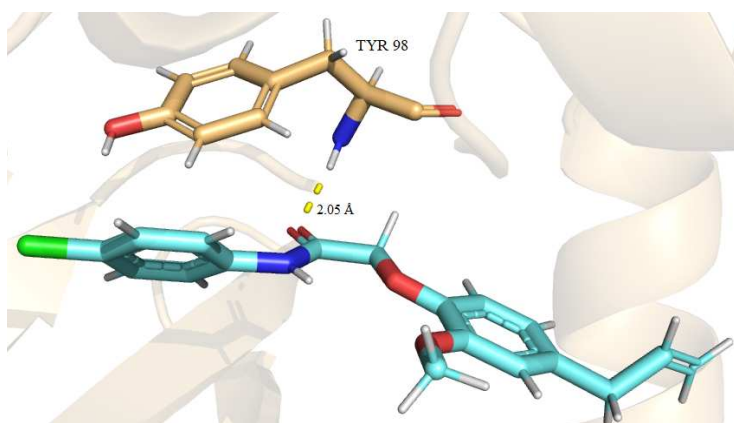
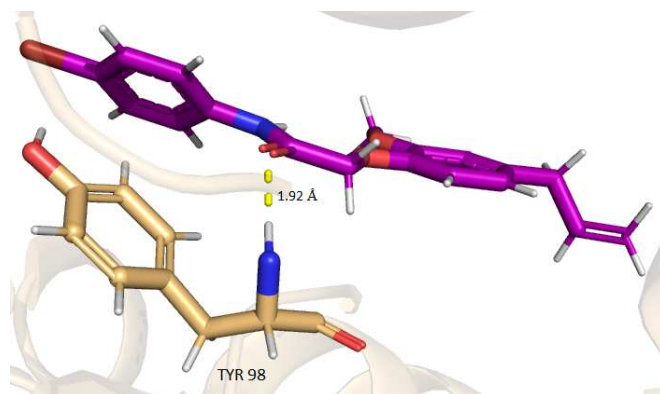
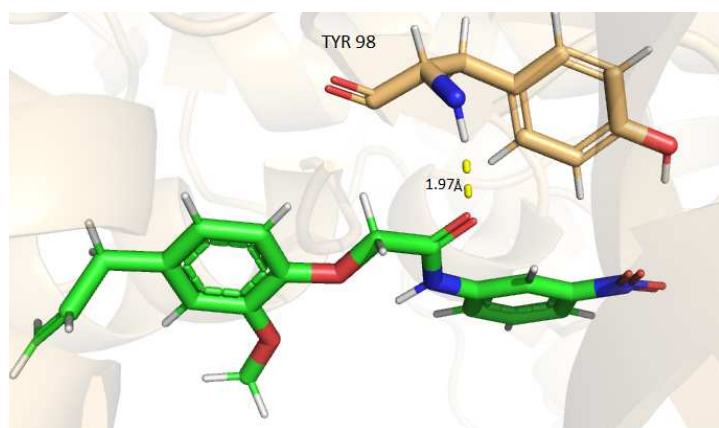
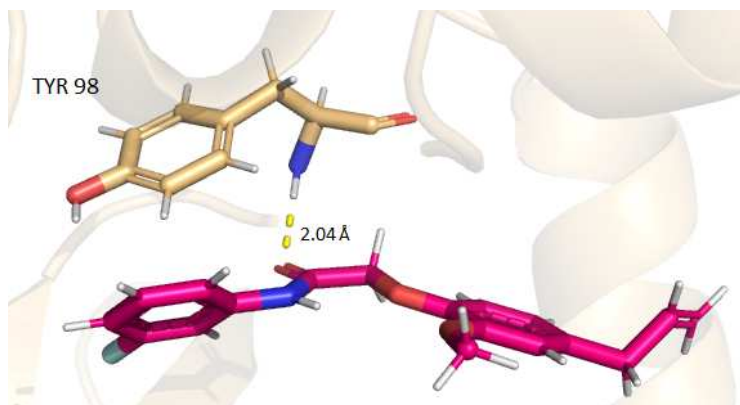
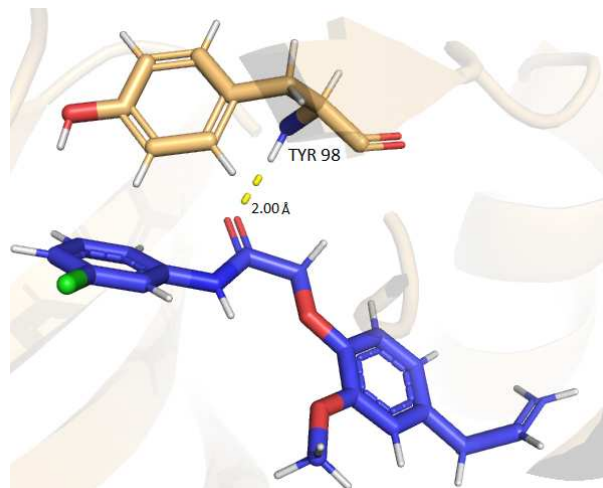
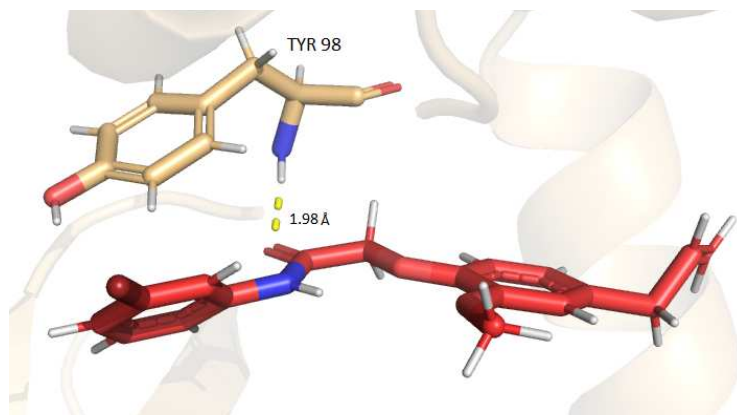
YANG, Z. et al. **AlphaFold2 and its applications in the fields of biology and medicine.** Signal Transduction and Targeted Therapy. [S.l: s.n.], 2023

ZHENG, K.; REN, Z.; WANG, Y. **Serine-arginine protein kinases and their targets in viral infection and their inhibition.** Cellular and Molecular Life Sciences. [S.l: s.n.], 2023

Anexo B: Alinhamento entre a LbSRPK truncada e a não truncada para destacar as regiões que foram removidas

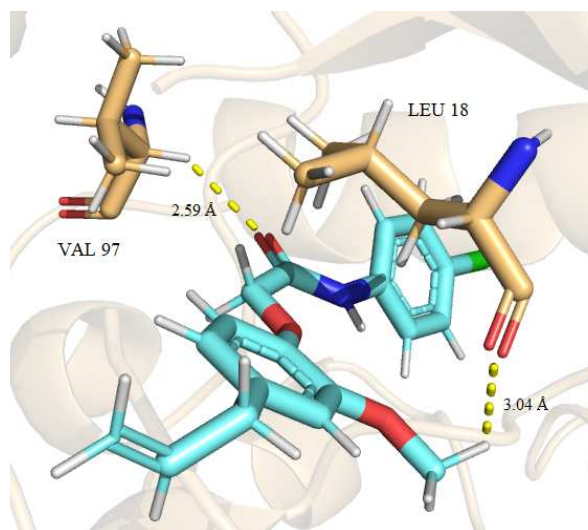
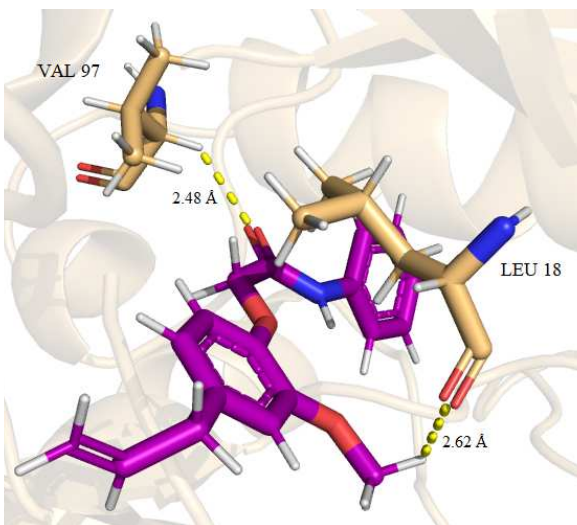
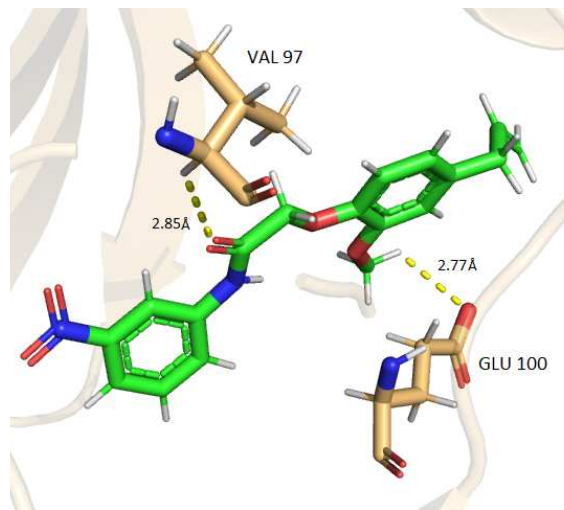
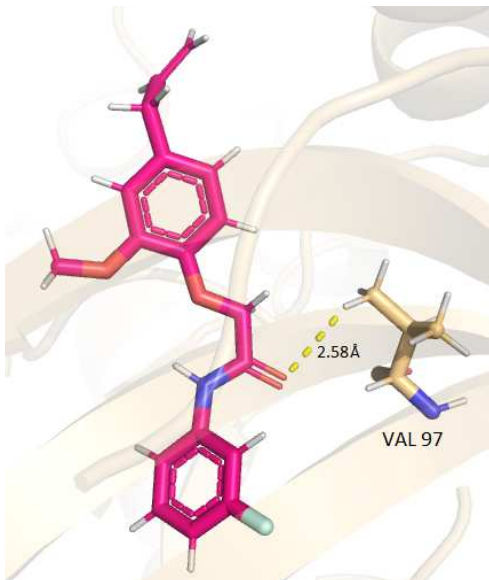
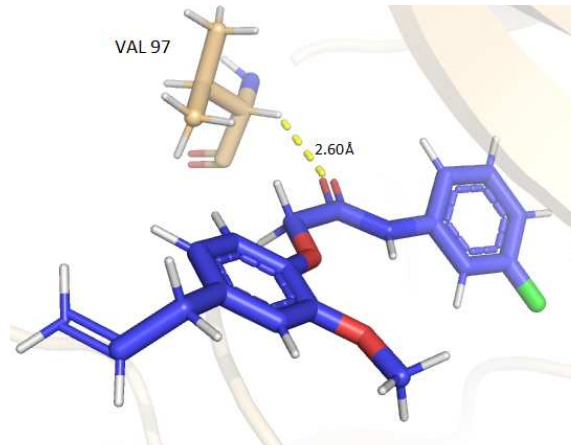
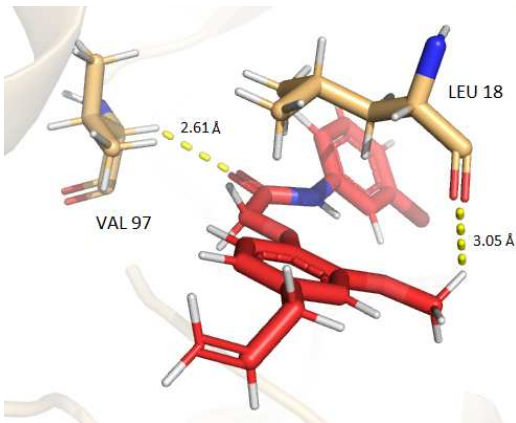
LbSRPKtruncada	-----	0
LbSRPK	MGKSKKHGKPAKGVLKRGNKNDKCKRKAKFIDPASSVSRDVRESVEALVEEIEREELWE	60
LbSRPKtruncada	-----	0
LbSRPK	PQPLIKAKKKRQELVEKESVLFKSGMTKEQGHTITNKLQQQGTTHRSEGEDEESNDGDG	120
LbSRPKtruncada	-----MHHVWIGEVYNNRYRVVKKLGGWYFSTVWLVWDYHKER	38
LbSRPK	GGTEEDYSDTANEPSREYRKGGYHHVWIGEVYNNRYRVVKKLGGWYFSTVWLVWDYHKER *****	180
LbSRPKtruncada	YQAMKIQKSAASYEAAYDEIKLLTEIMEADPHKTRCCARLNDYFKHTGPNGTGTHVCMFLD	98
LbSRPK	YQAMKIQKSAASYEAAYDEIKLLTEIMEADPHKTRCCARLNDYFKHTGPNGTGTHVCMFLD *****	240
LbSRPKtruncada	VYGENLLSLMERYEYRGIPLIVKCIARQVLIGLDHINSIDIIHTDLKPENVLLSTP---	155
LbSRPK	VYGENLLSLMERYEYRGIPLIVKCIARQVLIGLDHINSIDIIHTDLKPENVLLSTPKHS *****	300
LbSRPKtruncada	-----	155
LbSRPK	IISLMKHFHPPLHQRPKLTERRPKTMTKSQRRRYKLAKEERKTLLEKDGHESTRGD	360
LbSRPKtruncada	-----VERFHHVILADFGNSCWYKQFTDEVQTRQYRCPEVIL	193
LbSRPK	ERGTNENGDTSELSKTDPEWEVERFHHVILADFGNSCWYKQFTDEVQTRQYRCPEVIL *****	420
LbSRPKtruncada	GESYSTSIDIWSCACMIFELITGQFLFDPKKGDDYSRDEDHLALMSELLGDLPESMRLGD	253
LbSRPK	GESYSTSIDIWSCACMIFELITGQFLFDPKKGDDYSRDEDHLALMSELLGDLPESMRLGD *****	480
LbSRPKtruncada	GKYRSHYYNSKGVLRNIKDLQYWILEDVLHQRHKFTKKKAKEIADFLLPMLKYSPDTRAT	313
LbSRPK	GKYRSHYYNSKGVLRNIKDLQYWILEDVLHQRHKFTKKKAKEIADFLLPMLKYSPDTRAT *****	540
LbSRPKtruncada	PAAMLRDHDAFFDIQEDDYAPLC-----	336
LbSRPK	PAAMLRDHDAFFDIQEDDYAPLCFVDEGGDDEEGSASDDEEETDSDSSLDSYSSSYSSER *****	600
LbSRPKtruncada	-----	336
LbSRPK	KANRSRQLNNGADRSEAFRYWEHPILNRTYLEERGLTIADVQSVLAGNFLDDAATHKAA	660
LbSRPKtruncada	-----	336
LbSRPK	AEVIRLLSEEADRLSSDRGSAGDEADNEDEDSSDDDKESTQDSEKPEVAVGGVACS NH	720
LbSRPKtruncada	-----	336
LbSRPK	GVEEGKADSTKEDDEESDDGTD	742

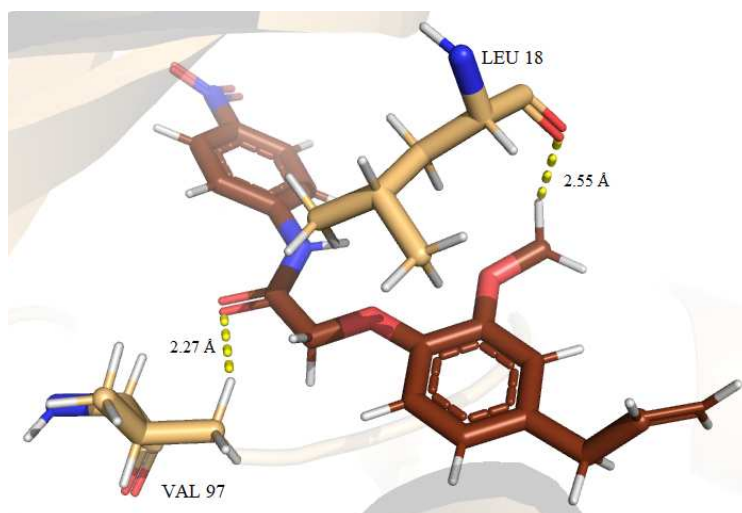
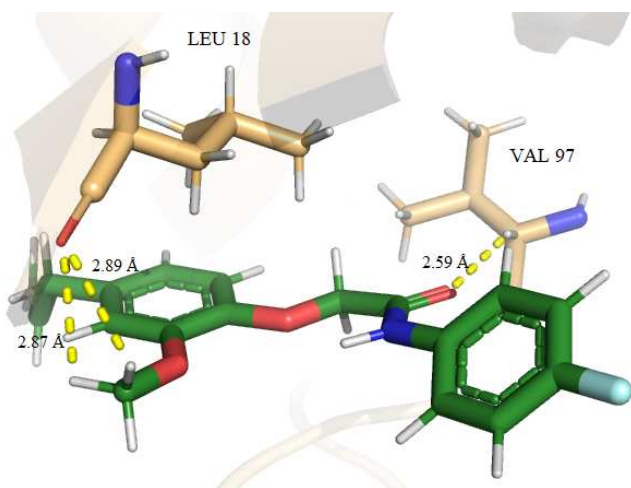
APÊNDICE A - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações de hidrogênio



Representação das ligações de hidrogênio encontradas entre os compostos e o resíduo Tyr 98 e suas distâncias em armstrong. Em vermelho está o composto 3-Br; em azul o 3-Cl, em rosa o composto 3-F; em verde claro o composto 4-NO₂; em roxo o composto 4-Br, em azul claro está o composto 4-Cl, em verde escuro o composto 4-F e em marrom o composto 4-NO₂

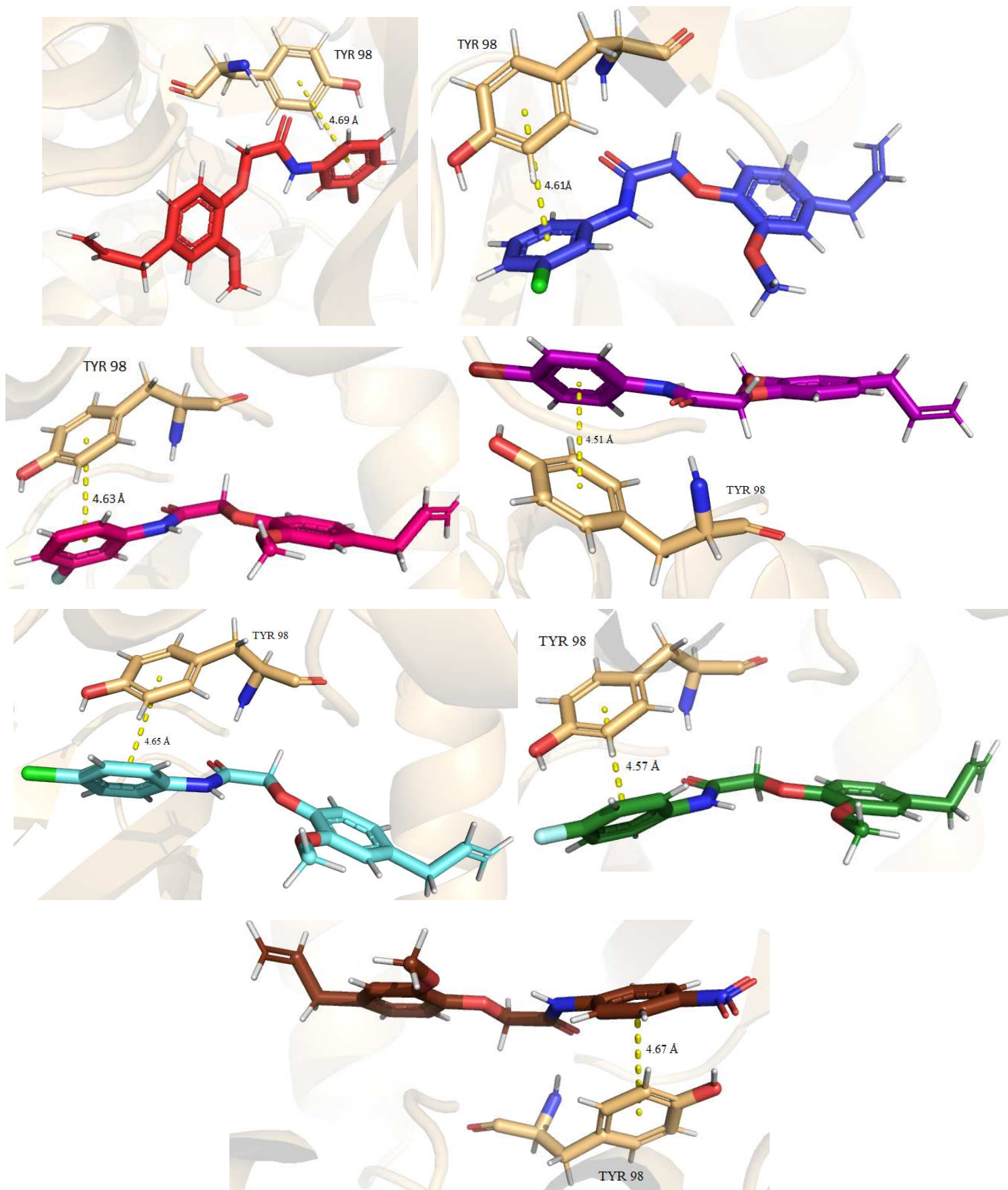
APÊNDICE B - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações carbono-hidrogênio





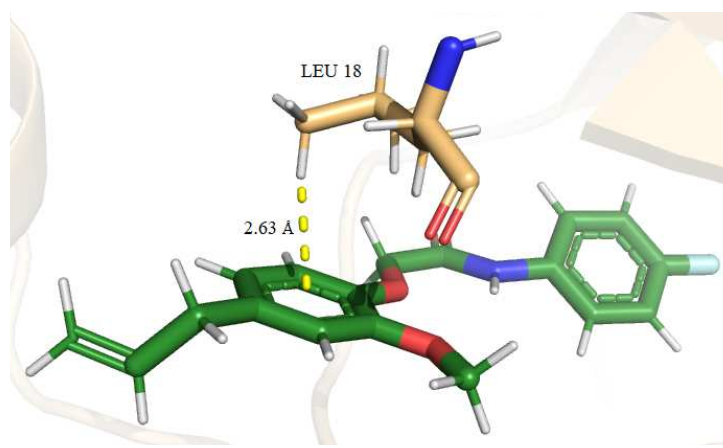
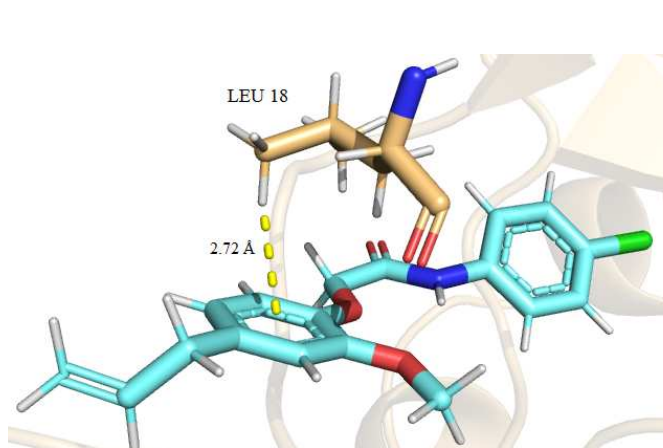
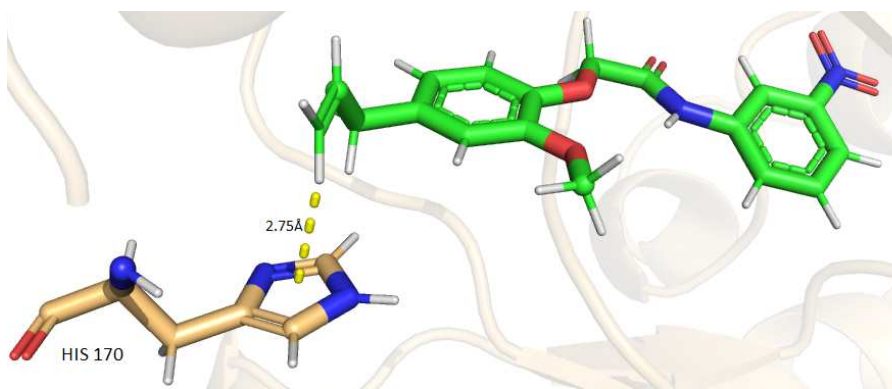
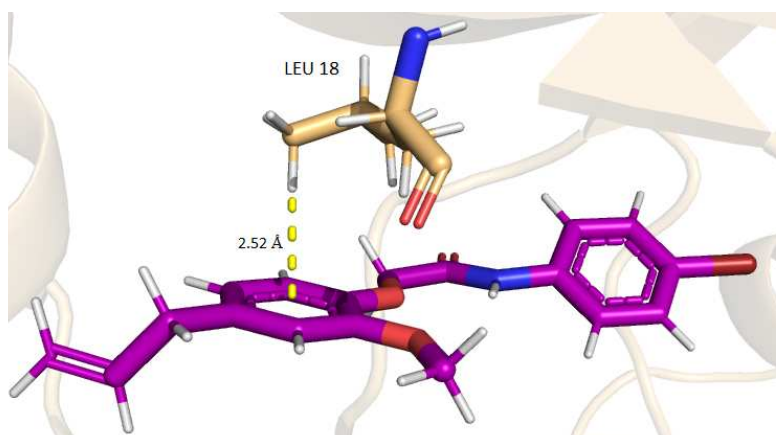
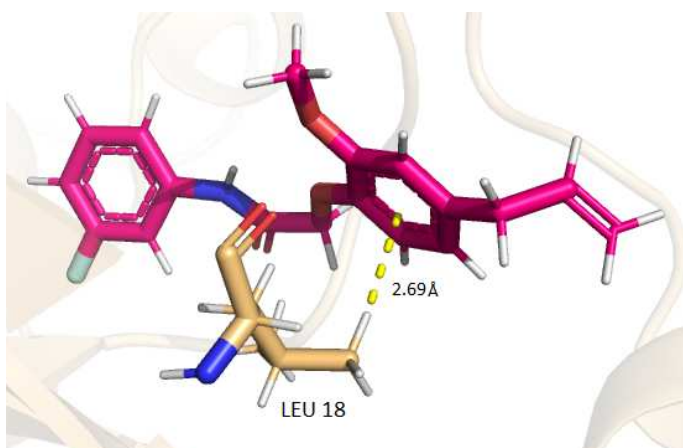
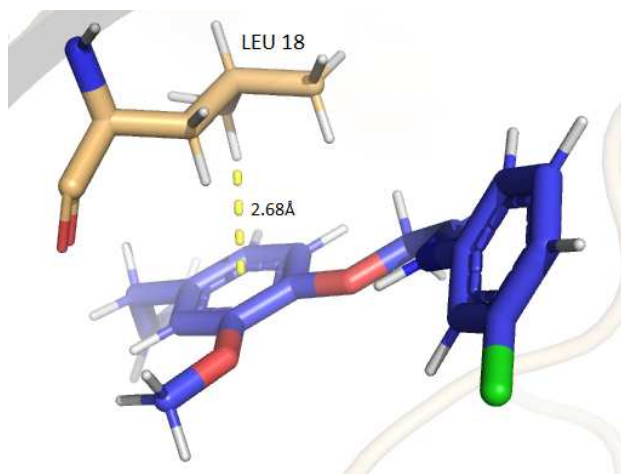
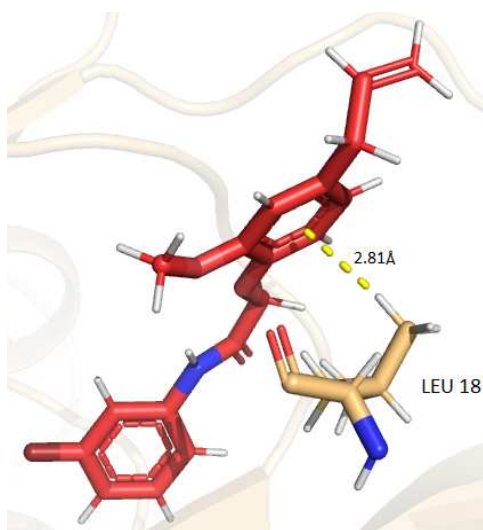
Representação das ligações carbono-hidrogênio (ligações de hidrogênio não-convencionais) encontradas entre os compostos e os resíduos Val 97, Leu18 e Glu100 e suas distâncias em armstrong. Em vermelho está o composto 3-Br; em azul o 3-Cl, em rosa o composto 3-F; em verde claro o composto 3-NO₂, em roxo o composto 4-Br, em azul claro está o composto 4-Cl, em verde escuro o composto 4-F e em marrom o composto 4-NO₂

APÊNDICE C - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo π - π empilhamento-T



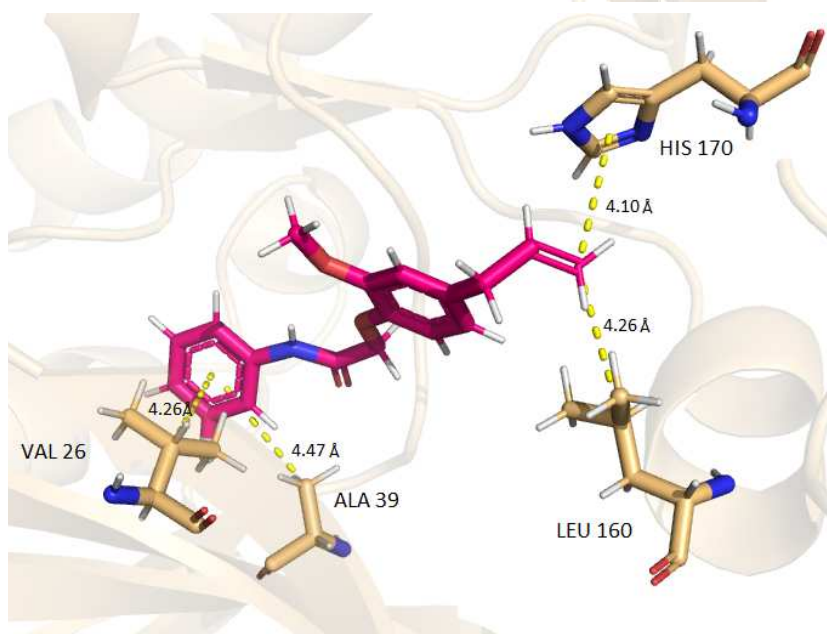
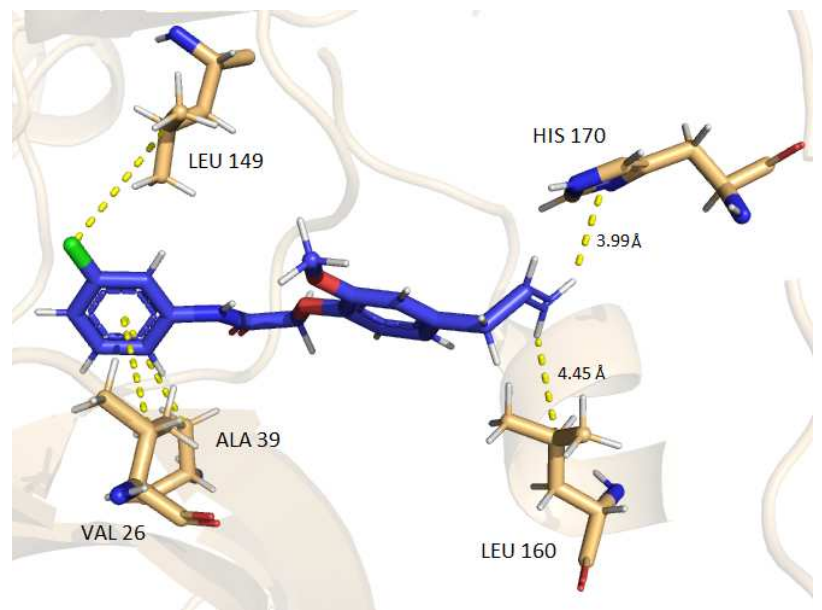
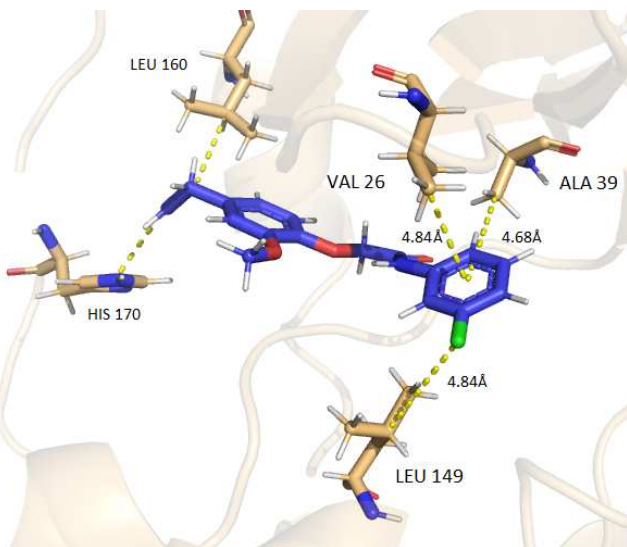
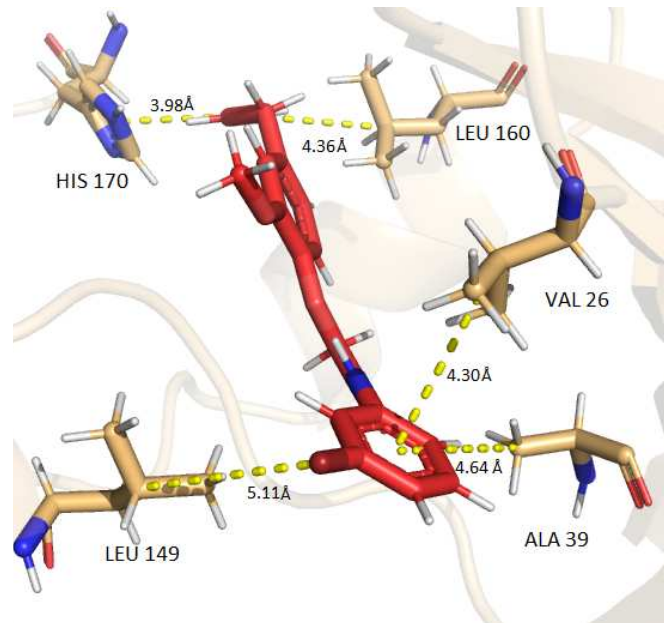
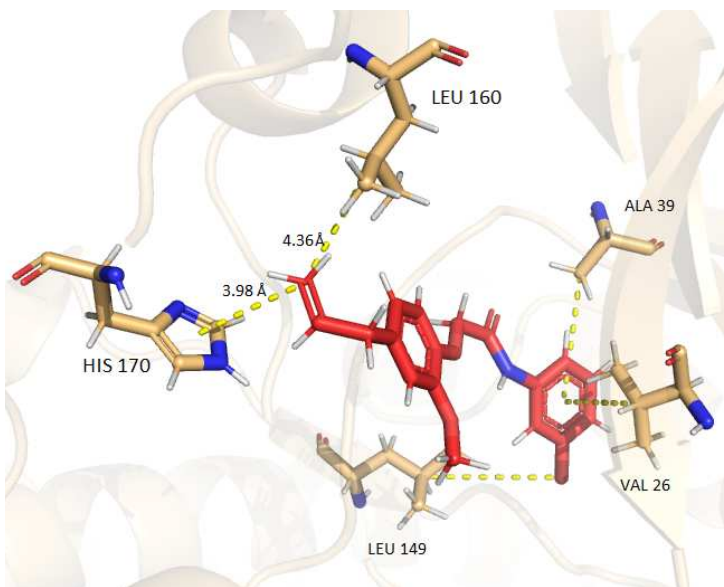
Representação das ligações do tipo pi-pi encontradas entre os compostos e o resíduo Tyr98 e suas distâncias em armstrong. Em vermelho está o composto 3-Br; em azul o 3-Cl, em rosa o composto 3-F; em roxo o composto 4-Br, em azul claro está o composto 4-Cl, em verde escuro o composto 4-F e em marrom o composto 4-NO₂

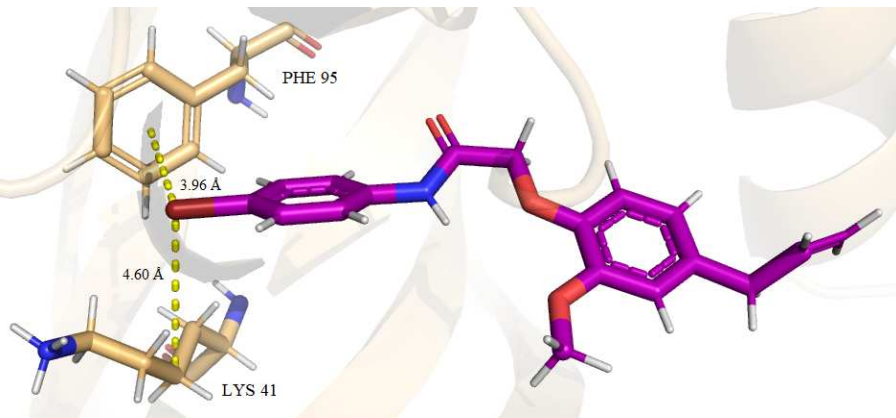
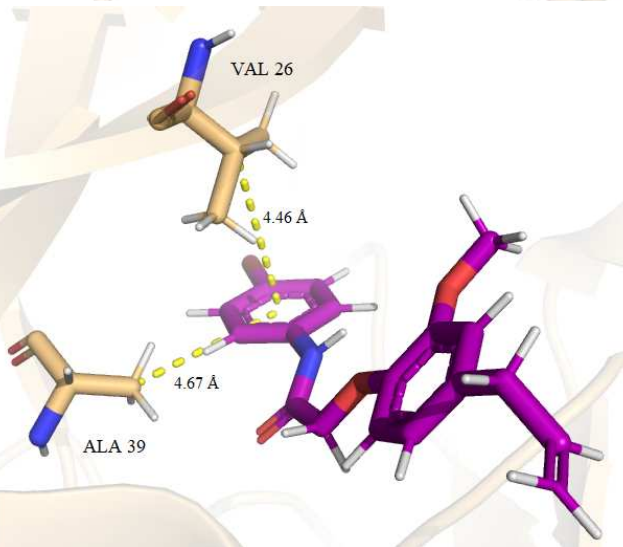
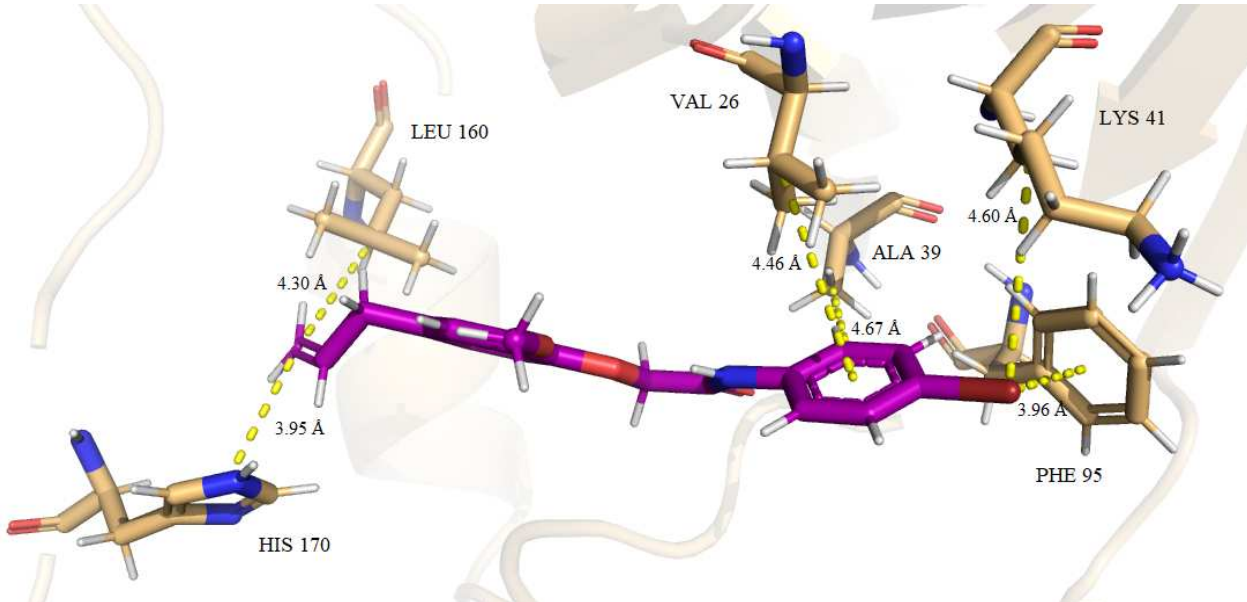
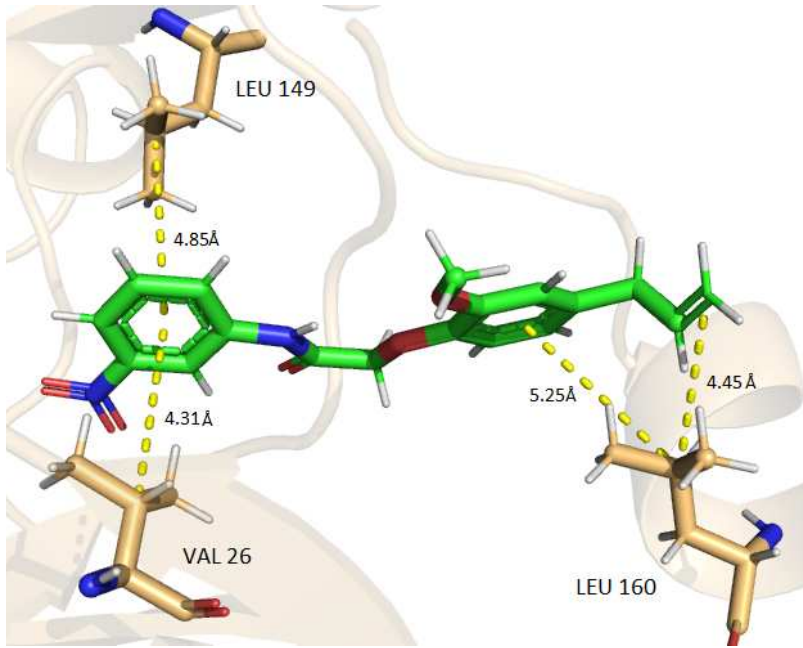
APÊNDICE D - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo π -sigma

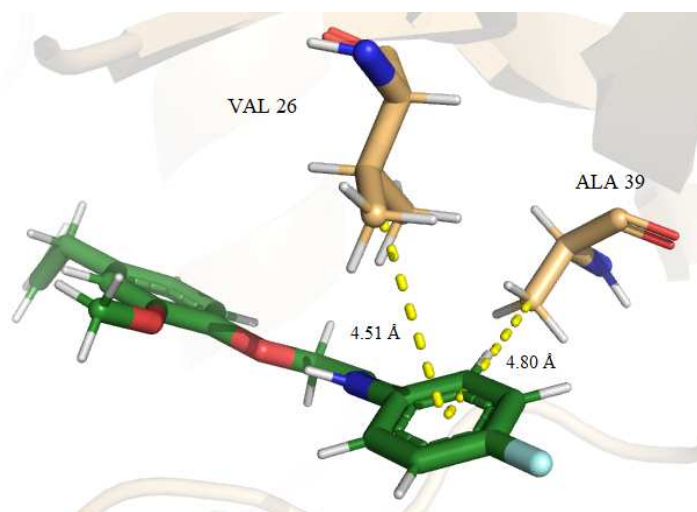
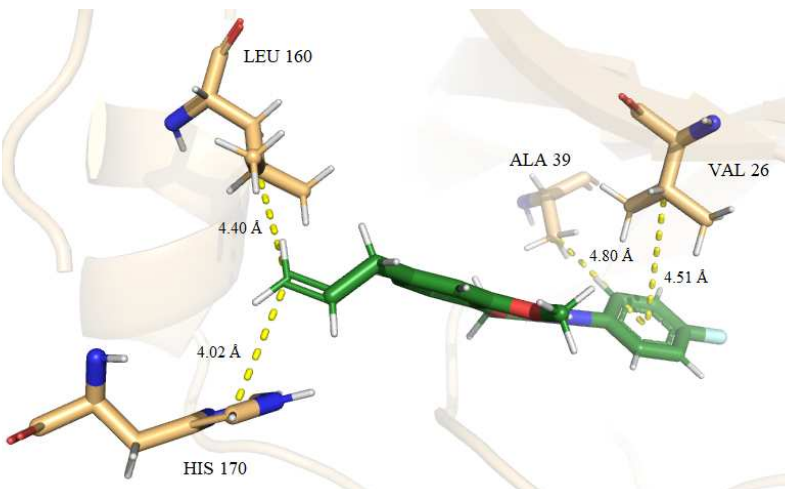
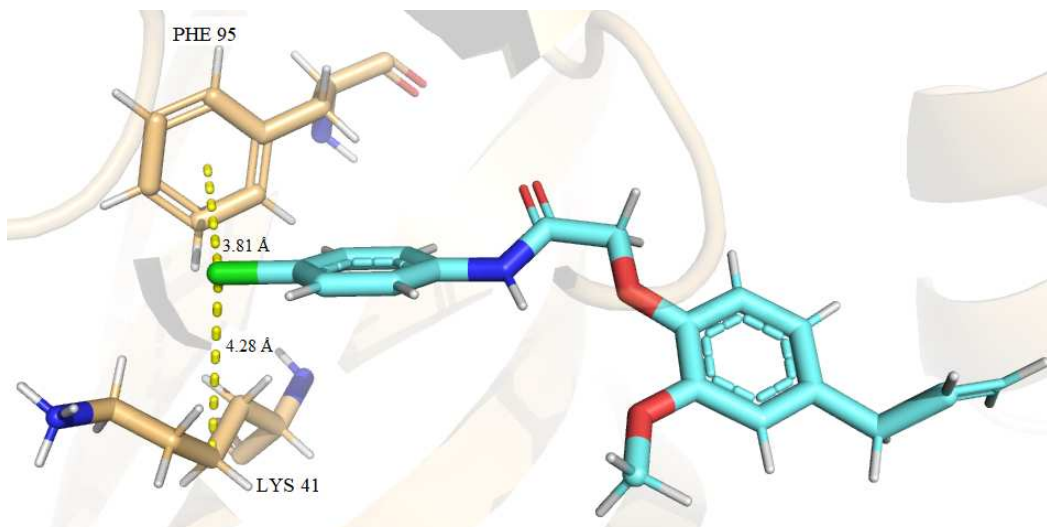
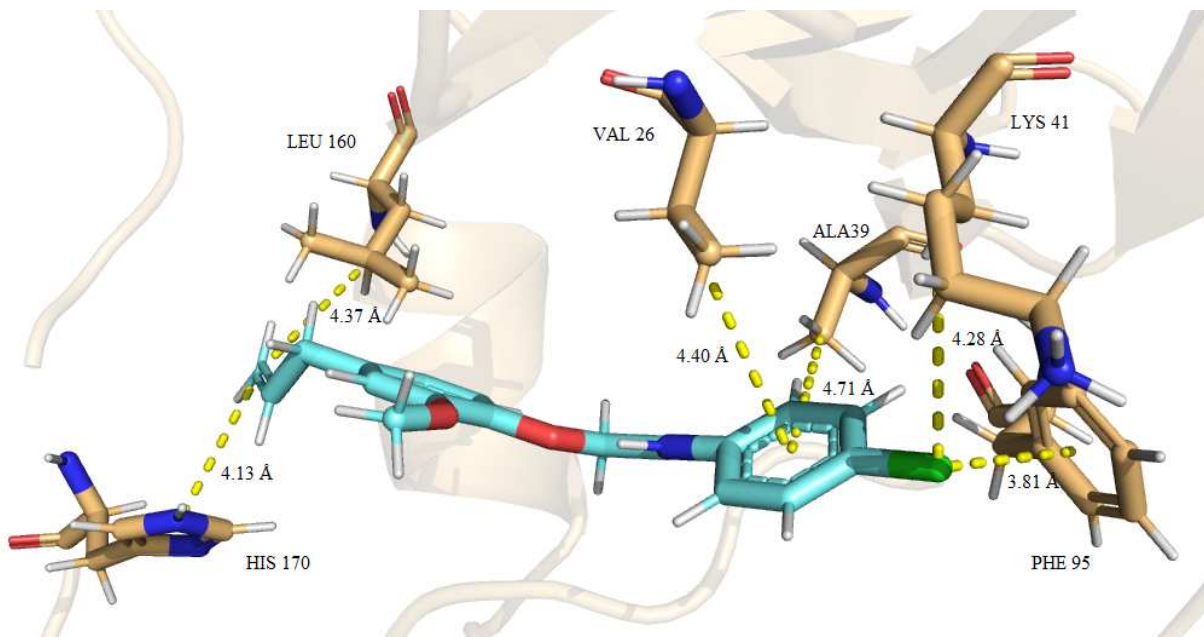


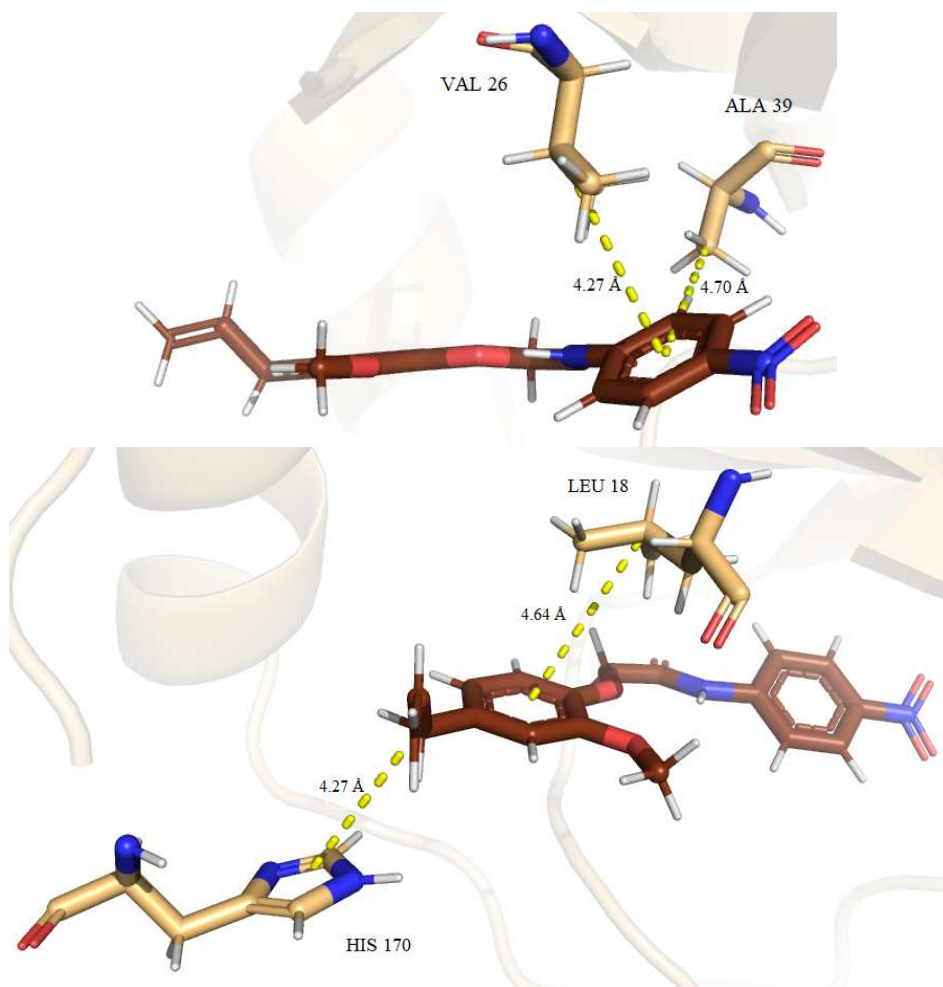
Representação das ligações pi-sigma encontradas entre os compostos e os resíduos Leu18 e His170 e suas distâncias em armstrong. Em vermelho está o composto 3-Br; em azul o 3-Cl, em rosa o composto 3-F; em verde claro o composto 3-NO₂, em roxo o composto 4-Br, em azul claro está o composto 4-Cl e em verde escuro o composto 4-F.

APÊNDICE E - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - Ligações tipo alquil e π -alquil



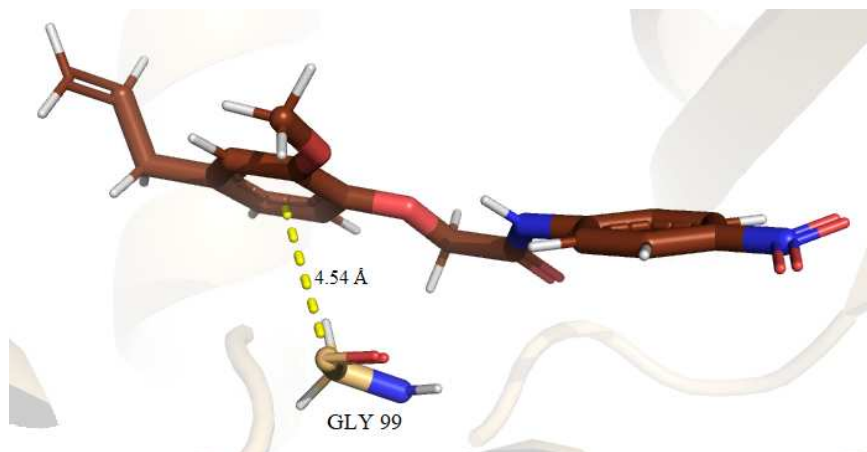






Representação das ligações alquil e pi-alquil encontradas entre os compostos e os resíduos Leu18, His170, Val26, Ala39, Leu160, Lys41, Phe95, Leu149 e suas distâncias em armstrong, os resíduos variam de composto para composto. Em vermelho está o composto 3-Br; em azul o 3-Cl, em rosa o composto 3-F; em verde claro o composto 3-NO₂, em roxo o composto 4-Br, em azul claro o composto 4-Cl, em verde escuro o composto 4-F e em marrom o composto 4-NO₂. Alguns compostos possuem mais de uma figura mostrando as interações para facilitar a visualização das mesmas.

APÊNDICE F - Ilustrações dos tipos de interação encontradas entre os ligantes e a LbSRPK - pi-amida



Representação da ligação pi-amida entre o resíduo Gly99 e o composto 4-NO₂ e sua distância em armstrong.