

LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS DO EFEITO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE
ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* IN VITRO
E IN VIVO EM MODELO MURINO**

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

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

Coorientadores: Eduardo de A. M. da Silva
Gustavo Costa Bressan
Raphael de S. Vasconcellos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

S729e
2022 Souza, Luciana Ângelo de, 1986-
Estudos bioquímicos do efeito leishmanicida de inibidores
de enzimas modificadoras de histonas em *Leishmania
braziliensis in vitro e in vivo* em modelo murino / Luciana
Ângelo de Souza. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (125 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.218>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Epigenética. 3. Histona
deacetilase - Inibidores. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel, 1971-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 579.84

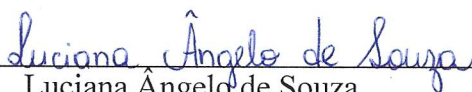
LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA

ESTUDOS BIOQUÍMICOS DO EFEITO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* IN VITRO E IN VIVO EM MODELO MURINO

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

APROVADA: 19 de abril de 2022.

Assentimento:



Luciana Ângelo de Souza
Autora



Juliana Lopes Rangel Fietto
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha Nossa Senhora de Fátima, por toda força, proteção e amparo durante cada segundo de mais este desafio.

Gratidão aos meus pais, Maria Lúcia e Sebastião, e à minha irmã, Juliana, pelo amor incondicional e apoio irrestrito em todos os momentos.

Gratidão ao meu marido Feiber, pelo companheirismo, paciência e por não medir esforços para que tudo pudesse dar certo nas horas a fio de trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Juliana Fietto, pelos ensinamentos, por confiar em meu trabalho e por sempre me incentivar e não me deixar desistir.

Agradecimento aos professores Eduardo Marques e Leandro Licursi, pela prontidão, boa vontade e paciência em sempre ajudar, explicar e ensinar. Com certeza, vocês foram fundamentais para realização e conclusão deste trabalho.

Agradecimento aos professores Gustavo Bressan, Raphael Vasconcellos e Mariana Neves, pela colaboração e boa vontade.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e a seus respectivos alunos pela colaboração no uso de equipamentos e empréstimos de materiais.

Agradeço à Lethícia, Victor Ferraz, Joice e Larissa, pelo companheirismo, prontidão e boas horas de diversão durante os experimentos *in vivo*. Lembranças boas, sempre!

Agradecimento à Sabrina e à Adriana pela troca de conhecimentos e colaboração durante a caminhada.

Agradecimento à Grazi, Ju Alves, Anna Cláudia e Ingrid pela colaboração e prontidão na realização dos experimentos *in vivo*.

Agradecimento à Flávia, pelo auxílio na dosagem de citocinas na etapa final deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental.

Agradecimento à Solange do Departamento de Nutrição da UFV, pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

Agradeço ao Sr. Valdir (*in memoriam*) e à Dayse, pela preocupação, boa vontade e auxílio na preparação dos materiais, e pelas boas risadas!

Agradeço à Beth, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por tamanha paciência, boa vontade e carinho com que sempre faz o seu trabalho.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Biologia Geral pela prontidão em ajudar quando preciso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, onde foram realizadas as análises de citometria de fluxo.

À União Européia: “This Project has received funding from the European Union’s Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 602080”.

Gratidão, sempre!

“O caminho do progresso não é rápido nem fácil.”

(Marie Curie)

RESUMO

SOUZA, Luciana Ângelo de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Estudos bioquímicos do efeito leishmanicida de inibidores de enzimas modificadoras de histonas em *Leishmania braziliensis* in vitro e in vivo em modelo murino.** Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Eduardo de Almeida Marques da Silva, Gustavo Costa Bressan e Raphael de Souza Vasconcellos.

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por espécies patogênicas do gênero *Leishmania*. *Leishmania braziliensis* é a principal espécie causadora de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Novo Mundo. O tratamento das leishmanioses é limitado, causa efeitos colaterais graves e os parasitos têm desenvolvido resistência. Histonas Deacetilases (HDACs), Proteínas Argininas Metiltransferase (PRMTs) e Amino-oxidases Dependentes de FAD (LSD1) são enzimas envolvidas no controle da estrutura da cromatina e são possíveis alvos para novos medicamentos contra as leishmanioses. Neste trabalho foram testados 86 inibidores dessas enzimas contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* na infecção *in vitro* e três inibidores foram testados em modelo de infecção animal. Os resultados mostram que oito inibidores de PRMTs e LSD1 apresentaram baixa toxicidade para macrófagos e efeito leishmanicida superior a 50% nos ensaios de infecção. BSF2 foi o inibidor selecionado com o melhor potencial leishmanicida. Para os inibidores de HDAC (HDACi), cinco mostraram efeito leishmanicida significativo, com EC₅₀ entre 4,38 - 10,21 µM e índice de seletividade de 6 a 21,7. Resultados de citometria de fluxo corroboram com análises de microscopia eletrônica de transmissão indicando que os HDACi levam a alterações no ciclo celular e indução de apoptose em *L. braziliensis*. A produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados não foi alterada após o tratamento com os cinco principais HDACi. Na experimentação animal, os compostos TH60 (5 mg/kg) e o TH74 (10 mg/kg) diminuíram a lesão na pata dos camundongos infectados, sendo o efeito maior e igual ao do medicamento Glucantime®, respectivamente. A diminuição da lesão corroborou com a ausência de parasitos nas lesões e com o aumento de TNF e INF-γ. As análises bioquímicas e histopatológicas mostraram menor toxicidade dos HDACi em relação ao Glucantime®. Esses resultados demonstram que inibidores de HDAC, PRMTs e LSD1 podem ser promissores para o tratamento da LTA.

Palavras-chave: Epigenética. HDACs. Inibidores de HDACs. *Leishmania braziliensis*

ABSTRACT

SOUZA, Luciana Ângelo de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Biochemical studies of the leishmanicidal effect of histone modifying enzyme inhibitors on *Leishmania braziliensis* in vitro and in vivo in a murine model.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Eduardo de Almeida Marques da Silva, Gustavo Costa Bressan and Raphael de Souza Vasconcellos.

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by pathogenic species of the genus *Leishmania*. *Leishmania braziliensis* is the main species causing american tegumentary leishmaniasis (ACL) in the New World. The treatment of leishmaniasis is limited, causes serious side effects, and the parasites have developed resistance. Histone Deacetylases (HDACs), Protein Arginine Methyltransferase (PRMTs) and FAD-Dependent Amino Oxidases (LSD1) are enzymes involved in the control of chromatin structure and are possible targets for the development of new drugs against leishmaniasis. In this work, 86 inhibitors of these enzymes were tested against intracellular amastigotes of *L. braziliensis* in *in vitro* infection and three inhibitors were tested in animal infection model. The results show that eight inhibitors of PRMTs and LSD1 showed low toxicity to macrophages and a leishmanicidal effect greater than 50% in the infection assays. BSF2 was the inhibitor selected with the best leishmanicidal potential. For HDAC inhibitors (HDACi), five showed significant leishmanicidal effect, with EC₅₀ between 4.38 - 10.21 µM and selectivity index from 6 to 21.7. Flow cytometry results corroborate transmission electron microscopy analysis indicating that HDACi lead to cell cycle changes and apoptosis induction in *L. braziliensis*. Nitric oxide production by infected macrophages was not altered after treatment with the five main HDACi. In animal experiments, the compounds TH60 (5 mg/kg) and TH74 (10 mg/kg) reduced the lesion in the paw of infected mice, and the effect was greater and equal to that of the drug Glucantime®, respectively. The decrease in the lesion corroborated the absence of parasites in the lesions and the increase in TNF and INF-γ. Biochemical and histopathological analyzes showed lower toxicity of HDACi in relation to Glucantime®. These results demonstrate that HDAC inhibitors, PRMTs and LSD1 may be promising for the treatment of ATL.

Keywords: Epigenetics. HDACs. HDAC inhibitors. *Leishmania braziliensis*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no hospedeiro vertebrado.....	20
Figura 2. Manifestações clínicas das leishmanioses.....	21
Figura 3. <i>Status</i> da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo para o ano 2020 segundo a Organização Mundial de Saúde.....	22
Tabela 1. Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de leishmaniose tegumentar americana no Velho e no Novo Mundo.....	23
Tabela 2. Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses, seu modo de ação específico, efeitos adversos e vias de administração.....	26
Figura 4. Polarização da resposta imune e ativação de macrófagos M1 e M2.....	31
Figura 5. Graus de compactação da cromatina e o processamento da informação genética	33
Figura 6. Dinâmica dos processos de acetilação e deacetilação	34
Figura 7. Classes I, II, III e IV de HDACs	35
Figura 8. Grupos de trabalho do Consórcio A-ParaDDisE	41
Figura 9. Avaliação da atividade de HDAC de macrófagos não infectados e infectados com <i>L. braziliensis</i> após o tratamento com os HDACi TH74 e TH85.....	74
Figura 10. Teste de toxicidade aguda para o HDACi TH74 em camundongos BALB/c.....	76
Figura 11. Experimento piloto da cinética da lesão na pata de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i>	78
Figura 12. Experimento piloto da cinética da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i>	79
Figura 13. Tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85 de lesão na pata de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i>	81
Figura 14. Quantificação da carga parasitária na pata de camundongos BALB/c tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	83
Figura 15. Produção das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , TNF, IL-2 e IL-17 por células do linfonodo de drenagem da pata infectada de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	85

Figura 16. Produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-6 e IL-10 por células do linfonodo de drenagem da pata infectada de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	87
Figura 17. Dosagem de creatinina plasmática de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	91
Figura 18. Dosagem plasmática das enzimas hepáticas AST, ALT e FAL de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	93
Tabela 3. Análises histopatológicas do fígado, rins, coração e baço dos animais após o tratamento com os HDACi.....	96
Tabela 4. Teste de triagem de inibidores de PRMT e LSD1: avaliação da toxicidade para os macrófagos e do efeito leishmanicida sobre amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i>	102
Tabela 5. CC ₅₀ para macrófagos e EC ₅₀ para amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> dos inibidores de PRMT e LSD1 selecionados nos testes de triagem.....	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A-ParaDDisE – *Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics*

CoREST – Complexo correpressor modificador de cromatina

DC – Células dendríticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina

FDA – *Food and Drug Administration*

HATs – Histonas acetilases

HDACs – Histonas deacetilases

HDMs – Histonas demetilases

HMEs – Enzimas modificadoras de histonas

HMTs – Histonas metiltransferases

HDACi – Inibidores de HDAC

IFN- γ – Interferon Gama

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IS – Índice de seletividade

LC – Leishmaniose cutânea

LSD1 – Amino-oxidases dependentes de FAD

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NK – Células natural killer

NO – Óxido nítrico

NuRD – Complexo de Remodelação de Nucleossomo e Desacetilase NuRD

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PRMTs – Proteínas argininas metiltransferases

PTMs – Modificações pós-traducionais

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SAH – S-adenosil-L-homocisteína

SAHA – Ácido hidroxâmico suberoilânida

SAM – S-adenosil-L-metionina

TLRs – Receptores do tipo toll

TSA – Tricostatina A

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1. Leishmanioses e leishmaniose tegumentar americana.....	19
1.2. Imunobiologia das leishmanioses	27
1.3. Enzimas Modificadoras de Histonas e Modificações Pós-traducionais.....	31
1.4. Inibidores de HDACs, PRMTs e LSD1.....	37
1.5. O Consórcio de Pesquisa A-ParaDDIsE.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivo Geral.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Cepa M2904 de <i>L.braziliensis</i>	45
4.2. Linhagem de macrófagos Raw.264.7.....	45
4.3. Formas promastigotas metacíclicas de <i>L. braziliensis</i> M2904 GFP.....	46
4.4. Compostos inibidores de HDAC (HDACi), de PRMTs e LSD1	46
4.5. Determinação da citotoxicidade dos inibidores de PRMTs e LSD1 em macrófagos.....	47
4.6. Determinação do efeito leishmanicida de inibidores de PRMTs e LSD1 no ensaio de infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i>	47
4.7. Determinação da concentração citotóxica (CC ₅₀) dos inibidores de HMEs em macrófagos.....	48
4.8. Determinação da concentração efetiva (EC ₅₀) dos inibidores de HMEs no ensaio de infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i>	48
4.9. Determinação da concentração efetiva (EC ₅₀) dos HDACi em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	48
4.10. Índice de seletividade.....	49
4.11. Ensaio por citometria de fluxo (CF): viabilidade, apoptose e ciclo celular.....	49
4.12. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos Raw 264.7 infectados com <i>L. braziliensis</i>	49

4.13. Ensaio de atividade de HDAC.....	50
4.14. Animais	50
4.15. Teste de toxicidade aguda.....	50
4.16. Desenvolvimento de lesão.....	51
4.17. Tratamento com os HDACi.....	52
4.18. Eutanásia.....	52
4.19. Dosagem da carga parasitária.....	52
4.20. Dosagem de citocinas.....	53
4.21. Dosagem de enzimas hepáticas e renal.....	54
4.22. Análises histológicas.....	54
4.23. Análises estatísticas.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Resultados para os HDACi.....	56
5.1.1. Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against <i>Leishmania braziliensis</i> , the main causative agent of new world Tegumentary leishmaniasis.....	56
5.1.2. Atividade de HDAC de macrófagos não infectados e infectados com <i>L.</i> <i>braziliensis</i> após o tratamento com os HDACi TH74 e TH85.....	73
5.1.3. Efeito dos inibidores de HDAC em modelo camundongo de infecção experimental por <i>L. braziliensis</i>	73
5.1.3.1. Teste de toxicidade aguda com o HDACi TH74 em camundongos BALB/c.....	75
5.1.3.2. Cinética de lesão na orelha e na pata de camundongos BALB/c após infecção com <i>L. braziliensis</i>	77
5.1.3.3. Tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85 da lesão na pata de camundongos infectados com <i>L. braziliensis</i>	80
5.1.3.4. Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i>	82
5.1.3.5. Avaliação da produção de citocinas (TNF, INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17) em cultura de células de linfonodo de drenagem da pata de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	84

5.1.3.6. Determinação dos níveis plasmáticos das enzimas creatinina, AST, ALT e FAL de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	90
5.1.3.7. Análises histopatológicas de fígado, rins, baço e coração de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85.....	95
5.2. Resultados para os inibidores de PRMTs e LSD1.....	101
5.2.1. Testes de triagem dos inibidores de PRMTs e LSD1 em macrófagos e na infecção em amastigotas <i>L. braziliensis</i>	101
5.2.2. Determinação da concentração citotóxica (CC ₅₀) em macrófagos e da concentração efetiva (EC ₅₀) nos ensaios de infecção para os inibidores de PRMTs e LSD1.....	105
6. CONCLUSÕES.....	107
7. PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110

INTRODUÇÃO GERAL

As doenças parasitárias negligenciadas como a doença de Chagas, a Malária e a Esquistossomose, são causa de altas morbidade e mortalidade globais, principalmente, em regiões subdesenvolvidas do mundo (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012). Entre essas doenças, destacam-se as leishmanioses, que são infecções tropicais negligenciadas que permanecem como grande problema de saúde pública, em especial, nas Américas, África Oriental, Norte e Oeste da África e Sudeste Asiático (RUIZ-POSTIGO et al., 2021).

Protozoários parasitos do gênero *Leishmania* são os agentes causadores das leishmanioses, sendo a transmissão destes ao hospedeiro vertebrado ocasionada pela picada de fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (MOHAPATRA, 2014). As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: a forma tegumentar, que é a mais prevalente e inclui as formas cutânea (LC) e mucocutânea, e a forma visceral (LV), que é a forma mais severa da doença, levando à morte de aproximadamente 90% dos pacientes não tratados (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; STOCKDALE; NEWTON, 2013).

Leishmania braziliensis é a principal espécie causadora de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Novo Mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que em 2020, foram reportados 208.357 novos casos de LC e que 89 países (dos 200 que se reportaram à OMS) eram endêmicos para a doença (RUIZ-POSTIGO et al, 2021).

A terapêutica para as leishmanioses, incluindo a LTA, é bastante restrita. Não há nenhuma vacina clinicamente disponível contra a doença e os medicamentos utilizados no tratamento são os mesmos há mais de 50 anos. Embora eficazes, os efeitos colaterais provocados por esses medicamentos são muitos e graves, como por exemplo, lesão renal (CHUA et al., 2017). Os antimonialis pentavalentes são os medicamentos de primeira linha para o tratamento das leishmanioses, seguidos da anfotericina B. Outros medicamentos alternativos, como o alopurinol e a paromomicina também são empregados na terapêutica. Além dos efeitos colaterais graves, o tratamento da doença é prologando, o que faz com que muitos pacientes desistam do tratamento antes deste ser finalizado. Outro fator preocupante que emergiu recentemente na terapêutica das leishmanioses é o fato de algumas espécies de *Leishmania* apresentarem resistência às medicações disponíveis. Diante desse cenário, a busca por novos medicamentos com novos mecanismos de ação para o tratamento das leishmanioses é urgente e crucial (ALMEIDA; SANTOS, 2011; PACE, 2014).

Uma nova abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos contra as leishmanioses abrange o campo da epigenética, cujos mecanismos controlam a estrutura da

cromatina e a acessibilidade ao DNA, sem alterar sua sequência, regulando fenômenos biológicos importantes como replicação e transcrição (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Enzimas modificadoras de histonas (HMEs) são elementos-chave da epigenética, uma vez que orquestram modificações pós-traducionais nas caudas das histonas (PTMs) associadas ao DNA, que incluem acetilação/deacetilação, realizadas por histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs), respectivamente, e metilação/demetilação, catalisadas por exemplo, pelas metiltransferases de arginina (PRMTs) e pelas demetilases de lisina (LSD1), respectivamente. As referidas PTMs, ao interferirem na interação entre o DNA e as histonas, alteram o estado da cromatina entre eucromatina e heterocromatina, implicando dessa forma, na ativação ou repressão da transcrição gênica (KELLY; CARVALHO; JONES, 2010). Esses processos podem se tornar aberrantes, ocorrendo, por exemplo, um desequilíbrio entre acetilação e deacetilação, e esses fatos estão envolvidos na gênese e progressão de várias doenças, como cânceres e distúrbios imunológicos, tornando as HMEs potenciais alvos terapêuticos. É importante destacar que o rígido controle da expressão gênica é fundamental para o equilíbrio da fisiologia celular (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; WOZNIAK; STRAHL, 2014).

As HDACs formam uma vasta família de proteínas com um domínio deacetilase altamente conservado. Em humanos, 18 HDACs foram identificadas até o momento, sendo divididas em quatro classes principais, I, II, III (família das sirtuínas) e IV segundo similaridade do sítio catalítico e dependência de um mesmo cofator (MARIADASON, 2008). Além das histonas, as HDACs agem também sobre outras proteínas, como a α -tubulina, HSP90 e reguladores de importação nuclear (MOMBELLI et al., 2011). As HDACs são altamente conservadas em eucariotos e já foram descritas em alguns parasitos, como *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (HAILU et al., 2017). O trabalho de Scholte e colaboradores, por exemplo, descreve a relação evolutiva entre as HDACs humanas e de parasitos causadores de doenças negligenciadas. É mostrado que as HDACs humanas estão mais relacionadas com as HDACs de *Schistosoma* (*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*) e se divergem mais das enzimas de *P. falciparum* e de tripanossomatídeos, respectivamente. Entre parasitos, HDACs de *Trypanosoma* e *Leishmania* estão mais relacionadas entre si do que com as HDACs de *Plasmodium falciparum*. Além disso, mais homólogos de HDACs foram identificados em *Schistosoma* do que em *Leishmania*, *Plasmodium* ou *Trypanosoma* (SCHOLTE et al., 2017). Em relação às PRMTs, nove enzimas já foram descritas em humanos, de 1 a 9, sendo a PRMT1 a mais extensivamente estudada (AL-

HAMASHI; DIAZ; HUANG, 2020). A LSD1 é uma amino-oxidase dependente de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e foi a primeira demetilase de lisina identificada em humanos, catalisando a demetilação de resíduos mono ou dimetilados (JIN et al., 2017). Em parasitos, essas enzimas também já foram descritas em *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (CABEZAS-CRUZ et al., 2014; DINIZ et al., 2021; FISK; READ, 2011).

Uma vez que as HMEs são bastante conservadas em eucariotos, tendo sido descritas tanto em humanos quanto em parasitos como supracitado, e que alterações nas PTMs podem estar relacionadas à patogênese de diversas doenças, como cânceres, a abordagem de “*drug repurposing*” tem sido empregada visando o desenvolvimento de novos medicamentos contra doenças parasitárias negligenciadas, como as leishmanioses. Isso porque, por exemplo, é possível estabelecer um paralelo entre as células cancerígenas e as células parasitárias, uma vez que ambas apresentam alta taxa metabólica, ambos os tipos celulares proliferam rapidamente e são capazes de escapar do sistema imune (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012; WANG et al., 2015a). Com essa estratégia, inibidores de HDACs (HDACi) validados clinicamente e outros inibidores dessas enzimas e também de outras HMEs como PRMTs e LSD1, têm sido testados contra diversos parasitos (ENGEL et al., 2015; INGRAM; HORN, 2002; KELLY et al., 2012).

A testagem de inibidores de HMEs a fim de se encontrar novos medicamentos contra parasitos abrange também a utilização de modelos animais, uma vez que, atualmente, não existem técnicas *in vitro* suficientemente eficazes para substituir a elucidação dos mecanismos envolvidos na complexa interação parasito-hospedeiro visando a validação de compostos para ensaios clínicos. De fato, modelos animais têm sido usados há muitos anos para decifrar os mecanismos envolvidos na leishmaniose tegumentar, como os tipos de células envolvidas, polarização da resposta imune, cascatas de sinalização para eliminar o parasito e também na busca de novos medicamentos contra a doença (DE OLIVEIRA et al., 2004; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

O A-ParaDDIsE (<http://a-paradise.cebio.org/>) foi um Projeto do tipo Consórcio Colaborativo Internacional financiado pela Comunidade Europeia, vigente entre 2014 e início de 2017, cujo objetivo foi o desenvolvimento de novos medicamentos contra doenças negligenciadas como a esquistossomose, leishmanioses, doença de Chagas e malária. As estratégias utilizadas no A-ParaDDIsE para o *design* de novos medicamentos foram alvos epigenéticos, como as HMEs envolvidas nos processos de acetilação/deacetilação, metilação/demetilação. A Universidade Federal de Viçosa (UFV), como uma das colaboradoras nacionais deste Consórcio, foi representada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora

Dra. Juliana Fietto e participou de grupos de trabalho distintos no Consórcio, que incluiu testes *in vitro* e em modelos animais com inibidores de HMEs.

Neste trabalho, foi testada uma biblioteca de derivados do ácido hidroxâmico (uma das classes de inibidores de HDACs) originalmente desenvolvidos como inibidores de HDAC8 de *S. mansoni* (HEIMBURG et al., 2016). Os compostos foram avaliados em relação à toxicidade para macrófagos como modelo de célula hospedeira e em relação ao efeito leishmanicida contra *L. braziliensis* durante a infecção *in vitro*. Além disso, foram avaliados possíveis mecanismos moleculares de ação *in vitro* e o efeito do tratamento *in vivo* em modelo de infecção animal em camundongos. Também foram testados alguns inibidores de PRMTs e LSD1 tanto em macrófagos como na infecção *in vitro*. O trabalho destaca que foram encontrados inibidores de HMEs com potencial para serem utilizados contra *L. braziliensis* no desenvolvimento de novos medicamentos contra o principal agente causador da leishmaniose tegumentar americana no Novo Mundo.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Leishmanioses e leishmaniose tegumentar americana

O estigma causado por infecções parasitárias em todo o mundo é substancial, e parasitos como *Schistosoma*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium*, são importantes causas de morbidade e mortalidade (HOTEZ; PECOUL, 2010). *Leishmania sp.* são os agentes etiológicos das leishmanioses, um espectro de doenças tropicais negligenciadas cuja incidência anual de novos casos é de 700 mil a um milhão (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION, 2021). A transmissão de *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasito, sendo os vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya* os principais propagadores desses parasitos no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Promastigotas e amastigotas são as duas principais formas evolutivas de *Leishmania* e mais de 20 espécies patogênicas do parasito já foram identificadas até o momento (JONES; WELBURN, 2021). Promastigotas são formas flageladas e móveis encontradas no inseto vetor e, portanto, a forma mais provável de infectar o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Amastigotas não apresentam flagelo exteriorizado e são imóveis, sendo encontradas no interior das células do hospedeiro, como células dendríticas, neutrófilos e macrófagos, sendo que, apenas nos macrófagos, o parasito consegue se multiplicar e estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado (BATES, 2008; ROMANO et al., 2014). Na Figura 1 é mostrado o ciclo de vida de *Leishmania*.

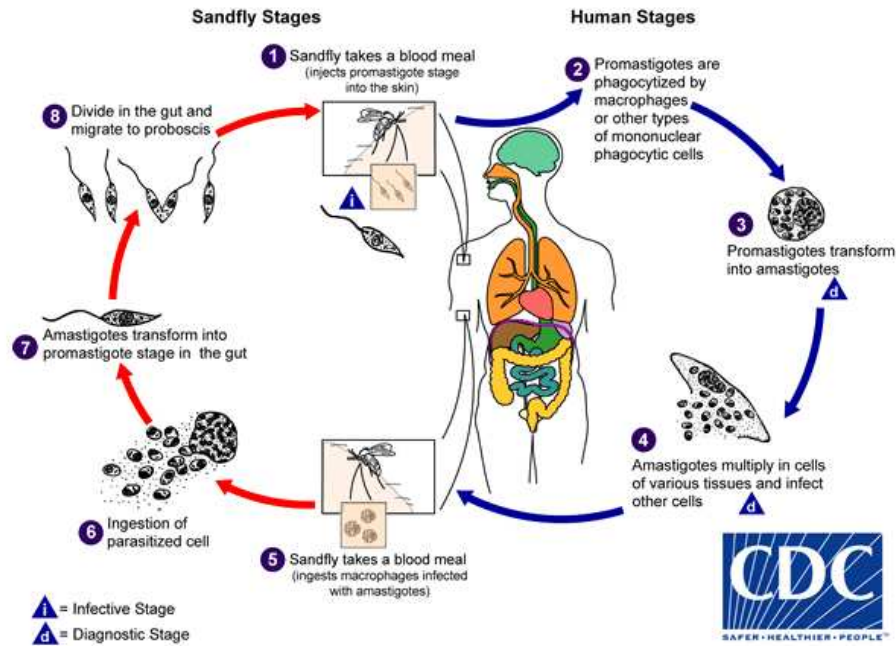


Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. 1) Fêmeas de flebotomíneos infectadas com *Leishmania* injetam formas promastigotas metacíclicas do parasito durante o repasto sanguíneo. 2) Promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos ou outras células do sistema mononuclear fagocitário. 3) No interior dessas células, promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas. 4) Amastigotas no interior de macrófagos teciduais (monócitos) se dividem por fissão binária, ocorre a ruptura da célula hospedeira e amastigotas livres são fagocitados por outros monócitos e macrófagos não infectados. 5 e 6) Fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo ingerem macrófagos infectados com amastigotas. 7) Amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas no intestino*. 8) Ocorre a metaciclologênese: promastigotas procíclicas se transformam em promastigotas nectomonadas, estes se transformam em promastigotas leptomonadas, que originam promastigotas haptomonadas, que então se transformam em promastigotas metacíclicas, as quais se dividem por fissão binária e migram para a proboscide do flebotomíneo, onde podem em um novo repasto sanguíneo, serem transmitidas para outro hospedeiro vertebrado fechando o ciclo de vida do parasito. i = forma infectante; d = forma encontrada no diagnóstico da doença. * No intestino grosso para *Leishmania* do subgênero *Viannia*; no intestino médio para *Leishmania* do subgênero *Leishmania*). Adaptado de (Centers For Disease Control And Prevention - CDC, 2020; Gossage; Rogers; Bates, 2010).

As manifestações clínicas das leishmanioses são governadas por fatores relacionados ao parasito, aos hospedeiros (flebotomíneos e animais vertebrados como o homem, cachorro e roedores) e à resposta imune do hospedeiro vertebrado (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As manifestações clínicas se relacionam ao parasito uma vez que são várias as espécies de *Leishmania* patogênicas, sendo a interação parasito x hospedeiro fator relevante (FREITES et al., 2018); estão relacionadas ao hospedeiro flebotomíneo porque *Leishmania* é capaz de manipulá-lo a fim de garantir a sua sobrevivência, como por exemplo, ao secretar uma espécie de gel, o gel secretor de promastigotas (PSG), que congestiona a proboscide do flebotomíneo obrigando-o a regurgitar os parasitos infectantes durante o repasto sanguíneo (GIRAUD et al., 2019); relacionam-se ao hospedeiro vertebrado e à resposta imune deste uma vez que

Leishmania pode subverter as defesas do hospedeiro e assim, conseguir se estabelecer ao iniciar ou manter o processo infeccioso, como por exemplo, ao prolongar o tempo de vida dos neutrófilos para conseguir se multiplicar no interior dessas células. Esse processo é visto em infecções crônicas causadas por *Leishmania major* (REGLI et al., 2017). *Leishmania* é capaz também, de modular vias de sinalização do hospedeiro e diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (MAHANTA et al., 2018; REGLI et al., 2017).

As leishmanioses podem ser classificadas como leishmaniose visceral, que é a forma mais grave da doença e que afeta órgãos como fígado, baço e medula óssea, podendo ser fatal quando não tratada (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), ou leishmaniose cutânea, sendo esta última passível de diferenciadas manifestações clínicas, como mostrado na Figura 2.

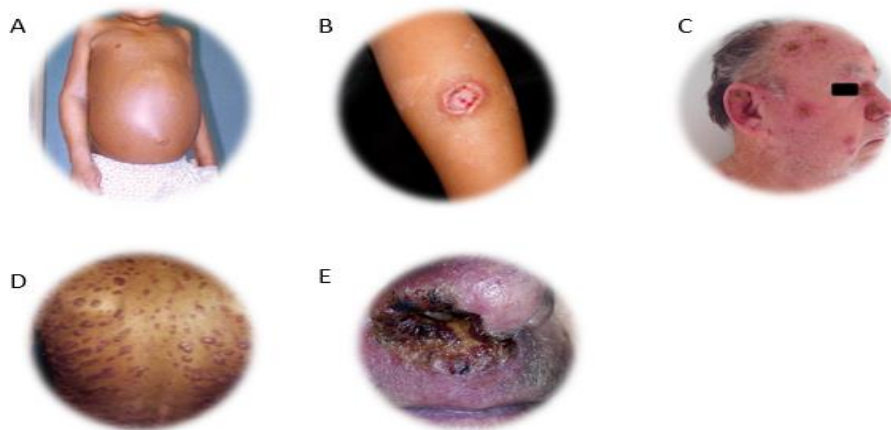


Figura 2 - Manifestações clínicas das leishmanioses. A) Leishmaniose visceral (Brasil, 2017); B) Leishmaniose cutânea localizada (Torres-Guerrero, 2017). C) Leishmaniose cutânea disseminada (Sgarbi et al, 2017); D) Leishmaniose cutânea difusa (Torres-Guerrero, 2017). E) Leishmaniose mucosa (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

As formas cutâneas de leishmaniose são as formas mais prevalentes na população e costumam ser classificadas em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LCD), leishmaniose cutânea difusa (LD) e leishmaniose mucocutânea (LM), caracterizando assim a chamada leishmaniose tegumentar americana (LTA) (STRAZZULLA et al., 2013). A leishmaniose cutânea é endêmica na América do Sul em países como Brasil e Colômbia, na África Setentrional em países como a Argélia, no sul da Ásia, como no Afeganistão e Paquistão, e também no Oriente Médio no Iraque e na Síria, onde foram reportados mais de cinco mil casos da doença em cada país em 2020 segundo a Organização

Mundial de Saúde, como pode ser visto na Figura 3 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

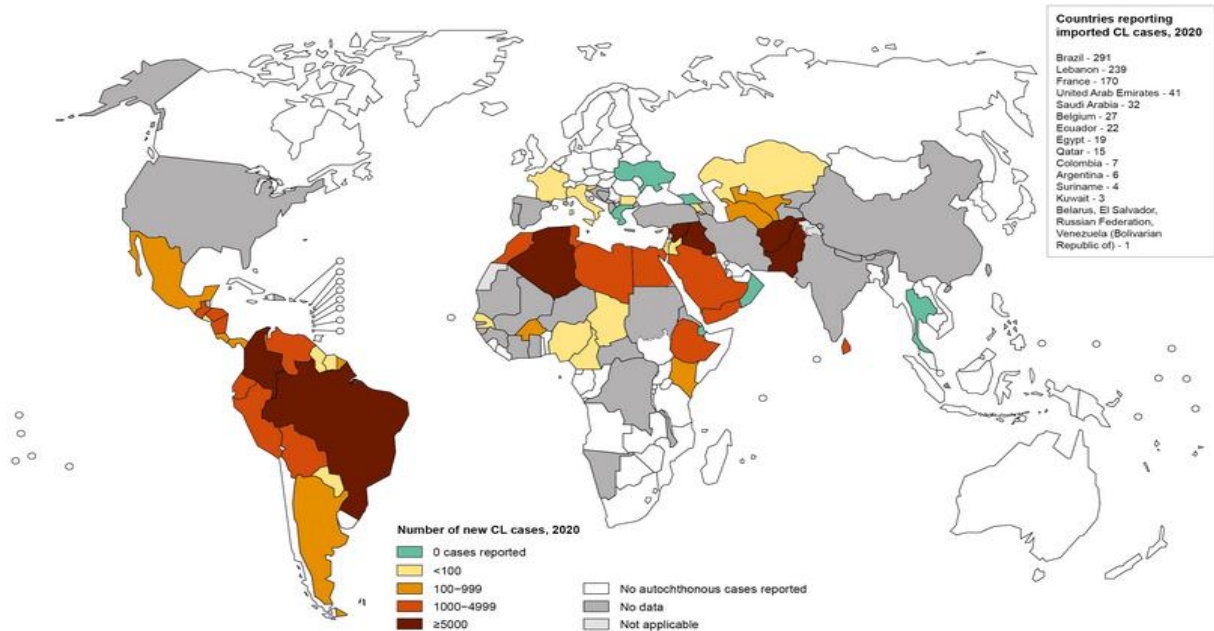


Figura 3 - Status da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo para o ano 2020 segundo a Organização Mundial de Saúde (Adaptado de World Health Organization, 2021).

A LCL é a forma mais comum de leishmanioses e pode se manifestar com uma ou mais lesões que se desenvolvem semanas ou meses após a picada do vetor flebotômico. Essas lesões se tornam ulceradas e são indolores, porém, existe a possibilidade de cura espontânea, ou essas lesões podem permanecer ativas por vários anos quando não tratadas. Infecções bacterianas secundárias podem ocorrer junto às lesões e causar dor. A LCL é caracterizada por forte reação de hipersensibilidade tardia, que envolve, principalmente, linfócitos T (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; CHRISTENSEN et al., 2019). A LCD é caracterizada pelo aparecimento de mais de 10 lesões polimórficas em grandes áreas corporais, que podem envolver a face, orelhas, tronco e membros; o acometimento da mucosa nasal é observado em grande parte dos casos. Indivíduos com LCD apresentam baixos níveis circulantes de citocinas Th1 no sangue (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019). A LD é uma forma rara e grave de leishmaniose cutânea em que os parasitos se multiplicam incontroladamente nas diversas lesões da pele e ao contrário das lesões da LCD, não são ulceradas. Na LD ocorre nos indivíduos, anergia, um mecanismo no qual os linfócitos T são funcionalmente inativados;

sendo assim, esses indivíduos são incapazes de montar uma resposta imune celular específica contra *Leishmania* (CHRISTENSEN et al., 2019; SCHWARTZ, 2003). Meses ou anos após o tratamento da LCL, o indivíduo pode desenvolver a LM, que causa severo dano desfigurativo na face devido às lesões destrutivas na cavidade oral e nasofaríngea em consequência da exacerbação da resposta imune celular à presença de *Leishmania*; análises microscópicas das biópsias de lesões mostram intensa reação inflamatória e poucos ou nenhum parasito. O exato mecanismo patológico para esse fato ainda não foi elucidado, porém, acredita-se que pode ser devido à elevada produção de TNF e INF- γ por linfócitos e baixa produção de IL-10, sendo esta última citocina, essencial para o controle da resposta imune desencadeada por TNF e INF- γ (BACELLAR et al., 2002; STRAZZULLA et al., 2013). Na América do Sul, *L. braziliensis* é a principal e mais prevalente espécie causadora de LTA, principalmente no Brasil, estando este entre os dez países com maior número de casos estimados de LC no mundo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WORLD AND HEALTH ORGANIZATION, 2021). Na Tabela 1 são apresentadas algumas espécies de *Leishmania* e os tipos de leishmaniose cutânea que causam.

Tabela 1 - Principais espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar no Velho e no Novo Mundo

Manifestação da doença	Espécie
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>Leishmania tropica</i> (raro) e <i>Leishmania major</i> (raro)
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania venezuelensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>Leishmania amazonensis</i>

Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania.braziliensis, Leishmania guyanensis, Leishmania panamensis, Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania panamensis</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>Leishmania braziliensis, Leishmania guyanensis, Leishmania panamensis Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Disseminada	<i>Leishmania braziliensis, Leishmania guyanensis, Leishmania panamensis</i>

Adaptado de (Freites et al., 2018; Kaye; Ccott, 2011; Kevric; Cappel; Keeling, 2015; Torres-Guerrero et al., 2017)

O diagnóstico da LTA é baseado nas manifestações clínicas, que foram supracitadas, e o diagnóstico diferencial com outras doenças sempre deve ser considerado de acordo com a forma clínica e características da lesão. Por exemplo, LCL e micobacterioses atípicas apresentam lesões com características semelhantes, de formato circular, bordas elevadas e purulentas (NOGUEIRA et al., 2021), fazendo-se necessário o diagnóstico diferencial. A presença de formas amastigotas de *L. braziliensis* na lesão é padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da LTA, sendo que quanto mais precocemente realizado, maior a probabilidade de encontrar o parasito na lesão (GOTO; LINDOSO, 2012). Dessa forma, amastigotas podem ser identificados através de esfregaços de escarificação da borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, de punção aspirativa da lesão ou de *imprint*, em que um fragmento de tecido da lesão é pressionado sobre uma lâmina de vidro. Os esfregaços são corados com Giemsa, *Leishman* ou corantes rápidos e então visualizados no microscópio. A presença de *Leishmania* na lesão também pode ser feita por meio do cultivo *in vitro* do parasito (formas promastigotas), através da biópsia de tecidos cutâneos ou de mucosa e também por meio do isolamento *in vivo* de *Leishmania*, em que o material é coletado, triturado em solução salina estéril e então inoculado na pata ou focinho de hamsters (*Mesocricetus auratus*); geralmente, as lesões aparecem após um mês (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Testes imunológicos como a Intradermoreação de Montenegro, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) também são utilizados no diagnóstico laboratorial da LTA. No teste de Montenegro, preparações contendo formas promastigotas de *Leishmania* (mortas ou lisados dessas células) são injetadas, geralmente no braço, de indivíduos a serem

diagnosticados, induzindo naqueles com exposição prévia ao parasito, uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) (OLLIARO et al., 2013). O ELISA e a RIFI são úteis na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo mais utilizados como métodos diagnósticos complementares aos de identificação do parasito na lesão (BRACAMONTE et al., 2020) e na triagem de pacientes com suspeita da doença (PENA et al., 2020), porém, seu uso é limitado a grandes centros devido ao alto custo (KUMARI et al., 2021). Para o ELISA, o tipo de antígeno utilizado determinará a sensibilidade e especificidade do método; o mais utilizado é o antígeno solúvel bruto, preparado pelo congelamento-descongelamento de promastigotas de *Leishmania* em tampão fosfato-salino, e a sensibilidade varia de 92 a 95%. Para a RIFI, lesões recentes (um a seis meses) exibirão resultado sorológico negativo, e nos casos positivos, o título de anticorpos será maior em indivíduos com múltiplas lesões; a sensibilidade do teste chega a 100% na forma mucosa (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Entretanto, tanto o ELISA quanto o RIFI podem apresentar reação cruzada com outras doenças, como a doença de Chagas, o que diminui a especificidade dos métodos (GOMES et al., 2014). Testes moleculares de alta sensibilidade e especificidade, mesmo quando a carga parasitária é baixa, como o da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em que é possível a detecção do DNA do parasito em amostras de pele ou mucosa, também são empregados, porém, seu uso também está limitado a centros de pesquisa e laboratórios de grande porte devido ao alto custo (KUMARI et al., 2021).

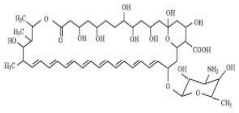
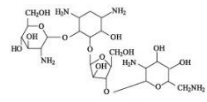
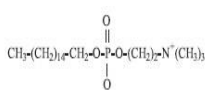
A variabilidade genética dos hospedeiros e de *Leishmania*, aliada às distintas respostas imunológicas causadas pelas diferentes espécies do parasito, tornam complexo o desenvolvimento de vacinas humanas contra as leishmanioses. Ainda não há nenhuma vacina aprovada contra essas doenças, o que torna a quimioterapia fundamental no combate às leishmanioses, além de outras medidas de saúde pública, como o combate aos vetores transmissores (WHYTE; ZUFFEREY, 2017).

Os medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses são limitados e vêm sendo usados há mais de 50 anos, como no caso dos antimoniais pentavalentes antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio, que são os primeiros medicamentos de escolha desde o início do século XX. A partir de 2005, porém, eles deixaram de fazer parte dos protocolos de tratamento utilizando monoterapia em muitas regiões, principalmente na Índia, dada a alta incidência de falha, aliada entre outras, à resistência de *L. donovani* (PONTE-SUCRE et al., 2017). No Brasil, o antimoniato de meglumina é o medicamento de primeira linha, sendo o estibogluconato de sódio não comercializado no país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A anfotericina B, comercializada como desoxicolato de anfotericina B e

na forma lipossomal, é usada como medicamento de segunda escolha no tratamento das leishmanioses quando os antimoniais são ineficazes. Há ainda a pentamidina, o alopurinol e a paromomicina, que são usados na terapêutica, sendo todos, administrados por via parenteral (principalmente, vias endovenosa e intramuscular). A miltefosina é o único medicamento oral disponível para o tratamento das leishmanioses. Fato comum a todos os medicamentos usados no tratamento da doença são os diversos e graves efeitos colaterais que eles causam, como cardiotoxicidade e lesão renal, além da necessidade de longos períodos de internação para a sua administração (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Além disso, casos de resistência à quimioterapia têm sido relatados para diversas espécies de *Leishmania*, como *L. donovani* (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012), *L. infantum chagasi* (FADILI et al., 2005) e até *L. braziliensis* (RUGANI et al., 2019). É importante destacar que, dadas as diferentes espécies de *Leishmania*, as diversas manifestações clínicas das doenças e como cada indivíduo responde aos medicamentos, além da resistência do parasito, os protocolos de tratamento variam para cada país e região. Levando-se em consideração todos os fatores supracitados, esses protocolos de tratamento passaram a incluir a terapia combinada e a terapia intralesional, como no caso do antimoniato de meglumina para leishmaniose cutânea localizada (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; BURZA, CROFT ; BOELAERT, 2018; SILVA et al., 2016). Na Tabela 2 são apresentados os principais medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses, o seu mecanismo de ação, efeitos adversos e vias de administração.

Tabela 2 - Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses, seu modo de ação específico, efeitos adversos e vias de administração

Medicamento	Mecanismo de ação	Efeitos adversos	Modo de administração
Antimoniato de N-metil glucamina $ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^- $	Interferem na bioenergética de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> . Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP	Artralgia, mialgia, inapetência, náusea, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, palpitação, insônia nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA)	IV ou IM
Desoxicolato de anfotericina B	Age se ligando ao ergosterol da membrana do parasito, levando à formação de poros e consequente lise celular.	Febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, alterações cardiovasculares,	IV

		alterações pulmonares, complicações renais.	
<p>Anfotericina B lipossomal</p> 	<p>A anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, o medicamento atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações.</p>	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar.	IV
<p>Paromomicina</p> 	<p>Liga-se à subunidade 30S dos ribossomos, interferem com a iniciação da síntese de proteínas através da fixação do complexo ribossômico 30S-50S no códon de iniciação do mRNA, o que leva à acumulação de complexo de iniciação anormal.</p>	Ototoxicidade e problemas na função hepática	IM
<p>Miltefosina</p> 	<p>Principal modo de ação é incerto; apoptose e inibição da citocromo C oxidase.</p>	Teratogenicidade	Oral

Adaptado de (Rajasekaran; Chen, 2015). IV = intravenosa; IM = intramuscular

1.2. Imunobiologia das leishmanioses

O sistema imune é uma rede interativa de órgãos linfóides, células, fatores humorais e citocinas que além de garantir a homeostase tecidual e a integridade do próprio sistema, representa nossa maquinaria de defesa contra diversos microrganismos a que somos continuamente expostos (PARKIN; COHEN, 2001). Há dois tipos de resposta imune: a inata (celular) e a adaptativa (humoral). A resposta imune inata é o tipo de resposta imediata, constituída por barreiras físicas, químicas e microbiológicas, por células como neutrófilos, monócitos e macrófagos, sistema do complemento, citocinas e proteínas de fase aguda. Já a

resposta imune adaptativa é uma resposta mais lenta, uma vez que é mediada por reações específicas dependentes de anticorpos com o envolvimento de linfócitos T e linfócitos B, podendo levar semanas ou meses para se desenvolver (MCCOMB et al., 2019). Em caso de infecção por *Leishmania*, a principal resposta envolvida é a resposta imune inata, uma vez que a localização dos parasitos no interior dos macrófagos impede uma resposta específica mediada por anticorpos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O papel da imunidade adaptativa nas leishmanioses não está totalmente elucidado, se ela auxilia no combate à infecção ou se é responsável por seu agravamento. Entretanto, altos títulos de anticorpos não específicos, IgG e IgM, se correlacionam com uma alta carga parasitária e gravidade da leishmaniose visceral em modelo animal e em humanos, aliados à uma fraca resposta imune celular Th1, estando esta relacionada à baixa produção de IFN- γ (DEAK et al., 2011; KUMAR; NYLÉN, 2012; MAGALHÃES et al., 2021; SILVA-BARRIOS et al., 2016). Na leishmaniose tegumentar, altos títulos de anticorpos IgG não específicos em pacientes também têm sido relacionados à gravidade da doença, destacando-se a leishmaniose mucosa e a leishmaniose cutânea disseminada, porém, o fato está relacionado à uma forte resposta imune celular Th1, devido à alta produção de IFN- γ e CXCL10, sendo esta última uma quimiocina que facilita a migração de leucócitos (MAGALHÃES et al., 2021; ROMERO et al., 2005; VALLI et al., 1999). Além disso, a produção desses anticorpos pode ocorrer tanto por meio da ativação das células B pelas células T ou a própria *Leishmania* pode induzir à expansão clonal das células B por meio dos receptores do tipo Toll, como mostrado por Silva-Barrios e colaboradores para *L. donovani* (SILVA-BARRIOS et al., 2016). A titulação de anticorpos nas leishmanioses, tanto na infecção animal quanto em humanos, tem sido melhor empregada como método diagnóstico da doença (KUMAR; NYLÉN, 2012; MAGALHÃES et al., 2021; ROSTAMI; KHAMESIPOUR, 2021; SUNDAR et al., 2002).

O início da resposta imune inata do hospedeiro para erradicação de *Leishmania* é caracterizado pelo recrutamento de monócitos, neutrófilos, células dendríticas (DC) e células *natural killer* (NK) para o local da infecção, onde essas células apresentam papel crucial e distinto para a polarização da resposta imune iniciada, para o tipo Th1 ou Th2. O recrutamento dessas células, as principais efetoras da resposta imune inata, é essencial, uma vez que macrófagos e DC residentes da pele não são capazes de conter o processo infeccioso desencadeado pela presença do parasito (GLEZER et al., 2000; GORHAM et al., 1996; REINER; LOCKSLEY, 1995). Monócitos, neutrófilos, células dendríticas (DC) e células NK apresentam em sua superfície os chamados receptores do tipo Toll (TLRs) que são capazes de

reconhecer moléculas de *Leishmania* (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) como o lipofosfoglicano (LPG), e esse estímulo específico ativa nessas células cascatas intracelulares de sinalização, como por exemplo, fagocitose, produção de citocinas e liberação de mediadores inflamatórios, que irão contribuir para a ativação e recrutamento de mais células a fim de combater o parasito (BARRAL-NETO et al., 1998; REINER; LOCKSLEY, 1995). É importante ressaltar que monócitos são leucócitos derivados da medula óssea e que circulam no sangue, diferenciando-se em macrófagos e DC quando recrutados nos tecidos (CHIU; BHARAT, 2016).

Os monócitos (macrófagos) recrutados para o local da infecção podem fagocitar *Leishmania* e eliminar o parasito por meio da “explosão respiratória”, caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KIMA; SOONG, 2013) ou podem se diferenciar em DC, como acima mencionado, e fagocitar *Leishmania*, tornando-se ativados e apresentando esse antígeno juntamente com moléculas coestimulatórias, para as células T $CD4^+$ *naïve*, o que inicia a resposta imune adaptativa e o processo de polarização Th1 ou Th2 supracitado (NONATO et al., 2014). Caso a apresentação antigênica das DC para as células T $CD4^+$ *naïve* ocorra sem a presença de sinais coestimulatórios, ocorrerá anergia do sistema imune, ou seja, o indivíduo será incapaz de montar uma resposta contra *Leishmania* (GRONSKI; OHASHI, 2006). Por outro lado, as DC diferenciadas de monócitos que não fagocitam o parasito, as chamadas DC *bystander*, têm a capacidade de aumentar a expressão de seu complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e também de produzir IL-12, citocina fundamental para a polarização do tipo Th1, o que potencializa e acelera esse processo iniciado pelas DC infectadas (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). A expressão do MHC de classe II é fundamental para a função das DC como células apresentadoras de antígenos (APCs), proporcionando um elo entre a imunidade inata e adaptativa (REINER E LOCKSLEY, 1995). Assim, as DC não infectadas por *Leishmania* e, portanto, produtoras de IL-12, agem sinergicamente com as DC infectadas, que não produzem essa citocina, na polarização para o tipo Th1.

Em relação aos neutrófilos e *L. braziliensis*, essas células do sistema imune contribuem na eliminação do parasito ao liberarem armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são uma rede extracelular constituída por substâncias granulares e componentes nucleares, capazes de matar promastigotas do parasito, e também ao modularem positivamente os macrófagos, induzindo uma maior produção de TNF e O_2^- por essas células (NOVAIS et al.,

2009; PAPAYANNOPOULOS, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016). Já as células NK recrutadas para o local da infecção, podem produzir IFN- γ e essa citocina induz as DC a produzirem mais IL-12 (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Na resposta imune do tipo Th1, os linfócitos Th1 produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF e IL-2, que levam à ativação de macrófagos (M1) e eliminação de *Leishmania* por essas células, através da produção de óxido nítrico (NO), principalmente. Citocinas pró-inflamatórias também são produzidas por macrófagos M1, como TNF, IL-12 e IL-18 (KOSTKA et al., 2010). Em contrapartida, as DC infectadas derivadas de monócitos, ao iniciarem o processo de polarização como mencionado anteriormente, podem também promover a polarização para o tipo Th2. Linfócitos Th2 são produtores de IL-10, IL-13 e IL-4. A IL-4 promove um aumento da atividade de arginase, que passa a competir por L-arginina com a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), culminando em maior produção de poliaminas e menos NO pelos macrófagos, favorecendo a proliferação de *Leishmania*, e, portanto, a infecção. A poliamina espermidina é crucial para tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, uma vez que ao se conjugar com a glutatona, forma a tripanotona, um peptídeo de baixo peso molecular que desempenha um papel fundamental na defesa desses parasitos contra espécies reativas de oxigênio (BACELLAR et al., 2009). Além disso, a IL-4 produzida por linfócitos Th2 promove a ativação alternativa dos macrófagos (M2, secretores de IL-4, IL-10, IL-13), os quais, entre outros mecanismos que favorecem a proliferação de *Leishmania*, secretam IL-4, promovendo uma retroalimentação positiva nesse processo (NONATO et al., 2014; PITTA et al., 2009; SCHELLER et al., 2011). Linfócitos Th2 são também produtores de IL-6, e essa citocina age inibindo a produção de IFN- γ e TNF pelos macrófagos, o que potencializa a resposta Th2 e favorece a sobrevivência de *Leishmania* (FOLLADOR et al., 2002). Na Figura 4 é mostrado como ocorre a polarização da resposta imune para o tipo Th1 ou Th2 e a ativação de macrófagos M1 ou M2.

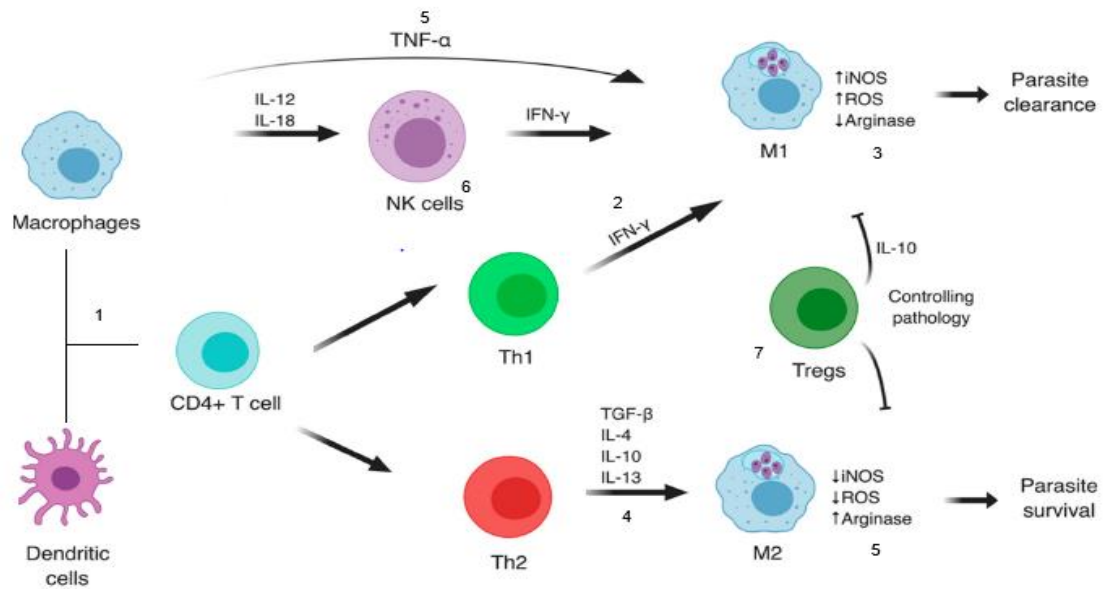


Figura 4 - Polarização da resposta imune e ativação de macrófagos M1 e M2. 1) Macrófagos e células dendríticas (DC) derivados de monócitos apresentam peptídeos antigênicos de *Leishmania* para os linfócitos T CD4⁺ *naive*, que se tornam ativados e se diferenciam em linfócitos efetores Th1 ou Th2. 2) Linfócitos Th1 produzem altos níveis de IFN- γ , TNF e IL-2, que levam à ativação de macrófagos (M1). 3) Macrófagos M1 aumentam a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da atividade de arginase, o que culmina com a morte de *Leishmania* parasitos intracelular. 4) Linfócitos Th2 produzem IL-10, IL-13 e IL-4 e TGF- β , levando à ativação de macrófagos M2. 5) Macrófagos M2 apresentam atividade aumentada de arginase e diminuição dos níveis da iNOS e ROS, o que acarreta a sobrevivência de *Leishmania*, como consequência da produção de tripanotona e resistência ao estresse oxidativo. 5 e 6) Macrófagos derivados de monócitos produzem TNF que é capaz de levar à ativação de macrófagos M1, e também produzem IL-12 e IL-18, que ativam células NK a produzirem IFN- γ e com isso, também promoverem a ativação de macrófagos M1. 7) A regulação da ativação dos macrófagos M1 e M2, e como consequência, do processo inflamatório, é feita por linfócitos T regulatórios (Treg), que secretam IL-10, que entre outras funções, inibe a produção de IL-12 por macrófagos. Adaptado de (Meira; Gedamu, 2019).

1.3. Enzimas Modificadoras de Histonas e Modificações Pós-traducionais

A epigenética estuda qualquer processo biológico reversível e hereditário que altera a atividade de um gene sem modificar a sequência do DNA. De forma mais ampla, ela avalia como o comportamento e o ambiente podem promover mudanças que afetam a forma como os genes trabalham (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2020). Assim, mecanismos epigenéticos controlam a acessibilidade ao DNA e a forma como a informação genética é lida, o que implica na regulação de fenômenos biológicos importantes como replicação e transcrição (CAVALLI; HEARD, 2019). Modificações pós-traducionais (PTMs) na cauda das histonas associadas ao DNA caracterizam os mecanismos supracitados e são orquestradas por enzimas modificadoras de histonas (HMEs). A acetilação e a metilação são as PTMs mais amplamente estudadas, embora existam outras descritas, como fosforilação, ubiquitilação, sumoilação, ADP-ribosilação, citrulinação e glicosilação. A maioria dessas

PTMs ocorre nos domínios N e C-terminal da cauda das histonas, porém, elas podem ocorrer também nos domínios globulares dessas proteínas (ROTHBART; STRAHL, 2014).

As histonas são proteínas fundamentais para a compactação do material genético nas células eucarióticas. Elas formam um octâmero de proteínas ao redor do qual se liga o DNA, e isso caracteriza a unidade básica da cromatina e seu mais básico grau de organização, que são os nucleossomos. Os nucleossomos se organizam de forma regular e se tornam mais compactados, constituindo fibras de 30 nm, que também sofrem compactação até atingirem o grau de compactação cromossômica. Até o momento, cinco tipos de histonas foram identificados: H1, H2A, H2B, H3 e H4. A histona H1 é um ligante entre nucleossomos adjacentes, permitindo a sua compactação, e as histonas H2A, H2B, H3 e H4 formam o octâmero proteico (PARK; KIM, 2020). Os graus de compactação da cromatina e algumas das HMEs que agem na cauda das histonas são mostrados na Figura 5.

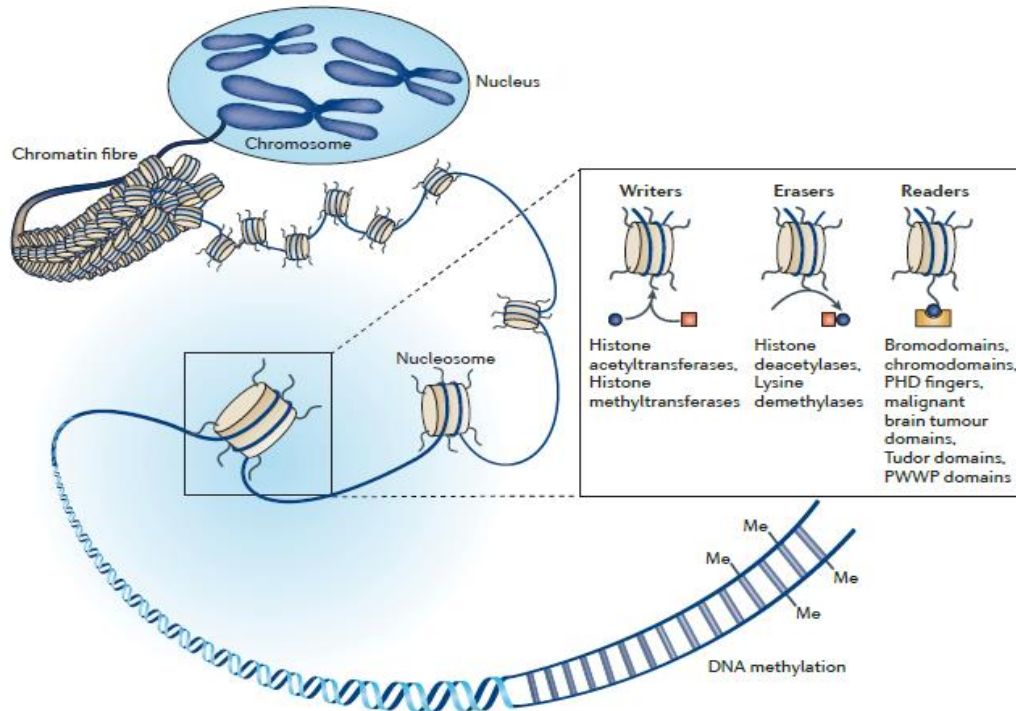


Figura 5 - Graus de compactação da cromatina e o processamento da informação genética. É possível observar os níveis de compactação da cromatina, desde o mais simples, a dupla hélice do DNA, até a formação dos nucleossomos, fibra de cromatina de 30 nm e cromossomos. No quadro, à esquerda, estão descritas enzimas modificadoras de histonas que “escrevem” a informação genética ao corroborarem com a transcrição gênica, como as histonas acetiltransferases e histonas metiltransferases (*Writers*). Ao centro, estão as enzimas que “apagam” a informação genética ao reverterem o processo das primeiras, como as histonas deacetilases e lisina demetilases (*Erasers*). À direita no quadro, estão famílias de proteínas contendo domínios que são capazes de “ler”, ou seja, que reconhecem as modificações pós-traducionais na porção N e C-terminal das histonas (*Readers*), como as proteínas contendo bromodomínios que reconhecem resíduos de lisina acetiladas. Abaixo está representada um tipo de PTM, a metilação (Arrowsmith et al., 2012).

Histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs), também chamadas de lisina deacetilases, são HMEs que catalisam as PTMs acetilação e deacetilação, respectivamente. As HATs, divididas em três principais famílias: GNAT, MYST, e CBP/p300, utilizam o acetil-coA como um cofator e promovem a transferência de um grupo acetil deste, para o grupo ϵ -amino das cadeias laterais de lisina nas histonas. Esse processo neutraliza a carga positiva da lisina que em pH fisiológico é protonada, o que consequentemente, reduz a afinidade histona-DNA e faz com que a cromatina adote uma conformação mais relaxada, permitindo o recrutamento da maquinaria transcricional. Proteínas contendo bromodomínios são peças importantes no processo transcricional, uma vez que são capazes de reconhecer e de “ler” as modificações nos resíduos de lisina, sendo, portanto, co-ativadoras do processo. Por outro lado, as HDACs exercem um efeito contrário e restauram a carga positiva da lisina ao reverter a acetilação, o que aumenta a interação das histonas com o DNA e torna a arquitetura da cromatina mais compacta, reprimindo a transcrição gênica. Na Figura 6 é possível visualizar a

dinâmica do processo de acetilação/deacetilação, além de estar representado que HATs e HDACs podem ter sua atividade inibida, como será descrito mais à frente. As HDACs podem também agir sobre outros substratos proteicos, como proteínas citoplasmáticas, incluindo a tubulina e a HSP90, e fatores de transcrição como o de supressão tumoral p53, STAT3 and NF- κ B subunidade RelA. Além disso, as HDACs podem exercer sua função de repressoras da transcrição ao se ligarem a outras proteínas e formarem complexos proteicos repressores, como o de Remodelamento de Nucleossomo e Desacetilase (NuRD) e o de repressão do REST (CoREST), o qual age sobre genes neuronais (ARROWSMITH et al., 2012; HARADA; HIDESHIMA; ANDERSON, 2016; PARK; KIM, 2020).

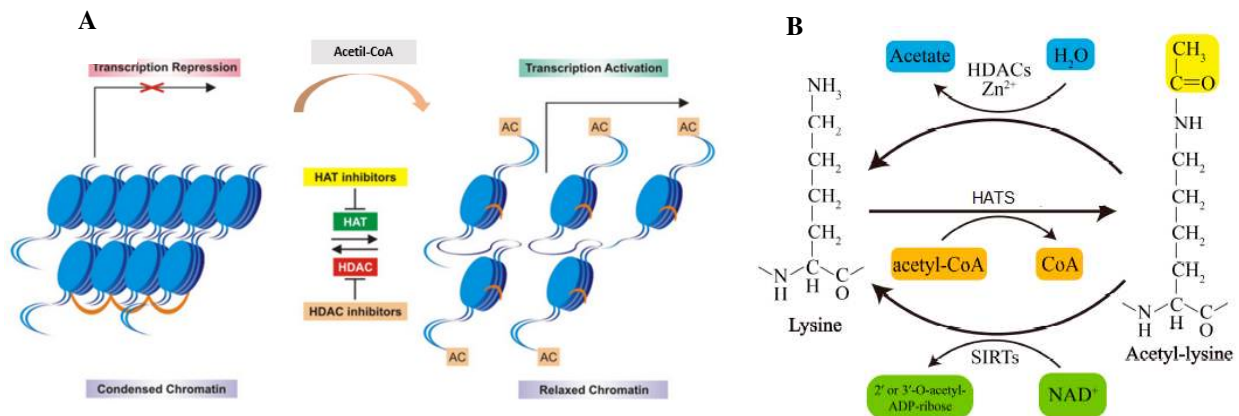


Figura 6 - Dinâmica dos processos de acetilação e deacetilação. Em A, à esquerda, observa-se o relaxamento da cromatina e ativação transcripcional após o processo de acetilação da porção N-terminal das histonas, catalisado por HATs, que utilizam acetil-coA como cofator. À esquerda, a deacetilação dos mesmos domínios catalisada por HDACs, inibe a transcrição gênica ao promover a compactação da cromatina. Em B, observa-se a estrutura química da lisina e a adição do grupo acetil ao grupo ϵ -amino da cadeia lateral desse aminoácido. Adaptado de (Freitas et al., 2021; Wang et al., 2020)

As HDACs formam uma família de proteínas que estão presentes em *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, e 18 delas foram identificadas até o momento em mamíferos, agrupadas em quatro classes diferentes: classe I, classe II e classe IV (enzimas dependentes de Zn²⁺), e classe III, das sirtuínas, que são enzimas dependentes de NAD⁺ como cofator para sua atividade. A classe I de HDACs compreende as HDACs 1-3 e 8; a classe II compreende as HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10 e é subdividida em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10); a classe III, que possui similaridade com os reguladores de informação silenciosa 2 (SIR2) de leveduras, compreende as sirtuínas 1-7; e a classe IV, é representada pela HDAC 11 (ENGEL et al., 2015; HAILU et al., 2017; SCHOLTE et al., 2017). As HDACs de classe I são encontradas quase que exclusivamente no núcleo, assim como a HDAC de classe IV. As HDACs de classe II podem

estar tanto no núcleo quanto no citoplasma, enquanto as sirtuínas, além desses, podem ter localização mitocondrial. Na Figura 7 são mostradas as classes de HDACs, o número de resíduos de aminoácidos que constituem cada enzima e o tamanho da proteína, sua localização na célula e sua homologia com HDACs de leveduras.

Class	Subtype	Protein domain	Number of amino acids	Protein size (kDa)	Localization	Yeast homolog
I	HDAC1		482	58	Nucleus	RPD3
	HDAC2		488	59	Nucleus	
	HDAC3		428	50	Nucleus, cytoplasm	
	HDAC8		377	44	Nucleus	
IIa	HDAC4		1,084	120	Nucleus, cytoplasm	Hda1
	HDAC5		1,122	130	Nucleus, cytoplasm	
	HDAC7		912	110	Nucleus, cytoplasm	
	HDAC9		1,011	160	Nucleus, cytoplasm	
IIb	HDAC6		1,215	160	Nucleus, cytoplasm	
	HDAC10		669	70	Nucleus, cytoplasm	
III	Sirt1		747	120	Nucleus	Sir2
	Sirt2		389	45	Cytoplasm	
	Sirt3		399	28	Mitochondria	
	Sirt4		314	35	Mitochondria	
	Sirt5		310	36	Mitochondria	
	Sirt6		355	39	Nucleus	
	Sirt7		400	48	Nucleus	
IV	HDAC11		347	39	Nucleus	HO53

Figura 7 - Classes I, II, III e IV de HDACs. Na coluna 1 (à esquerda), estão descritas as classes de HDACs. Na segunda coluna é descrito quais enzimas pertencem a cada classe. O domínio catalítico das HDACs de classe I, II e IV é mostrado em verde, e o das sirtuínas (HDACs de classe III), é mostrado em azul, como mostrado na terceira coluna. Na classe IIa, o domínio de ligação ao MEF-2 é mostrado em amarelo. Em seguida, na quarta coluna, é descrito o número total de resíduos de aminoácidos em cada HDAC, e na quinta coluna, o tamanho (kDa) de cada proteína. A penúltima e última colunas, descrevem a localização celular das HDAC e sua homologia com as HDACs de leveduras, respectivamente (Zhao; Tao; Peng, 2020).

Joshi e colaboradores identificaram uma HDAC em *Plasmodium falciparum*, à qual denominaram de PfHDAC1 e que foi predominantemente expressa nas formas intraeritrocíticas do parasito (trofozoítos e esquizontes) e também em gametócitos (formas circulantes e que são ingeridas pelo mosquito vetor), sendo a localização da enzima em sua maioria, no núcleo (JOSHI et al., 1999). Mukherjee e colaboradores criaram um modelo homólogo da PfHDAC1 a partir da estrutura cristalográfica da HDAC8 humana, validando-a como novo alvo para terapia contra a malária (MUKHERJEE et al., 2008). Já foram identificadas cinco HDACs em *P. falciparum* pertencentes às classes I e II, e classes III e IV das sirtuínas, e embora não caracterizadas completamente, algumas dessas HDACs, como a PfHDA2 (classe II), estão relacionadas ao crescimento do parasito, gametocitogênese e fatores de virulência (SCHOLTE et al, 2017). Em *Trypanosoma brucei*, Ingram e Horn descobriram que duas HDACs são

essenciais à sobrevivência do parasito, às quais denominaram DAC1 e DAC3, e que estão localizadas primariamente no núcleo (INGRAM; HORN, 2002). Análises recentes de Scholte e colaboradores sobre as relações evolutivas entre HDACs e sirtuínas de parasitos patogênicos, mostraram que *T. brucei* possui HDACs de classe I e II, e das classes I, II e III das sirtuínas. Em *Schistosoma mansoni*, o mesmo trabalho de Scholte e colaboradores também mostrou a presença de HDACs nesse parasito pertencentes à todas as classes, exceto à classe IV e II das sirtuínas, totalizando pelo menos 12 enzimas identificadas (SCHOLTE et al, 2017). Além disso, um importante estudo de Marek e colaboradores revelou que a HDAC8 de *S. mansoni* é essencial para a infectividade do parasito, sendo neste, HDACs de classe I mais expressas (MAREK et al., 2013). Em *Trypanosoma cruzi*, apenas HDACs das classes I e III de sirtuínas foram identificadas até o momento. Em *Leishmania*, as HDACs estão presentes em *L. major*, *Leishmania infantum chagasi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani* e *L. braziliensis*, sendo as enzimas pertencentes às classes I e II e I, II e III das sirtuínas. Em *L. braziliensis*, quatro genes de HDACs foram identificados quando comparados a ortólogos humanos (SCHOLTE et al, 2017). Em *L. infantum*, Ronin e colaboradores resolveram a estrutura cristalográfica de alta resolução da sirtuína SIR2rp1 (RONIN et al., 2018), que demonstrou ser essencial para a sobrevivência do parasito e ter atividade de ADP-ribosilação (em que um ou mais resíduos de ADP do NAD⁺ são transferidos para a proteína alvo) sobre a tubulina, (TAVARES et al., 2008; VERGNES et al., 2005). Prasanna e colaboradores, também recentemente, clonaram, purificaram e fizeram modelagem por homologia à HDAC2 de humanos para HDAC de *L. donovani* (PRASANNA et al., 2021). Além disso, outras sirtuínas de diversos protozoários parasitos, incluindo *Leishmania*, foram descritas por Religa e Waters (RELIGA; WATERS, 2012). A relevância da presença de HDACs em parasitos ficou evidente em resultados de análises de modelagem molecular de Melesina e colaboradores, em que pequenas diferenças foram observadas no sítio de ligação ao substrato, o que pode ser explorado como ponto de partida para a inibição seletiva dessas HDACs (MELESINA et al., 2015).

A metilação e a demetilação de histonas também são PTMs já bem caracterizadas, sendo a metilação da arginina, a primeira a ser descoberta, ainda nos anos 1970. Exemplos de enzimas que catalisam os referidos processos são as metiltransferases de arginina (PRMTs) e as demetilases de lisina (LSD1), respectivamente (LI et al., 2021). As PRMTs catalisam a transferência de um grupo metil do cofator S-adenosil-L-metionina (AdoMet, SAM) para um grupo guanidina de resíduos específicos de arginina, fazendo com que estes se tornem mono ou dimetilados e liberando S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy, SAH) como co-produto

(SPANNHOFF; SIPPL; JUNG, 2009). Em mamíferos, nove PRMTs foram descritas como pertencentes às classes I (1-4, 6 e 8) e II (5, 7 e 9) (MARON et al., 2022). A metilação das histonas está envolvida na regulação da expressão gênica, no metabolismo de RNA, no reparo do DNA, regulação de *splicing*, entre outros. Esse processo também influencia na hidrofobicidade e afinidade das histonas com certas proteínas, como os fatores de transcrição, e não altera a carga da cauda das histonas como o fazem a acetilação/deacetilação (BEDFORD, 2007; LI et al., 2021; SPANNHOFF; SIPPL; JUNG, 2009).

Em contraste às PRMTs, a LSD1 funciona como silenciadora da expressão gênica, removendo um ou dois grupos metil da histona H3 nos resíduos de lisina 4. Pelo menos 18 demetilases de lisina foram identificadas, incluindo a LSD1 (HAYWARD; COLE, 2016). Essa enzima também pode demetilar outras proteínas regulatórias epigenéticas, como a metiltransferase 1 de DNA (DNMT1). A ação repressora da LSD1 também pode ocorrer uma vez que essa enzima tem sido associada a complexos repressores, como o CoREST. A desregulação entre metilação/demetilação também está associada ao câncer (MOULD et al., 2014; SCHMITT et al., 2013; WANG et al., 2015a).

Em parasitos, em *P. falciparum*, Volz e colaboradores identificaram uma PRMT, denominada PfSET10, e que está relacionada à variação antigênica na membrana do parasito (VOLZ et al., 2012). Em *S. mansoni*, Padalino e colaboradores identificaram cinco PRMTs e três LSD1, visando a descoberta de novos alvos terapêuticos contra o parasito (PADALINO et al., 2018). Em *T. brucei*, pelo menos quatro PRMTs foram identificadas (KAFKOVA et al., 2017), sendo a PRMT7 a primeira delas (FISK et al., 2009), e a estrutura cristalográfica da PRMT6 do parasito já foi resolvida (WANG et al., 2014). Em *L. major* cinco genes codificam para PRMTs, e estudos mostram que a deleção do gene LmjPRMT7 leva a um aumento da infecciosidade do parasito *in vitro* e em modelo animal, e a super-expressão desse mesmo gene significativamente reduz a progressão da lesão causada pelo parasito (FERREIRA et al., 2014). Em *L. braziliensis*, recentemente, Lorenzon e colaboradores caracterizaram funcionalmente as cinco PRMTs do parasito, e mostraram que essas proteínas apresentam um papel regulatório durante o ciclo de vida deste, sendo esta HME importante para as interações de *Leishmania* com a célula hospedeira (LORENZON et al., 2022). Em relação às LSD1, estas já foram identificadas em *S. mansoni* (CARNEIRO et al., 2020) e *P. falciparum* (CUI; MIAO, 2010).

1.4. Inibidores de HDACs, PRMTs e LSD1

Inibidores de HDACs (HDACi) têm sido investigados nas últimas duas décadas como potenciais medicamentos contra o câncer, em especial, linfomas e mieloma múltiplo. Em 2006, a *Food and Drug Administration* (FDA), que é uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, aprovou o uso do vorinostat para o tratamento de linfoma de células T cutâneo. A romidepsina e o belinostat também são utilizados no tratamento desse tipo de câncer, enquanto o panobinostat é utilizado na terapia combinada para o mieloma múltiplo (CHUA et al., 2017).

A abordagem de “*drug repurposing*” tem sido empregada visando o desenvolvimento de novas drogas contra doenças parasitárias negligenciadas, uma vez que é possível estabelecer um paralelo entre as células cancerígenas e as células parasitárias, já que ambas apresentam alta taxa metabólica, proliferam rapidamente e são capazes de evadir do sistema imune (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012; WANG et al., 2015a). Além disso, análises de similaridade de sequência dos domínios catalíticos de HMEs humanas e de parasitos, permite melhor identificação dos alvos nestes últimos (MELESINA et al., 2015). Com essa estratégia, inibidores de HDACs validados clinicamente, como mencionado acima, e outros inibidores dessas enzimas e também de outras HMEs como PRMTs e LSD1, têm sido testados contra diversos parasitos (CHUA et al., 2017; HU et al., 2008).

Estudos *in vitro* com HDACi para *P. falciparum* realizados por Darkin-Rattray et al., em 1996, mostraram que a apicidina, um forte inibidor de HDAC da classe dos tetrapeptídeos cíclicos, sob determinadas concentrações, é eficaz contra esse parasito por inibir a atividade de PfHDAC1 e causar a hiperacetilação das histonas, dessa forma, interferindo no crescimento do parasito (DARKIN-RATTRAY et al., 1996). Engel e colaboradores avaliaram o efeito do vorinostat, romidepsina, belinostat e panobinostat em *P. falciparum* e *T. brucei*, e mostraram que esses inibidores apresentam atividade anti-parasitária dose-dependente (ENGEL et al., 2015). Em 2012, Kelly e colaboradores avaliaram o efeito de derivados do ácido hidroxâmico, que são uma das classes de HDACi, em formas sanguíneas de *T. brucei*, e mostraram que a maioria dos compostos testados foi eficaz em inibir o crescimento do parasito em concentrações muito baixas, na faixa de nanomolar (INGRAM; HORN, 2002; KELLY et al., 2012). Em 2017, Chua e colaboradores mostraram o efeito de diversos HDACi validados clinicamente contra *Plasmodium*, *Leishmania* e *Schistosoma* (CHUA et al., 2017). Além disso, Melesina e colaboradores realizaram estudos de modelagem por homologia em diversas HDACs de parasitos, o que caracteriza um ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores seletivos dessas enzimas baseados em estrutura (MELESINA et al, 2015).

Atualmente, várias classes estruturalmente diferentes de HDACi são conhecidas, incluindo os ácidos hidroxâmicos como o TSA e o SAHA, este último também conhecido como vorinostat; ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico e o ácido valpróico (VPA); tetrapeptídeos cíclicos, como a romidepsina e benzamidas, como o entinostat (NEBBIOSO et al., 2012; TANG; YAN; ZHUANG, 2013; WAGNER et al., 2013).

Os HDACi alteram seletivamente a transcrição gênica, seja por modificação na estrutura da cromatina, por levar à acetilação de regiões promotoras e inativar complexos co-repressores, ou ainda, por levar à acetilação de diversas proteínas não-histonas, modificando a sua função ou atividade (BOSE; DAI; GRANT, 2014; BROCHIER et al., 2013). É importante destacar que a inibição de HDACs leva ao aumento do processo de acetilação. Um dos efeitos da letalidade dos HDACi é o aumento da expressão de p21, que é uma proteína envolvida na regulação da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Esse aumento faz com que a p21 se ligue aos complexos ciclina-Cdk, promovendo a sua inativação e, conseqüentemente, resultando na parada do ciclo celular e diferenciação celular (YOO; JONES, 2006). Além disso, os HDACi podem causar inibição do reparo ao DNA, geração de espécies reativas de oxigênio, o que promove dano ao DNA, indução da autofagia, indução da apoptose, entre outros (BOSE, DAI; GRANT, 2014).

Quanto aos inibidores de PRMTs, um grande número destes foi descoberto na última década em todo o mundo. Pan-inibidores de metiltransferases como a sinefungina e a metiltioladenosina foram e ainda são utilizados como ferramenta inicial no desenvolvimento de inibidores de PRMTs-específicos (HU et al., 2016). Triagens virtuais de várias bibliotecas de compostos realizadas por diversos pesquisadores, identificaram também inibidores de PRMT-1, como a allantodapsone, e de PRMT-3 (BISSINGER et al., 2011; DILLON et al., 2012; HU et al., 2016). Além disso, as diamidinas foram identificadas como inibidoras seletivas de PRMT1, como mostrado por YAN e colaboradores (YAN et al., 2014). Compostos baseados em diamidina apresentam potente atividade antimicrobiana, incluindo ação contra *Giardia lamblia* e *P. falciparum* (DE SOUZA et al., 2004). As diamidinas têm sido também utilizadas há muito tempo no tratamento das leishmanioses, a exemplo da pentamidina, e vários estudos envolvendo esses compostos têm sido feitos em *Leishmania* com comprovação de sua eficácia contra esses parasitos tanto em promastigotas quanto em amastigotas intracelulares (HU et al., 2008). Entretanto, muitos desafios se interpõem na descoberta de inibidores de PRMTs. Poucos inibidores dessas HMEs mostram seletividade para determinada isoforma e os mecanismos estruturais de muitos desses compostos ainda não foram determinados. Além disso, muitos apresentam seletividade para o substrato (histonas) e não para a enzima, podendo também ter baixa eficácia na inibição (DILLON et al., 2012; YAN et al., 2014).

Para os inibidores de LSD1, estes têm emergido principalmente na terapêutica do câncer, em especial os hematológicos (MOULD et al., 2014). O tranilcypromine é um medicamento aprovado

pela FDA utilizado como antidepressivo e que foi identificado recentemente por apresentar alta capacidade de inibição de LSD1. Assim, pesquisadores e empresas farmacológicas têm utilizado esse medicamento para o *design* de novos inibidores de LSD1, como mostrado por Hayward e Cole. (HAYWARD; COLE, 2016). Há ainda outros inibidores de LSD1, como o CBB-1007, namoline e GSK 354, caracterizados por alterar os níveis globais de metilação das histonas (MOULD et al, 2015). Os referidos inibidores de LSD1 foram testados em nosso laboratório para avaliação de seu efeito leishmanicida contra *L. braziliensis*, porém, não foram eficazes contra o parasito e apresentaram elevada toxicidade para os macrófagos, nosso modelo de célula hospedeira (DE SOUZA, 2016). Recentemente, Carneiro e colaboradores identificaram um novo inibidor seletivo de LSD1 de *S. mansoni*, o MC3935, e mostraram que essa inibição seletiva levou à total desregulação da transcrição e a alterações estruturais que impediram a viabilidade do parasito (CARNEIRO et al, 2020).

1.5. O consórcio de pesquisa A-ParaDDisE: (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics)

O A-ParaDDisE (<http://a-paradise.cebio.org/>) foi um Projeto do tipo Consórcio Colaborativo Internacional financiado pela Comunidade Europeia, vigente entre 2014 e início de 2017, cujo objetivo foi o desenvolvimento de novos medicamentos contra doenças parasitárias negligenciadas como a esquistossomose, leishmanioses, doença de Chagas e malária. Esse projeto baseou-se em alvos epigenéticos, como as HMEs envolvidas nos processos de acetilação/deacetilação, metilação/demetilação. Essa estratégia foi oriunda de um projeto anterior, o SEtTReND FP7 (2010-2012), cujo objetivo foi a descoberta de novos medicamentos espécie-seletivos para *Schistosoma*. No SEtTReND, novos inibidores de HMEs contra HDAC 8 desse parasito foram identificados, além de ter sido possível criar uma biblioteca de compostos que pudessem ser testados contra outros parasitos humanos relevantes para saúde pública mundial, inclusive *Leishmania*.

Para que o Projeto pudesse ser desenvolvido, foram criados grupos de trabalho (WP) com as Instituições participantes segundo a especialidade de cada um, como pode ser visto na Figura 8.

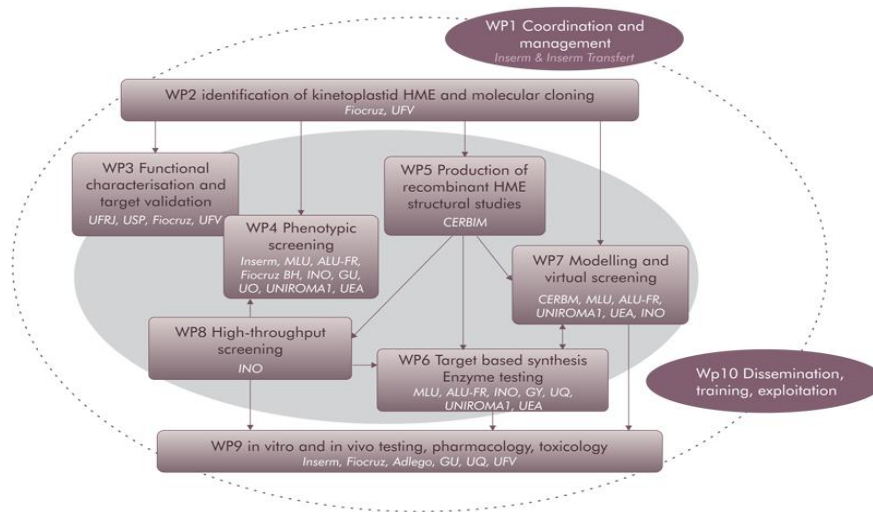


Figura 8 - Grupos de trabalho do Consórcio A-ParaDDisE. Estão representadas as Instituições participantes do Projeto e as atividades desenvolvidas por cada uma, bem como a interdependência entre elas. (<http://a-paradise.cebio.org/>)

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), representada pela Professora Doutora Juliana Fietto participou de três desses WP (WP2, WP3 e WP9) e as atividades incluíram identificação, clonagem e validação das HDACs de *L. braziliensis* como alvos, testes fenotípicos *in vitro* e em modelo murino com inibidores de HMEs selecionados, incluindo os HDACi e inibidores de PRMTs e LSD1 fornecidos pelos grupos parceiros da área de química.

No meu mestrado, intitulado: “Avaliação da ação leishmanicida de inibidores de Enzimas Modificadoras de histonas em *L. braziliensis* e na infecção de macrófagos” (DE SOUZA, 2016), e enquanto Pesquisadora Colaboradora do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 1 pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, testei 67 inibidores de HMEs enviados por pesquisadores parceiros, em especial os pesquisadores Wolfgang Sippl, da *Martin Luther Universitt Halle*, Alemanha, e Manfred Jung, da *Albert Ludwigs Universitt Freiburg*, França, em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, bem como avaliei a toxicidade desses compostos em modelo de célula hospedeira. Quatorze desses inibidores, apresentados na tabela a seguir, apresentaram efeito leishmanicida significativo contra amastigotas intracelulares e baixa toxicidade para macrófagos, permitindo-nos a continuidade das pesquisas, cujos resultados estão presentes neste trabalho.

Melhores inibidores de HMES testados durante o mestrado	Melhores inibidores de HMES testados como Pesquisadora Colaboradora
BSF2, BSF2E, BSF2P, TH85	BSF1B, BSF46B, BSF51B, BSF55B, TH58, TH60, TH71, TH72, TH74, TH76

2. OBJETIVOS

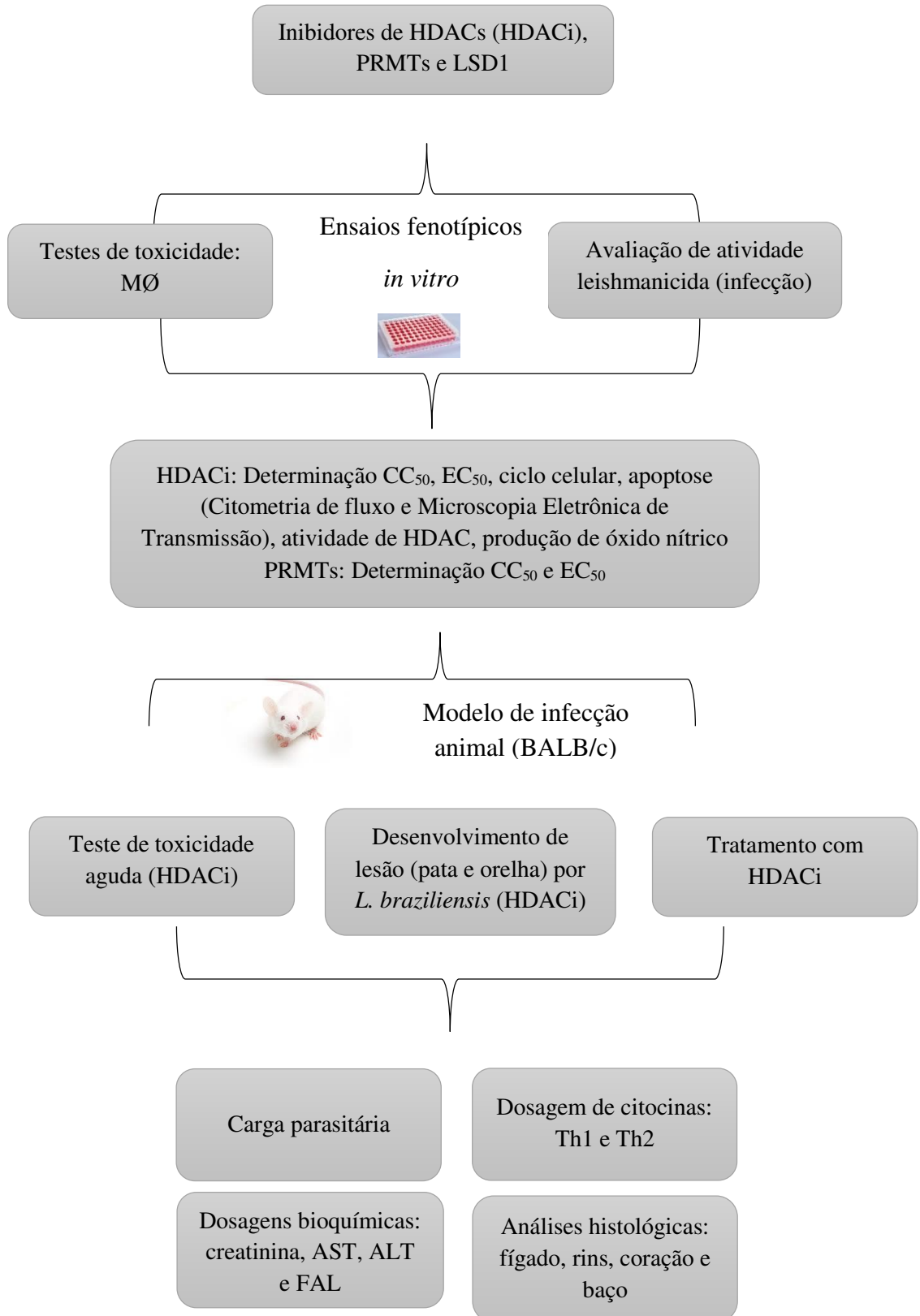
2.1. Objetivo geral:

Identificar inibidores de enzimas modificadoras de histonas com ação leishmanicida significativa contra *L. braziliensis* e investigar mecanismos moleculares do efeito leishmanicida de inibidores HDACs *in vitro* e em modelo de infecção em camundongo.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar a citotoxicidade de inibidores de HDACs, PRMTs e LSD1 para linhagem de macrófago usada em testes de infecção *in vitro*;
- Determinar o efeito leishmanicida de inibidores de HDACs, PRMTs e LSD1 na infecção *in vitro* de macrófagos por *L. braziliensis*;
- Determinar o CC₅₀, EC₅₀ e índice de seletividade (IS) dos melhores inibidores selecionados nos ensaios de infecção *in vitro* em macrófagos;
- Avaliar os efeitos dos HDACi na viabilidade, no tipo de morte e no ciclo celular de *L. braziliensis* e de macrófagos;
- Avaliar o efeito dos HDACi sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *L. braziliensis*;
- Avaliar o efeito dos HDACi sobre a atividade de HDACs de macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*;
- Avaliar a toxicidade em doses repetidas dos HDACi para camundongos BALB/c para ajuste das doses de tratamento;
- Avaliar o efeito dos HDACi na diminuição da lesão da pata de camundongos infectados com *L. braziliensis*;
- Analisar o efeito *in vivo* dos HDACi sobre a produção de citocinas (TNF, INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17);
- Analisar o efeito *in vivo* dos HDACi sobre as dosagens séricas de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT e fosfatase alcalina – FAL) e da enzima renal creatinina.
- Analisar o efeito dos HDACi sobre o fígado, rins, coração e baço dos camundongos infectados com *L. braziliensis*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepa M2904 de *L. braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (tipo selvagem), gentilmente cedidas pelo professor Dr. Luís Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto, e M2904-GFP (E BASTOS et al., 2017) foram cultivadas em garrafas de cultura de 10 mL, em meio Grace (Grace's Insect Medium, Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) e penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), pH 6.5, filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25 °C (E BASTOS et al, 2017).

Para o congelamento dos parasitos, as formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento (dia 5) em passagem até p3, foram centrifugadas a 1.200 x g, a 4 °C, durante 10 min e o pellet foi suspenso em Grace suplementado, procedendo-se à contagem celular em Câmara de Neubauer para obtenção de 1×10^6 *Leishmania*/mL. Feito isso, foram acrescentados em um tubo de fundo cônico de 15 mL o meio Grace suplementado com os parasitos já com o volume ajustado e o dimetilsulfóxido (DMSO; Neon Comercial, Vila Prudente, SP, Brasil) (6,5% v/v), transferindo-se 1 mL desse meio para criotubos. Após, os criotubos foram armazenados 1h em geladeira a 4 °C, seguindo-se 24 h em freezer a -20 °C, 24 h em freezer a -80 °C e então transferidos para o botijão de nitrogênio líquido para estoque, como descrito por (DE SOUZA, 2016).

Para o descongelamento das amostras, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados à temperatura ambiente. Após o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para uma garrafa de cultivo, onde adicionou-se aos poucos, 10 mL de meio Grace suplementado. As garrafas foram então incubadas em estufa B.O.D a 25 °C até a recuperação das células. Após esse tempo, foram feitos repiques de 4 em 4 dias com o número inicial de 1×10^5 células/mL para manutenção dos parasitos (DE SOUZA, 2016), até atingir a passagem p10. Ao chegar em p10, as amostras foram descartadas e procedeu-se ao descongelamento de outros criotubos, uma vez que em passagens acima de p10, a capacidade de infecção dos parasitos torna-se diminuída.

4.2. Linhagem de macrófagos Raw.264.7

A linhagem de macrófagos Raw 264.7, proveniente da empresa ATCC®, foi mantida em garrafas de cultura de 50 mL, em meio RPMI (RPMI-1640, Sigma, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina (2 mM) (Serva Electrophoresis; Life Science Products, NY, USA), penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), pH 7.2, filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubada em estufa de 5 % de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37 °C (E BASTOS et al, 2017).

Para o congelamento das células, estas, com mais de 90% de confluência na garrafa de cultivo, foram desaderidas com o auxílio de um espalhador celular e procedeu-se à contagem em Câmara de Neubauer para obtenção de 1×10^5 macrófagos/mL. Feito isso, foram acrescentados em um tubo de fundo cônico de 15 mL o meio RPMI suplementado com as células já com o volume ajustado e o DMSO (5% v/v), transferindo-se 1 mL desse meio para criotubos. Após, os criotubos foram armazenados 1 h em geladeira a 4 °C, seguindo-se 24 h em freezer a -20 °C, 24 h em freezer a -80 °C e então transferidos para o botijão de nitrogênio líquido para estoque, como descrito por (DE SOUZA, 2016).

Para o descongelamento das amostras, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em estufa de 5% de CO₂ a 37 °C. Após o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para uma garrafa de cultivo, onde adicionou-se aos poucos, 10 mL de meio RPMI suplementado. As garrafas foram então incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37 °C até a recuperação das células (DE SOUZA, 2016). Após esse tempo, foram feitos repiques de 2 em 2 dias com o número inicial de 5×10^4 células/mL para manutenção dos macrófagos.

4.3. Formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*

Para obtenção das formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, fez-se um repique inicial de 1×10^5 parasitos/mL em garrafa de cultivo e adicionou-se 10 mL de meio Grace suplementado (item 4.1). As amostras foram então armazenadas em estufa a 25 °C durante 7 dias (fase estacionária de crescimento determinada após curva de crescimento) (DE SOUZA, 2016).

4.4. Compostos inibidores de HDAC (HDACi), de PRMTs e LSD1

Os inibidores de HMEs estudados foram sintetizados no Instituto de Farmácia da Universidade Martin-Luther de Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Alemanha, pelo Professor Dr. Wolfgang Sippl, parceiro do A-ParaDDisE.

Soluções-estoque a 10 mM foram preparadas em 100% p/v DMSO para cada composto e armazenadas a -20 °C. Para utilização nos experimentos *in vitro* foram preparadas para cada composto soluções de uso, em água destilada estéril, nas concentrações desejadas a partir das soluções-estoque a 10 mM, sendo o armazenamento feito a -20 °C (DE SOUZA, 2016). Para utilização nos experimentos *in vivo*, os compostos liofilizados foram diluídos em DMSO (1% p/v) e posteriormente, em PBS estéril, para as concentrações desejadas, sendo preparados no dia anterior aos experimentos.

4.5. Determinação da citotoxicidade dos inibidores de PRMTs e LSD1 em macrófagos

Os testes para determinação da citotoxicidade em macrófagos Raw 264.7 foram feitos em placas de 96 poços. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado (item 4.2) e foram montadas 3 placas iguais para avaliar a ação dos inibidores após 48 h, utilizando-se o método da resazurina. Os inibidores, o DMSO (concentração final de 0,1% v/v) (controle negativo) e anfotericina B (3,4 µM) (controle positivo) foram adicionados nas placas em quadruplicata. Seguiu-se o mesmo protocolo descrito por (DE SOUZA, 2016).

A resazurina, também conhecida como Alamar Blue, é um sal de sódio e comumente utilizada em ensaios de cultivo celular como um indicador colorimétrico de proliferação e viabilidade. Em sua forma oxidada, a resazurina é um corante azul, e quando há presença de atividade metabólica celular, ela é reduzida a resorufina, que apresenta coloração rosa, podendo esse processo ser medido por leitura fluorimétrica ou colorimétrica (O'BRIEN et al, 2000). A resazurina utilizada no presente trabalho (Sigma-Aldrich, MO, USA, Mw: 251.17 g/mol) foi preparada a 1mM em PBS, filtrada em membrana 0,22 µM e armazenada em frasco âmbar a 4 °C (DE SOUZA, 2016).

4.6. Determinação do efeito leishmanicida de inibidores de PRMTs e LSD1 no ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*

Os testes de infecção *in vitro* foram realizados em placas de 96 poços. Inicialmente, foram montadas placas com os macrófagos Raw 264.7 e posteriormente foi feita a infecção dessas células com formas promastigotas enriquecidas em formas metacíclicas de *L.*

braziliensis (item 4.3), na proporção de 15:1 (*Leishmania*/macrófago). Feito isso, foram adicionados os inibidores e os controles, nas mesmas concentrações descritas no item 4.5 e avaliou-se a ação dos inibidores após 48 h pelo método da resazurina ou por quantificação de fluorescência em leitora de microplacas (Spectramax M5). Foi seguido o mesmo protocolo descrito por E BASTOS e colaboradores (E BASTOS et al, 2017).

4.7. Determinação da concentração citotóxica (CC₅₀) dos inibidores de HMEs em macrófagos

Os testes para determinação do CC₅₀ dos inibidores de HMEs em macrófagos Raw 264.7 seguiram o mesmo protocolo descrito no item 4.5 e por (DE SOUZA, 2016). Entretanto, as concentrações dos inibidores testadas foram: 120 µM, 100 µM, 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM e 1 µM, DMSO (0,8% v/v) (controle negativo) e anfotericina B (3,4 µM) (controle positivo).

Os cálculos para determinação do CC₅₀ foram feitos no GraphPad Prisma Versão 5.03.

4.8. Determinação da concentração efetiva (EC₅₀) dos inibidores de HMEs no ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*

Os testes de infecção *in vitro* foram realizados seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.6 e por (E BASTOS et al, 2017). Entretanto, as concentrações dos inibidores testadas foram 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM and 1 µM, DMSO (0,8% v/v) (controle negativo) e anfotericina B (3,4 µM) (controle positivo).

Os cálculos para determinação do EC₅₀ foram feitos no GraphPad Prisma Versão 5.03.

4.9. Determinação da concentração efetiva (EC₅₀) dos HDACi em formas promastigotas de *L. braziliensis*

Os ensaios para se determinar o EC₅₀ dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis* foram feitos em placas de 96 poços. Os parasitos foram cultivados segundo descrito no item 4.1 e as placas foram montadas adicionando-se 4 x10⁶ parasitos em um volume final de 200 µL/poço. Posteriormente, foram adicionados nas placas 4 µL dos compostos para as concentrações finais de 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM and 1 µM, 4 µL de DMSO (0,8% v/v) (controle negativo) e 2,5 µL de anfotericina B (3,4 µM) (controle positivo); todos em quadruplicata. Um controle para avaliar o crescimento de *Leishmania* na

ausência dos compostos também foi feito, constando apenas de parasitos e meio Grace suplementado. As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 25 °C e avaliou-se a ação dos inibidores após 48 h pelo método da resazurina ou por quantificação de fluorescência em leitora de microplacas (Spectramax M5). Foi seguido o mesmo protocolo descrito por DE SOUZA, 2016.

Os cálculos para determinação do EC₅₀ foram feitos no GraphPad Prisma Versão 5.03.

4.10. Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão obtida entre os valores de CC₅₀ / EC₅₀.

4.11. Ensaios por citometria de fluxo (CF): viabilidade, apoptose e ciclo celular

L. braziliensis M2904 e M2904-GFP e macrófagos Raw 264.7 foram cultivados conforme descrito anteriormente nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. Os parasitos foram tratados por 48 h com o EC₅₀, 2x EC₅₀ e 3x EC₅₀, uma vez que as sensibilidades entre o método da resazurina *in vitro* e da CF são diferentes. O EC₅₀ utilizado foi o determinado nos testes *in vitro* pelo método da resazurina (item 4.9). Os macrófagos foram tratados com o EC₅₀ determinado para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* nos ensaios de infecção (item 4.8), uma vez que nessa concentração os efeitos dos HDACi podem ser observados tanto para a célula hospedeira quanto para o parasito ao mesmo tempo. Os ensaios de viabilidade e ciclo celular foram feitos com *L. braziliensis* M2904-GFP, enquanto *L. braziliensis* do tipo selvagem foi utilizada nos testes de apoptose para evitar interferência do GFP com o FITC conjugado com a anexina-V. Para os ensaios, seguiu-se o mesmo protocolo descrito por (SOUZA et al, 2020).

4.12. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos Raw 264.7 infectados com *L. braziliensis*

O ensaio de infecção de macrófagos foi realizado conforme descrito em 4.6 e por (E BASTOS et al, 2017). As células foram tratadas com os HDACi TH57, TH60, TH71, TH74 e TH85 por 48 h nas concentrações do EC₅₀, 2x EC₅₀ e 3x EC₅₀, mantendo-se o que foi estabelecido para os ensaios por citometria de fluxo. Foi seguido o mesmo protocolo descrito por (SOUZA et al, 2020).

4.13. Ensaio de atividade de HDAC

O ensaio de atividade de HDAC foi realizado em placa de 96 poços e os macrófagos foram cultivados seguindo-se o protocolo descrito no item 4.5. Da mesma forma, o ensaio de infecção foi feito como descrito em 4.6. As células foram tratadas por 48 h com o TH74 e TH85 nas concentrações do EC_{50} , $1/2 EC_{50}$ e $1/4 EC_{50}$, todos em duplicata biológica. O ensaio de atividade de HDAC foi medido utilizando-se o Kit *Fluorometric Activity Assay* (Cayman Chemical, Michigan, USA - #600150) e as recomendações do fabricante foram seguidas. Este kit permite medir a atividade de diversas HDACs e também de complexos contendo HDAC1.

4.14. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 4 a 8 semanas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Os animais foram acondicionados no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular DBB/UFV, situado na Vila Gianetti, casa 29 (Biofármacos) onde foram mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclo 12 h claro/12 h escuro), de temperatura (21 ± 2 °C) e de umidade relativa do ar (60-70%). Foram mantidos 6 animais em cada gaiola (rack ventilado) de policarbonato transparente, nas medidas aproximadas (L x A x P) em mm: 200 x 230 x 300, forradas com maravalha previamente autoclavada. A água filtrada utilizada foi proveniente do sistema de abastecimento da Universidade Federal de Viçosa e a ração oferecida foi do tipo comercial apropriada para ratos e camundongos. Os animais receberam água e comida *ad libitum*. As gaiolas foram higienizadas duas vezes por semana com hipoclorito de sódio (1% v/v) comercial. Após a limpeza e desinfecção das caixas, a maravalha foi repostada. Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação de cinco dias antes do início dos experimentos. A experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais – CEUA/UFV sob o Processo número 52/2017 e respeitando os princípios éticos do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário.

4.15. Teste de toxicidade aguda

Após o período de adaptação dos animais, estes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos contendo 5 animais cada e então foram administrados os HDACi e o DMSO para o teste

de toxicidade aguda. O Grupo 1 – controle, não recebeu nenhum tratamento; ao Grupo 2 foi administrado DMSO (1% v/v - mesma concentração usada para diluir os compostos; controle negativo); ao Grupo 3 foi administrado o HDACi TH74 na concentração de 20 mg/kg/dia; ao grupo 4 foi administrado o HDACi TH74 na concentração de 10 mg/kg/dia e ao grupo 5 foi administrado o HDACi TH74 na concentração de 5 mg/kg/dia. A administração dos HDACi e DMSO foi feita por via intravenosa na cauda por 2 semanas em dias alternados, usando agulha 31 G (6 mm x 0,25 mm). As concentrações utilizadas e o tempo de administração dos HDACi foram escolhidos com base nas recomendações do Ministério da Saúde para o tratamento de leishmaniose cutânea (LC) por *L. braziliensis* e em trabalhos com a referida espécie em modelo de infecção animal (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; COELHO et al, 2016; INACIO et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

O HDACi TH74 foi utilizado no teste de toxicidade aguda como representante dos melhores HDACi da classe TH de compostos com efeito significativo contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis in vitro*.

4.16. Desenvolvimento de lesão

O desenvolvimento de lesão por *L. braziliensis* em modelo animal foi avaliado tanto por infecção na pata quanto na orelha. Após o período de adaptação, os animais (n=6) foram infectados subcutaneamente no coxim plantar da pata posterior esquerda com formas promastigotas (descrito no item 4.3) de *L. braziliensis* (1×10^7 parasitos em 40 μ L de PBS) utilizando agulha 31 G (6 mm x 0,25 mm). Após sete dias de infecção, uma vez por semana, durante nove semanas, o tamanho da lesão foi medido por meio de um micrômetro (modelo 1015 MA; LS, Starret Co, Itu, SP, Brasil). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença de espessura entre a pata infectada (esquerda) e a pata contralateral não infectada.

Para avaliação do desenvolvimento da lesão na orelha, os animais (n=6) foram infectados por via intradérmica no pavilhão auricular central esquerdo com formas promastigotas (descrito no item 4.3) de *L. braziliensis* (1×10^5 parasitos em 10 μ L de PBS) utilizando agulha 31 G (6 mm x 0,25 mm). Os camundongos foram acompanhados semanalmente, uma vez por semana, até o desenvolvimento da lesão. O tamanho da lesão, bem como a sua caracterização, foi determinado uma vez por semana, durante quatro semanas, utilizando-se um compasso de calibre digital Vernier (fabricante: Kahakiboy, Shenzhen, China) e também por meio de um método de pontuação (*score*) desenvolvido por Schuster e

colaboradores em 2014 para padronizar o monitoramento de lesões por *Leishmania* em modelo murino após infecção intradérmica na orelha.

4.17. Tratamento com os HDACi

O protocolo de tratamento com os HDACi e demais ensaios realizados foram conduzidos com os animais após infecção na pata. Na segunda semana após a infecção, os animais foram separados aleatoriamente em nove grupos de seis animais cada e, em seguida, o tratamento foi iniciado por via intravenosa na cauda por 3 semanas em dias alternados, usando agulha 31 G. Grupo 1 - controle, recebeu soro fisiológico (200 µL de NaCl 0,9% p/v); Grupo 2 - tratado com DMSO (1% v/v - mesma concentração usada para diluir os compostos; controle negativo); Grupo 3 - tratado com Glucantime® (antimoniato de meglumina; 20 mg/kg/dia; controle positivo); Grupo 4 - tratado com TH60 (5 mg/kg/ dia); Grupo 5 - tratado com TH60 (10 mg/kg/dia); Grupo 6 - tratado com TH74 (5 mg/ kg/dia); Grupo 7 - tratado com TH74 (10 mg/kg/dia); Grupo 8 - tratado com TH85 (5 mg/ kg/dia); Grupo 9 - tratado com TH85 (10 mg/kg/dia). O Glucantime® utilizado no experimento foi gentilmente cedido pelo Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ MINAS), Belo Horizonte, Brasil. As doses administradas dos HDACi e dos controles foram estabelecidas após o teste de toxicidade aguda (item 4.12).

4.18. Eutanásia

Após seis semanas de infecção, os animais foram eutanasiados para a realização dos ensaios de quantificação da carga parasitária na pata, dosagens bioquímicas de enzimas hepáticas e renal, avaliação do perfil de citocinas por citometria de fluxo e análises histopatológicas. A eutanásia foi realizada pela técnica de deslocamento cervical em substituição à utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis recomendados pela resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), visto que o uso de anestésicos pode interferir na resposta imune dos animais (MARKOVIC; MURASKI, 1990; THOMPSON et al., 2002).

4.19. Dosagem da carga parasitária

O número de parasitos na pata infectada dos animais foi estimado pelo ensaio de diluição limitante (AFONSO; SCOTT, 1993; DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008). A pata esquerda infectada foi retirada dos animais em condições assépticas e mantida em tubo de fundo cônico contendo meio de Grace suplementado (item 4.1). Em seguida, a pata foi macerada com o auxílio de um triturador de tecido em vidro do tipo Potter-Elvehjem, individual para cada grupo de trabalho. A suspensão proveniente de cada amostra foi transferida para um tubo de fundo cônico de 15 mL e centrifugada a $42 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/1 \text{ min}$. O sobrenadante da centrifugação foi então transferido para outro tubo de fundo cônico de 15 mL e centrifugado a $1540 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. O pellet resultante foi ressuspensão em 500 μL de meio de Grace suplementado e adicionado, em duplicata, nos primeiros poços de placas de 96 poços de fundo chato (assim, cada poço contendo 200 μL da suspensão). Nos demais poços da placa de 96, foram adicionados 160 μL de meio de Grace suplementado. Procedeu-se então à diluição limitante 1:5, transferindo-se 40 μL dos primeiros poços para os seguintes. As placas foram vedadas com parafilm e incubadas em estufa BOD a 25 $^\circ\text{C}$ por pelo menos 15 dias, para avaliação da presença de *Leishmania* utilizando-se microscópio invertido. Os resultados foram expressos como $-\log$ da última diluição em que foram detectados parasitos.

4.20. Dosagem de citocinas

Para a dosagem de citocinas, os linfonodos drenantes das patas infectadas dos camundongos foram coletados em condições assépticas e colocados em tubos de fundo cônico de 15 mL contendo meio Grace base. As amostras foram então maceradas com o auxílio de um pistilo e o conteúdo foi transferido para outro tubo de fundo cônico de 15 mL, sendo completado o volume para 5 mL com Grace base. O material foi centrifugado a $170 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/10 \text{ min}$, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 10 mL de RPMI. Foi então realizada a contagem do número de células em PBS e azul de tripan, com diluição de 50x, ajustando-se o volume para 2,5 milhões de células por poço ($2,5 \times 10^6$ células) em 500 μL . Após a contagem, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços na ausência e na presença de 25 μg de estímulo: antígeno de *L. braziliensis* (LbAg - extrato puro de promastigotas em fase estacionária de crescimento), sendo incubadas por 72 h a 37 $^\circ\text{C}$ em estufa de 5% de CO_2 . Após esse tempo, o sobrenadante da cultura foi coletado e transferido para um microtubo de centrifugação de 2 mL, de onde as amostras foram coletadas e preparadas para as dosagens de citocinas no citômetro de fluxo. Para a dosagem de citocinas foi utilizado o kit comercial BDTM

CBA *Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences, San Diego, CA) e foram seguidas as recomendações do fabricante.

Os protocolos na experimentação animal foram adaptados de EMERICK, 2016.

4.21. Dosagem de enzimas hepáticas e renal

As dosagens bioquímicas foram feitas no plasma dos animais. Previamente à coleta do sangue, 200 µL de heparina sódica (2,5 U) (diluída em solução salina foram aplicados nos animais por via intravenosa na cauda utilizando agulha 31 G. Após 1 h, o sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital em microtubo para centrifugação e então centrifugado a 2000 x g/10 min/ 4 °C. O plasma foi coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro microtubo de centrifugação e armazenado a -20 °C até o momento das dosagens bioquímicas.

Foram utilizados kits comerciais da empresa Bioclin (Quibasa-Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil) para as dosagens do marcador renal creatinina (kit creatinina cinética) e marcadores hepáticos: transaminase pirúvica (kit transaminase ALT/TGP), transaminase oxalacética (kit transaminase AST/TGO) e fosfatase alcalina (kit fosfatase alcalina cinética), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os kits foram gentilmente cedidos pela referida empresa através do Projeto Bioclin Educar, vertente Bioclin-Pesquisador.

As análises bioquímicas foram feitas em colaboração com o Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição da UFV.

4.22. Análises histológicas

Fígado, rins, baço e coração foram coletados para realização das análises histopatológicas dos animais. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5% v/v e paraformaldeído 4% v/v em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7.2) por 24 h (KARNOVSKY, 1965). Após o período de fixação, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol (70, 80, 90, 100% v/v), clarificados em xileno e emblocados em parafina. Secções semi-seriadas com espessura de 5 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de cada fragmento. Em seguida, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas com xileno, hidratadas em soluções decrescentes de etanol, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e montadas com *Entellan*. Dez regiões de cada tecido foram avaliadas por animal, utilizando microscópio de luz em aumento de 400x. Alterações histopatológicas foram avaliadas de forma

semi-quantitativa e foram atribuídos quatro níveis de danos, sendo eles: (-) sem alterações histológicas e, portanto, manutenção da arquitetura tecidual normal do órgão; (+) discreta, que envolve a ocorrência de alteração em um dos campos histológicos analisados, em pelo menos um animal por grupo; (++) moderada, quando a patologia foi encontrada em dois ou mais campos histológicos analisados, em pelo menos um animal por grupo; e (+++) severa, quando a alteração histológica encontrada em mais de dois campo histológicos, em dois ou mais animais por grupo (adaptado de OLIVEIRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2009). Os dados foram apresentados como a média por grupo. Para avaliar a presença de formas amastigotas de *L. braziliensis* no baço, fragmentos do órgão foram observados em aumento de 1000x utilizando-se óleo de imersão.

As análises histológicas foram feitas em colaboração com a Professora Mariana Neves e com o doutorando Luiz Otávio Guimarães do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV.

4.23. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prisma versão 5.03. As diferenças estatisticamente significativas foram identificadas utilizando-se *one-way* ANOVA. Quando $p < 0,05$, os resultados foram considerados estatisticamente significantes e foram identificados por asterisco (*), ^a ou ^b.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para fins de melhor entendimento dos resultados, estes foram separados em Resultados para HDACi, para os quais tem-se os resultados mais abrangentes (fenotípicos, mecanísticos *in vitro* e ensaio *in vivo*) e Resultados para os inibidores de PRMTs e LSD1, para os quais tem-se somente os ensaios fenotípicos *in vitro*.

5.1. Resultados para os HDACi

5.1.1. Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world Tegumentary leishmaniasis

Para os inibidores de HDACs os estudos realizados geraram um artigo publicado em 2020. Esse artigo incluiu a triagem dos compostos, a seleção dos mais efetivos e estudos dos mecanismos de ação *in vitro*. A seguir, o artigo é apresentado na sua íntegra.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world tegumentary leishmaniasis



Luciana Ângelo de Souza^{a,g}, Matheus Silva e Bastos^{b,g,1}, Joice de Melo Agripino^{b,g}, Thiago Souza Onofre^{b,g,2}, Lourdes Fanny Apaza Calla^{a,g}, Tino Heimbürg^f, Ehab Ghazy^f, Theresa Bayer^f, Victor Hugo Ferraz da Silva^a, Paula Dutra Ribeiro^a, Leandro Licursi de Oliveira^a, Gustavo Costa Bressan^{b,g}, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo^{b,g}, Abelardo Silva-Júnior^c, Raphael de Souza Vasconcellos^b, Ana Márcia Suarez-Fontes^d, Juliana Almeida-Silva^d, Marcos André Vannier-Santos^d, Raymond Pierce^{e,g}, Wolfgang Sippl^{f,g}, Juliana Lopes Rangel Fietto^{b,g,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^d LITEB, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^e Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 59000 Lille, France

^f Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

^g Consortium A-ParADDisE- Anti- Parasite Drug Discovery in Epigenetics - <http://a-paradise.cebio.org>

ARTICLE INFO

Keywords:

Tegumentary leishmaniasis
Leishmania braziliensis
Epigenetics
Histone deacetylases inhibitors
Hydroxamic acid derivatives
Drug discovery

ABSTRACT

The protozoan parasite *Leishmania braziliensis* is a major causative agent of the neglected tropical diseases Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the New World. There are no vaccines to prevent the infection and the treatment relies on few drugs that often display high toxicity and costs. Thus, chemotherapeutic alternatives are required. Histone Deacetylases (HDACs) are epigenetic enzymes involved in the control of chromatin structure. In this work, we tested an in-house library of 78 hydroxamic acid derivatives as putative inhibitors of *L. braziliensis* HDACs (HDACi). The compounds were evaluated in relation to the toxicity to the host cell macrophage and to the leishmanicidal effect against *L. braziliensis* during in vitro infection. Eight HDACi showed significant leishmanicidal effects and the top 5 compounds showed effective concentrations (EC₅₀) in the range of 4.38 to 10.21 μM and selectivity indexes (SI) from 6 to 21.7. Analyses by Transmission Electron Microscopy (TEM) indicated induction of apoptotic cell death of *L. braziliensis* amastigotes with a necrotic

Abbreviations: HDACs, Histone deacetylases; HDACi, HDACs inhibitors; FC, flow cytometry; TEM, Transmission Electron Microscopy; NO, nitric oxide; CL, cutaneous leishmaniasis; DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; DsCL, disseminated cutaneous leishmaniasis; ML, mucocutaneous leishmaniasis; ATL, American Tegumentary Leishmaniasis; HMEs, histone modifying enzymes; HATs, histone acetyltransferases; CC₅₀, cytotoxic concentration; EC₅₀, effective concentration; PS, phosphatidylserine; PI, propidium iodide

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) – Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais CEP: 36570-000, Brazil.

E-mail addresses: luciana.angelosz@gmail.com (L. Ângelo de Souza), matheusbasto@gmail.com (M. Silva e Bastos), joicebqi@gmail.com (J. de Melo Agripino), thiagosonofre@gmail.com (T. Souza Onofre), lourdes.fanny@gmail.com (L.F. Apaza Calla), Tino.heimburg@pharmazie.uni-halle.de (T. Heimbürg), Ehab.ghazy@pharmazie.uni-halle.de (E. Ghazy), Theresa.bayer@pharmazie.uni-halle.de (T. Bayer), vhferraz@gmail.com (V.H. Ferraz da Silva), pauladutrar@gmail.com (P. Dutra Ribeiro), leandro.licursi@ufv.br (L. Licursi de Oliveira), gustavo.bressan@ufv.br (G. Costa Bressan), maralamego@hotmail.com (M.R. de Almeida Lamêgo), abelardojunior@ufv.br (A. Silva-Júnior), raphael.vasconcellos@ufv.br (R. de Souza Vasconcellos), anamarcia1@gmail.com (A.M. Suarez-Fontes), juh_biomed@yahoo.com.br (J. Almeida-Silva), marcos.vannier@ioc.fiocruz.br (M.A. Vannier-Santos), Raymond.Pierce@pasteur-lille.fr (R. Pierce), wolfgang.sippl@pharmazie.uni-halle.de (W. Sippl), jufietto@ufv.br (J. Lopes Rangel Fietto).

¹ Present address: Matheus Silva e Bastos: Department of Pharmacology & Toxicology Indiana University School of Medicine 635 Barnhill Drive MS A405 Indianapolis, IN, 46202, USA.

² Present address: Thiago Souza Onofre: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114191>

Received 15 May 2020; Received in revised form 1 August 2020; Accepted 3 August 2020

Available online 07 August 2020

0006-2952/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

phenotype. An altered chromatin condensation pattern and cellular disorganization of intracellular amastigotes was also observed. A tight connection between the mitochondrion and nuclear protrusions, presumably of endoplasmic reticulum origin, was found in parasites but not in the host cell. In flow cytometry (FC) analyses, HDACi promoted parasite cell cycle arrest in the G2-M phase and no changes were found in macrophages. In addition, the direct effect of HDACi against the promastigotes showed apoptosis as the main mechanism of cell death. The FC results corroborate the TEM analyses indicating that the HDACi lead to changes in the cell cycle and induction of apoptosis of *L. braziliensis*. The production of nitric oxide by the infected macrophages was not altered after treatment with the top 5 compounds. Taken together, our results evidenced new HDACi as promising agents for the development of new treatments for American Tegumentary Leishmaniasis caused by *L. braziliensis*.

1. Introduction

Parasites of the genus *Leishmania* are the causative agents of leishmaniasis, a spectrum of neglected tropical diseases associated with high mortality and morbidity worldwide [1]. *Leishmania* parasites are transmitted to the vertebrate host during the blood meal of female infected sand flies vectors of the genera *Phlebotomus* (Old World) and *Lutzomyia* (New World) [2]. Promastigotes and amastigotes are the two developmental forms of *Leishmania*. Promastigotes are flagellated and mobile forms found in the insect vector and the form that infects the vertebrate host during the blood meal. Amastigotes have no exteriorized flagellum and are found inside the vertebrate host cells, such as macrophages, dendritic cells and neutrophils. Amastigotes can escape the macrophages host defences, replicate intracellularly and maintain the infection [3]. One of the ways *Leishmania* parasites find to modulate macrophage physiology in their favour is through interference in the production of nitric oxide (NO), which plays a key role in the elimination of the parasite. In this way, IFN- γ activated macrophages increase the production of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which then uses L-arginine for the production of NO [4,5]. *Leishmania* have developed various strategies to interfere with this process, such as the use of an LPG shield that impairs the iNOS assembly and secretion or induction of macrophage arginase, which competes with iNOS for arginine, decreasing the production of parasitotoxic NO [6]. Assessment of NO production is useful in pathological states [7,8].

Leishmaniasis can be classified as visceral or cutaneous diseases. Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar is the most severe form of the disease [9], while the cutaneous forms of leishmaniasis are the most common in the population and are usually classified as: cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), disseminated cutaneous leishmaniasis (DsCL) and mucocutaneous leishmaniasis (ML). These disease manifestations are collectively known as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) [10,11]. In South America, *Leishmania braziliensis* is the most prevalent ATL etiological agent, mainly present in Brazil, which is one among the ten countries with the highest incidence of CL [10,12].

There is no licensed vaccine available against leishmaniasis and chemotherapy is essential in the control of the disease, besides other public health measures, such as reservoir and/or vector control. However, the chemotherapy arsenal against the disease is very limited. Pentavalent antimonials and Amphotericin B have been used as first line treatment since the early twentieth century and miltefosine is the only oral drug available until now [13,14]. Factors such as high toxicity, high costs and the need for long periods of hospitalization, besides parasite resistance [15–17], make pivotal the need to search for new drugs against leishmaniasis.

A new approach to the development of new drugs against the disease encompasses the field of epigenetics [18], which mechanisms control the structure and accessibility of DNA, without changing its sequence, regulating important biological phenomena like replication and transcription. The histone modifying enzymes (HMEs) orchestrate post-translational modifications in the DNA-associated histones, which include acetylation/deacetylation of histone lysine residues, performed

by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively [19]. These processes can be aberrant and involved in the genesis and progression of various diseases such as cancers and immune disorders, which explains the interest in HMEs as potential therapeutic targets [18,20].

HDACs form a family of proteins that are present in *Bacteria*, *Archaea*, and *Eukarya*. Eighteen mammalian HDACs have been identified until now and grouped into four different classes: class I, class II, and class IV are Zn²⁺-dependent enzymes and class III, the sirtuins, are NAD⁺-dependent enzymes [21–23]. Recent analyses by Scholte and colleagues on the evolutionary relationships between HDACs and sirtuins of pathogenic parasites, have shown that Kinetoplastids, like *Leishmania*, have class I and class II HDACs [23] and four genes that encode putative HDACs were found in *L. braziliensis* when compared to human orthologs [24]. The relevance of the presence of these lysine deacetylases in parasites became evident in results of molecular modelling analyses by Melesina and colleagues, where small differences were observed in the substrate binding site that can be exploited as starting point for selective inhibition of Kinetoplastid enzymes [24].

Inhibitors of HMEs, like HDAC inhibitors (HDACi), have long been investigated as potential new drugs against cancer [20,25] and a new approach called “piggy-backing” has been explored to determine the potential use of HDACi against human parasites [26–30]. Currently, several structurally different classes of HDACi are known, including the most actively studied hydroxamic acids, the short chain fatty acids, the cyclic tetrapeptides and the benzamides.

The present work shows part of the results from the A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics) project [31], which aimed the discovery (“piggy-back”) and the design of new HDACi against *L. braziliensis* as a starting point for the development of new chemotherapy for ATL. The strategy applied in the A-ParaDDisE are from a previous project called SEtTReND (Schistosome Epigenetics: Targets, Regulation, New Drugs) [29] that validated HDACs from schistosomes as promising targets for new chemotherapy based on HDACi and provided a library of compounds that could be tested against other human parasites.

We tested 78 HDACi (in-house library of hydroxamic acid derivatives originally developed as inhibitors of the HDAC8 from *Schistosoma mansoni*) [32] in macrophages as a first screening, and then in infected macrophages, and deeper evaluations of the action of the most active compounds were done focusing on their specific actions in *L. braziliensis*. Our work highlights HDACi as potential new compounds to be used against *L. braziliensis*, the main causative agent of ATL in the New World.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

L. braziliensis MHOM/BR/75/M2904 (wild type) and M2904-GFP (this cell line constitutively express the Green Fluorescent Protein “GFP”) [33] promastigotes were maintained in Grace’s medium (Grace’s Insect Medium, Gibco, CA, USA) supplemented with 10%

inactivated fetal calf serum (LGC Biotecnologia, SP, Brazil), L-glutamine (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) and penicillin (100 µg/mL) (USB Corporation, OH, USA), pH 6.5 at 25 °C in BOD chamber.

2.2. Mammalian cells

Raw 264.7 macrophages (ATCC, Gaithersburg, MD, USA) were kept in RPMI medium (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, MO, USA) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (LGC Biotecnologia, SP, Brazil), L-glutamine (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) and penicillin (100 µg/mL) (USB Corporation, OH, USA), pH 7.2 at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

2.3. Compounds

The 78 studied HDAC inhibitors were synthesized at the Institute of Pharmacy at the Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany. Synthesis of the compounds has been published elsewhere [32,34,35]. All materials and reagents were purchased from Sigma-Aldrich, MO, USA. Compound TH57 (4,5,6,7-Tetrahydrobenzothiofene-2-hydroxamic acid) was synthesized using methods and materials analogous to the hydroxamates described in [32]. The commercially available 4,5,6,7-Tetrahydrobenzothiofene-2-benzoic acid (1 mmol) was dissolved in dry THF (50 mL) and PyBOP (1.2 mmol) was added. To the activated acid a mixture of NH₂OThP (1.5 mmol) and DIPEA (2.5 mmol) in dry THF (5 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The

solvent was evaporated under vacuum and the mixture was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with aq. potassium hydrogen carbonate solution and brine. The organic layer was evaporated under vacuum and the THP protected hydroxamate was purified by column chromatography (chloroform/ methanol/ TEA, 99.5:0.45:0.05). The obtained product was dissolved in THF and a catalytic amount of *para*-toluenesulfonic acid was added and it was stirred at room temperature. The reaction was controlled by TLC. After that the solvent was evaporated under reduced pressure and after that the mixture was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with brine. Subsequently the organic layer was evaporated under vacuum and the hydroxamate was purified by column chromatography (chloroform/ methanol/ formic acid, 95:4.95:0.05). (Yield: 18%). Due to overlapping fraction with *para*-toluenesulfonic acid and the desired product, the yield decreases after column chromatography. In further reactions *para*-toluenesulfonic acid was replaced by dil. HCl solution for cleaving the THP group which increases the yields after purification. MS *m/z*: 196.27 [M-H]⁻ 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.53 (s, 1H, -NH-OH), 8.94 (s, 1H, -NH-OH), 7.19 (s, 1H, ArC3-H), 2.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, -C7H₂-), 2.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, -C4H₂-), 1.63 (dd, *J* = 9.8, 6.8 Hz, 4H, -C4/5H₂).

HR-MS *m/z*: 220.0403 [M + Na]⁺; berechnet für C₉H₁₁NO₂SNa⁺: 220.0403, HPLC: rt 9.97 min (98.15%), Yield: 35 mg; 0.18 mmol; 18%.

All compounds were pure (> 95%) and were prepared as stock solutions at 10 mM in 100% DMSO (Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda, SP, Brazil).

All tested inhibitors have been optimized for the HDAC8 isoform and in vitro data for human and *Schistosoma mansoni* showed that most

Table 1

Results of the screening of HDACi compounds: evaluation of toxicity to the host cell macrophages and the effect on *L. braziliensis* intracellular amastigotes.

Compound	Structure	% MØ viability	% <i>L. braziliensis</i> viability (infection assay)
Amph B	–	94.49 ± 19.70	–2.46 ± 3.54
TH33		77.85 ± 4.63*	–
TH42		78.19 ± 9.11*	–
TH57		80.44 ± 6.90	68.96 ± 8.98**
TH58		82.30 ± 4.60	59.1 ± 10.1**
TH60		81.20 ± 5.27	51.58 ± 10.0**
TH65		53.55 ± 5.20*	–
TH66		68.81 ± 10.10*	–
TH71		87.40 ± 4.74	59.02 ± 9.26**
TH74		75.65 ± 7.50	46.84 ± 10.45**
TH76		81.50 ± 5.23	51.41 ± 7.36**
TH77		75.02 ± 9.65*	–
TH85		104.11 ± 10.08	56.93 ± 11.20**

Activities of HDACi were assayed at 10 µM for 48 h by resazurin assay to macrophages and by methodology based on *L. braziliensis* - M2904-GFP to the infection assay as described in [33]. The data represent the Median and Standard Deviation of at least three independent assays with internal quadruplicates for each of them. Amph B: amphotericin B. MØ: macrophages. * Compounds that were toxic to macrophages. ** Compounds that were toxic to *L. braziliensis*.

Table 2EC₅₀ and CC₅₀ for the selected HDACi to *L. braziliensis* promastigotes and intracellular amastigotes and for macrophages.

Compound	EC ₅₀ (μM) <i>L. braziliensis</i> promastigotes	CC ₅₀ (μM) MØ	EC ₅₀ (μM) <i>L. braziliensis</i> amastigotes (infection assay)	Selectivity index (SI)
TH60	> 80	94.092 ± 1.11	4.38 ± 0.26	21.7
TH71	> 80	> 120.00	10.21 ± 0.92	> 11.7
TH85	31.42 ± 1.03	54.59 ± 0.39	7.21 ± 0.35	7.6
TH57	27.81 ± 0.06	36.25 ± 1.06	4.92 ± 0.54	7.4
TH74	38.20 ± 0.24	45.95 ± 1.06	7.69 ± 0.69	6.0
TH76	28.07 ± 0.26	92.30 ± 0.95	14.14 ± 0.08	6.5
TH58	32.04 ± 0.80	> 80	26.50 ± 0.82	> 3.0

Activities of HDACi were assayed at 10 μM for 48 h by resazurin assay to promastigotes and macrophages and by methodology based on *L. braziliensis* - M2904-GFP to the infection assay as described in [33]. GraphPad Prism version 5.03 was used for HDACi CC₅₀ and EC₅₀ performing a nonlinear fitting and data represent the Median and Standard Deviation of at least three independent assays with internal quadruplicates for each of them. MØ: macrophages. Compounds are organized in ascending order of highest SI. SI = CC₅₀ (MØ) / EC₅₀ (*L. braziliensis* amastigotes).

of them are nanomolar HDAC8 inhibitors. Target engagement was carried out by cellular testing, biophysical characterization and X-ray structure determination. Some of the most potent compounds from the present work have been cocrystallized with *S. mansoni* HDAC8 (PDB ID 6H7H, 6HTL, 6HU2, [32]) and clearly showed the mode of action. Since the sequence similarity between *Leishmania* HDAC and HDAC8 is very high in the catalytic pocket it is highly likely that the compounds are also inhibitors of *Leishmania* HDAC, as shown by Melesina and colleagues [24]. Since the chemistry and enzymatic testing on HDAC isoforms have already been published, a detailed characterization was not included in the present manuscript.

2.4. Cytotoxicity to mammalian cells

Macrophages were cultured as mentioned above and the protocol used to assess the toxicity of compounds by the resazurin assay is described by [33]. The screening test was done at 10 μM for each HDACi. The choice of this concentration was based on the guidelines in hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases [36]. For the cytotoxic concentration (CC₅₀) assay, the HDACi were tested at concentrations of 80 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM and 1 μM, according to the percentage of live cells after screening at 10 μM. Positive and negative controls were amphotericin B (3.125 μg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA) and DMSO (0.1%) (Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda, SP, Brazil), respectively. The concentration of 0.1% of DMSO in the control samples is the same final amount of DMSO used in the assays with HDACi. All compounds and controls were tested in internal quadruplicates and at least 3 independent experiments were performed. GraphPad Prism version 5.03 was used for the determination of the CC₅₀.

2.5. Macrophage infection assay

The macrophage infection assays were performed using previously described methodology based on *L. braziliensis* - M2904-GFP [33]. All HDACi were tested at 10 μM, based on the guidelines in hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases [36] and the best compounds were used for determination of the effective concentration (EC₅₀). The EC₅₀ was determined using the concentrations: 80 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM and 1 μM, according to the percentage of live cells after screening at 10 μM. Positive and negative controls were amphotericin B (3.125 μg/mL and 0.1% DMSO (concentration used in the assays), respectively. All HDACi and controls were tested in internal quadruplicates and at least 3 independent experiments were performed. GraphPad Prism version 5.03 was used for HDACi EC₅₀ determination.

2.6. Selectivity index

The selectivity indexes (SI) were calculated as the ratio obtained on

Raw macrophages / *L. braziliensis* values (CC₅₀/ EC₅₀).

2.7. Ultrastructure analysis

Transmission electron microscopy (TEM) samples were prepared as described previously [37]. Briefly, cells were fixed in 1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 4 °C and post-fixed in 1% OsO₄, 0.8% K₃[Fe(CN)₆] and 5 mM CaCl₂ in the same buffer. Dehydration was performed in graded acetone imbedding, in PolyBed, which was polymerized at 60 °C for 48 h. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, MO, USA. Ultrathin sections were stained with 7% uranyl acetate (Polysciences, PA, USA) and 4% lead citrate (Sigma-Aldrich, PA, USA) aqueous solutions and examined at an analytical transmission electron microscope JEOL-JEM-1011.

2.8. Determination of EC₅₀ in promastigotes

Promastigotes were cultured as previously mentioned and the effect of HDACi was evaluated according to the methodology described by [33], using the Resazurin method. The screening test was done at 10 μM for each HDACi, following the same criteria described in 2.4 and 2.5. Then, the best active compounds were used to determinate the EC₅₀. For the EC₅₀ assay, the HDACi were tested at concentrations of 80 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM and 1 μM, according to the percentage of live cells after screening at 10 μM. Positive and negative controls were amphotericin B (3.125 μg/mL) and 0.1% DMSO, respectively. All HDACi and controls were tested in internal quadruplicates and at least 3 independent experiments were performed. GraphPad Prism version 5.03 was used for HDACi EC₅₀ determination.

2.9. Flow cytometry (FC) analysis

L. braziliensis M2904 and M2904-GFP and Raw 264.7 macrophages samples were cultured as previously described. Parasite cultures were treated for 48 h with EC₅₀, 2x EC₅₀ and 3x EC₅₀, since the sensitivities of the in vitro resazurin and FC are different. The EC₅₀ used was that determined in the in vitro tests by the resazurin method. Macrophages were treated with the EC₅₀ determined for intracellular amastigotes of *L. braziliensis* in the infection assays, since at that concentration the effects of the HDACi can be observed for host cell and parasite at the same time. Viability and cell cycle assays were done with *L. braziliensis* M2904-GFP, while *L. braziliensis* wild type was used in the apoptosis tests to avoid interference with the FITC conjugated to annexin-V. After treatment, for the assays of: **1) viability**: the promastigotes and macrophages samples were washed twice in Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.2, and centrifuged at 1,200 g at 4 °C, for 10 min and 500 g, 25 °C, for 10 min, respectively, being suspended in their respective culture media. At the time of acquisition of the data, propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, MO, USA) at a concentration of 50 μg/mL was added to all samples. **2) apoptosis**:

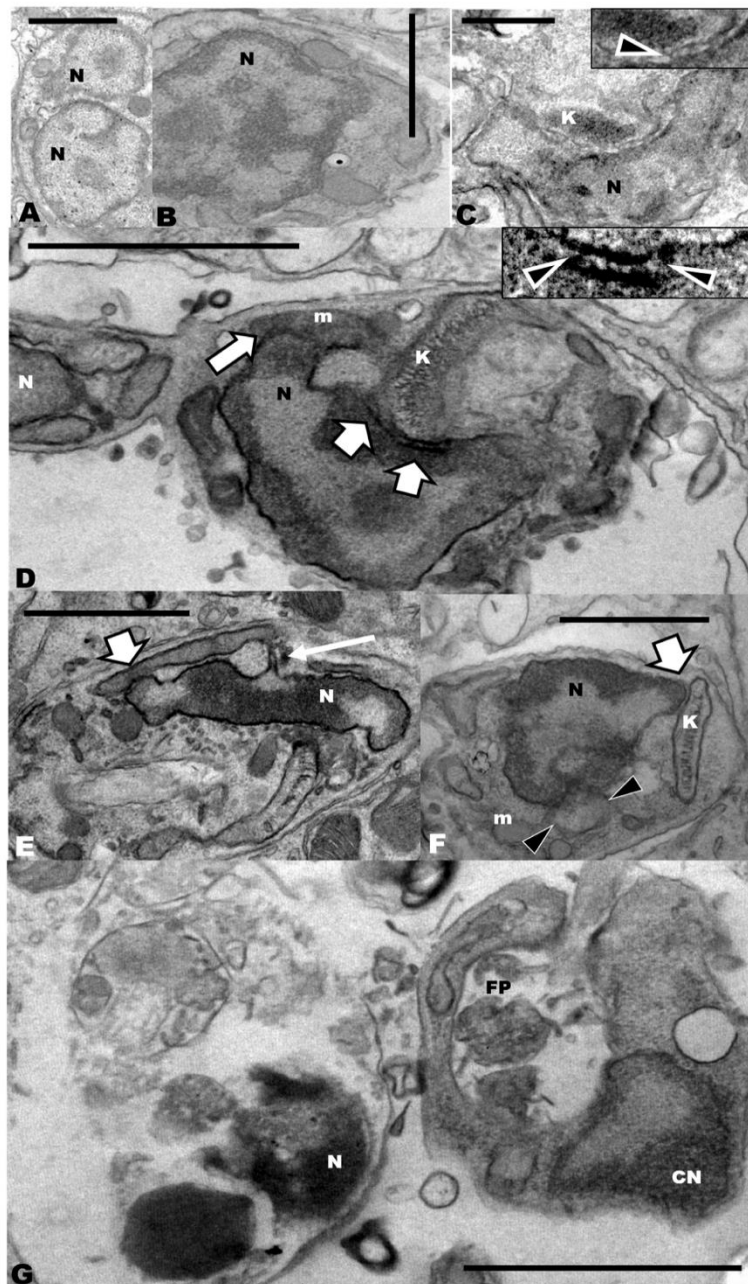


Fig. 1. Transmission electron microscopy of *L. braziliensis*-infected macrophages treated with HDACi TH60 shows altered chromatin condensation pattern and cellular disorganization of intracellular amastigotes. Contrary to control cells (A), TH60-treated parasites displayed nuclei with abundant dense chromatin, presenting a gross floccular appearance (B), close apposition (C) between kinetoplast (K) and bent nucleus (N). Interestingly electrondense material was observed between the kinetoplast and nuclear envelopes (insets in C and D - arrowheads). TH60-treated cells presented tight connections (arrows), involving nucleus (N) and kinetoplast (k) and mitochondrion (m). The parasite shown is apparently in division (D), presenting a forming daughter cell with a second nucleus (white N). TH60-treated parasite (E) showing remarkably elongated nucleus (N) connected to the mitochondrion via a blunt (thick arrow) and a slender protrusion (thin arrow) of the nuclear envelope. Parasite presenting nuclear (N) connection to kinetoplast (K) (F, arrow) as well as to another portion of the mitochondrion that displayed reduced electrondensity (arrowheads). Intracellular *L. braziliensis* parasites in TH60-treated macrophage monolayers (G), with the one on the right presenting increased peripheral dense chromatin (DC) as well as membrane-bounded cytoplasmic material in the lumen of the flagellar pocket (FP). The parasite on the left is necrotic, with washed-out cytoplasm and pyknotic nucleus (N). Magnification bars – 1 μ m.

Detection of apoptosis was done using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, NJ, USA) and the manufacturer's recommendations were followed. **3) cell cycle:** *Leishmania* promastigotes and macrophages were washed and centrifuged as described above. Subsequently, the samples were fixed in 70% chilled ethanol and stored at -4°C for 24 h, subjected to the same centrifugation as mentioned above and suspended in PBS. The samples were treated with RNase A (0.2 mg/

mL; Invitrogen, MA, USA) and stained with PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for at least 20 min in the dark at room temperature. Data were obtained on the BD FACSVerserTM flow cytometer from Núcleo de Microscopia e Microanálise from Universidade Federal de Viçosa (Brazil) and analysed using FlowJoTM v10 software. 10,000 events were collected for each promastigote sample and at least 5,000 events for macrophages. All assays were done in biological duplicates.

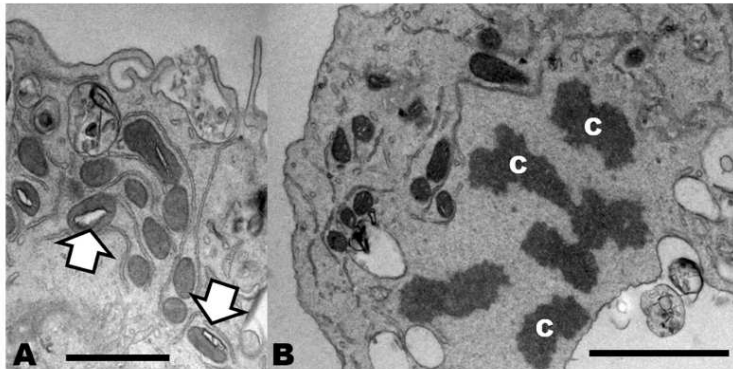


Fig. 2. Transmission electron microscopy of macrophages treated with HDACi TH60 shows few cells with mitochondrial damage and rarely karrhyorexis. TH60-treated Raw 264.7 macrophages rarely presented mitochondrial damage (A, arrows) as well as displaying chromatin masses (C) scattered in disassembling nuclei (B) Magnification bars in Figures A and B represent 1 and 2 μm , respectively.

2.10. Measurement of nitric oxide (NO) production

The macrophage infection assay was performed as described in 2.5. Cells were treated with HDACi TH57, TH60, TH71, TH74 and TH85 for 48 h at EC_{50} , 2 times EC_{50} and 3 times EC_{50} concentrations. LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, MO, USA) (100 ng / mL) diluted in non-supplemented RPMI medium was used as positive control. The culture supernatants were then collected and centrifuged at 500 g, 25° C for 2 min and the measurement of NO production was carried out using the Griess method [38]. The absorbance at 570 nm was measured in a microplate reader (Spectramax M5). The results were expressed as μM of nitrite based on a standard curve established by known concentrations of sodium nitrite dissolved in non-supplemented RPMI medium. Measurements were made in biological duplicates for each treatment.

2.11. Statistical analysis

The data were carried out using GraphPad Prism version 5.03. The CC_{50} and the EC_{50} were determined from non-linear concentration–response curves using a four-parameter logistic model (4PL, Hill-Slope model) [39] and expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments. Statistically significant differences were identified using one-way ANOVA followed by Tukey's test. When $p < 0.05$, results were considered statistically significant and are identified by *, ** and *** asterisks.

3. Results

3.1. Evaluation of the cytotoxicity of HDACi in macrophages and the leishmanicidal effect in the macrophage infection assays

The effect of 78 HDACi was initially evaluated on Raw 264.7 macrophages after 48 h of incubation at the concentration of 10 μM (data not shown). This assay constituted the first screening to determine which compounds were non-toxic to this host cell and that could be applied in the infection assay. We used amphotericin B as positive control, as it is a second-choice drug used in the leishmaniasis treatment [40] and well tolerated by macrophages. Considering the data from amphotericin B control, the maximum toxicity accepted in our assays was 20% of loss of macrophages viability. The HDACi which did not show high toxicity to macrophages were selected and used in the macrophage infection assay. The total of 31 compounds were originally designed on the basis of a benzhydroxamic acid core structure [32] and have been previously tested on several HDACs from different species, including other parasites [32,34,41]. All the tested inhibitors have been optimized for the HDAC8 isoform and in vitro data for human and

Schistosoma mansoni showed that most of them are nanomolar HDAC8 inhibitors. Table 1 shows the structures and toxicity results to macrophages for 13 of these compounds. It is possible to observe that five of these HDACi showed higher toxicity (highlighted by the *) considering the cut-off established according to amphotericin B. TH65 was the most toxic of the group as evidenced by the percentage of remaining viability of macrophages after the treatment ($53.55\% \pm 5.20$). For the other four compounds, the order of toxicity was TH66 ($68.81\% \pm 10.10$) > TH77 ($75.02\% \pm 9.65$) > TH33 ($77.85\% \pm 4.63$) > TH42 ($78.19\% \pm 9.11$) (Table 1). The non-toxic compounds from this subset were evaluated in the infection assays.

The HDACi, TH57, TH58, TH60, TH71, TH74, TH76, and TH85, showed the lowest toxicities to macrophages and the greatest effects against intracellular amastigotes (Table 1).

For these seven HDACi, the CC_{50} for macrophages and the EC_{50} for *L. braziliensis* in the infection assay were determined, allowing the calculation of the selectivity index (SI). The order of toxicity to intracellular *L. braziliensis* was: TH60 > TH57 > TH85 > TH74 > TH71 > TH76 > TH58 (Table 2). According to this, TH58 was the least effective against intracellular amastigotes (EC_{50} of $26.50 \mu\text{M} \pm 0.82$), whereas the HDACi TH60 ($\text{EC}_{50} = 4.38 \mu\text{M} \pm 0.26$) and TH57 ($\text{EC}_{50} = 4.92 \mu\text{M} \pm 0.54$) were the most effective during infection. Guidelines in hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases, including leishmaniasis, shows that an SI > 10 in a *Leishmania* infection trial validates a certain compound to be tested in vivo [36]. We calculated the SI to our data and the results can be seen in Table 2. The HDACi TH60 and TH71 showed the highest SI (21.7 and > 11.7, respectively), which could validate them for subsequent in vivo tests.

3.2. Evaluation of ultrastructural changes in host cell and in intracellular amastigotes of *L. braziliensis* induced by the treatment with the HDACi during in vitro infection

Here we employed TEM in order to approach the HDACi mode of action as this method may be useful in the elucidation of mechanisms of action of different antiparasitic agents [42–44]. The treatments were done using TH60, TH74, and TH85, among the most effective HDACi against the intracellular amastigotes (see EC_{50}). TH60 led to an altered chromatin condensation pattern and triggered the cellular disorganization of intracellular amastigotes (Fig. 1). Parasite nuclear division was evidenced in the intracellular control amastigotes, sometimes binucleate with normal chromatin condensation (Fig. 1A), whereas TH60-treated parasites displayed nuclei with abundant dense chromatin, presenting a gross floccular appearance (Fig. 1B, D–G). TH60 induced the formation of a tight connection between the mitochondrion and the often elongated or polymorphic nucleus (Fig. 1C–F), presenting tethering filamentous electrondense material between

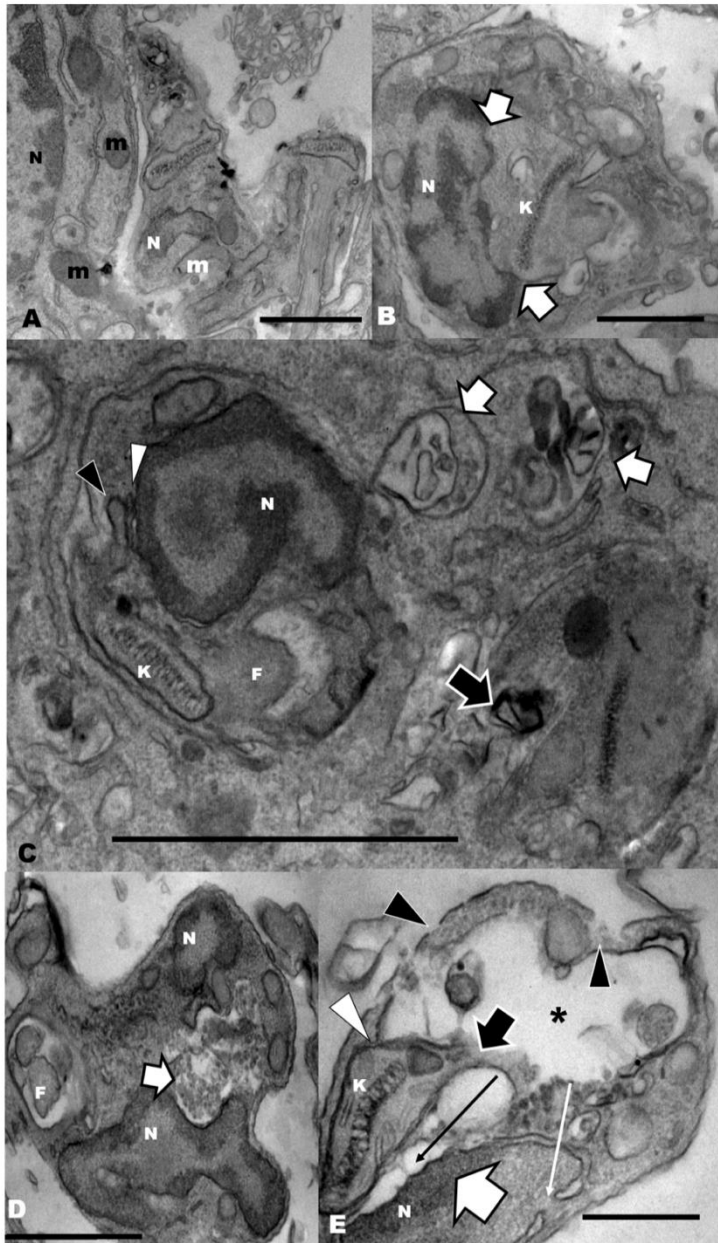


Fig. 3. Transmission electron microscopy of *L. braziliensis*-infected macrophages treated with HDACi TH74 shows parasites during the cell division process presenting tight connection between elongated nucleus and mitochondrion. TH74-treated infected macrophages showing parasite during cell division process (A), showing tight connection between elongated nucleus (white N) and mitochondrion (white m). Note that such a connection is not observed in the host cell (black M and N). Parasite displaying large nucleus (N)-kinetoplast (K) attachment area (B, arrows). TH74-treated macrophage showing two parasites (C). The one on the right presents membrane deposits in the flagellar pocket area (black arrow), whereas the one on the left displays a thick peripheral chromatin layer in the nucleus (N), as well as a tight connection between the mitochondrion (white arrowhead) and a nuclear protrusion (black arrowhead), possibly of endoplasmic reticulum origin. Note that the nucleus is partially interposed between the kinetoplast and the flagellar pocket (F). The host cell cytoplasm presented autophagosomes (white arrows). TH74 lead to the formation of multinucleate (N) parasites (D) as well as to the presence of cytoplasmic glycogen deposits (arrow). At an advanced stage of parasite cell death concentrated dense chromatin (thick white arrow), swollen nuclear envelope cisternae (thin black arrow) were observed as well as dilated nuclear pores (thin white arrow) as well as mitochondrial destruction in association (thick black arrow) with the separation of the mitochondrial membranes (white arrowhead) by the kinetoplast (K) region. In vicinity of this electronlucent area (*), indicating loss of cytoplasmic material, plasma membrane discontinuities were observed (black arrowheads). Magnification bars A, B and D represent 1 μ m; C, 2 μ m and E, 0.5 μ m.

these organelles (Fig. 1C, D). Connections formed both blunt and slender protrusions in the nuclear envelope (Fig. 1E). Interestingly, portions of the mitochondrion displayed reduced electron density/distension in the binding region (Fig. 1F). Furthermore, some necrotic amastigotes, with washed-out cytoplasm were observed with pyknotic nuclei (Fig. 1G).

TH60-treated cultures presented some Raw 264.7 macrophages with mitochondrial damage and rarely karrhyorexis (Fig. 2).

TH74-treated infected macrophages showed parasites undergoing cell division presenting a tight connection between the parasite elongated nucleus and mitochondrion, but such a connection was not observed in the host cell (Fig. 3A). A large and tight parasite nucleus-kinetoplast attachment area presumably indicates that the connection orchestrates the nuclear remodeling (Fig. 3B). Many TH74-treated amastigotes displayed a thick peripheral chromatin layer in the nucleus, as well as a tight connection between the mitochondrion and nuclear

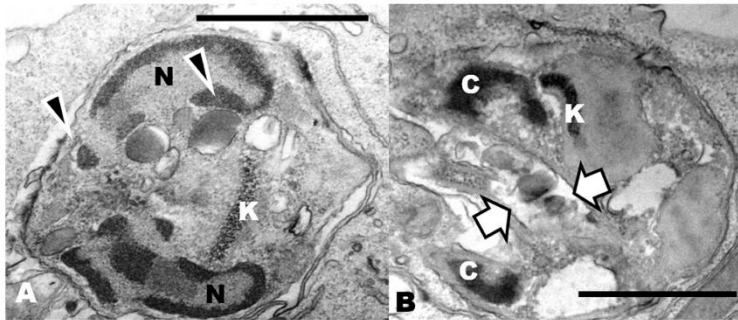


Fig. 4. Transmission electron microscopy of *L. braziliensis*-infected macrophages treated with HDACi TH74 indicates unusual nuclear division with signs of karrhyorexis. TH74 incubation of infected macrophages induced unusual nuclear division (A) and the nuclei (N) are poorly compartmentalized, as chromatin masses appear in direct contact with the cytoplasm, indicating karrhyorexis (arrowheads). In a dividing parasite (B), dense chromatin masses (C) were observed on each side of the cytokinesis cleavage furrow (arrows). Magnification bars – 1 µm.

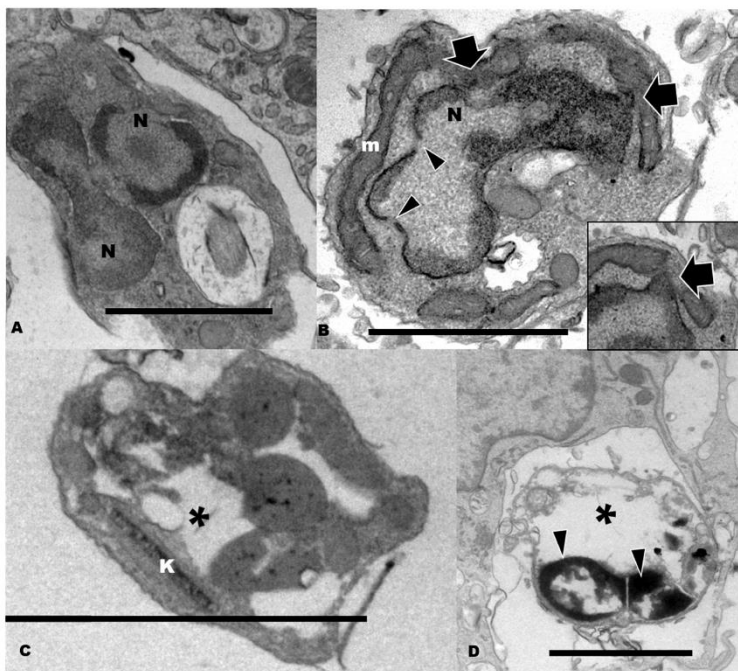


Fig. 5. Transmission electron microscopy of *L. braziliensis*-infected macrophages treated with HDACi TH85 shows multinucleate parasites, nucleus-mitochondrion binding, parasite disorganization, lysis and pyknotic chromatin. TH85-treated macrophages often harbored multinucleate (N) parasites (A) and interestingly one of the nuclei is apparently dividing. The antagonist also caused nucleus-mitochondrion binding (arrows), which in another section planes can be observed protruding into the nuclear envelope (inset arrow). TH85 caused disorganization (C) and lysis (D) of the intracellular parasites, that displayed loss of cytoplasmic material (*) and pyknotic chromatin (arrowheads). Magnification bars A and B – 1 µm; C and D, 2 µm.

protrusions, presumably of endoplasmic reticulum origin (Fig. 3C). Polymorphic/multiple nuclear profiles were also caused by TH74 (Fig. 3D). At an advanced stage of parasite cell death, concentrated dense chromatin, swollen nuclear envelope cisternae and dilated nuclear pores were observed (Fig. 3E). The amastigote displays mitochondrial destruction with a large electronlucent area, indicating loss of cytoplasmic material in the vicinity of plasma membrane discontinuities.

Some TH74-treated macrophages harbored parasites with signs of karrhyorexis, with chromatin masses in direct contact with the cytoplasm (Fig. 4A, B) and such dense chromatin fragments were detected on the side of the cell division cleft (Fig. 4B).

TH85-treated cultures regularly showed multinucleate parasites (Fig. 5A) and interestingly one of the nuclei is apparently dividing. The HDACi triggered nucleus-mitochondrion binding, eventually protruding the nuclear envelope (Fig. 5B). TH85 caused disorganization (Fig. 5C) and lysis (Fig. 5D) of the intracellular parasites, that displayed loss of cytoplasmic material and pyknotic chromatin.

3.3. Evaluation of direct action of HDACi on *L. braziliensis* promastigotes and macrophages by flow cytometry analyses

In order to investigate the mechanisms of action of the selected HDACi, we evaluated viability, apoptosis and the cell cycle by flow cytometry (FC). Evaluation of the direct action of compounds in intracellular amastigotes of *Leishmania* is not simple because the parasites are inside the host cell. This means that the data collected during the infection can result from the direct action of the compound in the macrophages, that become better killers of *Leishmania*, or the effects can be directly on the parasite itself. Therefore, one way to see if the HDACi could have direct action on the parasite is to evaluate the effects of compounds on extracellular promastigotes that can be easily cultivated. Combining data showing the direct effect of the HDACi in the promastigotes and in uninfected macrophages as one way to evaluate the direct action of compounds in each cell. It is important to highlight that we observed significant differences between the EC₅₀ to intracellular amastigotes in comparison with the extracellular promastigotes (Table 2), but these differences are not unusual findings because they

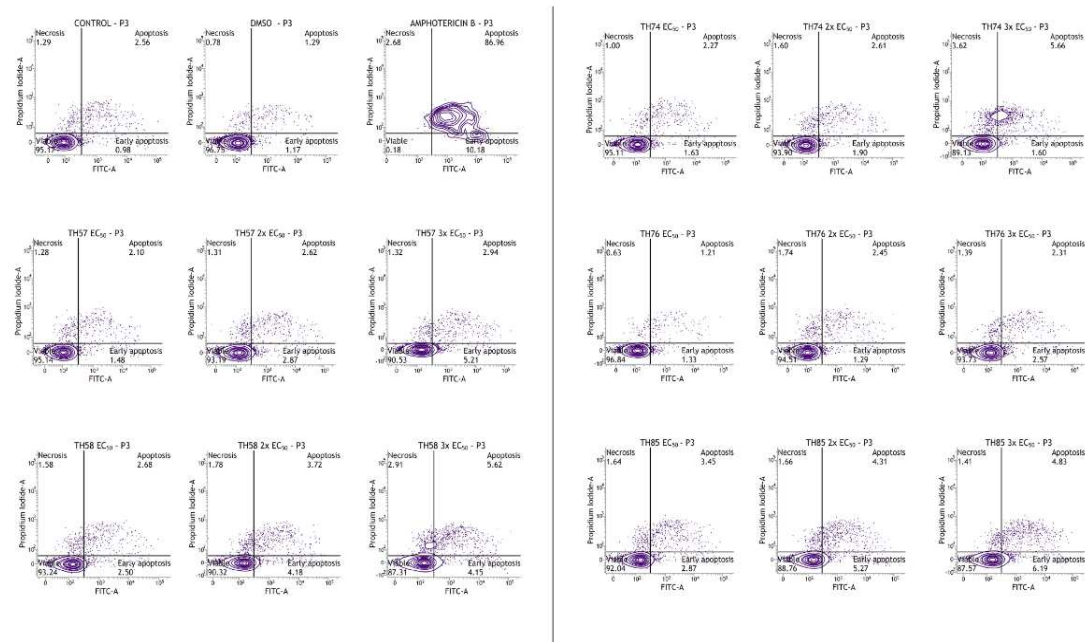


Fig. 6. Contour plots of cell viability, apoptosis and necrosis in promastigotes after treatment with HDACi. Promastigotes of *L. braziliensis* were incubated with the HDACi for 48 h at EC₅₀, 2 times EC₅₀ and 3 times EC₅₀ concentrations and then washed in PBS and suspended in Grace medium. The apoptosis and necrosis were measured using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. PI was added at the time of data acquisition in flow cytometer. A total of 10,000 events were collected for each sample and the contour plots data are representative of biological duplicates. Control is the untreated promastigotes, DMSO is the diluent control and amphotericin B was used as a known leishmanicidal control.

are quite distinct forms of the parasite adapted to extremely different environments/conditions. In fact, analyses of the transcriptome of *L. donovani* by Saxena and collaborators, showed variations in the expression of various genes during differentiation of promastigotes into amastigotes [45], which may have an impact on the different drug sensitivity of both parasite forms in any *Leishmania* species. Studies of Obonaga et al. corroborate this fact by showing that *L. braziliensis* promastigotes were less sensitive to miltefosine than amastigotes, and miltefosine is currently used to treat leishmaniasis [46].

3.3.1. Evaluation of viability in *L. braziliensis* promastigotes and macrophages

In order to use the compounds in the FC assays we evaluated the EC₅₀ of those previously selected by the in vitro infection assay (THs 57, 58, 60, 71, 74, 76, 85) and chose those that had the best EC₅₀ to promastigotes determined by the resazurin method. As we can see in Table 2, TH60 and TH71 showed high EC₅₀ values (> 80 μM), which preclude their use in the promastigote assays. On the other hand, the other compounds had measurable EC₅₀ (Table 2) and were applied to the following assays. The same treatments described above for the in vitro infection were done. Thus, after the treatments, the cell viabilities of promastigotes were approximately 90% for all compounds. Then, we used 2 times EC₅₀ and 3 times EC₅₀ and the viability remained high in the 3 concentrations tested, as shown in Fig. 6. For amphotericin B, using the EC₉₀, the cell viability did not reach 1% (0.18% cells), which confirms its effect against *Leishmania*. Almost 100% of the parasites died in relation to the untreated control (97, 14% cells).

In relation to macrophages, viable cells were > 80% in the 3 concentrations tested after 48 h when compared to the untreated control and DMSO, as shown in Fig. 7, which means that these compounds seem to be well tolerated by this host cell.

3.3.2. Evaluation of apoptosis and necrosis induced by HDACi in promastigotes and macrophages

The translocation of phosphatidylserine (PS) from the cytoplasmic leaflet to the outer side of the cell membrane is a characteristic attribute of apoptotic cells. Annexin V is a Ca²⁺-dependent phospholipid binding protein widely used to label externalization of PS. Based on this, the labelling of PS is indicative of both early apoptosis and apoptosis. On the other hand, labelling with propidium iodide (PI) is an indicative of cell death, caused both by apoptosis and necrosis [47,48]. To evaluate the mechanism of death of the parasite and the toxicity to macrophages induced by HDACi, we evaluated PS and PI labelling after the treatment of *L. braziliensis* promastigotes (Figs. 6 and 8) and macrophages (Fig. 7) with the previously selected HDACi. Thus, after treatment, the number of apoptotic cells (annexin V⁺ and PI⁻/annexin V⁺ and PI⁺) was higher and statistically significant in relation to the untreated control and DMSO-treated parasites when the promastigotes were exposed to the 3 concentrations tested of the HDACi TH58 and TH85. This number was significant in relation to DMSO when parasites were treated with the 3 concentrations of the HDACi TH57 (Fig. 8). TH85 was the compound that led to the highest level of cell death by apoptosis compared to the other HDACi, while TH76 was the least effective (Figs. 6 and 8). In Fig. 6 it is possible to see the representative contour plots of the TH85 effect when compared to the untreated control and DMSO. Fig. 6 also shows the effect of amphotericin B, the positive control. The number of apoptotic cells after treatment with amphotericin B is almost 100% (97.14%). The same assay was done using macrophages as shown in Fig. 7. It is noticeable that none of the HDACi induces apoptosis or necrosis in macrophages when compared to the untreated control and DMSO. This is a good sign of safety of the compounds for this host cell. The number of necrotic cells (annexin V⁻ and PI⁺) relative to the untreated control and DMSO was not statistically significant after

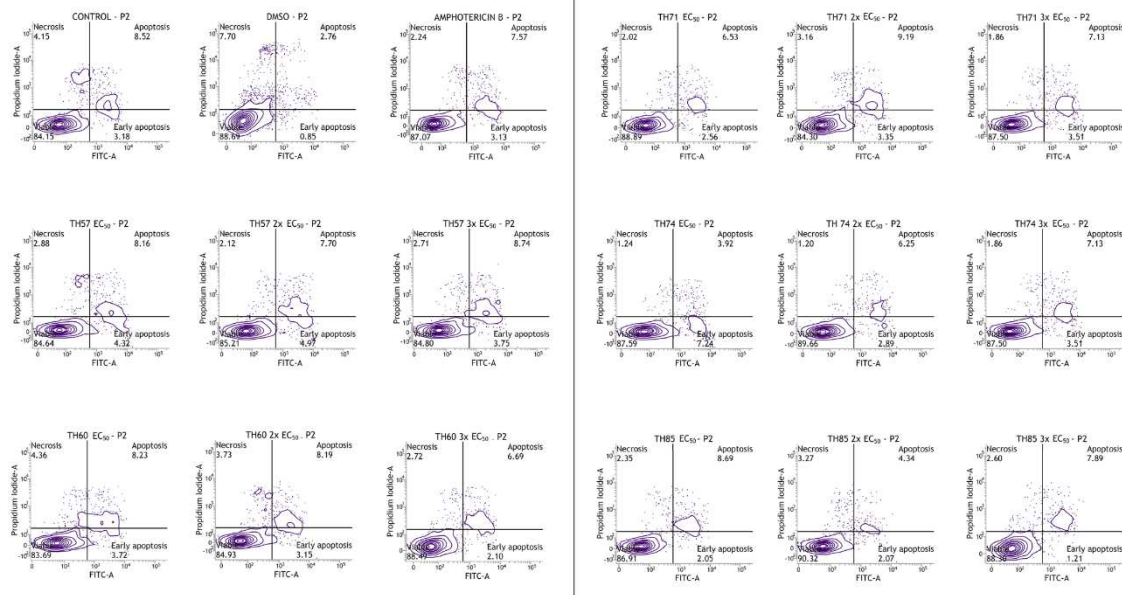


Fig. 7. Contour plots of cell viability, apoptosis and necrosis in macrophages after treatment with HDACi. Cells were incubated with the HDACi for 48 h at EC_{50} , 2 times EC_{50} and 3 times EC_{50} concentrations and then washed in PBS and resuspended in RPMI medium. The apoptosis and necrosis were measured using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. The PI was added at the time of data acquisition in the flow cytometer. At least 5,000 events were collected for each sample and the contour plots data are representative of biological duplicates. Control is untreated macrophages, DMSO is the diluent control and amphotericin B was used as a known leishmanicidal control.

treatment at any of the concentrations tested for all HDACi neither to promastigotes nor macrophages. Thus, we can infer that the type of cell death induced by HDACi on the parasites is primarily apoptosis, in agreement with the TEM data.

3.3.3. Evaluation of the effect of HDACi on the cell cycles of promastigotes and macrophages

Measurement of cellular DNA content using fluorescent dyes is a widely used method in cell cycle analysis and may also be useful in determining the frequency of apoptotic cells, in which DNA is fragmented [49,50]. In our tests, we used the DNA-binding dye PI to assess the effects of HDACi on the major phases of the cell cycle, G0-G1, S and G2-M of *L. braziliensis* promastigotes and macrophages (Fig. 9A and B). There was a cell cycle arrest in G2-M phase of promastigotes after treatment with the HDACi TH57 at the EC_{50} concentration when compared to the untreated control and DMSO (Fig. 9A). The same effect was observed on parasites treated with the HDACi TH74, TH76 and TH85 at 3 times EC_{50} when compared to the untreated control (Fig. 9A). In relation to macrophages, as shown in Fig. 9B, fewer cells are in the G2-M phase after treatment with the HDACi TH57 and TH60 at the EC_{50} concentration when compared to the untreated control, suggesting that there was a cell cycle arrest at this phase. However, this effect is compensated by a greater number of cells in the G0-G1 phase when compared to the untreated control.

None of the other treatments (2 times and 3 times the EC_{50}) with the HDACi significantly influenced the cell cycle of these cells (no statistically significant differences between treatments and the untreated control and DMSO) (Fig. 9C). Nevertheless, taken together, these results with those previously described indicate that the HDACi do not significantly affect macrophages, which reinforces the idea that they are safe for this host cell.

3.4. Measurement of nitric oxide (NO) production

The occurrence of an oxidative explosion, in which there is production of reactive oxygen species and nitric oxide, for example, characterizes the defence of macrophages against *Leishmania* [5]. In this trial, we aimed to evaluate whether the treatment with HDACi TH60, TH71, TH85, TH57 and TH74 positively modulate macrophages in order to make them more effective in eliminating *L. braziliensis* or if the effect of these inhibitors can be attributed to a direct action on the parasite. Cells were treated with the compounds at concentrations of EC_{50} , 2 times EC_{50} and 3 times EC_{50} and the production of NO was estimated using the Griess method. We used LPS to induce the production of NO as positive control. As can be seen in Fig. 10, the NO_2 concentration did not change in any of the treatments with HDACi when compared to the untreated control, DMSO or to non-infected macrophages. In addition, all of these samples showed lower levels of NO than the positive control (LPS). This allows us to infer that HDACi do not interfere with the production of NO by macrophages in vitro and supports the hypothesis that their leishmanicidal effect is more related with the direct effect on the parasite.

4. Discussion

HDACi have been employed in “drug repurposing” strategies or as starting points for the design of selective inhibitors against neglected parasitic diseases, including leishmaniasis [24,27,29,30,51,52]. The mechanism of action of HDACs occurs not only through the inhibition of the enzymes (HDACs) that participate in the control of gene expression, but they can also act on other proteins that are deacetylated by HDACs and have roles in key cellular processes, such as the cell cycle and apoptosis [22]. Thus, HDACi are capable of promoting various

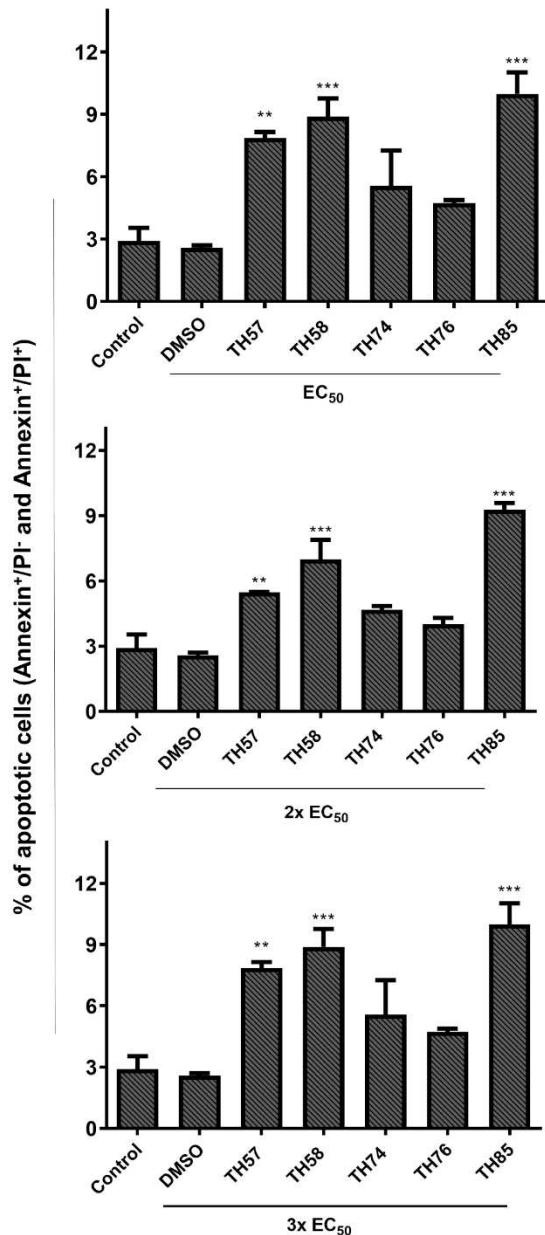


Fig. 8. Evaluation of apoptosis by measure of PS exposure and PI labeling in promastigotes using flow cytometry shows that TH57, TH58 and TH85 were the most effective HDACi. Cells were incubated for 48 h with the selected HDACi at EC₅₀, 2 times EC₅₀ and 3 times EC₅₀ concentrations. A total of 10,000 events were collected for each sample. The data are representative of the mean and the standard deviation of biological duplicates. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.03. The asterisks mean statistical difference with $p < 0.05$: ** means difference between the treatment and the DMSO and *** means difference between the treatment and both controls (untreated control and DMSO).

deleterious effects on cells [28].

The HDACi TH60 presented the greatest leishmanicidal effect against intracellular amastigotes and the least toxicity for macrophages, but along with TH71, both were completely inactive against promastigotes in all the concentration ranges, and for this reason, they were not used in flow cytometry analyses. However, our results agree with other studies that show that promastigotes have different susceptibility to drugs in relation to amastigotes, such as the findings of Azeredo-Coutinho and colleagues who showed that *L. braziliensis* promastigotes are approximately 100 times more resistant to Glucantime® than intracellular amastigotes [53].

In the viability tests on promastigotes by flow cytometry, it was observed that most of parasites were viable after treatments. These results differ from what we expected based on the EC₅₀, but the differences could be explained by the distinct mode of action of the techniques. The colorimetric method Alamar Blue® (syn. resazurin), long widely used due to its low cost and good sensitivity in viability tests [54], is based on the activity of mitochondrial enzymes which reduce resazurin (blue) to resorufin (pink and fluorescent) [55]. Propidium iodide (PI) is a fluorogenic DNA intercalating agent that is permeant only in dead cells, where there are alterations in the permeability of the plasma membrane. Apoptotic cells are not labelled with PI unless the integrity of the membrane has changed at late stages [56]. Therefore, it could be possible that the HDACi tested on promastigotes have decreased mitochondrial function without immediately leading to death. Indeed, a decrease in absorbance in the tests that employ resazurin, caused by some chemical agents, may indicate possible mitochondrial damage [57], also reported in [58,59]. In relation to macrophages, their viability was similar in both assays, reinforcing the low toxicity of HDACi to these cells.

The mechanism of cell death caused in promastigotes by HDACi tested in this study seems to be primarily apoptosis, as shown by HDACi TH57, TH58 and TH85. However, the number of promastigotes that died after exposure to treatment with these HDACi was minimal as compared to amphotericin B, our positive control. This fact can be explained since it was recently reported that HDACi, such as SAHA, increase autophagy in eukaryotic cells. Self-regulation in some cases may inhibit apoptosis [60–62]. This effect may be mediated by damaged mitochondria [71].

Rather than acting solely on energetic metabolism, mitochondria play important roles in different phenomena, including cell signaling [63], death mechanism, immune responses [64] and pathogenesis [65,66]. During these processes, mitochondria may bind ER membranes and this organelle coupling is founded in yeasts as ER-mitochondria encounter structure (ERMES) [67] and in mammals as mitochondria-associated membranes (MAMs), as well as mitochondria-ER contacts (MERCs), composed of such molecules as PERK (Protein Kinase RNA-Like ER Kinase), EMC (ER membrane protein complex) and MFN (mitofusin)1/2 [68,69], but remains to be elucidated in parasitic protozoa such as *Leishmania*. The mitochondria-ER connection may take part in post-translational histone modification as this former organelle can transfer the ganglioside GD3 to the nucleus [70], leading to phosphorylation of histone H1 and apoptosis [71].

Interestingly, the ER-mitochondria connections observed in HDACi-treated *L. braziliensis* (e.g. Fig. 1F), were both focal and extensive and the former eventually formed membrane protrusions, indicating a stable, presumably protein-mediated, tight association, possibly accounting for the filamentous material observed between the apposed membranes, which appear to comprise the “tethering structures” described between the ER and the outer mitochondrial membranes in rat liver [83]. To our knowledge this is the first demonstration of this structure in *Leishmania*. Panobinostat, a pan-deacetylase inhibitor, able to act as an HDACi, may trigger ER stress [96], which is involved in

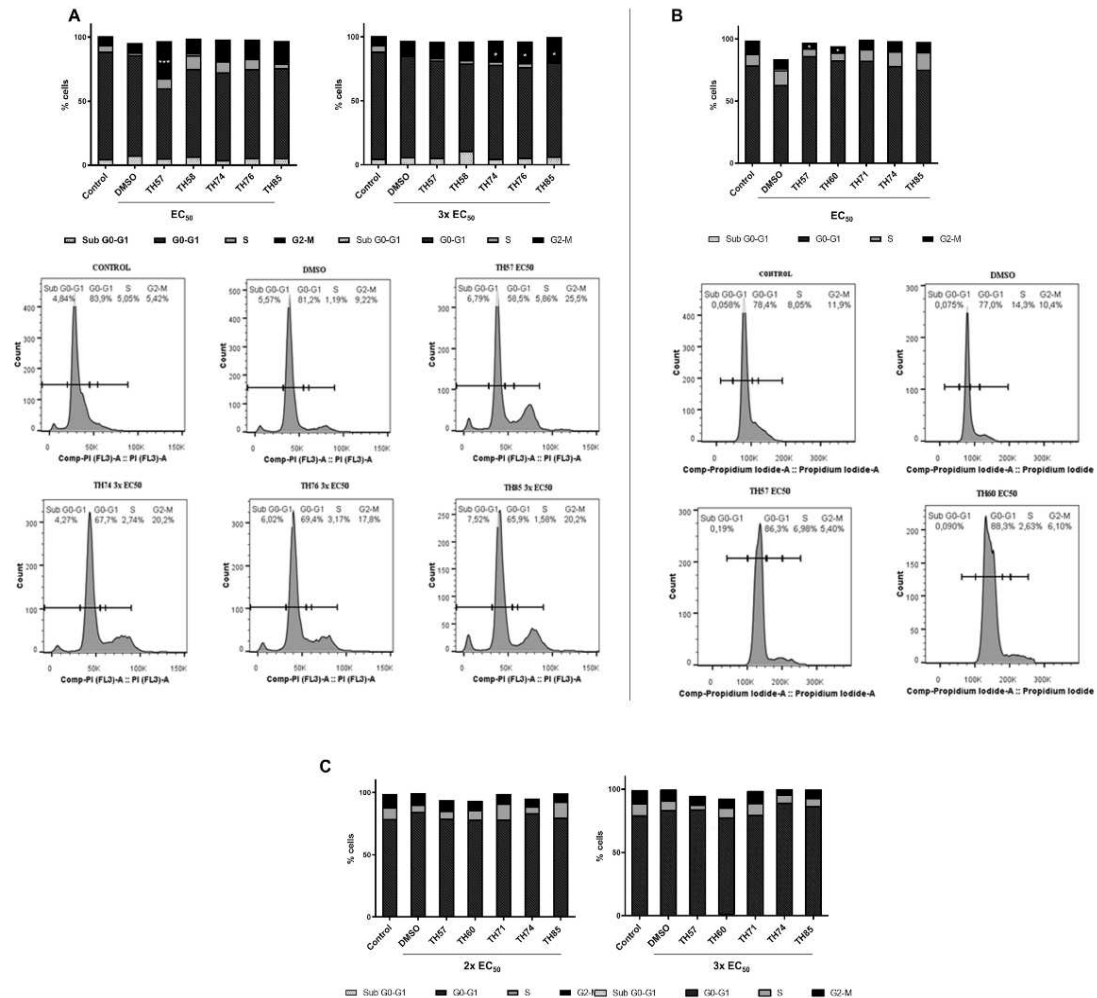


Fig. 9. Evaluation of the effect of HDACi in the cell cycle and DNA content in *L. braziliensis* promastigotes and macrophages shows a cell cycle arrest in G2-M phase of promastigotes and no change in macrophages after treatment with the EC₅₀. Cells were incubated for 48 h with the selected HDACi at EC₅₀, 2 times EC₅₀ and 3 times EC₅₀ concentrations. Cells were fixed in 70% ice-cold ethanol for 24 h and then stained with PI. (A) promastigotes cell cycle data. Upper – A total of 10,000 events were collected for each promastigotes sample. The data are representative of the mean and the standard deviation of biological duplicates. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.03. The asterisks indicate statistical difference with $p < 0.05$: * means difference between the treatment and the untreated control and *** means difference between the treatment and both controls (untreated control and DMSO). Below: representative histograms of the untreated control, DMSO and treatments with statistical differences showed in the upper panel (TH57 at EC₅₀ and TH74, TH76 and TH85 at 3 times EC₅₀). (B) macrophages cell cycle. Upper – At least 5,000 events were collected for each macrophage sample. The data are representative of the mean and the standard deviation of biological duplicates. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.03. The asterisks mean statistical difference with $p < 0.05$: * means difference between the treatment and the untreated control. Below: representative histograms of control, DMSO and treatments with TH57 and TH68 at EC₅₀ concentration. (C) shows that no phase of the cell cycle of these cells was affected after treatment with 2 times EC₅₀ and 3 times EC₅₀ concentrations. At least 5,000 events were collected for each macrophage sample. The data are representative of the mean and the standard deviation of biological duplicates. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.03.

autophagy [97], enhances mitochondrial activity and mitochondrion-associated ER membrane [98,99].

The presence of glycogen particle deposits in association with HDACi-treated *L. braziliensis* nuclei may be explained at least in part by the presence of enzymes such as glycogen synthase kinase 3 β in ER-mitochondria junctions [86].

It is noteworthy that here the ER-mitochondria connections were not observed on the host cells, possibly indicating a selective mode of action. In this regard, the macrophage infection by *L. donovani* leads to

the phagocyte mitochondrion depolarization, reduction of mitochondrial dynamics as well as association to ER, at least in part due to the reduced expression of the protein Mitofusin 2, involved in ER-mitochondria binding [87].

Fig. 11 shows a proposed model of action and cell death of *L. braziliensis* induced by our HDACi. In this model, the HDACi-induced ER stress and nucleus-mitochondria binding via tethering filaments that impairs mitophagy and so the oxidative stress triggers cell death by both necrosis and apoptosis.

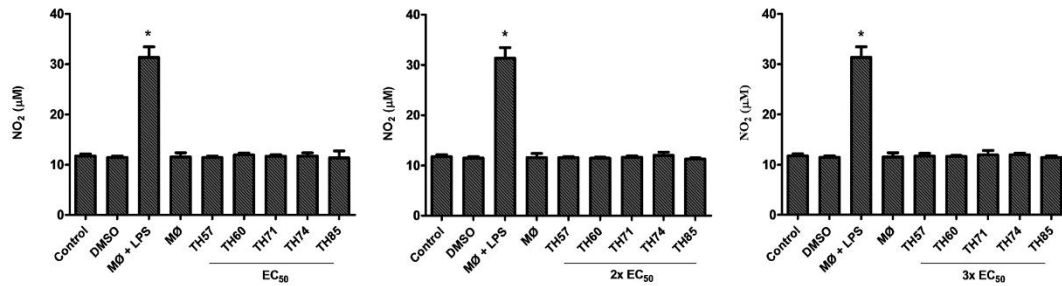


Fig. 10. The treatment with HDACi did not affect the NO production by infected macrophages. Macrophages were infected with *L. braziliensis* promastigotes and treated with HDACis at EC_{50} , 2 times EC_{50} and 3 times EC_{50} concentrations for 48 h. LPS (100 ng/mL) was used as positive control. Measurement of NO production was made in culture supernatant using Griess method. The data are representative of two independent experiments with biological duplicates and the bars above each column indicate the standard deviation of the duplicate. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.03. The asterisks mean statistical difference with $p < 0.05$: * means difference between the treatment and the untreated control.

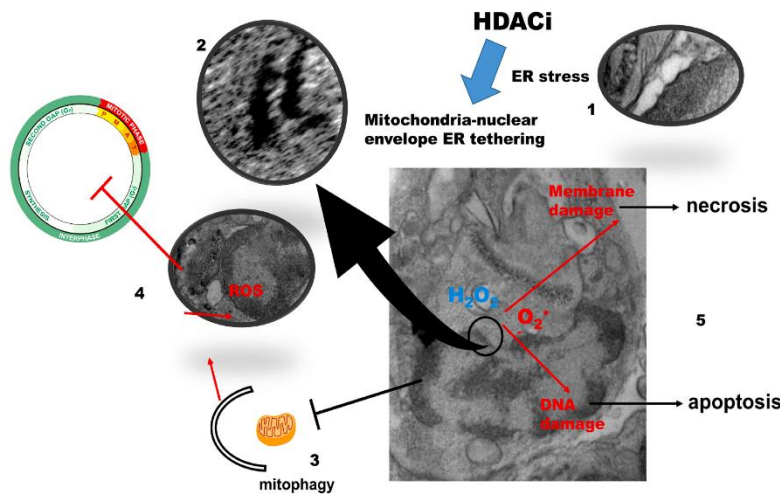


Fig. 11. Proposed model of cell death of *L. braziliensis* induced by HDACi from TH compounds. HDACi-induced ER stress (1) and nucleus-mitochondria binding via tethering filaments, (2) impairs mitophagy (3) and so the oxidative stress may cause DNA damage and cell cycle arrest (4), triggering cell death (5) by both necrosis and apoptosis. In addition, cell cycle arrest could also produce oxidative stress (4).

In parasites, the importance of autophagy for the metacyclogenesis of trypanosomes and *Leishmania* sp. has already been demonstrated [101,102]. We can thus hypothesize that treatment with HDACi may lead to an increase in autophagy in *L. braziliensis* promastigotes, which consequently inhibited the death of these cells by apoptosis. Indeed, evidence of microautophagy was detected by TEM in TH85- treated cultures. Concerning macrophages, the treatment with HDACi did not promote a significant macrophage cell death by apoptosis or necrosis and there was no alteration in chromatin organization.

Exposure to the HDACi TH74, TH76 and TH85 at 3 times EC_{50} and to TH57 at EC_{50} , promoted a cell cycle arrest in G2-M phase of promastigotes. These results demonstrate one of the effects caused by HDACi, which is interference with normal progression of the cell cycle [28] and are consistent with the fact that higher concentrations of HDACi tend to block the cell cycle in the G2-M phase, maybe due its effect in downregulation of cyclins or other proteins involved in cell cycle progression [103]. In fact, HDACi can affect leishmanial division via both chromatin organization and microtubule function, culminating in impaired karyokinesis homeostasis, as TEM revealed a dividing nucleus in a binucleate parasite with one flagellum in the flagellar pocket (a second pocket in other section planes cannot be ruled out), which might be implicated in cell cycle arrest. Besides, the Trypanosomatid kinetoplast segregation usually follows a specific order, but in *Leishmania* spp. it may take place both before and after that of the nucleus

[104]. The homeostasis of this division process may presumably be impaired by the mitochondrial attachment to nuclei in HDACi-treated parasites, particularly in view of the different shapes and volumes of the organelles, which can also explain the cell cycle in HDACi-treated parasites, arrested in the G2 phase, when nuclear and kinetoplast segregations take place [106]. In addition, mitochondria communicate with the nucleus via retrograde signalling pathways, that may be implicated in mitochondrial quality control [107], which includes DNA damage by ROS produced mitochondria [108], particularly under conditions of impaired mitophagy [109]. In this regard, it is reasonable to suppose that the cell cycle arrest could produce the oxidative stress [110], as suggested in Fig. 11. Furthermore, HDACi may also interfere with the G2-M phase checkpoint, which corroborates our findings [28]. In relation to macrophages, none of the treatments significantly altered the cell cycle or viability.

Macrophages are key elements in the elimination of intracellular parasites and the nitric oxide (NO) produced by activated cells is one of the most potent agents of these cells against *Leishmania* [5,111]. However, in our work, the NO concentration not changed after treatment with HDACi on infected macrophages, suggesting other mechanisms responsible for the elimination of the parasite, such as a possible direct leishmanicidal effect of these inhibitors. Our results are in agreement with the studies of Han and Lee in Raw 264.7 macrophages treated with HDACi such as SAHA, that showed that treatment did not

affect NO production in these cells [112].

Thus, several HDACi tested in this work showed significant leishmanicidal effects in vitro and were able to impair cell division and to induce apoptosis of *L. braziliensis*. At the same time, these HDACi were not toxic to macrophages, nor did they alter their viability and nitric oxide production. These results are encouraging and make these HDACi possible candidates as new drugs for the treatment of American Tegumentary Leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. Further studies are needed for this purpose.

Authors contributions

Luciana Ângelo de Souza – worked in the planning of the assays, helped in the standardization and did the in vitro assays, cytometry assays, measurement of nitric oxide production and participated in the manuscript preparation. Matheus Silva e Bastos – worked in the planning of the assays, did the standardization and done part of the HDACi in vitro assays and participated in the manuscript preparation. Joice de Melo Agripino – helped in measurement of nitric oxide production and participated in the manuscript preparation. Thiago Souza Onofre – did part of the screening of HDACi in in vitro assays. Lourdes Fanny Apaza Calla – did part of the HDACi in vitro assays. Tino Heimbürg – synthesized part of the HDACi. Ehab Ghazy – synthesized part of the HDACi. Theresa Bayer – synthesized part of the HDACi. Victor Hugo Ferraz da Silva – helped in the Flow cytometry assays. Paula Dutra Ribeiro – helped in measurement of nitric oxide production. Leandro Licursi de Oliveira – helped in the Flow cytometry assays, measurement of nitric oxide production and data analyses. Gustavo Costa Bressan – co-supervision of the research and participated in the manuscript preparation. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo – helped in the supervision of the research and participated in the manuscript preparation. Abelardo Silva-Júnior – helped in the supervision of the research and participated in the manuscript preparation. Raphael de Souza Vasconcellos – helped in the supervision of the research and participated in the manuscript preparation. Ana Márcia Suarez-Fontes – prepared and analyzed TEM samples. Juliana Almeida-Silva – prepared and analyzed TEM samples. Marcos André Vannier-Santos – coordinated TEM analysis and participated in the manuscript preparation. Raymond Pierce – coordinated the A-ParaDDisE Consortium, helped in the identification of *L. braziliensis* HDACs, participated in the manuscript preparation. Wolfgang Sippl – coordinated the design and synthesis of HDACi and participated in the manuscript preparation. Juliana Lopes Rangel Fietto – coordinated the work, supervised the students, analyzed data, participated in preparation and revision of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank to Núcleo de Microscopia e Microanálise of UFV for support flow cytometry analyses and Electron Microscopy Platform of Rudolf Barth Electron Microscopy Platform IOC/Fiocruz, for support on EM analysis. This work has been supported by funding from the European Commission Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement no. 602080 (A- ParaDDisE), Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fiocruz for Fellowships. This study was sponsored in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Grant Code

001. RP received institutional support from the CNRS, the University of Lille and the Pasteur Institute of Lille.

References

- [1] G.U, M. Pinart, M. Rengifo-Pardo, A. Macaya, J. Alvar, J. Alvar, Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2012). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004834.pub2>. www.cochranelibrary.com.
- [2] Edoardo Torres-Guerrero, Marco Romano Quintanilla-Cedillo, Julieta Ruiz-Esmenjaud, Roberto Arenas, Leishmaniasis: a review, *F1000Res* 6 (2017) 750, <https://doi.org/10.12688/f1000research.10.12688/f1000research.11120.1>.
- [3] Vanessa Liévin-Le Moal, Philippe M. Loiseau, Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments, *FEBS J.* 283 (4) (2016) 598–607, <https://doi.org/10.1111/febs.13601>.
- [4] F.J.S. Rocha, U. Schleicher, J. Mattner, G. Alber, C. Bogdan, Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice, *IAI* 75 (8) (2007) 3823–3832, <https://doi.org/10.1128/IAI.01335-06>.
- [5] C.M. Gomes, L.R. Ávila, J.C. Santos, P.G. Oliveira, F.D. Tomé, L.L.A. Pereira, M.L. Dorta, R.S. Lino, F. Ribeiro-Dias, M.A.P. Oliveira, Leishmania (Viannia) braziliensis amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection, *Pathog. Dis.* 74 (2016) ftw023, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw023>.
- [6] M. Rossi, N. Fasel, How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!, *Int. Immunol.* 30 (2018) 103–111, doi: 10.1093/intimm/dxx075.
- [7] Dimitrios Tsikas, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research, *J. Chromatogr. B* 851 (1–2) (2007) 51–70, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>.
- [8] H. Maksouri, P.M.C. Dang, V. Rodrigues, J. Estaquier, M. Riyad, K. Akarid, Moroccan strains of Leishmania major and Leishmania tropica differentially impact on nitric oxide production by macrophages, *Parasites Vectors* 10 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2401-4>.
- [9] Paul Kaye, Phillip Scott, Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8) (2011) 604–615, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>.
- [10] Alessio Strazzulla, Salvatore Cocuzza, Marilia Rita Pinzone, Maria Concetta Postorino, Stefano Cosentino, Agostino Serra, Bruno Caopardo, Giuseppe Nunnari, Mucosal Leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 1–7, <https://doi.org/10.1155/2013/805108>.
- [11] Sakib Burza, Simon L Croft, Marleen Boelaert, Leishmaniasis, *The Lancet* 392 (10151) (2018) 951–970, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- [12] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. de Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One.* 7 (2012), doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- [13] J. Heras-Mosteiro, B. Monge-Maillo, M. Pinart, P. Lopez Pereira, L. Revez, E. Garcia-Carrasco, P. Campuzano Cuadrado, A. Royuela, I. Mendez Roman, R. López-Vélez, Interventions for old world cutaneous leishmaniasis (review) summary of findings for the main comparison, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2017) 394, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005067.pub5>. www.cochranelibrary.com.
- [14] A. Ponte-Sucre, F. Gamarro, J.-C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulos, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0006052, doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.
- [15] M. Ghorbani, R. Farhoudi, Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 25–40, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>.
- [16] Nathaniel K. Copeland, Naomi E. Aronson, Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review, *Curr. Opin Infectious Diseases* 28 (5) (2015) 426–437, <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000194>.
- [17] B.S. McGwire, A.R. Satoskar, Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *Qjm.* 107 (2014) 7–14, doi: 10.1093/qjmed/hct116.
- [18] T.K. Kelly, D.D. De Carvalho, P.A. Jones, Epigenetics modifications as therapeutic targets, *Nat. Biotechnol.* 28 (2012) 1–19, <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>.
- [19] Glenn G. Wozniak, Brian D. Strahl, Hitting the 'mark': Interpreting lysine methylation in the context of active transcription, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839 (12) (2014) 1353–1361, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.002>.
- [20] Olaf Witt, Hedwig E. Deubzer, Till Milde, Ina Oehme, HDAC family: what are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* 277 (1) (2009) 8–21, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>.
- [21] Jessica A. Engel, Amy J. Jones, Vicky M. Avery, Subathdrage D.M. Sumanadasa, Susanna S. Ng, David P. Fairlie, Tina S. Adams, Katherine T. Andrews, Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against Plasmodium and Trypanosoma parasites, *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resistance* 5 (3) (2015) 117–126, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.004>.
- [22] Gebremedhin S. Hailu, Dina Robaa, Mariantonieta Forgiogione, Wolfgang Sippl, Dante Rotili, Antonello Mai, Lysine deacetylase inhibitors in parasites: past, present, and future perspectives, *J. Med. Chem.* 60 (12) (2017) 4780–4804, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01595>.

- [23] Larissa L.S. Scholte, Marina M. Mourão, Fabiano Sviatopolk-Mirsky Pais, Jelena Melesina, Dina Robaa, Angela C. Volpini, Wolfgang Sippl, Raymond J. Pierce, Guilherme Oliveira, Laila A. Nahum, Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases, *Infection, Genetics Evolution* 53 (2017) 175–188, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.011>.
- [24] Jelena Melesina, Dina Robaa, Raymond J. Pierce, Christophe Romier, Wolfgang Sippl, Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors, *J. Mol. Graph. Model.* 62 (2015) 342–361, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.10.006>.
- [25] Cheryl H. Arrowsmith, Chas Bountra, Paul V. Fish, Kevin Lee, Matthieu Schapira, Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (5) (2012) 384–400, <https://doi.org/10.1038/nrd3674>.
- [26] Solomon Nwaka, Alan Hudson, Innovative lead discovery strategies for tropical diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (11) (2006) 941–955, <https://doi.org/10.1038/nrd2144>.
- [27] Colette Dissous, Christoph G. Grevelding, Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol.* 27 (2) (2011) 59–66, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.09.001>.
- [28] P. Bose, Y. Dai, S. Grant, Histone deacetylase inhibitor (HDACi) mechanisms of action: emerging insights, *Pharmacol Ther.* 143 (2014) 323–336, <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>.
- [29] R. Pierce, Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development, *Curr. Pharm. Des.* (2012) 3567–3578, <https://doi.org/10.2174/138161212801327248>.
- [30] Ming Jang Chua, Megan S.J. Arnold, Weijun Xu, Julien Lancelot, Suzanne Lamotte, Gerald F. Späth, Eric Prina, Raymond J. Pierce, David P. Fairlie, Tina S. Skinner-Adams, Katherine T. Andrews, Effect of clinically approved HDAC inhibitors on Plasmodium, Leishmania and Schistosoma parasite growth, *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resistance* 7 (1) (2017) 42–50, <https://doi.org/10.1016/j.ijpdr.2016.12.005>.
- [31] R.J. Pierce, Anti-parasitic drug discovery, *Pan Eur. Networks Sci. Technol.* ([s.d.]) 192–193.
- [32] Tino Heimburg, Alokta Chakrabarti, Julien Lancelot, Martin Marek, Jelena Melesina, Alexander-Thomas Hauser, Tajith B. Shaik, Sylvie Duclaud, Dina Robaa, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Christophe Romier, Raymond J. Pierce, Manfred Jung, Wolfgang Sippl, Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from Schistosoma mansoni for the Treatment of Schistosomiasis, *J. Med. Chem.* 59 (6) (2016) 2423–2435, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01478>.
- [33] Mathesus Silva e Bastos, Luciana Ângelo de Souza, Thiago Souza Onofre, Abelardo Silva Júnior, Márcia Rogéria de Almeida, Gustavo Costa Bressan, Juliana Lopes Rangel Fietto, Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp Leishmania braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112 (2) (2017) 155–159, <https://doi.org/10.1590/0074-02760160237>.
- [34] Theresa Bayer, Alokta Chakrabarti, Julien Lancelot, Tajith B. Shaik, Kristin Hausmann, Jelena Melesina, Karin Schmidtkunz, Martin Marek, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Dina Robaa, Christophe Romier, Raymond J. Pierce, Manfred Jung, Wolfgang Sippl, Synthesis, Crystallization Studies, and in vitro Characterization of Cinnamic Acid Derivatives as Sm HDAC8 Inhibitors for the Treatment of Schistosomiasis, *ChemMedChem* 13 (15) (2018) 1517–1529, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800238>.
- [35] Tino Heimburg, Fiona R. Kolbinger, Patrik Zeyen, Ehab Ghazy, Daniel Herp, Karin Schmidtkunz, Jelena Melesina, Tajith Baba Shaik, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Christophe Romier, Dina Robaa, Olaf Witt, Ina Oehme, Manfred Jung, Wolfgang Sippl, Structure-Based Design and Biological Characterization of Selective Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors with Anti-Neuroblastoma Activity, *J. Med. Chem.* 60 (24) (2017) 10188–10204, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01447>.
- [36] K. Katsuno, J.N. Burrows, K. Duncan, R.H. Van Huijsduijnen, T. Kaneko, K. Kita, C. E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B.T. Slingsby, Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 751–758, doi: 10.1038/nrd4683.
- [37] Michelle Peixoto Rodrigues, Deborah Campos Tomaz, Luciana Ângelo de Souza, Thiago Souza Onofre, Wemerson Aquiles de Menezes, Juliana Almeida-Silva, Ana Márcia Suarez-Fontes, Márcia Rogéria de Almeida, Adalberto Manoel da Silva, Gustavo Costa Bressan, Marcos André Vannier-Santos, Juliana Lopes Rangel Fietto, Róbson Ricardo Teixeira, Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against Leishmania braziliensis, *Eur. J. Med. Chem.* 183 (2019) 111688, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111688>.
- [38] Laura C. Green, David A. Wagner, Joseph Glogowski, Paul L. Skipper, John S. Wishnok, Steven R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1) (1982) 131–138, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- [39] Andrea Mülleberner, Anjan Patel, Werner Stamborg, Katrin Staniak, Thomas Rosenau, Thomas Netscher, Lars Gille, Modulation of the Mitochondrial Cytochrome bc 1 Complex Activity by Chromanols and Related Compounds, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (1) (2010) 193–202, <https://doi.org/10.1021/tx900333f>.
- [40] Ghorbani Masoud, Farhudi Ramin, Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 25–40, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>.
- [41] Martin Marek, Tajith B. Shaik, Tino Heimburg, Alokta Chakrabarti, Julien Lancelot, Elizabeth Ramos-Morales, Cyrielle Da Veiga, Dmitrii Kalinin, Jelena Melesina, Dina Robaa, Karin Schmidtkunz, Takayoshi Suzuki, Ralph Holl, Eric Ennifar, Raymond J. Pierce, Manfred Jung, Wolfgang Sippl, Christophe Romier, Characterization of Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Selective Inhibition Reveals Specific Active Site Structural and Functional Determinants, *J. Med. Chem.* 61 (22) (2018) 10000–10016, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01087>.
- [42] Rubem F.S. Menna-Barreto, Kelly Salomão, Andréia P. Dantas, Ricardo M. Santa-Rita, Maurilio J. Soares, Helene S. Barbosa, Solange L. de Castro, Different cell death pathways induced by drugs in Trypanosoma cruzi: an ultrastructural study, *Micron* 40 (2) (2009) 157–168, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.08.003>.
- [43] M. Soeiro, A. Daliry, C. Silva, D. Bastista, E. Souza, G. Oliveira, K. Salomão, R. Menna-Barreto, S. Castro, Electron microscopy approaches for the investigation of the cellular targets of trypanocidal agents in Trypanosoma cruzi, 2010.
- [44] D.C.S. Vannier-Santos MA, Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill, *Curr Drug Targets.* 10 (2009) 246–260.
- [45] A. Savena, T. Ihar, N. Holland, A. Agarwal, A. Anupama, Y. Huang, H. Volpin, P. Myler, D. Zilberstein, Analysis of the Leishmania donovani transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152 (2007) 53–65, <https://doi.org/10.1037/a0032811>.
- [46] Ricardo Obonaga, Olga Lucía Fernández, Liliana Valderrama, Luisa Consuelo Rubiano, María del Mar Castro, María Claudia Barrera, María Adelaida Gomez, Nancy Gore Saravia, Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by Leishmania Subgenus Viannia Species, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (1) (2014) 144–152, <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>.
- [47] I K H Poon, M D Hulett, C R Parish, Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance, *Cell Death Differ* 17 (3) (2010) 381–397, <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.195>.
- [48] E. Brauchle, S. Thude, S.Y. Brucker, K. Schenke-Layland, Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–9, <https://doi.org/10.1038/srep01698>.
- [49] T. Ernst, E. Obstfelder, A. Hochhaus, Chronic myeloid leukemia, *Onkologie* 24 (2018) 427–442, <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0380-5>.
- [50] Zbigniew Darzynkiewicz, Xuan Huang, Hong Zhao, Analysis of cellular DNA content by flow cytometry, *Curr. Protocols Cytometry* 82 (1) (2017), <https://doi.org/10.1002/0471142956.2017.82.issue-110.1002.cpey.28>.
- [51] Florence F. Wagner, Michel Weiwler, Michael C. Lewis, Edward B. Holson, Small molecule inhibitors of Zinc-dependent histone deacetylases, *Neurotherapeutics* 10 (4) (2013) 589–604, <https://doi.org/10.1007/s00761-013-0226-1>.
- [52] Jelena Melesina, Lucas Praetorius, Conrad V Simoben, Dina Robaa, Wolfgang Sippl, Design of selective histone deacetylase inhibitors: rethinking classical pharmacophore, *Future Med. Chem.* 10 (13) (2018) 1537–1540.
- [53] R.B.G. Azeredo-Coutinho, S.C.F. Mendonça, H. Callahan, A.C. Portal, M. Grögl, Sensitivity of Leishmania Braziliensis Promastigotes To Meglumine Antimoniate (Glucantime) Is Higher Than That of Other Leishmania Species and Correlates With Response To Therapy in American Tegumentary Leishmaniasis, *J. Parasitol.* 93 (2007) 688–693, doi: 10.1645/ge-1031r.1.
- [54] S.N. Rampersad, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors (Switzerland)* 12 (2012) 12347–12360, doi: 10.3390/s120912347.
- [55] R.J. Gonzalez, J.B. Tarloff, Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity, *Toxicol. In Vitro* 15 (3) (2001) 275–259, [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00014-5).
- [56] L.C. Crowley, B.J. Marfell, A.P. Scott, N.J. Waterhouse, Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (2016) 953–957, doi: 10.1101/pdb.prot087288.
- [57] C. Ferlini, S. Di Cesare, G. Rainaldi, W. Marloni, P. Samoggia, R. Biselli, A. Fattorossi, Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques, *Cytometry* 24 (1996) 106–115, <https://doi.org/10.5209/CFCG.55707>.
- [58] D. Menezes, C. Valentim, M.F. Oliveira, M.A. Vannier-Santos, Putrescine analogue cytotoxicity against Trypanosoma cruzi, *Parasitol. Res.* 98 (2006) 99–105, doi: 10.1007/s00436-005-0010-1.
- [59] M.A. Vannier-Santos, D. Menezes, M.F. Oliveira, F.G. de Mello, The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in Leishmania amazonensis, *Microbiology.* 154 (2008) 3104–3111, doi: 10.1099/mic.0.2007/013896-0.
- [60] K. Lohitesh, H. Saini, A. Srivastava, S. Mukherjee, A. Roy, R. Chowdhury, Autophagy inhibition potentiates SAHA-mediated apoptosis in glioblastoma cells by accumulation of damaged mitochondria, *Oncol. Rep.* 39 (2018) 2787–2796, <https://doi.org/10.3892/or.2018.6373>.
- [61] A. Hrzanjak, M.-L. Kremser, B. Stromeier, F. Moinkar, K. Zatloukal, H. Denk, SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway, *J. Pathol.* 216 (2008) 495–504, <https://doi.org/10.1002/path>.
- [62] T. Yonekawa, A. Thorburn, D. Gozuacik, A. Kimchi, Autophagy and Cell Death Tohru, *Essays Biochem.* 55 (2013) 105–117, <https://doi.org/10.1042/bse0550105>.
- [63] Umut Cagin, José Antonio Enriquez, The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus: what goes in between? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 63 (2015) 10–15, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.026>.
- [64] Manan M. Mehta, Samuel E. Weinberg, Navdeep S. Chandel, Mitochondrial control of immunity: beyond ATP, *Nat. Rev. Immunol.* 17 (10) (2017) 608–620, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.66>.
- [65] Oliver M. Russell, Gráinne S. Gorman, Robert N. Lightowers, Doug M. Turnbull, Mitochondrial diseases: hope for the future, *Cell* 181 (1) (2020) 168–188, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>.
- [66] L. Craven, C.L. Alston, R.W. Taylor, D.M. Turnbull, Recent advances in

- mitochondrial biology - integrated aspects, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 18 (2017) 257–275, <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2533-4>.
- [67] A.H. Michel, B. Kornmann, The ERMES complex and ER-mitochondria connections, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 445–450, doi: 10.1042/BST20110758.
- [68] Saverio Marchi, Simone Patergnani, Paolo Pinton, The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837 (4) (2014) 461–469.
- [69] M.S. Herrera-Cruz, T. Simmen, Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors, *Biol. Direct.* 12 (2017) 1–21, <https://doi.org/10.1186/s13062-017-0174-5>.
- [70] T. Garofalo, A. Tinari, P. Matarrese, A.M. Giammarioli, V. Manganelli, L. Ciarlo, R. Misasi, M. Sorice, W. Malorni, Do mitochondria act as “cargo boats” in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis?, *FEBS Lett.* 581 (2007) 3899–3903, doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.020.
- [71] Italo Tempera, Barbara Buchetti, Emanuela Lococo, Roberto Gradini, Annalisa Mastronardi, Maria Teresa Mascellino, Patrizio Sale, Luciana Mosca, Maria d’Erme, Luisa Lenzi, GD3 nuclear localization after apoptosis induction in HUT-78 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (3) (2008) 495–500, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.196>.
- [83] György Csordás, David Weaver, György Hajnóczky, Endoplasmic reticulum-mitochondrial contactology: structure and signaling functions, *Trends Cell Biol.* 28 (7) (2018) 523–540, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>.
- [86] Glenn R. Bantug, Marco Fischer, Jasmin Grählert, Maria L. Balmer, Gunhild Unterstab, Leyla Develioglu, Rebekah Steiner, Lianjun Zhang, Ana S.H. Costa, Patrick M. Gubser, Anne-Valérie Burgener, Ursula Sauder, Jordan Löliger, Réka Belle, Sarah Dimeloe, Jonas Lötscher, Anais Jauch, Mike Recher, Gideon Höngler, Michael N. Hall, Pedro Romero, Christian Prezza, Christoph Hess, Mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites function as immunometabolic hubs that orchestrate the rapid recall response of memory CD8 + T cells, *Immunity* 48 (3) (2018) 542–555.e6, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.012>.
- [87] Yogaditya Chakrabarty, Suvendra N. Bhattacharyya, Karsten Weis, Leishmania donovani restricts mitochondrial dynamics to enhance miRNP stability and target RNA repression in host macrophages, *MBoC* 28 (15) (2017) 2091–2105, <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0388>.
- [96] Roberta Montalbano, Petra Waldegger, Karl Quint, Samir Jabari, Daniel Neureiter, Romana Illig, Matthias Ocker, Pietro Di Fazio, Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Pivotal Role in Cell Death Mediated by the Pan-Deacetylase Inhibitor Panobinostat in Human Hepatocellular Cancer Cells, *Transl. Oncol.* 6 (2) (2013) 143–1N6, <https://doi.org/10.1593/tlo.12271>.
- [97] Harun-Or Rashid, Raj Kumar Yadav, Hyung-Ryong Kim, Han-Jung Chae, ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection, *Autophagy* 11 (11) (2015) 1956–1977, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>.
- [98] Manoj Prasad, Anna N. Walker, Jasmeet Kaur, James L. Thomas, Shirley A. Powell, Amit V. Pandey, Randy M. Whittall, William E. Burak, Guy Petruzzelli, Himangshu S. Bose, Endoplasmic reticulum stress enhances mitochondrial metabolic activity in mammalian adrenals and gonads, *Mol. Cell. Biol.* 36 (24) (2016) 3058–3074, <https://doi.org/10.1128/mcb.00411-16>.
- [99] R. Bravo, J.M. Vicencio, V. Parra, R. Troncoso, J.P. Munoz, M. Bui, C. Quiroga, A.E. Rodriguez, H.E. Verdejo, J. Ferreira, M. Iglewski, M. Chiong, T. Simmen, A. Zorzano, J.A. Hill, B.A. Rothermel, G. Szabadkai, S. Lavadero, Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 2143–2152, doi: 10.1242/jcs.095455.
- [101] Roderick A. Williams, Laurence Tetley, Jeremy C. Mottram, Graham H. Coombs, Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*, *Mol. Microbiol.* 61 (3) (2006) 655–674, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05274.x>.
- [102] Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* 10 (2) (2019), <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.
- [103] Aline A Zuma, Wanderley de Souza, Histone deacetylases as targets for anti-trypanosomal drugs, *Future Sci. OA* 4 (8) (2018) FSO325, <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0037>.
- [104] M.S. Da Silva, J.P. Monteiro, V.S. Nunes, E.J. Vasconcelos, A.M. Perez, L.D.H. Freitas, M.C. Elias, M.I.N. Cano, *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle, *PLoS One.* 8 (2013) 1–12, doi: 10.1371/journal.pone.0081397.
- [106] R.J. Wheeler, E. Gluenz, K. Gull, The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology, *Mol. Microbiol.* 79 (2011) 647–662, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x.
- [107] Vassilios N. Kotiadis, Michael R. Duchon, Laura D. Osellame, Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (4) (2014) 1254–1265, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.041>.
- [108] Mohammad Saki, Aishwarya Prakash, DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria, *Free Radical Biol. Med.* 107 (2017) 216–227, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.050>.
- [109] J. Wu, C. Quijano, E. Chen, H. Liu, L. Cao, M.M. Fergusson, I. Ilsa, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy, *Aging (Albany NY)*. 1 (2009) 425–437.
- [110] S. Dodig, I. Čepelak, I. Pavić, Hallmarks of senescence and aging, *Biochem. Medica.* 29 (2019) 1–15, <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>.
- [111] K. Das Gupta, M.R. Shakespear, A. Iyer, D.P. Fairlie, M.J. Sweet, Histone deacetylases in monocyte/macrophage development, activation and metabolism: refining HDAC targets for inflammatory and infectious diseases, *Clin. Transl. Immunol.* 5 (2016) e62–10, <https://doi.org/10.1038/cti.2015.46>.
- [112] Sang-Bae Han, Jae Kwon Lee, Anti-inflammatory effect of Trichostatin-a on murine bone marrow-derived macrophages, *Arch. Pharm. Res.* 32 (4) (2009) 613–624, <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1418-4>.

5.1.2. Atividade de HDAC de macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* após o tratamento com os HDACi TH74 e TH85

A atividade de HDAC em macrófagos não infectados após o tratamento com o TH85 nas concentrações de 1/4 EC₅₀ (86% ± 3) e 1/2 EC₅₀ (85% ± 6) diminuiu significativamente quando comparada ao controle não tratado (100% ± 6,8), conforme mostrado na Figura 9A. Os tratamentos com o TH85 na concentração do EC₅₀ (93,5% ± 2,5) e com o TH74 nas três concentrações testadas (1/4 EC₅₀ = 91% ± 2,7; 1/2 EC₅₀ = 98% ± 6; EC₅₀ = 95,6% ± 6,4) tenderam a diminuir a atividade de HDAC nessas células em relação ao controle não tratado (Figura 9A). No ensaio de infecção como mostrado na Figura 9B, houve um aumento significativo na atividade de HDAC após o tratamento com o TH74 na concentração de 1/2 EC₅₀ (115,4% ± 3,1) em relação ao controle não tratado (99,9% ± 9,3). Os tratamentos com 1/4 EC₅₀ e EC₅₀ do TH74 (107% ± 1,2 e 110,2% ± 4, respectivamente) e do TH85 (100,5% ± 5,7 e 102,7% ± 6,9, respectivamente) tenderam a aumentar a atividade enzimática em relação ao controle sem tratamento. No entanto, o tratamento com o TH85 na concentração de 1/2 EC₅₀ (95,4% ± 5,7) tendeu a diminuir a atividade de HDAC quando comparado ao controle não tratado (Figura 9B). É importante destacar que a atividade de HDAC em macrófagos não infectados e infectados no controle sem tratamento foi significativamente maior do que aquela observada para HDAC1 + TSA. A tricostatina A (TSA) é um potente inibidor de HDACs de classe I e II com propriedades contra bactérias, fungos e células cancerígenas (JOSÉ-ENÉRIZ; GIMENEZ-CAMINO; AGIRRE, 2019). Vale salientar que os efeitos inibitórios dos HDACi selecionados contra *L. braziliensis* sobre os macrófagos não infectados são bem pequenos quando comparados com o controle com tricostatina A, o que pode indicar sua seletividade maior para as enzimas do parasito em detrimento das enzimas do hospedeiro.

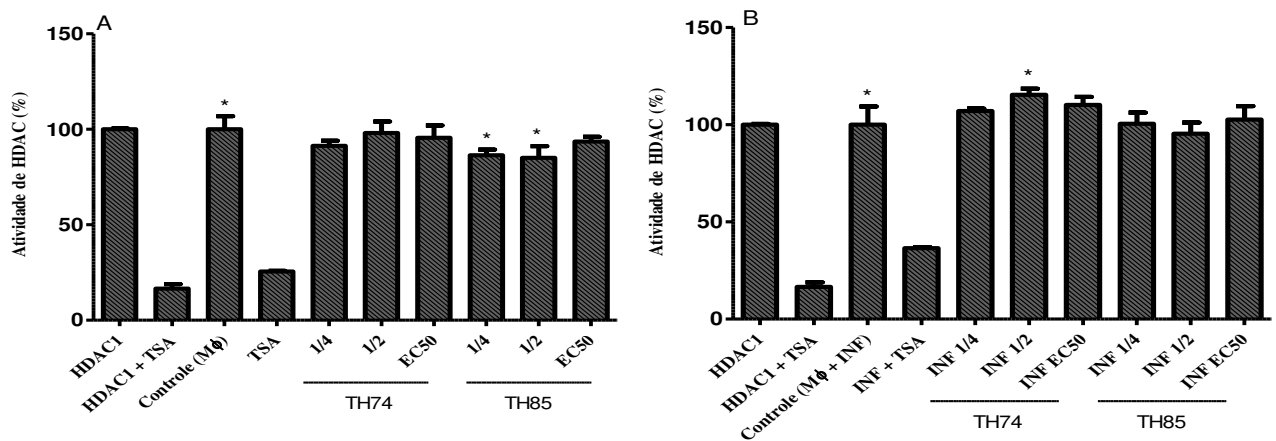


Figura 9 - Avaliação da atividade de HDAC de macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* após o tratamento com os HDACi TH74 e TH85. As células foram tratadas por 48 h com os HDACi nas concentrações de EC₅₀, 1/2 EC₅₀ e 1/4 EC₅₀. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se kit comercial (*HDAC Fluorometric Activity Assay Kit - Cayman Chemical*). O resultado é a média e o desvio padrão de duplicata biológica. Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle. A) Atividade de HDAC em macrófagos não infectados. B) Atividade de HDAC em macrófagos infectados com *L. braziliensis*.

As HDACs desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica eucariótica e a contribuição dessas enzimas para a viabilidade de *L. braziliensis* após o tratamento com os HDACi foi avaliada medindo-se a atividade de HDACs em macrófagos não infectados e infectados com o parasito. Observou-se que a atividade de HDAC aumentou significativamente em relação ao controle em macrófagos infectados após tratamento com TH74 na concentração de 1/2 EC₅₀ e esse fato não foi observado em células não infectadas nas mesmas condições. Provavelmente nessa menor concentração do HDACi, o efeito leishmanicida deste foi baixo e o parasito foi capaz de modular o macrófago para garantir sua sobrevivência. De fato, estudos de Calegari-Silva e colaboradores mostraram que *L. amazonensis* é capaz de regular negativamente a expressão de iNOS via Histona Desacetilase 1 (HDAC1) em macrófagos infectados, o que contribui para sua sobrevivência (CALEGARI-SILVA et al., 2018). A atividade de HDAC tendeu a aumentar em macrófagos infectados após o tratamento com o TH74 e TH85 na concentração do EC₅₀, o que não foi observado em células não infectadas. No entanto, é nessa concentração que o efeito leishmanicida é significativo, conforme demonstrado em nossos resultados anteriores (5.2.1). Assim, é possível que a inibição seletiva de alguma das HDACs (do hospedeiro ou do parasito) leve a um efeito compensatório estimulatório em outra isoforma, não havendo, portanto, diminuição da atividade enzimática. De fato, estudos de Cao e colaboradores mostraram que a inibição seletiva de HDAC1 ou HDAC2 de macrófagos está relacionada à expressão de genes pró-inflamatórios (CAO et al., 2019), como aqueles para citocinas (MULLICAN et al., 2011),

visando a eliminação de *Leishmania*. Resultados anteriores (item 5.1s.1) mostraram que a concentração de óxido nítrico não se alterou nos macrófagos infectados após o tratamento com o TH74 e TH85 na concentração de EC₅₀, o que reforça essa hipótese.

5.1.3. Efeito dos inibidores de HDAC em modelo camundongo de infecção experimental por *L. braziliensis*

5.1.3.1. Teste de toxicidade aguda com o HDACi TH74 em camundongos BALB/c

Modelos animais têm sido utilizados há muitos anos para elucidar os mecanismos envolvidos na leishmaniose tegumentar humana, como os tipos de células envolvidas, polarização da resposta imune, cascatas de sinalização para eliminar o parasito e também na busca de novos medicamentos contra a doença (DE OLIVEIRA et al., 2004; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Os resultados mostrados anteriormente nos ensaios de infecção de macrófagos por *L. braziliensis* *in vitro* (item 5.1.1), mostraram que cinco HDACi tiveram efeito leishmanicida significativo contra amastigotas intracelulares do parasito. Então, como próxima etapa, foi avaliado o efeito de três desses inibidores (TH60, TH74 e TH85) em modelo de infecção animal por *L. braziliensis*. Para determinação das doses de tratamento frente à infecção, foi feito primeiramente, o teste de toxicidade aguda, o qual desempenha papel importante no desenvolvimento de novos medicamentos uma vez que avalia os efeitos indesejados que ocorrem logo após a administração, de uma única ou múltiplas doses, de uma substância teste em um período de 24 h (SAGANUWAN, 2017). O teste de toxicidade aguda é o procedimento inicial para a triagem de agentes farmacológicos para avaliação de toxicidade antes que outros testes sejam conduzidos, além de estimar os potenciais riscos diretos aos seres humanos (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013; ERHIRHIE; IHEKWEREME; ILODIGWE, 2018). Assim, o teste foi feito com o HDACi TH74 nas concentrações de 20 mg/kg/dia, 10 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia. As doses foram administradas em dias alternados por via intravenosa (IV) na cauda dos animais, durante duas semanas, totalizando seis doses para cada grupo de cinco animais. A dose de 20 mg/kg/dia foi letal para um animal do grupo logo na primeira aplicação, em apenas instantes após a administração do HDACi. Mais uma morte ocorreu min após a administração da terceira dose de 20 mg/kg/dia. Após a aplicação da quarta dose de 20 mg/kg/dia, mais dois animais do grupo morreram, também em poucos min. Os sinais de toxicidade observados nos animais desse grupo foram anestesia, ataxia, tremores e espasmos musculares. Assim, como mostrado na Figura 10, a dosagem de 20 mg/kg/dia foi muito tóxica

para os animais, sendo a taxa de sobrevivência destes, de apenas 20% em relação ao controle. Para os demais grupos, incluindo os controles, nenhuma morte foi observada ao final das seis doses.

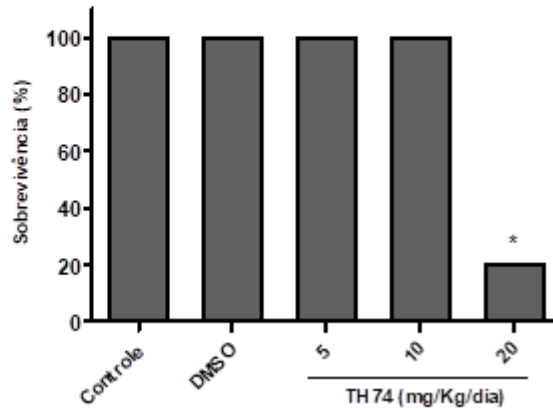


Figura 10 - Teste de toxicidade aguda para o HDACi TH74 em camundongos BALB/c. O TH74 foi aplicado por via IV na cauda dos animais em dias alternados, durante duas semanas, nas concentrações de 20 mg/kg/dia, 10 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia. Os resultados refletem a taxa de sobrevivência dos animais de cada grupo (n = 5) ao final da aplicação das seis doses. Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle.

O principal parâmetro que avalia a toxicidade aguda de um composto e que reflete a dose desse composto capaz de matar 50% da população de animais em estudo (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013), é a dose letal mediana (DL_{50}). Dessa forma, a partir dos resultados mostrados anteriormente, foi determinada a DL_{50} de 15,66 mg/kg para o HDACi TH74. Segundo a classificação de toxicidade de substâncias administradas por via parenteral proposta por Berezovskaya (BEREZOVSKAYA, 2003), uma DL_{50} por via IV maior do que 0,7 mg/kg e menor do que 40 mg/kg é classificada como altamente tóxica, pertencendo à classe 2 de toxicidade e risco. Uma DL_{50} entre 300 mg/kg e 700 mg/kg por via IV segundo a mesma classificação supracitada, é categorizada como de risco moderado. De fato, uma DL_{50} maior do que 500 mg/kg por via IV foi determinada em um estudo *in vivo* a respeito da toxicidade do RL-712, um antimonial pentavalente com maior tempo de meia vida do que o Glucantime® e com potencial leishmanicida para *L. donovani* (CASALS, 1972), refletindo a sua moderada toxicidade. Assim, se utilizarmos apenas esse parâmetro, o HDACi TH74 é muito tóxico em relação ao antimonial pentavalente do referido estudo. Entretanto, os efeitos tóxicos de uma substância-teste em modelo animal são também avaliados através de outros parâmetros, como por exemplo, dosagens de enzimas renais e hepáticas (testes bioquímicos) e possíveis alterações histológicas possivelmente a estas relacionadas (INACIO et al., 2014; NEVES et al., 2009).

A elevada toxicidade observada para o HDACi TH74 na concentração de 20 mg/kg/dia pode ser explicada pelo fato de que na administração IV, não ocorre o efeito de primeira passagem, em que o fármaco primeiramente é absorvido pelo trato digestivo e direcionado pela veia porta até o fígado, onde é metabolizado, para então cair na circulação sistêmica. Dessa forma, sem o efeito de primeira passagem, o fármaco é introduzido diretamente na circulação sistêmica, o que, conseqüentemente, torna alta a sua biodisponibilidade e os efeitos tóxicos observados, praticamente imediatos (WANG et al., 2015b). Além disso, fatores críticos na administração IV, são a apresentação do fármaco (solução, suspensão, emulsão) e sua estabilidade até o momento da aplicação. Em relação à apresentação do fármaco na forma de solução por exemplo, caso haja precipitação, esse fato pode levar a uma embolia pulmonar (WONG et al., 2008). De fato, foram observados precipitados nos microtubos de centrifugação contendo o HDACi TH74 na concentração de 20 mg/kg, o que pode explicar também a alta letalidade encontrada nesse grupo, além de indicar uma baixa solubilidade do composto em tampão fosfato-salino.

Assim, a partir do teste de toxicidade aguda foi possível selecionar as doses de 10 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia para o tratamento da infecção em modelo animal por *L. braziliensis*.

5.1.3.2. Cinética de lesão na orelha e na pata de camundongos BALB/c após infecção com *L. braziliensis*

Camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção causada por *Leishmania* (DE OLIVEIRA et al., 2004) e foram utilizados como modelo para avaliação da cinética de lesão causada por *L. braziliensis*, tanto na pata quanto na orelha, para posterior quimioterapia com os HDACi. Para avaliação do desenvolvimento da lesão na pata, foi feito inicialmente, um experimento piloto, em que os animais foram infectados com 1×10^7 parasitos em fase estacionária de crescimento. A lesão foi medida uma vez por semana, durante nove semanas após a infecção, e o resultado é mostrado na Figura 11.

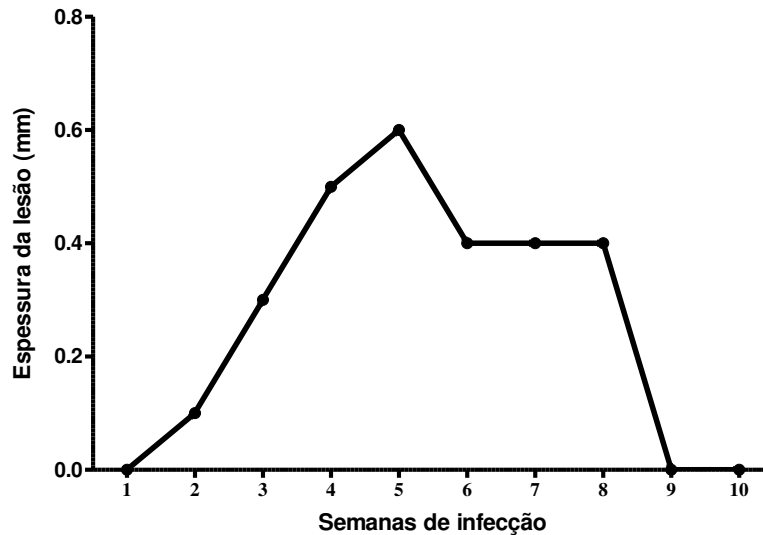


Figura 11. Experimento piloto da cinética da lesão na pata de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os animais ($n = 6$) foram infectados subcutaneamente no coxim plantar da pata posterior esquerda com 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento e a lesão foi medida durante nove semanas utilizando-se um micrômetro. Os resultados refletem a média e o desvio padrão da diferença de espessura entre a pata infectada (esquerda) e a pata contralateral não infectada.

É possível observar na Figura 11 que a lesão aumenta progressivamente ao longo da segunda semana após a infecção, havendo um pico na quinta semana, e uma diminuição já na sexta semana. Essa lesão se estabiliza na sétima semana e oitavas semanas após a infecção e apresenta remissão a partir da nona semana. A cinética de lesão encontrada nesse estudo segue o padrão observado tanto por Lima e colaboradores em trabalho para avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999) quanto por Pereira *et. al.* ao avaliar as características histopatológicas de camundongos infectados por diferentes cepas de *L. braziliensis* (PEREIRA *et al.*, 2009b).

A auto-cura observada para a lesão se deve ao fato de que *L. braziliensis* causa apenas uma doença cutânea transitória em camundongos BALB/c (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004), em parte, devido à incapacidade do parasito em gerar uma produção forte e sustentada de IL-4 nesses animais. Baixos níveis de IL-4 não neutralizam a ação do IFN – γ , o qual promove a ativação de macrófagos infectados com *Leishmania*, a fim de que essas células eliminem o parasito (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999). Macrófagos ativados produzem óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio para erradicação de microrganismos intracelulares, sendo que o NO produzido, é um dos mais potentes agentes de macrófagos contra *Leishmania* (GOMES *et al.*, 2016; LIEW; O'DONNELL, 1993). Dessa forma, sem IL-4 suficiente, o IFN – γ exerce seu efeito que culmina com a eliminação do parasito e posterior cura da lesão.

No que diz respeito à avaliação da cinética de lesão na orelha dos camundongos BALB/c, também foi feito um experimento piloto e os animais foram infectados no pavilhão auricular

central esquerdo com 1×10^5 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento, sendo a progressão da lesão acompanhada uma vez por semana, durante oito semanas após a infecção. As imagens abaixo na Figura 12 são representativas de um animal do grupo e mostram a progressão da lesão na orelha nesses animais.

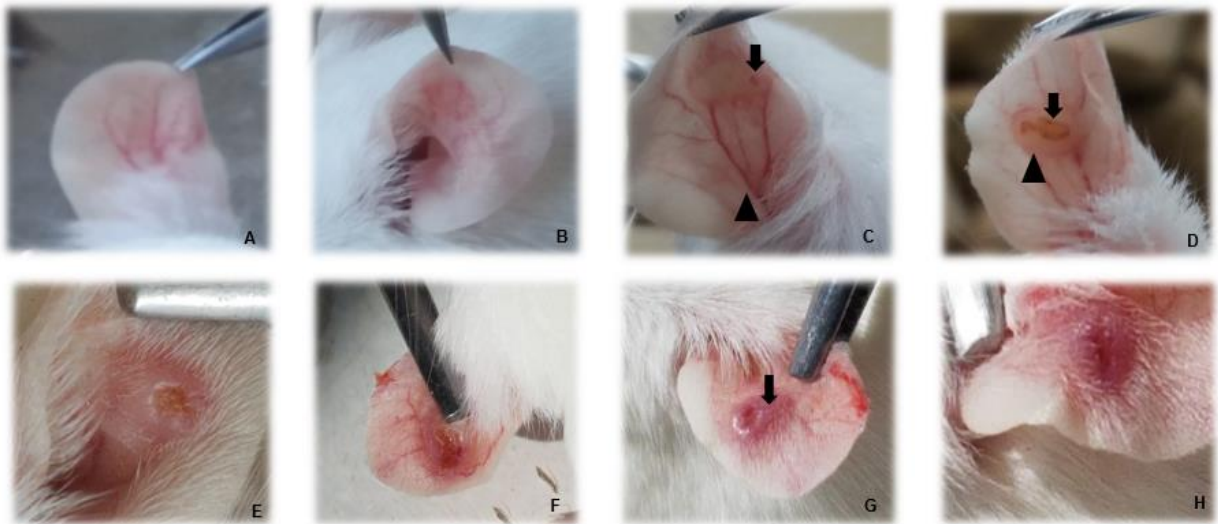


Figura 12 - Experimento piloto da cinética da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os animais ($n = 6$) foram infectados por via intradérmica no pavilhão auricular central esquerdo com 1×10^5 promastigotas em fase estacionária de crescimento e o tamanho e a caracterização da lesão foram determinados, durante oito semanas, utilizando-se um compasso de calibre digital e pelo método de pontuação desenvolvido por Schuster e colaboradores (Schuster et al, 2014). Os resultados são mostrados em dias após a infecção. A) PP 15 dias; B) PA 28 dias; C) PP 28 dias; D) PP 35 dias; E) PA 35 dias; F) PP 49 dias; G) PA 49 dias; H) PA 56 dias. PA = porção anterior; PP = porção posterior

É possível observar que na segunda semana após a infecção (A), a orelha infectada está mais avermelhada, com os capilares sanguíneos proeminentes (eritema), e já na quarta semana (B), ocorre o aparecimento de uma lesão com contorno de aspecto oval na extremidade desses capilares proeminentes (C), que estão com hiperemia acentuada (cabeça de seta), sendo visível à direita superior uma lesão circular menor (seta preta). Na quinta semana após a infecção (D), é possível observar que na porção posterior da orelha, a lesão está com um contorno oval mais acentuado (cabeça de seta) e houve expansão da lesão circular menor (seta preta) que se apresentou com um aspecto mais granuloso e formato irregular; na porção anterior (E), a lesão apresentou-se ulcerada e também com contornos irregulares. Sete semanas após a infecção (F e G), a lesão apresentou-se com sinais de epitelação (seta preta), havendo diminuição da área ulcerada (H) (contração da lesão) e maior epitelação após oito semanas da infecção.

A cinética da lesão na orelha por *L. braziliensis* em modelo murino acima apresentada, está de acordo com os estudos de Khouri e colaboradores, em que foi avaliada a eficácia do

dietilditiocarbamato de sódio (DETC), um potente inibidor da superóxido dismutase (SOD), na diminuição da lesão por *L. braziliensis* na orelha de camundongos BALB/c (KHOURI et al., 2010), e também concorda com o trabalho de Moura *et.al.*, em que eles buscaram desenvolver um modelo de infecção experimental que mais se aproximasse do que acontece na leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*, sendo avaliada a lesão também na orelha de camundongos BALB/c (MOURA et al., 2005). Nos dois trabalhos citados, ocorre o pico da lesão na orelha dos animais na quinta semana após a infecção, assim como mostrado na Figura 12E, em que a lesão está ulcerada. Além disso, Moura e colaboradores mostraram também que na nona semana após a infecção, a lesão na orelha dos animais havia regredido completamente (MOURA et al., 2005). Na Figura 12H, que corresponde à oitava semana após a infecção, a área ulcerada está menor e há maior epitelização, indicando possível cura posteriormente. Tanto a lesão ulcerada quanto a epitelização e a cura espontânea da lesão são observadas em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (BEDOYA-PACHECO et al., 2017).

No que diz respeito à ulceração da lesão relacionada à presença de *Leishmania in situ*, a fase que precede a ulceração é a fase ativa do processo de auto-cura da lesão e é caracterizada por intensa multiplicação do parasito, aparecimento de reação inflamatória aguda (recrutamento de monócitos e macrófagos, infiltração de células T CD4⁺, CD8⁺, liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) e aparecimento da lesão. Entretanto, quando a lesão progride para ulceração (fase ulcerativa), o processo inflamatório já está estabelecido e a carga parasitária tende a diminuir, em decorrência desse processo inflamatório instalado e predominância de uma resposta imune do tipo Th1 (SCOTT; NOVAIS, 2016). Dessa forma, a ulceração da lesão cutânea é em maior parte, consequência do forte processo inflamatório local e não devido ao aumento do número de parasitos *in situ* (ABDOLI; MASPI; GHAFFARIFAR, 2017; BELKAID et al., 2000; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2018). A Figura 12A-C pode sugerir a fase ativa e portanto, a alta taxa proliferação de *Leishmania* na lesão, uma vez que mostra a progressão da hiperemia, e esta é característica de inflamação (BROWN, 2019), e precedeu a lesão ulcerada.

5.1.3.3. Tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85 da lesão na pata de camundongos infectados com *L. braziliensis*

Após a padronização da cinética de lesão por *L. braziliensis* na orelha e na pata de camundongos BALB/c, e com base no ensaio de toxicidade aguda (item 5.2.3.1), a próxima etapa experimental abrangeu o tratamento com os HDACi de animais infectados na pata pelo

referido parasito. Embora a infecção na orelha mimetize melhor a cinética da lesão que ocorre em pacientes com leishmaniose cutânea, a lesão na pata se desenvolveu mais rapidamente (detectável já na segunda semana após a infecção) e serviria ao proposto inicial de avaliar a eficácia do tratamento com os HDACi em modelo de infecção animal por *L. braziliensis*. Assim, os camundongos foram infectados com o parasito em fase estacionária de crescimento e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85 nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg por via intravenosa na cauda, da segunda à quarta semana após a infecção. Esses três HDACi foram selecionados entre os cinco HDACi com maior eficácia contra amastigotas intracelulares *in vitro*, como mostrado anteriormente. Na Figura 13 é mostrado o efeito do tratamento com os HDACi na lesão da pata dos camundongos.

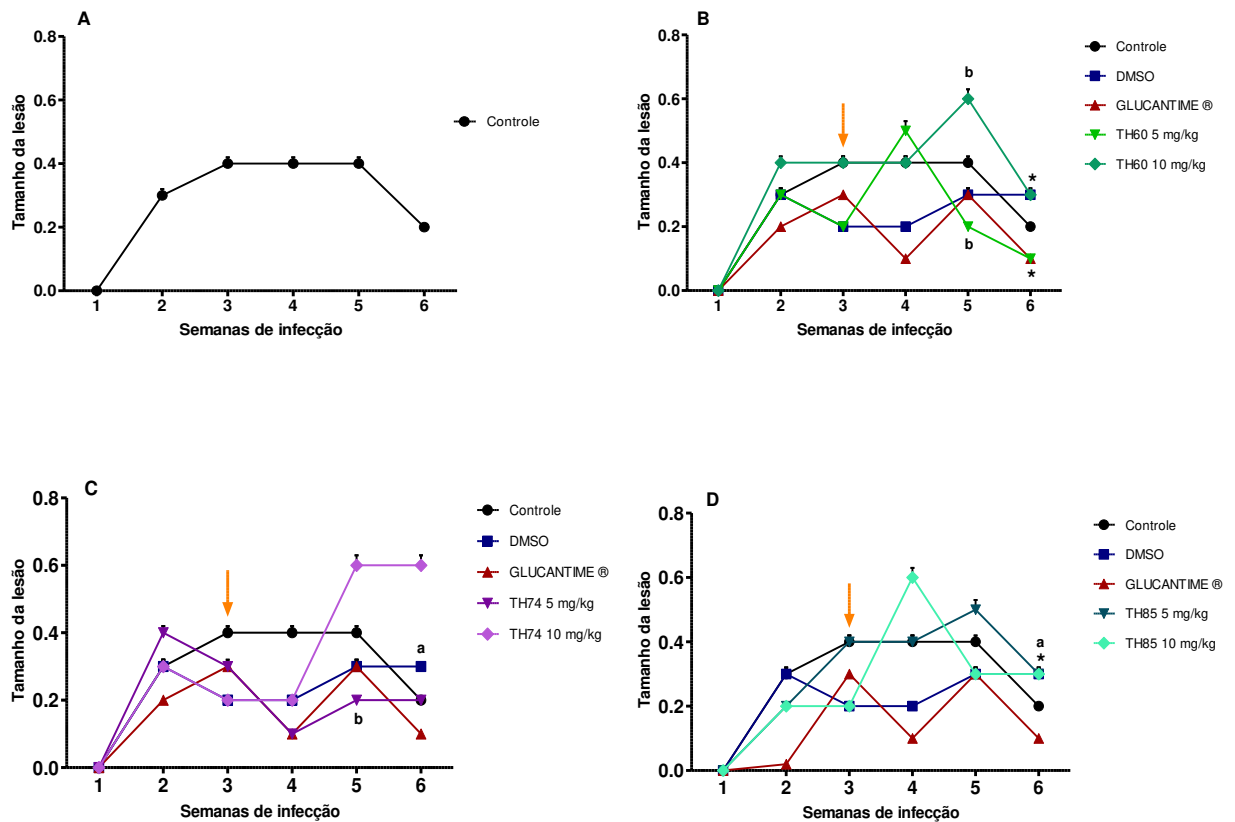


Figura 13 - Tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85 de lesão na pata de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os animais (n = 6) foram tratados com os HDACi nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg por via IV, por três semanas, em dias alternados. Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente, e o tratamento da infecção teve início na segunda semana após a infecção (seta alaranjada). Os resultados são a média e o desvio padrão da diferença de espessura entre a pata infectada (esquerda) e a pata contralateral não infectada após o tratamento. Os dados foram submetidos a *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle, ^a significa $p < 0,05$ em relação ao Glucantime® e ^b significa $p < 0,05$ em relação ao controle, DMSO e Glucantime®. A) tamanho da lesão no controle (recebeu somente PBS). B) tamanho da lesão após o tratamento com TH60. C) tamanho da lesão após o tratamento com TH74. D) tamanho da lesão após o tratamento com TH85.

As lesões apresentaram aspecto nodular sem ulceração e seu tamanho foi determinado pela diferença de espessura entre a pata infectada (esquerda) e pata contralateral não infectada (controle). Na Figura 13A, é mostrada a cinética da lesão no controle, em que não houve tratamento. É possível observar que na quinta semana após a infecção (e última do experimento), o tamanho da lesão diminuiu, inferindo um processo de auto-cura característico da linhagem BALB/c quando infectada por *L. braziliensis* (SCOTT; NOVAIS, 2016). Conforme mostrado na Figura 13B e 13C para o TH60 e TH74, respectivamente, na quarta semana após a infecção e última de tratamento, o tamanho da lesão tratada com 5 mg/kg foi menor do que para o Glucantime®, controle positivo, e para o DMSO, controle negativo, enquanto após o tratamento com 10 mg/kg/dia para esses mesmos HDACi, houve um aumento da lesão em relação aos controles. Para o TH85 (13D) no mesmo período (quarta semana após a infecção), o tamanho da lesão foi o mesmo em relação ao Glucantime® e DMSO após o tratamento com 10 mg/kg, enquanto para a concentração de 5 mg/kg, a lesão não diminuiu, sendo esta maior do que a dos controles. Interessante destacar que na sexta semana, quando não houve tratamento e os animais foram eutanasiados, o tamanho da lesão após o tratamento com o TH60 (13B) na concentração de 5 mg/kg, foi menor do que na semana anterior e se igualou ao do Glucantime®. Esses resultados diversos podem estar relacionados à carga parasitária e ao controle da resposta imune nos animais, portanto, para melhor entender o que poderia ter ocorrido durante o tratamento, foram realizadas análises de carga parasitária e produção de citocinas Th1 e Th2.

5.1.3.4. Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*

A quantificação da carga parasitária na pata infectada dos camundongos pode refletir o efeito leishmanicida dos HDACi, corroborando com os achados de diminuição da lesão, como mostrado anteriormente. Assim, os animais foram eutanasiados na quinta semana após a infecção e procedeu-se à dosagem da carga parasitária, que foi feita por diluição limitante e o crescimento de *Leishmania* foi acompanhado por pelo menos 15 dias, sendo o resultado mostrado na Figura 14.

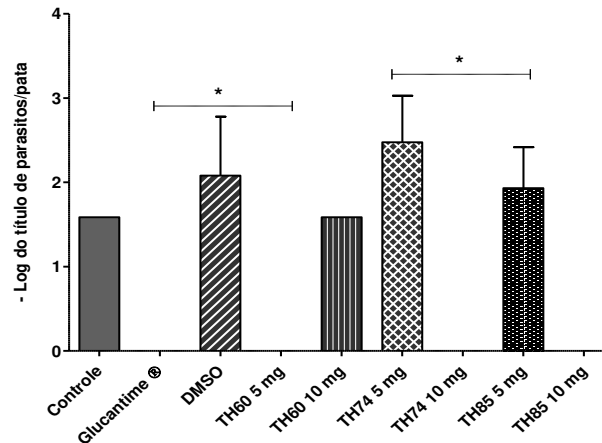


Figura 14 - Quantificação da carga parasitária na pata de camundongos BALB/c tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85. Os animais (n = 6) foram tratados da segunda à quarta semana após a infecção e então eutanasiados na quinta semana para quantificação da carga parasitária na pata infectada, utilizando-se a técnica de diluição limitante. Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são a média e o desvio padrão do $-\log$ do título de parasitos na pata dos animais. A ausência de barras indica que não foram detectados parasitos na pata infectada. Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle.

É possível observar que houve crescimento de *Leishmania* nos grupos controle (sem tratamento) e que receberam DMSO, e também nos grupos de animais tratados com o TH60 na concentração de 10 mg/kg e TH74 e TH85 na concentração de 5mg/kg. Estudos têm mostrado que o DMSO apresenta efeito imunomodulatório (HUANG et al., 2020), e que em baixas concentrações (1%), esse solvente é capaz de aumentar a resposta inflamatória (GOTO; YAMAMOTO-YAMAGUCHI; HONMAL, 1996). Entretanto, mesmo que este fato tenha ocorrido, não foi observado no presente trabalho um efeito direto na carga parasitária, mesmo os animais tendo recebido a mesma concentração de DMSO presente na diluição dos compostos (1%). A presença de parasitos na pata dos animais após o tratamento com o TH60 na concentração de 10 mg/kg e com o TH85 na concentração de 5 mg/kg, corrobora com o tamanho da lesão na quarta semana após a infecção e última do tratamento, e pode ser explicada pela possibilidade de os HDACi terem efeito anti-inflamatório e serem capazes de modular a resposta imune para Th2 (BODE et al., 2007). Em contrapartida, a correspondência entre menor tamanho de lesão e baixa carga parasitária não se confirmou após o tratamento com o TH74 na concentração de 5 mg/kg, já que a lesão foi a menor quando comparada ao tratamento com o mesmo HDACi na concentração de 10 mg/kg e controles na quarta semana após a infecção (13C), e a carga parasitária foi a maior entre todos os grupos em que houve crescimento de *Leishmania*, como mostrado na Figura 14. É possível que o TH74 tenha, desde o início da infecção, exacerbado a resposta imune Th2 dos animais, que é intrínseca da linhagem de camundongos BALB/c (GORHAM et al., 1996; REINER; LOCKSLEY, 1995), impedindo uma

resposta Th1 e favorecendo a proliferação de *Leishmania* na pata dos animais. Nos demais tratamentos, TH60 (5mg/kg), TH74 (10 mg/kg) e TH85 (10 mg/kg), e controle positivo, não foi observada a presença do parasito. Assim, para o TH60 (5 mg/kg), a ausência de parasitos corrobora com o menor tamanho da lesão (13B), enquanto para os outros dois HDACi, a ausência de parasitos e presença de lesão (13C e 13D, respectivamente) possa indicar o efeito pró-inflamatório do TH74 e TH85 nessas concentrações.

5.1.3.5. Avaliação da produção de citocinas em cultura de células de linfonodo de drenagem da pata de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85

As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são elementos chave na geração de resposta imune e apresentam diferentes papéis na resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (BARRAL-NETO et al., 1998; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016), como discutido no item 1.2. Assim, com o objetivo de avaliar o perfil dessas citocinas, bem como qual o tipo de resposta imune, Th1 ou Th2, que foi desencadeada após o tratamento com os HDACi, o sobrenadante da cultura de células de linfonodo de drenagem da pata dos camundongos foi coletado após 72 h de estímulo com extrato puro de promastigotas de *L. braziliensis* e analisado por citometria de fluxo para as citocinas TNF, INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. Na Figura 15 é mostrado o perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF, INF- γ , IL-2 e IL-17 produzidas segundo essas condições.

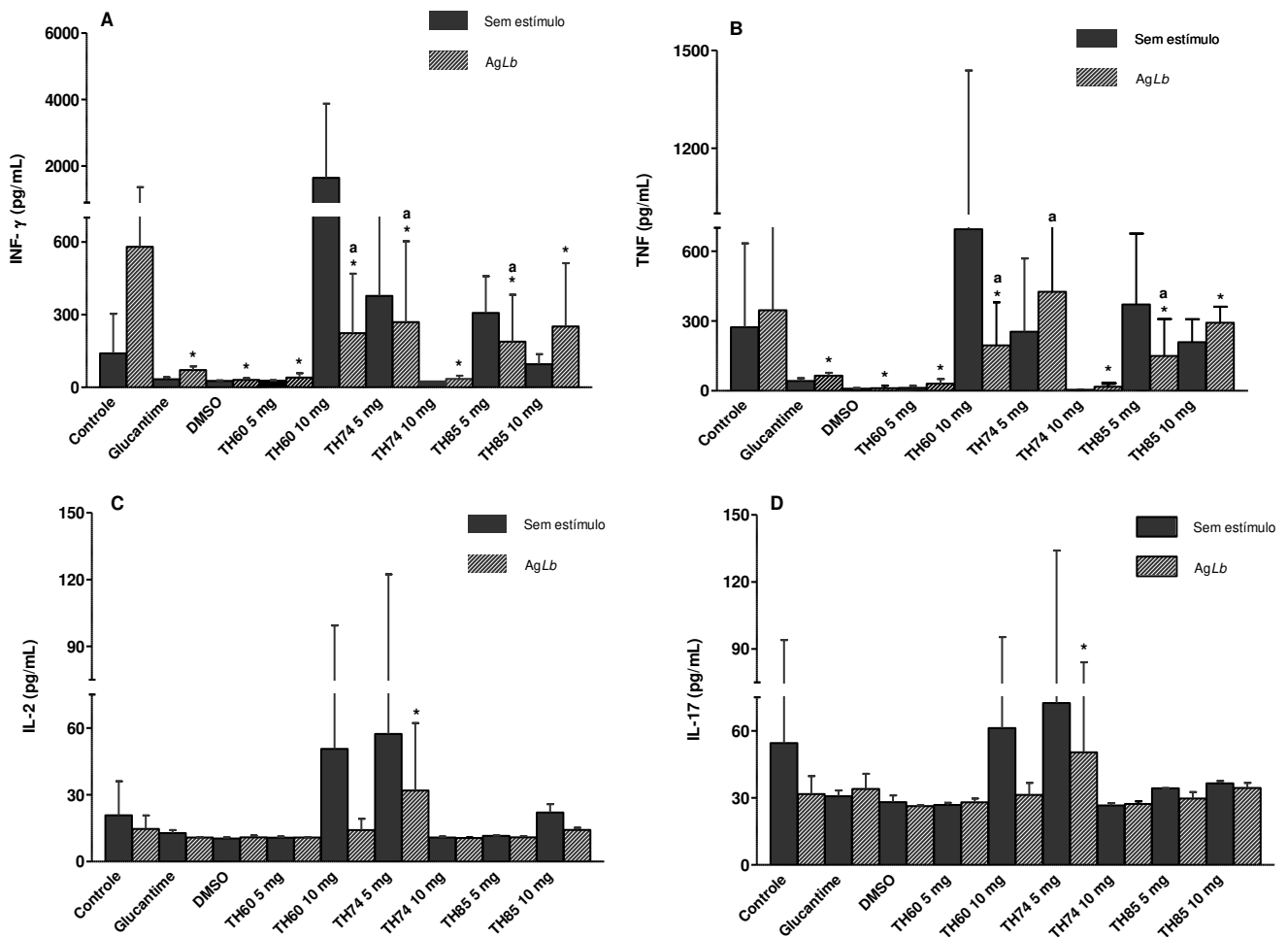


Figura 15 - Produção das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , TNF, IL-2 e IL-17 por células do linfonodo de drenagem da pata infectada de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85. Os animais ($n = 6$) foram tratados da segunda à quarta semana após a infecção e então eutanasiados para avaliação do perfil de citocinas frente ao tratamento. O sobrenadante da cultura de células do linfonodo de drenagem da pata infectada foi coletado após 72 h de estímulo com extrato puro de promastigotas de *L. braziliensis*, e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são a média e o desvio padrão da cultura de células de dois poços, sendo cada poço ($n = 3$). Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação controle; ^a indica $p < 0,05$ em relação Glucantime®. A) Produção de INF- γ . B) Produção de TNF. C) Produção de IL-2. D) Produção de IL-17.

É possível observar que os níveis tanto de INF- γ (15A) quanto os de TNF (15B) diminuíram com o estímulo de antígeno de *L. braziliensis* (LbAg) para praticamente todos os tratamentos com os HDACi em relação ao controle, e para o TH60 (5 mg/kg) e TH74 (10 mg/kg) praticamente não houve a produção dessas citocinas, sendo, controle (INF- γ = 580,08 pg/mL \pm 785,46 ; TNF = 346,02 \pm 478,57); TH60 (5mg/kg): INF- γ = 40,16 pg/mL \pm 18,00 ; TNF = 30,68 pg/mL \pm 19,95; TH74 (10mg/kg): INF- γ = 34,88 pg/mL \pm 13,20; TNF = 17,80 pg/mL \pm 14,32. Os baixos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias corroboram com a não

detecção de parasitos nas lesões dos camundongos após o tratamento com os referidos HDACi (Figura 14). Além disso, a ausência de parasitos na pata relaciona-se com a diminuição da lesão nos camundongos tratados com o TH60 (5 mg/kg), que na quarta semana após a infecção, apresentou-se menor do que a do controle, DMSO e Glucantime[®] e na quinta semana após a infecção, foi menor do que a lesão do controle e igual à do Glucantime[®] (Figura 13B), o que nos permite inferir um bom efeito leishmanicida do TH60 (5 mg/kg), equiparando-se ao Glucantime[®]. Para o TH74 (10 mg/kg), entretanto, apesar da não detecção de parasitos na pata, a lesão não diminuiu na quinta semana após a infecção (Figura 13C), podendo esse fato estar relacionado a um processo inflamatório para erradicação da infecção, como mencionado no item 5.2.3.3. Em relação ao TH60 (10 mg/kg), TH74 (5 mg/kg) e TH85 (5 mg/kg) houve maior produção de **INF- γ** e **TNF** quando comparados ao Glucantime[®], sendo, Glucantime[®]: **INF- γ** = 71,40 pg/mL \pm 14,87; **TNF** = 64,99 pg/mL \pm 12,29; TH60 (10mg/kg): **INF- γ** = 223,49 pg/mL \pm 245,16; **TNF** = 195,65 pg/mL \pm 184,40; TH74 (5 mg/kg): **INF- γ** = 268,76 pg/mL \pm 333,86; **TNF** = 425,38 pg/mL \pm 556,04; TH85 (5 mg/kg): **INF- γ** = 188,51 pg/mL \pm 193,26; **TNF** = 149,84 pg/mL \pm 158,29. Para esses HDACi, a maior produção **INF- γ** e **TNF** está de acordo com a presença de parasitos nas lesões dos camundongos (Figura 14) e também com o aumento da lesão na pata dos animais na quinta semana após a infecção em relação ao controle para o TH60 (10 mg/kg) (Figura 13B), em relação ao Glucantime[®] para o TH74 (5 mg/kg) (Figura 13C) e em relação ao controle e Glucantime[®] para o TH85 (5 mg/kg) (Figura 13D). Para o Glucantime[®], os níveis mais baixos de **INF- γ** e **TNF** relacionam-se com a ausência de parasitos nas lesões e diminuição da lesão na quinta semana após a infecção (Figura 13). Em relação à produção de **IL-2** e **IL-17**, os níveis foram praticamente os mesmos entre tratamentos e controles (Figura 15C e 15D, respectivamente), à exceção do TH74 (5 mg/kg), cuja produção foi estatisticamente maior do que a do controle para as duas citocinas.

As dosagens de citocinas anti-inflamatórias (**IL-4**, **IL-6** e **IL-10**) também foram realizadas após o tratamento com os HDACi e os resultados são mostrados na Figura 16.

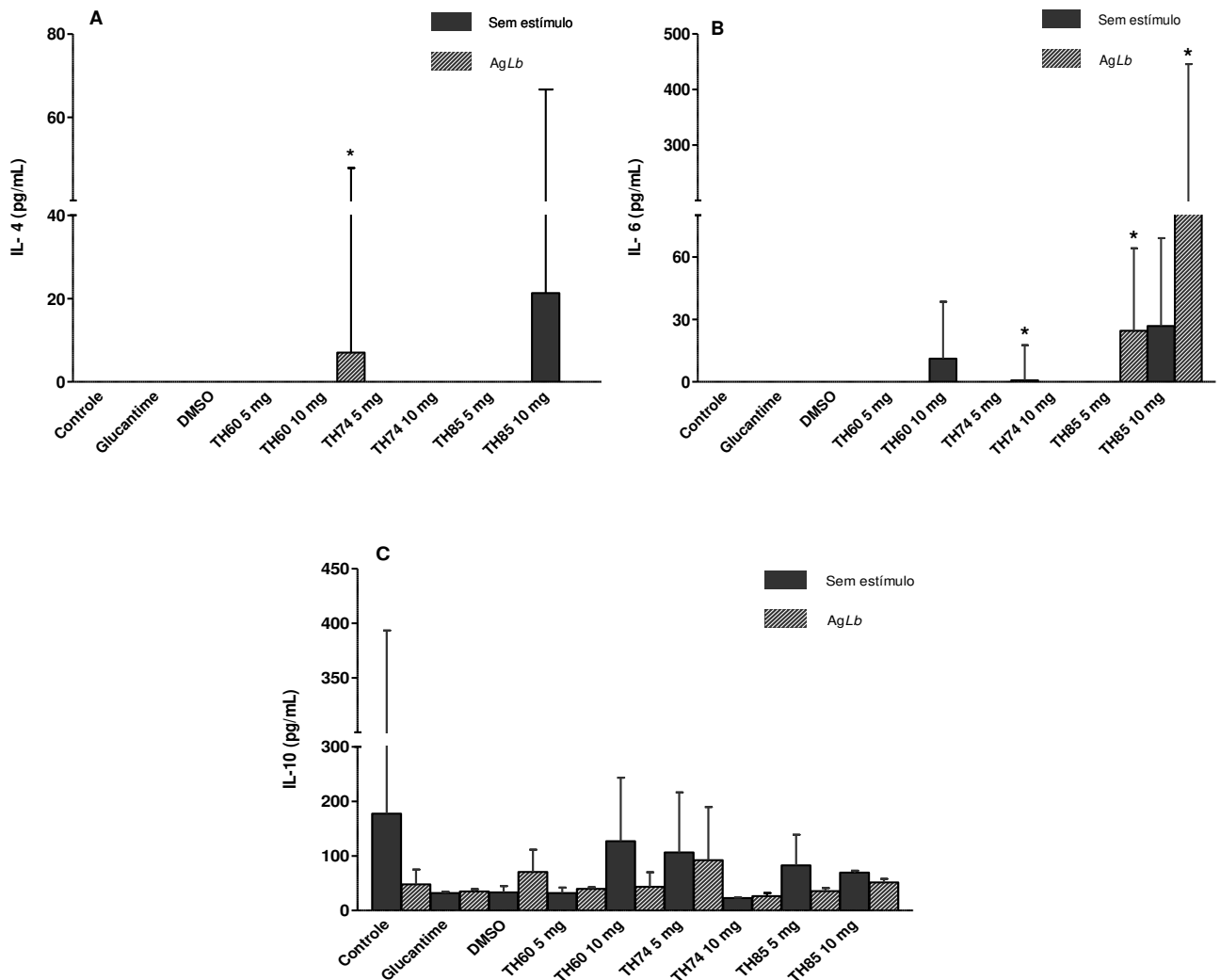


Figura 16 - Produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-6 e IL-10 por células do linfonodo de drenagem da pata infectada de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85. Os animais (n = 6) foram tratados da segunda à quarta semana após a infecção e então eutanasiados para avaliação do perfil de citocinas frente ao tratamento. O sobrenadante da cultura de células do linfonodo de drenagem da pata infectada foi coletado após 72 h de estímulo com extrato puro de promastigotas de *L. braziliensis*, e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são a média e o desvio padrão da cultura de células de dois poços, sendo cada poço (n = 3). Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação controle. A) Produção de IL-4. B) Produção de IL-6. C) Produção de IL-10.

É possível observar que no tempo analisado (72 h), praticamente não houve a produção nem de IL-4 (16A) e nem de IL-6 (16B) após estímulo antigênico, corroborando com os achados anteriores (Figura 15) de predominância de resposta do tipo Th1 nos camundongos BALB/c, à exceção de IL-4 para o TH60 (10 mg/kg): $7,01 \text{ pg/mL} \pm 40,81$ e de IL-6 para o TH74 (5 mg/kg): $12,67 \pm 0,71$, TH85 (5 mg/kg): $24,50 \text{ pg/mL} \pm 39,65$ e TH85 (10 mg/kg): $181,58 \pm 264,26$

pg/mL. A produção de IL-4 após o tratamento com o TH60 (10 mg/kg) e de IL-6 após o tratamento com TH85 (5 mg/kg), correlaciona-se diretamente com a presença de parasitos na lesão, como mostrado na Figura 14. O tratamento com o TH85 na concentração de 10 mg/kg levou à maior produção de IL-6 entre os grupos experimentais, entretanto, não foram detectados parasitos nas lesões dos animais. Em relação à IL-10, a produção após o estímulo antigênico praticamente não se alterou entre controles e tratamentos, à exceção do TH74 (5 mg/kg), em que houve aumento em relação aos controles, mas sem significância estatística (16C). A atividade anti-inflamatória da IL-10 resulta da sua capacidade de inibição da função de macrófagos e DC, dessa forma, interferindo na produção de INF- γ e TNF e regulando a resposta imune (O’GARRA; VIEIRA, 2007). Assim, é que o aumento seja em resposta à produção INF- γ e TNF pelo TH74 (5 mg/kg) (15A e 15B).

Para o DMSO, a produção das citocinas pró-inflamatórias praticamente não se alterou após estímulo antigênico (Figura 15), foram detectados parasitos nas lesões dos animais (Figura 14) e estas não diminuíram em relação ao controle nem na quarta ou quinta semana após a infecção (Figura 13). Além disso, para as citocinas anti-inflamatórias (Figura 16), estas não foram produzidas após estímulo antigênico, o que descarta um papel imunomodulatório para o DMSO e reforça a ação dos HDACi.

Na infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, uma resposta imune predominante do tipo Th1 favorece a eliminação do parasito e conseqüente cura da lesão (TITUS, 1999), enquanto uma resposta predominante do tipo Th2, não é comum de ser detectada na interação *L. braziliensis*-BALB/c. Na verdade, camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* produzem pouca quantidade de IL-4, o que favorece uma resposta Th1 (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999), e os resultados acima descritos corroboram com essa afirmação. É importante ressaltar que a dinâmica da resposta imune difere entre as diferentes linhagens de camundongos e é dependente da espécie de *Leishmania* causadora da infecção nesses animais. Alguns aspectos dessa complexidade parasito-hospedeiro podem ser encontrados em (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Diversos estudos têm mostrado os HDACi como moduladores da resposta imune, podendo estes agirem tanto inibindo quanto estimulando a expressão de diversos genes de defesa do hospedeiro, como de receptores de membrana, de citocinas e de fatores de crescimento (LEONI et al., 2002; ROGER et al., 2016). Essas alterações causadas pelos HDACi impactam diretamente na secreção de mediadores inflamatórios, em especial, de NO pelos macrófagos, o qual é um elemento chave para matar *Leishmania* e é produzido pela ação de

INF- γ e TNF sobre essas células como discutido no item 1.2 (ROGER et al, 2016). De fato, Cao e colaboradores visando avaliar como a inibição seletiva de HDACs de classe I interfere na expressão de genes inflamatórios em macrófagos, mostraram que o entinostat, um HDACi utilizado em ensaios clínicos contra diversos tipos de câncer, foi capaz de aumentar a expressão dos genes de TNF, IL-6 e iNOS (CAO et al., 2019). Outros estudos têm mostrado que os HDACi podem induzir o aumento da expressão de MHC de classe II (MAGNER et al., 2000), o que seria benéfico para potencializar a ação das DC, como mencionado anteriormente (item 1.2), corroborando para o efeito pró-inflamatório desses inibidores. Assim, é possível inferir que os efeitos observados para o TH60 (5mg/kg) sejam devidos à potencialização da resposta imune Th1 dos animais por esse inibidor, com maior ativação de macrófagos e controle da infecção da terceira para a quarta semana após a infecção, já que na quarta semana a lesão diminuiu de forma significativa, como descrito acima, conferindo a esse HDACi ação pró-inflamatória. Para o TH60 (10 mg/kg), TH74 (5 mg/kg) e TH85 (5 mg/kg) também é possível inferir a estes um efeito pró-inflamatório, uma vez que houve maior produção INF- γ e TNF e praticamente não houve a produção de citocinas anti-inflamatórias após o tratamento com esses HDACi. Além disso, para o TH74 (5mg/kg), foram produzidas também maiores quantidades de IL-2 e IL-17. A IL-2 estimula a produção de INF- γ por macrófagos e a IL-17, que é produzida principalmente por células Th17 (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016), e que desempenha papel importante no recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *Leishmania*, pode ter papel tanto protetor quanto cooperativo para a progressão da doença por esse parasito, sendo ambos dependentes da espécie de *Leishmania* e do tecido acometido, pele, fígado e/ou baço (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). No presente trabalho a partir dos resultados encontrados, não fica claro o papel dessa citocina, mas, levando-se em conta aquele encontrado para o TH74 (5 mg/kg), é possível que a IL-17 não tenha um efeito benéfico no controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, já que foram detectados parasitos na lesão após o tratamento com o referido HDACi.

Alguns mecanismos pelos quais HDACi exercem seu efeito pró-inflamatório abrangem os TLRs. A ativação de TLRs por diversos PAMPs inicia uma rápida mudança na expressão gênica, e uma das vias de sinalização que podem ser ativadas para essa finalidade é a de fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BODE et al., 2007). NF- κ B são fatores de transcrição homo ou heterodiméricos, formados por diferentes proteínas da família Rel, sendo o complexo heterodimérico RelA/p50 o mais bem caracterizado. Esse complexo se liga à região promotora de genes alvo, como de citocinas pró-inflamatórias, levando a um aumento na sua expressão

(GHIZZONI et al., 2011; GLEZER et al., 2000). A acetilação e deacetilação das subunidades de NF- κ B são processos importantes na regulação da ativação desse fator de transcrição (MOHAMMADI et al., 2018). Por exemplo, a acetilação de resíduos específicos de lisina do complexo RelA/p50 por HATs, favorece a ligação deste ao DNA e diminui ao mesmo tempo, a interação do complexo com um próprio inibidor, o I κ B α , permitindo a ativação de genes específicos, como os que codificam para citocinas. A acetilação por HATs ocorre uma vez que HDACs-chave levam à deacetilação de lisinas no complexo RelA/p50 estão inibidas por HDACi (CHEN; MU; GREENE, 2002; DAI et al., 2005). A deacetilação por HDACs diminui a interação do complexo RelA/p50 ao DNA e favorece a interação do complexo com seu inibidor I κ B α , inibindo a transcrição de genes, como daqueles para citocinas.

5.1.3.6. Determinação dos níveis plasmáticos das enzimas creatinina, AST, ALT e FAL de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85

A determinação de parâmetros bioquímicos no sangue de animais experimentais é essencial, uma vez que através desses parâmetros, pode-se avaliar possíveis alterações metabólicas e também no funcionamento de tecidos e órgãos frente a um modelo de infecção, quimioterapia ou ambos (ALMEIDA et al., 2008). Assim, foram avaliados os níveis plasmáticos de creatinina, transaminase pirúvica (transaminase ALT/TGP), transaminase oxalacética (transaminase AST/TGO) e fosfatase alcalina (FAL) dos camundongos BALB/c. Para algumas amostras dentro de um mesmo grupo, houve a necessidade de se fazer um *pool* (misturar duas ou mais amostras), uma vez que a quantidade de sangue coletado por animal, aproximadamente 0,5 mL, não seria suficiente para a realização de todas as análises, já que cerca de 20% desse valor é utilizado na determinação de cada parâmetro bioquímico (BIOCLIN, 2018, 2019, 2020a, 2020b). De fato, o volume de amostra sanguínea para testes com roedores geralmente é insuficiente (JOHNS et al, 2018). Camundongos BALB/c fêmea em idade adulta (8 semanas), pesam em média 20 gramas, e seu volume de sangue circulante varia de 1,10 – 1,40 mL (NEVES et al., 2013), porém, fatores como alimentação, alterações climáticas e ambientais, variabilidade individual (BARBOSA et al., 2017) e até mesmo, o estresse experimental, podem interferir nesses valores. Na Figura 17 são mostrados os níveis de creatinina determinados para os grupos experimentais.

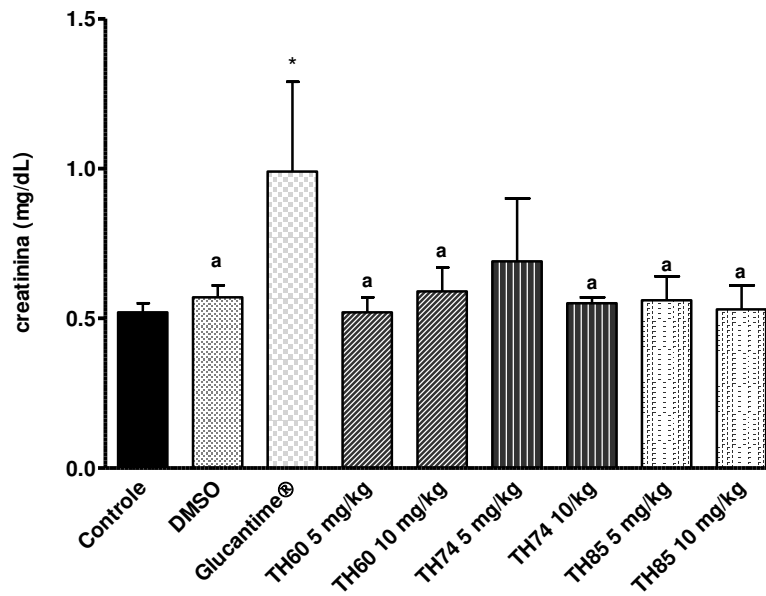


Figura 17 - Dosagem de creatinina plasmática de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85. Os animais (n = 6) foram tratados da segunda à quarta semana após a infecção e previamente à eutanásia foi coletado o sangue pelo plexo retroorbital para a dosagem de creatinina utilizando-se kit comercial (Bioclin - Quibasa-Bioclin®). Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são a média e o desvio padrão da dosagem de creatinina em cada grupo. Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle e ^a significa $p < 0,05$ em relação ao Glucantime®.

É possível observar que os níveis plasmáticos de creatinina foram menores para todos os tratamentos com os HDACi quando comparados ao Glucantime®. Além disso, é interessante destacar que os níveis de creatinina foram os mesmos para o controle (0,52 mg/dL, $\pm 0,03$) e para o TH60 (5 mg/kg) (0,52 mg/dL, $\pm 0,05$) e que o tratamento com o TH74 (5 mg/kg) (0,69 mg/dL $\pm 0,21$) foi o que mais elevou o nível desse parâmetro bioquímico em relação a todos os demais tratamentos. Se compararmos os níveis de creatinina do controle com os do Glucantime®, nota-se que para este último, os níveis praticamente dobraram em relação ao primeiro, sendo eles (0,52 mg/dL $\pm 0,03$) e (0,99 mg/dL $\pm 0,30$) respectivamente.

A creatinina sérica é o principal biomarcador da função renal e é o produto irreversível final do metabolismo da creatina e fosfocreatina, em especial no músculo esquelético, em que a concentração desses substratos energéticos é maior em relação ao restante do organismo devido à alta demanda intrínseca tecidual. Assim, sendo produzida em taxa constante, a creatinina precisa ser eliminada do organismo a fim de se evitar toxicidade para o mesmo, sendo essa eliminação feita pelos rins em indivíduos saudáveis (BROSNAN; BROSNAN, 2010; KASHANI; ROSNER; OSTERMANN, 2019; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). Os níveis séricos normais de creatinina em humanos são de 0,6 a 1,3 mg/dL (ABENSUR, 2011) e

em camundongos BALB/c fêmea, esse valor é de $0,44 \text{ mg/dL} \pm 0,11$ (BARBOSA et al., 2017). Dessa forma, a maioria dos valores de creatinina obtidos no presente trabalho (entre $0,55 - 0,69 \text{ mg/dL}$) estão de acordo com os valores de referência em animal experimental e também concordam com achados para pacientes tratados com antimoniais pentavalentes ($0,57 \text{ mg/dL} \pm 0,20$) (AN et al., 2019), indicando que não houve alteração na função renal após o tratamento com os HDACi. Em relação ao Glucantime[®], o valor de creatinina obtido ($0,99 \text{ mg/dL} \pm 0,30$) foi maior do que o de referência para camundongos BALB/c. Os achados nos permitem inferir uma menor toxicidade dos HDACi para os rins quando comparados ao de um medicamento já em uso no tratamento das leishmanioses. Alterações nos níveis de creatinina são um efeito adverso encontrado no tratamento com Glucantime[®] em pacientes com leishmaniose (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) e a nefrotoxicidade é rara (AN et al., 2019; RODRIGUES et al., 1999).

Alterações na função hepática, sejam elas em decorrência de alguma patologia ou até mesmo pelo uso de medicamentos, podem ser avaliadas através da dosagem sanguínea de alguns principais marcadores como a transaminase oxalacética (AST/TGO), a transaminase pirúvica (ALT/TGP) e a fosfatase alcalina (FAL) (HU et al., 2014). Na Figura 18 são mostrados os níveis plasmáticos dos referidos marcadores após o tratamento com os HDACi.

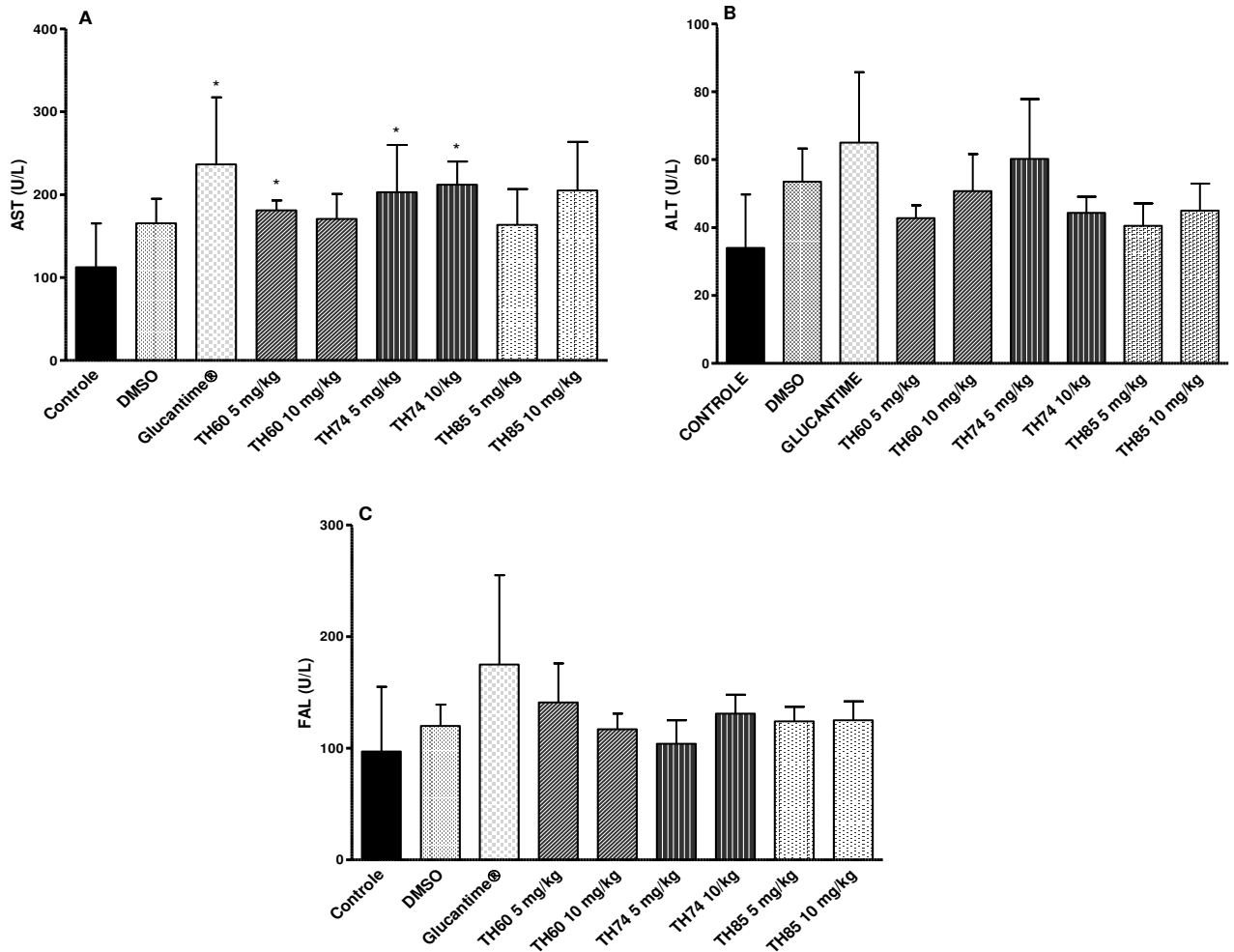


Figura 18 - Dosagem plasmática das enzimas hepáticas AST, ALT e FAL de camundongos BALB/c após o tratamento com os HDACi TH60, TH74 e TH85. Os animais (n = 6) foram tratados da segunda à quarta semana após a infecção e previamente à eutanásia foi coletado o sangue pelo plexo retro-orbital para a dosagem das enzimas utilizando-se kit comercial (Bioclin - Quibasa-Bioclin®). Glucantime® e DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são a média e o desvio padrão da dosagem de AST, ALT e FAL em cada grupo. Os dados foram submetidos ao *one-way* ANOVA utilizando-se o GraphPad Prisma versão 5.03. O asterisco indica diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao controle. A) Níveis plasmáticos de transaminase oxalacética (AST). B) Níveis plasmáticos de transaminase pirúvica (ALT). C) Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina (FAL).

Na Figura 18A, é possível observar que o TH60 na concentração de 5 mg/kg ($181 \text{ U/L} \pm 11,91$), e o TH74 nas concentrações de 5 mg/kg ($203 \text{ U/L} \pm 56,84$) e 10 mg/kg ($212 \text{ U/L} \pm 27,87$) foram os tratamentos que mais elevaram os níveis de AST em comparação ao controle ($112,50 \text{ U/L} \pm 52,69$), entretanto, para todos os HDACi, essa elevação foi menor do que a encontrada para o Glucantime® ($236,50 \text{ U/L} \pm 80,83$). O TH85 na concentração de 5 mg/kg foi o que menos alterou os níveis do referido parâmetro ($163,50 \pm 43,12$) quando comparado ao controle. Em relação aos níveis de ALT (18B), não houve diferença significativa entre

tratamentos e controles, porém, para todos os HDACi houve diminuição da produção em relação ao Glucantime® e ao DMSO, sendo: Glucantime® (65 U/L \pm 20,75); DMSO (53,50 U/L \pm 9,75); TH60 (5 mg/kg) (42,75 U/L \pm 3,77); TH60 (10 mg/kg) (50,75 U/L \pm 10,87); TH74 (5 mg/kg) (60,20 U/L \pm 17,64); TH74 (10 mg/kg) (44,33 U/L \pm 4,72); TH85 (5 mg/kg) (40,50 U/L \pm 6,61) e TH85 (10 mg/kg) (45 U/L \pm 7,94), à exceção do TH74 (5 mg/kg) (60,20 U/L \pm 17,64) em relação ao DMSO (Figura 18B). Para a FAL, também não houve diferença significativa entre controles e tratamentos, porém, para todos os HDACi também foi observada diminuição da produção desse marcador hepático em relação ao Glucantime®, sendo: Glucantime® (174,75 U/L \pm 79,86); TH60 (5 mg/kg) (140,50 U/L \pm 35,48); TH60 (10 mg/kg) (116,50 U/L \pm 13,89); TH74 (5 mg/kg) (104,40 U/L \pm 20,76); TH74 (10 mg/kg) (131,33 U/L \pm 17,01); TH85 (5 mg/kg) (124 U/L \pm 12,54) e TH85 (10 mg/kg) (125 U/L \pm 16,52) (Figura 18C). Em relação ao controle (97 U/L \pm 58,07), houve aumento da produção de FAL após o tratamento com todos HDACi, mas sem significância estatística. Para o DMSO, controle negativo dos experimentos e diluente dos HDACi, houve também aumento de AST, ALT e FAL em relação ao controle, porém, não foi estatisticamente significativo.

As referidas enzimas, AST, ALT e FAL são marcadores de dano hepático, como mencionado anteriormente. AST e ALT participam da gliconeogênese ao transferir grupos amino do ácido aspártico ou alanina para o α -cetogluturato levando à produção de ácido oxaloacético e ácido pirúvico, respectivamente. Essas enzimas são encontradas tanto no citosol de hepatócitos, sendo que a ALT está presente em grande quantidade, quanto podem também ser encontradas em outros órgãos, como rins, e nos músculos cardíaco e esquelético, porém, em menor quantidade. A FAL é uma hidrolase presente em nível elevado na membrana do canalículo biliar dos hepatócitos, estando presente também nos ossos e rins. Quando ocorre injúria hepática ou elevada metabolização no fígado, essas enzimas são então lançadas na circulação sanguínea (LALA et al., 2021; LOWE; SANVICTORES; JOHN, 2021).

Os valores normais de AST/TGO são $<$ 31 U/L (mulheres) e $<$ 37 U/L (homens) e os de ALT/TGP são $<$ 32 U/L (mulheres) e $<$ 42 U/L (homens) (NEWS, 2019). Para a FAL, os valores são de 35 a 104 U/L (mulheres) e de 40 a 129 U/L (homens) (FLEURY MEDICINA DIAGNÓSTICA, 2022). Informações acerca da dosagem de parâmetros bioquímicos em camundongos é escassa, porém, Spinelli e colaboradores encontraram para ALT/TGP (44, 33 U/L \pm 4,78) e para AST/TGO (21,66 U/L \pm 12,60) em camundongos BALB/c fêmea, enquanto Almeida e colaboradores, determinaram para FAL (210,43 - 323,57 U/L) para a mesma espécie de animais (ALMEIDA et al., 2008; SPINELLI et al., 2012). Os resultados encontrados no

presente trabalho, como discutido acima, reforçam o fato de que o uso de medicamentos ou qualquer substância química pode elevar os níveis das enzimas hepáticas. Pacientes com LC e tratados com antimoniais pentavalentes, de fato, apresentam níveis elevados de enzimas hepáticas (AN et al., 2019), porém, quando ocorre injúria no órgão com destruição dos hepatócitos, a elevação dos níveis de AST, ALT e FAL é de pelo menos 10 vezes, podendo alcançar 100 vezes mais em relação aos valores normais (MAYO CLINIC LABORATORIES, 2022). Assim, embora alguns níveis aqui encontrados para AST e FAL estejam elevados em relação aos valores normais, essa elevação foi pequena, os níveis de ALT permaneceram dentro da normalidade mesmo após o tratamento e todos os HDACi resultaram em menores níveis de AST, ALT e FAL em relação ao Glucantime®, mesmo que para os dois últimos, de forma não significativa estatisticamente, o que portanto, nos permite inferir que o tratamento com os HDACi não levou a dano hepático e esses inibidores apresentaram menor toxicidade terapêutica do que um medicamento já utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea. Além disso, a elevação nos níveis das enzimas hepáticas em decorrência do tratamento da LC com antimoniais, é transitório (WISE et al., 2012).

5.1.3.7. Análises histopatológicas de fígado, rins, baço e coração de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com os HDACi TH60, TH74 e TH85

Animais de todos os grupos experimentais apresentaram alterações histológicas no fígado, como granulomas, infiltrados inflamatórios e congestão, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Análises histopatológicas do fígado, rins, coração e baço dos animais após o tratamento com os HDACi

	PBS	GLUC.	DMSO	TH60 5 mg	TH60 10 mg	TH74 5 mg	TH74 10 mg	TH85 5 mg	TH85 10 mg
Fígado									
Granulomas	+++	+	+++	++	+	+	+	+	+
Infiltrado inflamatório	++	++	+++	++	++	++	+++	++	++
Congestão	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++
Hemossiderina	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Rins									
Congestão	++	++	++	+	++	+	++	+	+
Coração									
Infiltrado inflamatório	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	++
Baço									
Amastigotas no interior de macrófagos	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Megacariócitos	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Hemossiderina	+++	+	+	+	++	+	++	+	+

Os resultados foram expressos seguindo-se os seguintes parâmetros para cada padrão histopatológico (Oliveira et al., 2017): (-) alterações histológicas não observadas; (+) alterações discretas; (++) alterações histológicas moderadas; (+++) alterações histológicas severas. Foram analisadas amostras de 6 animais por grupo.

É possível observar que as alterações no fígado foram mais severas nos animais controle (PBS) e naqueles que receberam DMSO, e apresentaram-se moderadas nos animais tratados com o TH60 (5 mg/kg). Para os animais tratados com o TH74 e TH85 nas duas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg e com o TH60 (10 mg/kg), foram encontrados granulomas em menor quantidade. Em relação à presença de infiltrados inflamatórios, estes apresentaram-se moderados nos animais tratados com todos os HDACi, exceto para o TH74 (10 mg/kg), em que a quantidade desses infiltrados foi maior. A presença de congestão no fígado também foi moderada nos animais dos grupos tratados com os HDACi, exceto naqueles que receberam tratamento com o TH85 (10 mg/kg). A hemossiderina foi encontrada em pouca quantidade nos animais dos controles (PBS e DMSO) e também naqueles tratados com TH74 (10 mg/kg) e com o TH85 nas duas concentrações (5 mg/kg e 10 mg/kg), não sendo detectada nos animais dos demais grupos, TH60 (5 mg/kg e 10 mg/kg) e TH74 (5mg/kg).

O fígado é o órgão responsável pela metabolização de medicamentos (WOOLBRIGHT; JAESCHKE, 2018) e pode ser acometido devido a processos infecciosos, como no caso da

leishmaniose visceral (HERMIDA et al., 2018). A visceralização por espécies dermatrópicas de *Leishmania* distante do local de infecção também pode ocorrer e tem sido reportada em camundongos, estando relacionada à densidade de parasitos utilizada no inóculo para infecção dos animais nos experimentos (GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014). Em humanos, a visceralização por espécies dermatrópicas do parasito é rara, porém, tem sido relatada em pacientes imunossuprimidos (ZIJLSTRA, 2014). Macrófagos residentes no fígado denominados células de *Kupffer*, são a primeira linha de defesa contra *Leishmania* e podem formar os chamados granulomas, que são agrupamentos de macrófagos na tentativa de conter o parasito (KAYE; BEATTIE, 2016; SOUZA-LEMOS et al., 2008). Em contato com *Leishmania*, as células de *Kupffer* tornam-se ativadas e secretam citocinas e quimiocinas como CXCL10 e TNF- γ , recrutando para o fígado, outras células do sistema imune para combater a infecção, como monócitos, neutrófilos e células NK, que podem constituir infiltrados inflamatórios (PALACIOS et al., 2021). Assim, é possível que nos animais dos grupos que receberam PBS e DMSO tenha ocorrido visceralização, já que a carga parasitária pode ter se mantido elevada em decorrência da ausência de tratamento, e esse fato pode explicar a maior quantidade de granulomas encontrada nesses grupos. Para os animais tratados com os HDACi a quantidade de granulomas no fígado foi menor, talvez em resposta à menor carga parasitária hepática dos animais após o tratamento. Em relação às quantidades moderada e elevada de infiltrados inflamatórios no fígado dos animais, esse fato pode ser em decorrência dos granulomas ou pode ser efeito dos próprios HDACi em causar algum dano hepático (HUANG; BARR; RUDNICK, 2013).

Em relação à congestão hepática, o fato de ela ter sido mais severa nos animais dos grupos PBS, DMSO e tratados com TH85 (10 mg/kg), pode estar relacionado a algum dano no coração causado pelo próprio tratamento ou como consequência da infecção por *L. braziliensis*, já que esses grupos apresentaram maior quantidade de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco. De fato, problemas cardíacos são causa de congestão hepática, como mostrado por Wells et al, (WELLS et al., 2016). A congestão hepática como consequência do dano cardíaco ocorre uma vez que, o aumento da pressão atrial direita no coração acometido por alguma patologia ou medicamento, reduz o gradiente de pressão para o retorno venoso, o que também reduz o influxo de sangue para o ventrículo direito a partir da veia cava inferior, fazendo com que o fígado se torne inchado à medida que os capilares sinusóides ingurgitam e dilatam com o sangue, provocando a estase sanguínea no órgão (GORE et al., 2004).

A hemossiderina foi encontrada no fígado dos animais dos grupos controles (PBS e DMSO) e também naqueles tratados com o TH74 (10 mg/kg) e TH85 (5 mg/kg e 10 mg/kg) e é possível que esse fato seja devido à destruição de células vermelhas como consequência da congestão (WELLS et al, 2016) de intensidade severa para o PBS, DMSO e TH85 (10 mg/kg) e de severidade moderada para o TH74 (10 mg/kg) e TH85 (5 mg/kg). Quando ocorre a lise de hemácias no fígado, macrófagos residentes fagocitam essas células vermelhas e promovem a quebra do grupo heme da hemoglobina liberando o ferro, que pode ser armazenado no citoplasma desses macrófagos na forma de ferritina e hemossiderina ou pode ser exportado e transportado para o organismo ligado à transferrina (BROWN; WETTERE; CULLEN, 2017).

Os rins atuam na excreção de produtos residuais do metabolismo e também estão envolvidos em diversos processos regulatórios, como regulação da pressão sanguínea (FERGUSON; WAIKAR, 2012). As análises histológicas mostraram que os animais controles (PBS e DMSO) e tratados com os HDACi apresentaram congestão renal, entretanto, a intensidade desta foi maior nos animais dos grupos controles e daqueles tratados com o TH60 e TH74 na concentração de 10 mg/kg. A congestão renal, assim como a congestão hepática, pode ser consequência de problemas cardíacos e também está relacionada ao retorno sanguíneo anormal para o coração pelas grandes veias (SHIMADA et al., 2018), como descrito para o fígado anteriormente.

A presença de infiltrados inflamatórios no coração foi detectada nos animais de todos os grupos experimentais, sendo maior nos grupos controles (PBS e DMSO) e naqueles tratados com o TH85 (10mg/kg). A miocardite é uma inflamação do músculo cardíaco e pode comprometer a capacidade de bombeamento do coração (BASSO et al., 2012), e tem sido descrita em cães como uma das alterações cardiológicas que podem ocorrer devido à resposta imune sistêmica desencadeada pela infecção por *Leishmania* (COSTAGLIOLA et al., 2016) Em pacientes com leishmaniose, dados do comprometimento cardíaco pelo processo infeccioso são raros (FARINA et al., 2022). Assim, é possível que a presença dos infiltrados inflamatórios no coração dos animais esteja relacionada ao envolvimento sistêmico para erradicar a infecção e não devido ao tratamento com os HDACi. Além disso, o emprego de HDACi para o tratamento de problemas cardiovasculares tem sido proposto (FERREIRA; PITT; ZANNAD, 2021), o que pode reforçar o fato do dano cardíaco ser consequência da infecção por *Leishmania*.

A visceralização no baço, assim como no fígado, também pode ocorrer em caso de infecção por *Leishmania* (PEREIRA et al., 2009b; ZIJLSTRA, 2014). A presença de

amastigotas no interior dos macrófagos dos grupos PBS e DMSO reforça esse fato, além de estes serem também os grupos em que os animais não receberam nenhum tratamento. Para os animais tratados com os HDACi, amastigotas não foram detectados no baço, o que permite inferir possível eficácia desses inibidores no controle da infecção nesse órgão. Megacariócitos, que são precursores de plaquetas, foram encontrados no baço dos animais de todos os grupos experimentais, estando em maior quantidade nos grupos controles (PBS e DMSO) e sua presença indica atividade hematopoiética (PEREIRA et al, 2009), a qual pode ser alterada pela presença de *Leishmania* no organismo. Esse parasito induz na medula óssea a ativação de progenitores de células mielóides, que migram para o baço e se diferenciam por exemplo, em monócitos, os quais são mais permissivos à infecção por *Leishmania* pela incapacidade de produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo a persistência do parasito no organismo (ABIDIN et al., 2017). É interessante destacar que é *Leishmania* quem induz nos macrófagos a secreção de moléculas coestimulatórias, como fatores estimuladores de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), que levam à diferenciação celular (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Assim, a presença de amastigotas no baço, como descrito, pode ter tido maior influência na hematopoese dos animais dos grupos controles. Em relação à hemossiderina, esta foi também detectada no baço dos animais de todos os grupos experimentais, estando em maior quantidade naqueles que receberam PBS e nos tratados com TH60 e TH74 (10 mg/kg). É possível que a própria infecção tenha provocado outras alterações no baço não investigadas nesse trabalho e que culminaram com o aumento da hemocaterese no órgão (MELO et al., 2020), resultando neste maior quantidade de hemossiderina.

Em relação ao tratamento com o Glucantime®, observa-se que os animais apresentaram alterações histológicas de severidade variável em todos os órgãos analisados, fígado, rins, coração e baço. A toxicidade desse antimonial pentavalente é bem descrita na literatura (KATO et al., 2014; RATH et al., 2003) e o mecanismo proposto como responsável por esse efeito é o acúmulo do medicamento na sua forma trivalente Sb (III) nos órgãos, o que leva à depleção intracelular de glutathione com conseqüente inibição da glutathione redutase e aumento do estresse oxidativo tecidual (KATO et al, 2014). Uma das funções da glutathione é a neutralização de ROS (PIZZORNO, 2014). Além disso, os resultados anteriormente apresentados de marcadores renal e hepáticos, corroboram com as análises histológicas de maior toxicidade do Glucantime® em relação aos HDACi.

Os resultados apresentados na histopatologia demonstram que o tratamento da infecção por *L. braziliensis* com os HDACi causou danos menores ou iguais nos órgãos dos animais em

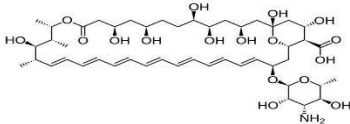
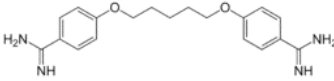
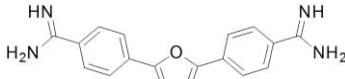
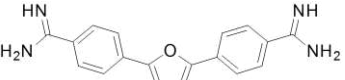
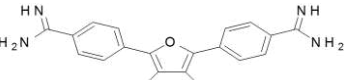
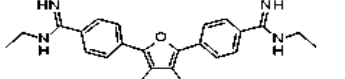
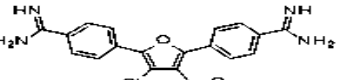
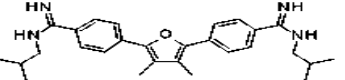
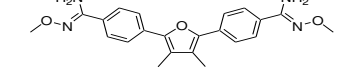
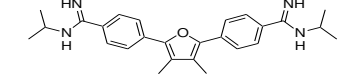
relação aos controles (PBS, Glucantime® e DMSO), o que permite inferir menor toxicidade desses inibidores em relação a um medicamento já utilizado no tratamento das leishmanioses. Além disso, as alterações encontradas nos grupos tratados com PBS e DMSO foram muito equivalentes, o que se permite inferir que estas podem ser em decorrência da própria infecção e não devidas à toxicidade do DMSO.

5.2. Resultados para os inibidores de PRMTs e LSD1

5.2.1. Testes de triagem dos inibidores de PRMTs e LSD1 em macrófagos e na infecção em amastigotas *L. braziliensis*

Os inibidores de PRMTs e LSD1 foram inicialmente testados em modelo de célula hospedeira, macrófagos Raw 264.7, a fim de avaliar sua toxicidade para essas células. A anfotericina B foi o controle positivo dos testes, pois é utilizada na quimioterapia das leishmanioses e apresenta baixa toxicidade para macrófagos. Assim, dos quatro inibidores testados: BSF1B, BSF46B, BSFF51B e BSF55B, nenhum deles apresentou alta toxicidade para macrófagos, sendo o BSF46B, o menos tóxico entre eles ($106,5 \pm 6,20$), como mostrado na Tabela 4. A toxicidade dos inibidores para macrófagos foi determinada segundo a toxicidade máxima de 20% da anfotericina B para essas células. Desta forma, inibidores com baixa toxicidade para macrófagos (mais de 80% dessas células estavam viáveis), foram testados na infecção contra *Leishmania*. Os inibidores BSF1B ($4,92\% \pm 2,49$ de células viáveis) e BSF2 ($5,73\% \pm 2,47$ de células viáveis) foram os que apresentaram o maior efeito leishmanicida contra amastigotas intracelulares do parasito, com aproximadamente 95% de eficácia. Além disso, todos os outros inibidores testados apresentaram efeito leishmanicida superior a 50% nos ensaios de infecção (Tabela 4). Os inibidores BSF2, BSF2E e BSF2P foram testados em macrófagos e nos testes de triagem na infecção em trabalho anterior (DE SOUZA, 2016), durante o meu mestrado. Eles constam no presente trabalho devido à baixa toxicidade para macrófagos e efeito leishmanicida maior do que 50% nos testes de triagem (Tabela 4), o que possibilitou a realização de outros testes (CC_{50} e EC_{50}), como será mostrado a seguir. A furamidina comercial também foi testada e é possível observar que o efeito desta e do BSF1B foi similar tanto em macrófagos quanto em *L. braziliensis*.

Tabela 4 - Teste de triagem de inibidores de PRMT e LSD1: avaliação da toxicidade para os macrófagos e do efeito leishmanicida sobre amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*

Composto	Estrutura química dos compostos	% viabilidade MØ	% viabilidade <i>L. braziliensis</i> (Ensaio de infecção 10 µM)
Amph B		96,79 ± 15,44	0 ± 0,90
Pentamidina		-	-
Furamidina (Comercial)		91,80 ± 3,66	17,91 ± 12,85
BSF1B (Furamidina Sippl)		89,1 ± 8,95	4,92 ± 2,49
BSF2**		81,52 ± 11,54	5,73 ± 2,47
BSF51B		86,29 ± 6,312	12,64 ± 3,79
BSF46B		106,5 ± 6,20	17,94 ± 3,12
BSF55B		85,18 ± 4,83	28,66 ± 2,97
BSF2E**		102,84 ± 10,52	33,43 ± 12,26
BSF2P**		84,71 ± 8,91	43,85 ± 12,58

Os dados representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes com quadruplicatas internas para cada um deles. AmphB: anfotericina B. MØ: macrófagos. ** Compostos testados em trabalho anterior (DE SOUZA, 2016).

A pentamidina é um medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses como mencionado no item 2.1, e também é utilizada na quimioterapia para a tripanossomíase humana africana (HAT) e pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* (PORCHEDDU; GIACOMELLI; LUCA, 2012). Em face dos seus efeitos colaterais graves, compostos alternativos à pentamidina foram descobertos, como a furamidina (DAS; BOYKIN, 1977). A furamidina é um potente inibidor de PRMT1 humana e apresenta forte atividade antimicrobiana como a pentamidina (YAN et al, 2014), sendo eficaz, por exemplo, contra o *Trypanosoma brucei rhodesiense* (causador da HAT) e *P. falciparum* (HU et al., 2009). Apesar de em ensaios clínicos a furamidina ter apresentado potenciais efeitos colaterais, ela tem sido utilizada como modelo para o *design* de novos compostos antimicrobianos (SAUER et al, 2017), tendo sido empregada dessa forma, para a síntese dos inibidores testados neste trabalho, podendo esse processo de síntese e o seu efeito contra *P. falciparum* serem vistos no trabalho de Sauer e colaboradores (SAUER et al., 2017). A pentamidina e a furamidina são diamidinas aromáticas e como pode ser visto na Tabela 4 para a furamidina, a cadeia alcóxi que liga os anéis fenil, como na pentamidina, foi substituída por um anel furânico. Os inibidores testados seguem a referida modificação da furamidina, porém, no anel furânico e nos grupos amidina foram feitas outras modificações que impactaram no efeito leishmanicida desses compostos. Todos os inibidores testados são dimetilfuramidinas, uma vez que foram acrescentados ao anel furânico nas posições 3 e 4, grupos metil, à exceção do BSF46B. Dessa forma, é possível observar na Tabela 4 que a eficácia dos inibidores contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* está relacionada às substituições nos grupos amina das amidinas. Esse fato torna-se claro quando comparamos a eficácia do BSF2 com a do BSF1B, em que a adição de grupos metil nas posições 3 e 4 do anel furânico no BSF2, sem alteração nas aminas, pouco alterou a eficácia deste em relação ao BSF1B, sendo ambos os melhores compostos testados contra *L. braziliensis*. Porém, comparando-se o BSF51B com o BSF2P, observa-se que no BSF51B houve substituição nas aminas por grupos etil, enquanto no BSF2P, a substituição nas aminas foi por grupos isopropil e essa alteração interferiu negativamente na eficácia do inibidor, que foi o menos eficaz contra o parasito. Da mesma forma para o BSF55B, a substituição nas aminas foi por grupos isobutil e a eficácia desse inibidor foi menor do que a do BSF51B. A substituição nas aminas por grupos metóxi como no caso do BSF2E, também não foi positiva, uma vez que esse composto foi o segundo menos eficaz no ensaio de infecção. Para o BSF46B que é um 3-cloro-4-alcoximetilenfuramidina, não houve substituição nas aminas igualmente ao BSF2, e ao invés de grupos metil no anel furânico, houve a adição de Cl e de grupo etóxi nas posições 3 e 4

respectivamente, sendo a eficácia do inibidor um pouco maior do que a do BSF55B. Dessa forma, relacionando-se a estrutura química dos compostos com a sua eficácia na potencial inibição de PRMTs e LSD1 de *L. braziliensis*, é possível que o BSF2, o inibidor mais eficaz encontrado, tenha melhor se encaixado no sítio catalítico das referidas enzimas e por meio de seus grupos amidina, tenha se ligado a resíduos de aminoácidos essenciais para atividade catalítica de PRMTs e LSD1, dessa forma, inibindo-as (DAI et al., 2021; QIAN et al., 2021). Estudos de Yan e colaboradores mostraram que a inibição da PRMT1 humana pelos compostos testados em seu trabalho, ocorre pela ligação dos grupos amidina (ligações de hidrogênio) desses compostos a resíduos de ácido glutâmico (Glu144 e Glu153) no sítio catalítico da enzima, os quais são essenciais para a atividade desta (YAN et al, 2014). A LSD1 é uma enzima que apresenta um domínio amina oxidase dependente de FAD (MOULD et al., 2014) e estudos de Carneiro e colaboradores com potenciais inibidores de LSD1 de *S. mansoni* (SmLSD1), mostraram que um dos compostos testados inibiu essa enzima ao se encaixar entre os resíduos de ácido glutâmico Glu682 e aspartato Asp669 presentes no sítio catalítico da enzima, o que interferiu na viabilidade do parasito (CARNEIRO et al., 2020). Para os inibidores com substituintes nas aminas, como no caso do BSF51B, BSF55B e BSF2P, é possível que a adição de grupos hidrofóbicos tenha diminuído a capacidade dos grupos amidina em fazer ligações de hidrogênio com os aminoácidos presentes no sítio catalítico de PRMTs e LSD1, diminuindo dessa forma, a eficácia dos inibidores. Além disso, o impedimento estérico pode explicar o menor efeito leishmanicida dos compostos, já que grandes volumes nos terminais amidina reduziram a eficácia destes, como para o BSF55B em relação ao BSF51B. De fato, a substituição por grupos hidrofóbicos nas aminas e o maior volume nesses terminais têm sido relatados na menor eficácia de diamidinas aromáticas na inibição de PRMT1 (YAN et al, 2014). A eficácia de diamidinas aromáticas contra *Leishmania*, além da pentamidina, tem sido descrita na literatura (MACHARIA; BOURDICHON; GICHERU, 2004; ROBERTSON et al., 2021) e os mecanismos de inibição supracitados são hipotéticos, sendo necessários outros estudos como de modelagem molecular, para elucidar como e se de fato, os inibidores agem na inibição de PRMTs e LSD1 do parasito, uma vez que as diamidinas aromáticas podem também se ligar ao DNA do cinetoplasto e assim exercer seu efeito inibitório (YANG; CHOI; NO, 2016). De fato, técnicas computacionais acopladas a técnicas moleculares, como modelagem por homologia, ancoragem molecular e dinâmica molecular, têm sido empregadas na busca de novos inibidores alvo-específicos contra diversos parasitos (ANDREOLI; DEL RIO, 2015; MELESINA et al., 2015).

5.2.2. Determinação da concentração citotóxica (CC₅₀) em macrófagos e da concentração efetiva (EC₅₀) nos ensaios de infecção para os inibidores de PRMTs e LSD1

A partir dos testes de triagem com os inibidores de PRMTs e LSD1 na concentração de 10 µM como mostrado no item anterior (5.2.1), os inibidores BSF2, BSF1B, BSF46B, BSF51B, BSF55B, BSF2P e BSF2E foram selecionados para testes posteriores: determinação do CC₅₀ em macrófagos e EC₅₀ para *Leishmania*. Assim, como pode ser visto na Tabela 5, o composto BSF2E foi o que apresentou o maior CC₅₀ em macrófagos (> 80 µM), o que nos permite inferir que ele foi o menos tóxico para essas células, ao contrário do BSF46B, cujo CC₅₀ foi o menor (10,94 µM), e por isso, o inibidor de maior toxicidade para macrófagos. Em relação ao ensaio de infecção, o BSF2 foi o inibidor com menor EC₅₀, e, portanto, o mais eficaz contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. A partir do CC₅₀ e EC₅₀ encontrados, foi possível determinar o índice de seletividade (IS) desses inibidores, o qual reflete o quanto um determinado composto é mais seletivo para o parasito do que para a célula hospedeira. Além disso, sendo esse IS maior do que 10, é possível seguir com a avaliação do efeito leishmanicida em modelo de infecção animal, como descrito por critérios para a descoberta de novos medicamentos contra doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses (KATSUNO et al., 2015). Dessa forma, o BSF2 é o inibidor com maior seletividade para *Leishmania* e que pode ser testado em modelo animal segundo os critérios citados, já que IS foi de 19,76.

Tabela 5 - CC₅₀ para macrófagos e EC₅₀ para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* dos inibidores de PRMT e LSD1 selecionados nos testes de triagem

Composto	CC₅₀ MØ Raw 264,7 (µM)	EC₅₀ Ensaio de infecção (µM)	Índice de seletividade (IS)
BSF2	12,65	0,64	19,76
BSF1B (Furamidina Sippl)	21,54	4,12	5,23
Furamidina (comercial)	14,87	3,0	4,95
BSF2E	> 80	17,96	> 4,45
BSF2P	50,75	13,29	3,82
BSF55B	14,84	3,89	3,81
BSF46B	10,94	3,72	2,94
BSF51B	14,57	12,45	1,17

Os inibidores de PRMT e LSD1 foram testados por 48h pelo método da resazurina para macrófagos nas concentrações de 120 µM - 1 µM e pela metodologia baseada em *L. braziliensis* - M2904-GFP para o ensaio de infecção conforme descrito por E Bastos et al, 2017, nas concentrações de 80 µM - 1 µM. GraphPad Prisma versão 5.03 foi usado para determinação do CC₅₀ e do EC₅₀ empregando um ajuste não linear e os dados representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes com quadruplicatas internas para cada um deles. MØ: macrófagos. Os compostos estão organizados em ordem decrescente de IS. IS = CC₅₀ (MØ) / EC₅₀ (amastigotas de *L. braziliensis*).

6. CONCLUSÕES

- Os inibidores de PRMTs e LSD1 testados apresentaram baixa toxicidade para macrófagos e efeito leishmanicida contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* superior a 50% nos ensaios de triagem na infecção.
- O BSF2E foi o que o inibidor de PRMTs e LSD1 que apresentou o maior CC₅₀ em macrófagos (> 80 µM), sendo, portanto, o menos tóxico para essas células. O BSF2 foi o inibidor de PRMTs e LSD1 com o menor EC₅₀ (0,64 µM) e com o maior índice de seletividade (IS) (19,76), podendo ser testado em modelo de infecção animal.
- Para os HDACi, oito deles (TH57, TH58, TH60, TH71, TH74, TH76 e TH85) mostraram baixa toxicidade para macrófagos e efeito leishmanicida significativo, sendo a ordem de toxicidade: TH60 > TH57 > TH85 > TH74 > TH71 > TH76 > TH58 e EC₅₀ variando de 4,32 - 26,50 µM. O TH60 foi o HDACi mais efetivo contra amastigotas intracelulares (EC₅₀ = 4,38 µM ± 0.26).
- As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicaram que os três principais HDACi (TH60, TH74 e TH85) induziram a morte celular de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* por apoptose com fenótipo necrótico. Um padrão alterado de condensação da cromatina e desorganização celular nos parasitos também foi observado. Além disso, uma conexão estreita entre a mitocôndria e as protuberâncias nucleares, presumivelmente de origem do retículo endoplasmático, foi encontrada em *Leishmania*, mas não em macrófagos.
- Nas análises de citometria de fluxo (CF), os cinco principais HDACi (TH60, TH71, TH85, TH57 e TH74) promoveram a parada do ciclo celular de *Leishmania* na fase G2-M e não foram encontradas alterações nos macrófagos. Além disso, o efeito direto dos HDACi contra promastigotas mostrou a apoptose como o principal mecanismo de morte celular. Os resultados da CF corroboram com as análises de TEM indicando que os HDACi levam a alterações no ciclo celular e indução de apoptose em *L. braziliensis*.
- A produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados não foi alterada após o tratamento com os cinco principais HDACi.
- O ensaio de atividade de HDAC mostrou aumento de atividade enzimática em macrófagos infectados, possivelmente, por inibição seletiva de alguma HDAC (do hospedeiro ou do parasito) levando a um efeito compensatório estimulatório em outra isoforma, não havendo, portanto, diminuição da atividade enzimática

- Nos experimentos em modelo de infecção animal, foram estabelecidas as concentrações de 5mg/kg e 10 mg/kg dos HDACi TH60, TH74 e TH85 para o tratamento da infecção por *L. braziliensis* na pata dos animais.
- O TH60 na concentração de 5 mg/kg foi o HDACi mais eficaz na diminuição da lesão na pata dos camundongos infectados, inclusive, com eficácia maior do que a do Glucantime®, o controle positivo, DMSO e controle sem tratamento. A diminuição da lesão pelo TH60 na referida concentração corrobora com a ausência de parasitos na lesão após a dosagem da carga parasitária.
- O TH74 (10 mg/kg) também foi eficaz na diminuição da lesão, igualando-se ao Glucantime®, e também não foi observada a presença de *Leishmania* na lesão após o referido tratamento.
- O perfil de citocinas indicou a predominância de uma resposta imune do tipo Th1 nos animais tratados com HDACi, sendo que o aumento dos níveis de TNF e INF- γ após o tratamento com TH60 (5 mg/kg) e TH74 (10 mg/kg) concorda com a diminuição da lesão e ausência de parasitos nas lesões.
- Todos os três HDACi (TH60, TH74 e TH85) nas concentrações testadas apresentaram menor toxicidade renal e hepática do que o Glucantime®.
- As análises histopatológicas mostraram que o tratamento com os HDACi promoveu menores alterações nos órgãos dos animais em relação ao Glucantime®, sendo que os HDACi foram tão eficazes quanto o referido medicamento no controle da infecção no fígado e no baço. A toxicidade cardíaca foi menor para os HDACi em relação ao Glucantime®. Em geral, os dados desta tese mostram o potencial de uso dos HDACi testados como agentes leishmanicidas contra *L. braziliensis* e os evidenciam como promissores compostos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana.

7. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Os dados obtidos possibilitam maiores investigações no que diz respeito à possibilidade de diminuição da toxicidade dos HDACi *in vitro*, e principalmente, em modelo de infecção animal, mantendo-se o efeito leishmanicida ou até mesmo aumentando esse efeito.

Para os HDACi TH57, TH58, TH60, TH71, TH74, TH76 e TH85, os experimentos de toxicidade para macrófagos, ensaios de infecção dessas células por *L. braziliensis*, citometria de fluxo e produção de óxido nítrico, podem ser feitos a partir da combinação dos referidos compostos com a anfotericina B ou Glucantime®, e também da combinação desses HDACi entre si.

Para os experimentos em modelo de infecção animal é possível testar a eficácia dos HDACi TH60, TH74 e TH85 por outras vias de administração, como subcutânea e oral. A partir da combinação dos HDACi, é possível avaliar a eficácia destes por via intravenosa e também pelas vias subcutânea e oral.

Para o BSF2, é possível avaliar seu mecanismo molecular de ação realizando os mesmos testes feitos para os HDACi e também é possível testar sua eficácia em modelo de infecção em camundongo.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis : a double edged sword of IL-10 and TGF- β . “**Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**”, 2017.
- ABENSUR, H. **Biomarcadores na Nefrologia**. São Paulo: [s.n.].
- ABIDIN, B. M. et al. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. e1006422, 2017.
- AL-HAMASHI, A. A.; DIAZ, K.; HUANG, R. Non-Histone Arginine Methylation by Protein Arginine Methyltransferases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 7, p. 699–712, 2020.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429–432, 2008.
- ALMEIDA, L. S.; SANTOS, J. B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years : a systematic. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.
- AN, I. et al. The effect of pentavalent antimonial compounds used in the treatment of cutaneous leishmaniasis on hemogram and biochemical parameters. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 294–297, 2019.
- ANDREWS, K. T.; HAQUE, A.; JONES, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 1, p. 66–77, 2012.
- ARROWSMITH, C. H. et al. Epigenetic protein families: A new frontier for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 384–400, 2012.
- BACELLAR, O. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
- BACELLAR, O. et al. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.
- BARBOSA, B. D. S. et al. Haematological and Biochemical Profile of Balb-c Mice. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, p. 1–5, 2017.
- BARRAL-NETO, M. et al. Cytokines in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 149–155, 1998.
- BASSO, C. et al. Classification and histological , immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. **Heart Fail Reviews**, p. 1–9, 2012.
- BATES, P. A. Europe PMC Funders Group Leishmania sand fly interaction : progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 340–344, 2008.

BEDFORD, M. T. Arginine methylation at a glance Arginine Methylation at a Glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 24, p. 4243–4246, 2007.

BEDOYA-PACHECO, S. J. et al. Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis : A Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis : A randomized controlled blind non-inferiority trial in Rio de Janeiro , Brazil. n. July, 2017.

BELKAID, Y. et al. A Natural Model of Leishmania major Infection Reveals a Prolonged “Silent” Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. 2000.

BEREZOVSKAYA, I. V. CLASSIFICATION OF SUBSTANCES WITH RESPECT TO ACUTE TOXICITY FOR PARENTERAL ADMINISTRATION. v. 37, n. 3, p. 139–141, 2003.

BIOCLIN. **Creatinina cinética**. Disponível em: <<https://www.bioclin.com.br/creatinina-cinetica-k067-1.html>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

BIOCLIN. **Fosfatase Alcalina cinética**. Disponível em: <<https://www.bioclin.com.br/fosfatase-alkalina-cinetica-k021-1.html>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

BIOCLIN. **Transaminase AST (TGO) cinética**. Disponível em: <<https://www.bioclin.com.br/transaminase-ast-tgo-cinetica-k048-6.html>>. Acesso em: 23 mar. 2021a.

BIOCLIN. **Transaminase ALT (TGP) cinética**. Disponível em: <<https://www.bioclin.com.br/humano/bioquimica/automacao/transaminase-alt-tgp-cinetica-k049/transaminase-alt-tgp-cinetica-k049-6.html>>. Acesso em: 23 mar. 2021b.

BISSINGER, E. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Acyl derivatives of p - aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3717–3731, 2011.

BODE, K. A. et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. p. 596–606, 2007.

BOSE, P.; DAI, Y.; GRANT, S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. **Pharmacol Ther**, v. 143, n. 3, p. 323–336, 2014.

BRACAMONTE, M. E. et al. High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with Leishmania (Viannia) braziliensis amastigotes membrane crude antigens. **PLoS ONE**, v. May, p. 1–12, 2020.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed. Brasília: [s.n.].

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** [s.l: s.n.].

BROCHIER, C. et al. Specific Acetylation of p53 by HDAC Inhibition Prevents DNA Damage-Induced Apoptosis in Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 20, p. 8621–8632, 2013.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Creatine metabolism and the urea cycle. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 100, p. S49–S52, 2010.

BROWN, D. L.; WETTERE, A. J. VAN; CULLEN, J. M. Chapter 8: Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas 1. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease.** [s.l: s.n.]. p. 412–470.

BROWN, R. B. Potential interaction of inflammatory hyperemia and hyperphosphatemia in tumorigenesis. v. 15, p. 3909–3916, 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CABEZAS-CRUZ, A. et al. Epigenetic control of gene function in schistosomes : a source of therapeutic targets ? **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1–12, 2014.

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

CAO, F. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Inhibitory selectivity among class I HDACs has a major impact on inflammatory gene expression in macrophages. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 177, p. 457–466, 2019.

CARNEIRO, V. C. et al. Pharmacological inhibition of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) induces global transcriptional deregulation and ultrastructural alterations that impair viability in Schistosoma mansoni. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008332, 2020.

CASALS, J. B. O. U. Pharmacokinetic and toxicological studies of antimony dextran glycoside (RL-712). p. 281–288, 1972.

CAVALLI, G.; HEARD, E. Review Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, p. 489–499, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Genomics & Precision Health.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/genomics/disease/epigenetics.htm>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

CHEN, L.; MU, Y.; GREENE, W. C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- kB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 23, p. 6539–6548, 2002.

CHINEDU, E.; AROME, D.; AMEH, F. S. Original Article A New Method for Determining Acute Toxicity in Animal Models. n. 3, p. 224–227, 2013.

CHIU, S.; BHARAT, A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response

following lung transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 239–245, 2016.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

CHUA, M. J. et al. Effect of clinically approved HDAC inhibitors on *Plasmodium*, *Leishmania* and *Schistosoma* parasite growth. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 42–50, 2017.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. et al. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. v. 9, n. June, p. 1–17, 2018.

COSTAGLIOLA, A. et al. Immunopathological Features of Canine Myocarditis Associated with *Leishmania infantum* Infection. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . **Blood**, v. 95, n. 5, p. 1642–1651, 2000.

CUI, L.; MIAO, J. Chromatin-Mediated Epigenetic Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1138–1149, 2010.

DAI, X. et al. Reversible Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors: A Promising Wrench to Impair LSD1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 2466–2488, 2021.

DAI, Y. et al. Blockade of Histone Deacetylase Inhibitor-Induced RelA / p65 Acetylation and NF- κ B Activation Potentiates Apoptosis in Leukemia Cells through a Process Mediated by Oxidative Damage, XIAP Downregulation, and c-Jun N-Terminal Kinase 1 Activation. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 25, n. 13, p. 5429–5444, 2005.

DARKIN-RATTRAY, S. J. et al. Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase (cyclic tetrapeptide Apicomplexa antiparasitic malariacoccidiosis). **Medical Sciences**, v. 93, n. November 1996, p. 13143–13147, 1996.

DAS, B. P.; BOYKIN, D. W. Synthesis and Antiprotozoal Activity of 2,5-Bis(4-guanylphenyl)furans Bijan. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 531–536, 1977.

DE OLIVEIRA, C. I. et al. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 1, n. 1, p. 81–86, 2004.

DE SOUZA, E. M. et al. Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 593–600, 2004.

DE SOUZA, L. Â. AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS Dissertação. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

DEAK, E. et al. Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368,

2011.

DILLON, M. B. C. et al. Novel Inhibitors for PRMT1 Discovered by High-Throughput Screening Using Activity-Based Fluorescence Polarization. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 7, p. 1198–1204, 2012.

DINIZ, J. A. et al. Protein methyltransferase 7 deficiency in *Leishmania major* increases neutrophil associated pathology in murine model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1–20, 2021.

E BASTOS, M. S. et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp leishmania *Braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.

ENGEL, J. A. et al. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against *Plasmodium* and *Trypanosoma* parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 117–126, 2015.

ERHIRHIE, E. O.; IHEKWEREME, C. P.; ILODIGWE, E. E. Advances in acute toxicity testing : strengths , weaknesses and regulatory acceptance. v. 11, n. 1, p. 5–12, 2018.

FADILI, K. EL et al. Role of the ABC Transporter MRPA (PGPA) in Antimony Resistance in *Leishmania infantum* Axenic and Intracellular Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1988–1993, 2005.

FARINA, M. J. et al. Leishmaniasis and Heart. **Archivos de Cardiología de México**, v. 92, n. 1, p. 85–93, 2022.

FERGUSON, M. A.; WAIKAR, S. S. Established and Emerging Markers of Kidney Function. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 680–689, 2012.

FERREIRA, J. P.; PITT, B.; ZANNAD, F. Histone deacetylase inhibitors for cardiovascular conditions and healthy longevity. **The Lancet Healthy Longevity**, v. 2, n. 6, p. e371–e379, 2021.

FERREIRA, T. R. et al. Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection. **Molecular Microbiology**, v. Online ahe, 2014.

FISK, J. C. et al. A Type III Protein Arginine Methyltransferase from the Protozoan Parasite *Trypanosoma brucei* *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11590–11600, 2009.

FISK, J. C.; READ, L. K. Protein Arginine Methylation in Parasitic Protozoa. **EUKARYOTIC CELL**, v. 10, n. 8, p. 1013–1022, 2011.

FLEURY MEDICINA DIAGNÓSTICA. Fosfatase Alcalina. 2022.

FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1 June, p. 54–58, 2002.

- FREITAS, N. L. DE et al. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. January, p. 1–22, 2021.
- FREITES, C. O. et al. First Case of Diffuse Leishmaniasis Associated With *Leishmania panamensis*. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, p. 1–3, 2018.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. et al. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, 2012.
- GHIZZONI, M. et al. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- κ B mediated inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 11/12, p. 504–511, 2011.
- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.
- GIRAUD, E. et al. Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. **Communications Biology**, v. 2, n. 84, p. 25–28, 2019.
- GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos The role of the transcription factor NF- κ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 26–30, 2000.
- GOMES-SILVA, A. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 771–779, 2013.
- GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–709, 2014.
- GOMES, C. M. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection. n. November 2015, p. 1–10, 2016.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. et al. The equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. October, p. 1–11, 2017.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.
- GORE, R. M. et al. Computed Tomography (CT). In: **Encyclopedia of Gastroenterology**. [s.l.: s.n.], p. 482–498.
- GORHAM, J. D. et al. Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1 / T helper 2 type responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 93, p. 12467–12472, 1996.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Europe PMC Funders Group Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies : implications for understanding the life cycle. **International Journal of Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–

1034, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GOTO, I.; YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; HONMAY, Y. Enhancement of sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to growth-inhibitory activity of interferon α by differentiation-inducing agents. **British Journal of Cancer**, v. 74, p. 546–554, 1996.

GRONSKI, M. A.; OHASHI, P. S. **Tolerance and Autoimmunity: T Cells**. Fourth Edition ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2006.

HAILU, G. S. et al. Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 4780–4804, 2017.

HARADA, T.; HIDEHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: from bench to bedside. **International Journal of Hematology**, v. 104, n. 3, p. 300–309, 2016.

HAYWARD, D.; COLE, P. A. LSD1 Histone Demethylase Assays and Inhibition. **Methods in Enzymology**, v. 573, p. 261–278, 2016.

HEIMBURG, T. et al. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2423–2435, 2016.

HERMIDA, M. E. et al. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. November, p. 1–10, 2018.

HOTEZ, P. J.; PECOUL, B. “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. e718, 2010.

HU, H. et al. Small Molecule Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferases. **Expert Opin Investigating Drugs**, v. 25, n. 3, p. 335–358, 2016.

HU, L. et al. Azaterphenyl diamidines as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 247–251, 2008.

HU, L. et al. Synthesis and activity of azaterphenyl diamidines against *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6651–6658, 2009.

HU, Z. et al. Quantitative Liver-Specific Protein Fingerprint in Blood: A Signature for Hepatotoxicity. **Theranostics**, v. 4, n. 2, 2014.

HUANG, J.; BARR, E.; RUDNICK, D. A. Characterization of the Regulation and Function of Zinc-Dependent Histone Deacetylases During Mouse Liver Regeneration. **Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 1–17, 2013.

HUANG, S.-H. et al. Immunobiology Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. **Immunobiology**, v. 225, p. 1–6, 2020.

- INACIO, J. D. F. et al. The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O - Gallate In Vitro and In Vivo in *Leishmania braziliensis*: Involvement of Reactive Oxygen Species as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.
- INGRAM, A. K.; HORN, D. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei* : two are essential and another is required for normal cell cycle progression. **Molecular Mi**, v. 45, p. 89–97, 2002.
- JIN, Y. et al. LSD1 knockdown reveals novel histone lysine methylation in human breast cancer MCF-7 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 896–904, 2017.
- JONES, C. M.; WELBURN, S. C. Leishmaniasis Beyond East Africa. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. February, p. 1–10, 2021.
- JOSÉ-ENÉRIZ, S. E.; GIMENEZ-CAMINO, N.; AGIRRE, X. HDAC Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. **Cancers**, v. 11, n. 1794, p. 1–24, 2019.
- JOSHI, M. B. et al. Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, p. 11–19, 1999.
- KAFKOVA, L. et al. The Major Protein Arginine Methyltransferase in *Trypanosoma brucei* Functions as an Enzyme-Prozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 6, p. 2089–2100, 2017.
- KARNOVSKY, M. J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1A-?-149A, 1965.
- KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: From physiology to clinical application. **European Journal of Internal Medicine**, n. Nov, 2019.
- KATO, K. C. et al. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug : Possible Role of Residual Sb (III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481–488, 2014.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.
- KAYE, P. M.; BEATTIE, L. Lessons from other diseases : granulomatous inflammation in leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, p. 249–260, 2016.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KELLY, J. M. et al. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 1886–1890, 2012.
- KELLY, T. K.; CARVALHO, D. D. DE; JONES, P. A. Epigenetics Modifications as Therapeutic Targets. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1–19, 2010.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania*

- Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 156, p. 1–5, 2013.
- KOSTKA, S. L. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2010.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. August, p. 1–10, 2012.
- KUMARI, D. et al. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics : An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, n. May, p. 174436, 2021.
- LALA, V. et al. Liver Function Tests. In: [s.l.] StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2021.
- LEONI, F. et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 99, n. 5, p. 2995–3000, 2002.
- LI, W. et al. Profiling PRMT methylome reveals roles of hnRNPA1 arginine methylation in RNA splicing and cell growth. **Nature Communications**, v. 12, n. 1946, 2021.
- LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 162–192, 1993.
- LIMA, H. C.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Resolution of an Infection with *Leishmania braziliensis* Confers Complete Protection to a Subsequent Challenge with *Leishmania major* in BALB / c Mice. v. 94, n. 1, p. 71–76, 1999.
- LORENZON, L. et al. **Leishmania braziliensis Protein Arginine Methyltransferases interactomes**. Disponível em: <<https://repositorio.uspdigital.usp.br/handle/item/344>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LOWE, D.; SANVICTORES, T.; JOHN, S. Alkaline Phosphatase. In: **StatPearls**. [s.l.] StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2021.
- MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 2019.
- MACHARIA, J. C.; BOURDICHON, A. J.; GICHERU, M. M. Efficacy of trypan ® : a diminazene based drug as antileishmanial agent. **Acta Tropica**, v. 92, p. 267–272, 2004.
- MAGALHÃES, A. et al. Anti-*Leishmania* IgG is a marker of disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 106, p. 83–90, 2021.

MAGNER, W. J. et al. Activation of MHC Class I, II, and CD40 Gene Expression by Histone Deacetylase Inhibitors. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 7017–7024, 2000.

MAHANTA, A. et al. Integrative Approaches to Understand the Mastery in Manipulation of Host Cytokine Networks by Protozoan Parasites with Emphasis on Plasmodium and Leishmania Species. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–8, 2018.

MAREK, M. et al. Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.

MARIADASON, J. M. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer ND ES SC RIB. **Epigenetics**, v. 3, n. 1, p. 28–37, 2008.

MARON, M. I. et al. Type I and II PRMTs inversely regulate transcriptional intron detention through Sm and CHTOP methylation. **eLife**, v. 11, p. e72867, 2022.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis : a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MAYO CLINIC LABORATORIES. **Alanine Aminotransferase (ALT) (GPT), Serum**. Disponível em: <<https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/8362#Clinical-and-Interpretive>>.

MCCOMB, S. et al. Introduction to the Immune System. **Immunoproteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 2024, p. 1–24, 2019.

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

MEIRA, C. DOS S.; GEDAMU, L. Protective or Detrimental ? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.

MELESINA, J. et al. Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 62, p. 342–361, 2015.

MELO, C. V. B. DE et al. Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 653, p. 1–13, 2020.

MOHAMMADI, A. et al. Manipulating macrophage polarization and function using classical HDAC inhibitors: Implications for autoimmunity and inflammation. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 128, p. 1–18, 2018.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis : Newer developments. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4–9, 2014.

MOMBELLI, M. et al. Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 9, p. 1367–1374, 2011.

- MOULD, D. P. et al. Reversible Inhibitors of LSD1 as Therapeutic Agents in Acute Myeloid Leukemia : Clinical Significance and Progress to Date. **Medicinal Research Reviews**, p. 1–33, 2014.
- MOURA, T. R. DE et al. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.
- MUKHERJEE, P. et al. Structural insights into the *Plasmodium falciparum* histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5254–5265, 2008.
- MULLICAN, S. E. et al. Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. **Genes and Development**, v. 25, n. 23, p. 2480–2488, 2011.
- NEBBIOSO, A. et al. Trials with ‘ epigenetic ’ drugs : An update. **Molecular Oncology**, v. 6, p. 657–682, 2012.
- NEVES, A. et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection Veterinary Parasitology Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. n. August, 2009.
- NEVES, S. M. . et al. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. [s.l: s.n.].
- NOGUEIRA, L. B. et al. Non-tuberculous cutaneous mycobacterioses. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 5, p. 527–538, 2021.
- NONATO, W. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **CYTOKINE**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.
- NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 8088–8098, 2009.
- O’GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology Immunology**, v. 7, n. June, p. 425–428, 2007.
- OLIVEIRA, C. I. DE et al. DETC Induces *Leishmania* Parasite Killing in Human In Vitro and Murine In Vivo Models : A Promising Therapeutic Alternative in Leishmaniasis. v. 5, n. 12, p. 8–9, 2010.
- OLIVEIRA, L. F. G. et al. Evidence for Tissue Toxicity in BALB/c Exposed to a Long-Term Treatment with Oxiranes Compared to Meglumine Antimoniate. **BioMed Research International**, p. 1–12, 2017.
- OLLIARO, P. et al. Methodology of Clinical Trials Aimed at Assessing Interventions for Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PADALINO, G. et al. Combining bioinformatics , cheminformatics , functional genomics and whole organism approaches for identifying epigenetic drug targets in *Schistosoma mansoni*. **Drugs and Drug Resistance**, v. 8, p. 559–570, 2018.

PALACIOS, G. et al. Early Transcriptional Liver Signatures in Experimental Visceral Leishmaniasis. **International Journal of Mo**, v. 22, p. 1–21, 2021.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 134–147, 2018.

PARK, S.; KIM, J. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 58, p. 204–212, 2020.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. Junho, p. 1777–1789, 2001.

PENA, H. P. et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis : a systematic literature review with meta- analyses. **Tropical Medicine and Intrnational Health**, v. 25, n. 10, p. 1168–1181, 2020.

PEREIRA, C. G. et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 231–240, 2009a.

PEREIRA, C. G. et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection **Veterinary Parasitology** Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in. v. 165, n. August, p. 231–240, 2009b.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Invesigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PIZZORNO, J. Glutathione! **Integrative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 8–12, 2014.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis : A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

PORCHEDDU, A.; GIACOMELLI, G.; LUCA, L. DE. New Pentamidine Analogues in Medicinal Chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 5819–5836, 2012.

PRASANNA, P. et al. Infection , Genetics and Evolution Cloning , purification, and homology modeling of Histone deacetylase in *Leishmania donovani*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, n. December 2020, 2021.

QIAN, K. et al. Pharmacophore-based screening of diamidine small molecule inhibitors for protein arginine. **The Royal Society of Chemistry**, v. 12, p. 95–102, 2021.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 958–968, 2015.

RATH, S. et al. ANTIMONIAIS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE: ESTADO DA ARTE. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REGLI, I. B. et al. Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to escape neutrophil Killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–8, 2017.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to Leishmania major. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 151–177, 1995.

RELIGA, A. A.; WATERS, A. P. Molecular & Biochemical Parasitology Sirtuins of parasitic protozoa : In search of function (s). **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 71–88, 2012.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different Leishmania (*Viannia*) braziliensis Concentrations. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p. 5203–5213, 2014.

ROBERTSON, J. et al. Direct , Late-Stage Mono- N -arylation of Pentamidine : Method Development , Mechanistic Insight , and Expedient Access to Novel Antiparasitics against Diamidine-Resistant Parasites. **ChemMedChem**, v. 16, p. 3396–3401, 2021.

RODRIGUES, M. L. O. et al. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 33–37, 1999.

ROGER, T. et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. v. 117, n. 4, p. 1205–1218, 2016.

ROMANO, A. et al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. 16808–16813, 2014.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis or *Leishmania* (*Viannia*) guyanensis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, p. 49–56, 2005.

RONIN, C. et al. The crystal structure of the *Leishmania infantum* Silent Information Regulator 2 related protein 1 : Implications to protein function and drug design. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0193602, 2018.

ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, 2021.

ROTHBART, S. B.; STRAHL, B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 8, p. 627–643, 2014.

RUGANI, J. N. et al. Antimony resistance in *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56 / ARM58 transcripts and

reduced drug uptake. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. e190111, p. 1–9, 2019.

RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. **World Health Organization**, v. 35, n. 96, p. 401–419, 2021.

SAGANUWAN, S. A. TOXICITY STUDIES OF DRUGS AND CHEMICALS IN ANIMALS : AN OVERVIEW. n. 4, p. 291–318, 2017.

SAUER, B. et al. Synthesis , biological characterisation and structure activity relationships of aromatic bisamidines active against Plasmodium falciparum. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 22–40, 2017.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta journal**, v. 1813, p. 878–888, 2011.

SCHMITT, M. L. et al. Nonpeptidic Propargylamines as Inhibitors of Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) with Cellular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 7334–7342, 2013.

SCHOLTE, L. L. S. et al. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 175–188, 2017.

SCHWARTZ, R. H. T CELL ANERGY*. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 302–334, 2003.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis : immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581–592, 2016.

SHIMADA, S. et al. Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16808, p. 1–15, 2018.

SILVA-BARRIOS, S. et al. Innate Immune B Cell Activation by Leishmania donovani Exacerbates Disease and Mediates Innate Immune B Cell Activation by Leishmania donovani Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. **Cell Reports**, v. 15, p. 2427–2437, 2016.

SILVA, R. E. DA et al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 512–516, 2016.

SOUZA-LEMOS, C. et al. Dynamics of immune granuloma formation in a Leishmania braziliensis -induced self-limiting cutaneous infection in the primate Macaca mulatta. **Journal of Pathology**, v. 216, p. 375–386, 2008.

SPANNHOFF, A.; SIPPL, W.; JUNG, M. Cancer treatment of the future: Inhibitors of histone methyltransferases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 4–11, 2009.

SPINELLI, M. O. et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2012.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.

STRAZZULLA, A. et al. Mucosal Leishmaniasis : An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

SUNDAR, S. et al. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 19–23, 2002.

TANG, J.; YAN, H.; ZHUANG, S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. **Clinical Science**, v. 124, n. 11, p. 651–662, 2013.

TAVARES, J. et al. The *Leishmania infantum* cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. **Biochemical Journal**, v. 415, n. 3, p. 377–386, 2008.

TITUS, R. G. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. v. 66, n. 2, p. 827–829, 1998.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.

VALLI, L. C. P. et al. Humoral Immune Responses among Mucosal and Cutaneous Leishmaniasis Patients Caused by *Leishmania braziliensis* Lee Callahan , Jonathan D . Berman and Max Grogl Published by : Allen Press on behalf of The American Society of Parasitologists Stable URL : [htt](http://). **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 6, p. 1076–1083, 1999.

VERGNES, B. et al. Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. **Gene**, v. 363, n. 1–2, p. 85–96, 2005.

VOLZ, J. C. et al. PfSET10, a *Plasmodium falciparum* Methyltransferase, Maintains the Active var Gene in a Poised State during Parasite Division. **Cell Host and Microbe**, v. 11, p. 7–18, 2012.

WAGNER, F. F. et al. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 589–604, 2013.

WANG, C. et al. Crystal Structure of Arginine Methyltransferase 6 from *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87267, 2014.

WANG, Q. et al. Targeting Lysine Deacetylases (KDACs) in Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015a.

WANG, R. et al. Imbalance of Lysine Acetylation Contributes to the Pathogenesis of Parkinson 's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7182, p. 1–22, 2020.

WANG, Y. et al. Relationship between lethal toxicity in oral administration and injection to mice : Effect of exposure routes. v. 71, p. 205–212, 2015b.

WELLS, M. L. et al. Imaging Findings of Congestive Hepatopathy. **RadioGraphics**, v. 36, n.

4, p. 1024–1037, 2016.

WHYTE, D. C.; ZUFFEREY, R. Cutaneous Leishmaniasis : Update on Vaccine Development. **Human Parasitic Diseases**, v. 9, p. 1–15, 2017.

WISE, E. S. et al. Monitoring Toxicity Associated with Parenteral Sodium Stibogluconate in the Day-Case Management of Returned Travellers with New World Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2012.

WONG, J. et al. Suspensions for intravenous (IV) injection : A review of development , preclinical and clinical aspects ☆. v. 60, p. 939–954, 2008.

WOOLBRIGHT, B. L.; JAESCHKE, H. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity. **Current Pharmacology Reports**, v. 4, n. 5, p. 346–357, 2018.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 28 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Map Gallery Search Results**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/map-gallery-search-results?&maptopics=910b5dfc-ce2e-4440-8b43-8d83f4a85485&term=leishmaniasis>>. Acesso em: 7 fev. 2022.

WOZNIAK, G. G.; STRAHL, B. D. Hitting the “mark”: Interpreting lysine methylation in the context of active transcription. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 12, p. 1353–1361, 2014.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **PHYSIOLOGICAL REVIEWS**, v. 80, n. 3, p. 1107–1213, 2000.

YAN, L. et al. Diamidine Compounds for Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 1. **J. Med. Chem**, v. 57, p. 2611–2622, 2014.

YANG, G.; CHOI, G.; NO, J. H. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6828–6836, 2016.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer : past , present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. January, p. 37–50, 2006.

ZHAO, M.; TAO, Y.; PENG, G. The Role of Histone Acetyltransferases and Histone Deacetylases in Photoreceptor Differentiation and Degeneration. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1307–1314, 2020.

ZIJLSTRA, E. E. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3258, 2014.